

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 750**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2016 PCT/US2016/025722**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16161374**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2016 E 16716412 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3277814**

54 Título: **Compuestos oligonucleotídicos dirigidos a ARNm de huntingtina**

30 Prioridad:

03.04.2015 US 201562142731 P

31.01.2016 US 201662289274 P

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

01.03.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (100.0%)
One Beacon Street 31st Floor
Boston, MA 02108, US**

72 Inventor/es:

**KHVOROVA, ANASTASIA;
ARONIN, NEIL y
ALTERMAN, JULIA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 808 750 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos oligonucleotídicos dirigidos a ARNm de huntingtina

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a nuevas dianas de huntingtina y nuevos oligonucleótidos para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

Antecedentes

10 Los trastornos neurológicos incluida la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer representan una gran necesidad médica insatisfecha. En algunos casos, estas enfermedades son monógenas, lo que las convierte en dianas ideales para la intervención terapéutica con oligonucleótidos, p. ej., interferencia por ARN (iARN). La iARN es un mecanismo fundamental que implica fragmentos de ARN bicatenarios cortos que se pueden usar para reprogramar la maquinaria celular y silenciar y degradar el ARNm diana a discreción. Esta tecnología está clínicamente avanzada y ha revolucionado el campo de la genética funcional humana.

15 Se han analizado muchas tecnologías diferentes para la atenuación del ARNm, tanto como agentes terapéuticos como herramientas para el estudio funcional, incluido el suministro con base vírica de ARN horquillados cortos (ARNhc), oligonucleótidos de antisentido (OAS) y ARNip no modificados o ligeramente modificados (Sah, D. W. Y. & Aronin, N. Oligonucleotide therapeutic approaches for Huntington disease. *J. Clin. Invest.* 121, 500-507 (2011); DiFiglia, M. et al. Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17204-17209 (2007)).

20 Los OAS también han demostrado ser una estrategia prometedora. Esta tecnología exhibe un suministro eficaz a células sin un vehículo de suministro y se ha administrado al cerebro para el tratamiento de la enfermedad de Huntington para la atenuación satisfactoria en cerebros de roedores y primates no humanos (Mantha, N., Das, S. K. & Das, N. G. RNAi-based therapies for Huntington's disease: delivery challenges and opportunities. *Therapeutic delivery* 3, 1061-1076 (2012); Kordasiewicz, H. B. et al. Sustained Therapeutic Reversal of Huntington's Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis. *NEURON* 74, 1031-1044 (2012)). Desafortunadamente, los estudios actuales muestran que se requiere una dosis acumulada de 700 µg administrada en dos semanas para observar un silenciamiento de apenas 50 % (Kordasiewicz, *Supra*).

25 Dongbo et al. (2012) *Cell*, 150(5):895-908, Rodriguez-Lebron et al (2005) *Molecular Therapy*, 12(4):618-633; la publicación internacional núm. WO 2007/051045; y DiFiglia et al. (2007) *PNAS*, 104(43):17204-17209 describen un ARNip dirigido a ARNm de Huntingtina (*HTT*).

30 La publicación internacional núm. WO 2012/005898 describe el transcriptoma de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) y un ARNip dirigido a huntingtina de hámster.

La publicación internacional núm. WO 2012/118911 describe moduladores oligonucleotídicos de la vía del receptor de tipo TOLL.

35 El suministro del ARNip no modificado ("ARNip no modificado") ha presentado dificultades en líneas celulares más sensibles e *in vivo* en tejido en el pasado. Aunque se pueden usar reactivos de transfección tales como Lipofectamine, hay una ventana muy estrecha en la que es eficaz y no tóxico, y se debe optimizar independientemente para diferentes lotes de neuronas para determinar las relaciones entre ARNip y lípidos necesarias para niveles semejantes de silenciamiento (Bell, H., Kimber, W. L., Li, M. & Whittle, I. R. Liposomal transfection efficiency and toxicity on glioma cell lines: in vitro and in vivo studies. *NeuroReport* 9, 793-798 (1998); Dass, C. R. Cytotoxicity issues pertinent to lipoplex-mediated gene therapy in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1-9 (2010); Masotti, A. et al. Comparison of different commercially available cationic liposome-DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 68, 136-144 (2009); Zou, L. L. et al. Liposome-mediated NGF gene transfection following neuronal injury: potential therapeutic applications. *Gene Ther* 6, 994-1005 (1999)).

40 También se han usado ARNip hidrófobamente modificados como una alternativa para el suministro celular y cerebral suministro (Sah, *Supra*; Soutschek, J. et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-178 (2004); Cheng, K., Ye, Z., Guntaka, R. V. & Mahato, R. I. Enhanced hepatic uptake and bioactivity of type alpha1(I) collagen gene promoter-specific triplex-forming oligonucleotides after conjugation with cholesterol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 317, 797-805 (2006); Byrne, M. et al. Novel Hydrophobically Modified Asymmetric RNAi Compounds (sd-rxRNA) Demonstrate Robust Efficacy in the Eye. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 29, 855-864 (2013)), y algunos de estos compuestos incluso

45 llegaron hasta la clínica, pero garantizar tanto la estabilidad química como una mínima toxicidad mientras se maximiza el suministro continúa siendo una tarea difícil. Los obstáculos actuales en la tecnología de iARN limitan su capacidad de uso en los estudios genómicos funcionales y la terapéutica, y ofrecen una oportunidad para mejorar su diseño, ya que corresponde al área de la neurociencia tanto *in vitro* como *in vivo*.

50

Compendio

- Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan nuevas secuencias diana de huntingtina. También se proporcionan en la presente memoria nuevas moléculas de ARN (p. ej., ARNip) que se dirigen a las nuevas secuencias diana de huntingtina. Dichas nuevas moléculas de ARN (p. ej., ARNip) demuestran eficacia y potencia tanto en neuronas primarias *in vitro* como *in vivo* en el cerebro de ratón después de una inyección simple de dosis baja.
- 5 En un aspecto, se proporciona una molécula de ARN que tiene una longitud entre 15 y 30 bases o una longitud entre 15 y 35 bases, que comprende una región de complementariedad que es completamente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1) para uso terapéutico en la inhibición de la expresión del gen Huntingtina (*HTT*) en un organismo.
- 10 En un aspecto, se proporciona el uso de una molécula de ARN que tiene una longitud entre 15 y 30 bases o una longitud entre 15 y 35 bases, que comprende una región de complementariedad que es completamente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1) para inhibir la expresión del gen Huntingtina (*HTT*) en una célula *in vitro*.
- 15 En ciertas realizaciones, la molécula de ARN es ARN monocatenario (mc) ARN o ARN bicatenario (bc). En ciertas realizaciones, el ARNbc comprende una cadena de sentido y una cadena de antisentido, en donde la cadena de antisentido comprende la región de complementariedad que es completamente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1).
- 20 En ciertas realizaciones, el ARNbc es de extremo romo. En ciertas realizaciones, el ARNbc comprende al menos una prolongación de nucleótido monocatenario. En ciertas realizaciones, el ARNbc comprende nucleótidos de origen natural.
- 25 En ciertas realizaciones, el ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado. En ciertas realizaciones, el nucleótido modificado se elige del grupo de: un nucleótido modificado por 2'-O-metilo, un nucleótido que comprenden un grupo 5'fosforotioato y un nucleótido terminal enlazado a un derivado de colesterilo o grupo bisdecilamida ácido dodecanoico. En ciertas realizaciones, el nucleótido modificado se elige del grupo de: un nucleótido modificado por 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido modificado por 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido modificado por 2'-amino, un nucleótido modificado por 2'-alquilo, un nucleótido morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural. En ciertas realizaciones, el ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado por 2'-O-metilo y al menos un nucleótido que comprende un grupo 5'fosforotioato.
- 30 En ciertas realizaciones, la molécula de ARN comprende un extremo hacia 5', un extremo hacia 3' y tiene complementariedad con respecto a una diana, en donde: (1) la molécula de ARN comprende 2'-metoxi-ribonucleótidos y 2'-fluoro-ribonucleótidos alternantes; (2) los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 desde el extremo hacia 5' no son 2'-metoxi-ribonucleotidós; (3) los nucleótidos están conectados a través de enlaces fosfodiéster o fosforotioato; y (4) los nucleótidos en las posiciones 1-6 desde el extremo hacia 3', o las posiciones 1-7 desde el extremo hacia 3' están conectadas a nucleótidos adyacentes a través de enlaces fosforotioato.
- 35 En ciertas realizaciones, el ARNbc tiene un extremo hacia 5', un extremo hacia 3' y complementariedad con respecto a una diana, y comprende un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido, en donde: (1) el primer oligonucleótido comprende una secuencia establecida como la SEQ ID NO:1; (2) una porción del primer oligonucleótido es complementaria a una porción del segundo oligonucleótido; (3) el segundo oligonucleótido comprende 2'-metoxi-ribonucleótidos y 2'-fluoro-ribonucleótidos alternantes; (4) los nucleótidos en las posiciones 2 y 40 14 desde el extremo hacia 3' del segundo oligonucleótido son 2'-metoxi-ribonucleotidós; y (5) los nucleótidos del segundo oligonucleótido están conectados a través de enlaces fosfodiéster o fosforotioato.
- 45 En ciertas realizaciones, el segundo oligonucleótido está enlazado a una molécula hidrófoba en el extremo hacia 3' del segundo oligonucleótido. En ciertas realizaciones, el enlace entre el segundo oligonucleótido y la molécula hidrófoba comprende polietilenglicol o trietilenglicol. En ciertas realizaciones, los nucleótidos en las posiciones 1 y 2 desde el extremo hacia 3' del segundo oligonucleótido están conectados a nucleótidos adyacentes a través de enlaces fosforotioato. En ciertas realizaciones, los nucleótidos en las posiciones 1 y 2 desde el extremo hacia 3' del segundo oligonucleótido y los nucleótidos en las posiciones 1 y 2 desde el extremo hacia 5' del segundo oligonucleótido están conectados a ribonucleótidos adyacentes a través de enlaces fosforotioato.
- 50 En ciertos aspectos, se proporciona una composición farmacéutica para uso terapéutico para inhibir la expresión del gen *HTT* en un organismo, que comprende un ARNbc y un portador farmacéuticamente aceptable. El ARNbc comprende una cadena de sentido y una cadena de antisentido. El ARNbc tiene una longitud entre 15 y 35 pares de bases y la cadena de antisentido comprende una región de complementariedad que es completamente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1).
- En ciertas realizaciones, el ARNbc comprende un resto colesterol.

- También se describe en la presente memoria un método para inhibir la expresión del gen *HTT* en una célula. El método incluye las etapas de introducir en la célula un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) que comprende una cadena de sentido y una cadena de antisentido, el ARNbc tiene una longitud entre 15 y 35 pares de bases y la cadena de antisentido comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1), y mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen *HTT* e inhibir de este modo la expresión del gen *HTT* en la célula.
- También se describe en la presente memoria que se proporciona un método para tratar o manejar la enfermedad de Huntington que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento o manejo una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNbc. El ARNbc comprende una cadena de sentido y una cadena de antisentido y tiene una longitud entre 15 y 35 pares de bases, y la cadena de antisentido comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1).
- También se describe en la presente memoria, el ARNbc que se administra al cerebro del paciente. También se describe en la presente memoria, el ARNbc que se administra por cualquiera de infusión y/o bomba intraestriatal, intracerebroventricular e/o intratecal. También se describe en la presente memoria que administrar el ARNbc al cerebro provoca una disminución en el ARNm del gen *HTT* en el cuerpo estriado. También se describe en la presente memoria que administrar el ARNbc al cerebro provoca una disminución en el ARNm del gen *HTT* en la corteza.
- En ciertos aspectos, se proporciona un vector para uso terapéutico para inhibir la expresión del gen *HTT* en una célula. El vector que comprende una secuencia reguladora enlazada funcionalmente a una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARN completamente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1), en donde dicha molécula de ARN tiene una longitud entre 15 y 35 bases, y en donde dicha molécula de ARN, después de entrar en contacto con una célula que expresa dicho gen *HTT*, inhibe la expresión de dicho gen *HTT* en al menos 20 %.
- También se describe en la presente memoria una célula que comprende un vector para inhibir la expresión del gen *HTT* en una célula. El vector que comprende una secuencia reguladora enlazada funcionalmente a una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARN sustancialmente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1), en donde dicha molécula de ARN tiene una longitud entre 15 y 35 bases, y en donde dicha molécula de ARN, después de entrar en contacto con una célula que expresa dicho gen *HTT*, inhibe la expresión de dicho gen *HTT* en al menos 20 %.
- También se describe en la presente memoria una molécula de ARN que tiene una longitud entre 15 y 35 bases, que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a 5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (SEQ ID NO:2) o 5' CUCAGGAUUUAAA 3' (SEQ ID NO:3).
- En ciertas instancias, el ARNbc es de extremo romo. En ciertas instancias, el ARNbc comprende al menos una prolongación de nucleótido monocatenario. En ciertas instancias, el ARNbc comprende nucleótidos de origen natural.
- En ciertas instancias, el ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado. En ciertas instancias, el nucleótido modificado se elige del grupo de: un nucleótido modificado por 2'-O-metilo, un nucleótido que comprenden un grupo 5'fosforotioato y un nucleótido terminal enlazado a un derivado de colesterilo o grupo bisdecilamida ácido dodecanoico. En ciertas instancias, el nucleótido modificado se elige del grupo de: un nucleótido modificado por 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido modificado por 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido modificado por 2'-amino, un nucleótido modificado por 2'-alquilo, un nucleótido morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural. En ciertas instancias, el ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado por 2'-O-metilo y al menos un nucleótido que comprende un grupo 5'fosforotioato.
- En ciertas instancias, la molécula de ARN comprende un extremo hacia 5', un extremo hacia 3' y tiene complementariedad con respecto a una diana, en donde: (1) la molécula de ARN comprende 2'-metoxi-ribonucleótidos y 2'-fluoro-ribonucleótidos alternantes; (2) los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 desde el extremo hacia 5' no son 2'-metoxi-ribonucleótidos; (3) los nucleótidos están conectados a través de enlaces fosfodiéster o fosforotioato; y (4) los nucleótidos en las posiciones 1-6 desde el extremo hacia 3', o las posiciones 1-7 desde el extremo hacia 3' están conectadas a nucleótidos adyacentes a través de enlaces fosforotioato.
- En ciertas instancias, el segundo oligonucleótido está enlazado a una molécula hidrófoba en el extremo hacia 3' del segundo oligonucleótido. En ciertas instancias, el enlace entre el segundo oligonucleótido y la molécula hidrófoba comprende polietilenglicol o trietilenglicol. En ciertas instancias, los nucleótidos en las posiciones 1 y 2 desde el extremo hacia 3' del segundo oligonucleótido están conectados a nucleótidos adyacentes a través de enlaces fosforotioato. En ciertas instancias, los nucleótidos en las posiciones 1 y 2 desde el extremo hacia 3' del segundo oligonucleótido y los nucleótidos en las posiciones 1 y 2 desde el extremo hacia 5' del segundo oligonucleótido están conectados a ribonucleótidos adyacentes a través de enlaces fosforotioato.

- 5 También se describe en la presente memoria que se proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión del gen *HTT* en un organismo, que comprende un ARNbc y un portador farmacéuticamente aceptable. El ARNbc comprende una cadena de sentido y una cadena de antisentido. El ARNbc tiene una longitud entre 15 y 35 pares de bases y la cadena de antisentido comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a 5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (SEQ ID NO:2) o 5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (SEQ ID NO:3).
- En ciertas instancias, el ARNbc comprende un resto colesterol.
- 10 También se describe en la presente memoria un método para inhibir la expresión del gen *HTT* en una célula. El método incluye las etapas de introducir en la célula un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) que comprende una cadena de sentido y una cadena de antisentido, el ARNbc tiene una longitud entre 15 y 35 pares de bases y la cadena de antisentido comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a 5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (SEQ ID NO:2) o 5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (SEQ ID NO:3), y mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen *HTT* e inhibir de este modo la expresión del gen *HTT* en la célula.
- 15 También se describe en la presente memoria que se proporciona un método para tratar o manejar la enfermedad de Huntington que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento o manejo una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNbc. El ARNbc comprende una cadena de sentido y una cadena de antisentido y tiene una longitud entre 15 y 35 pares de bases, y la cadena de antisentido comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a 5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (SEQ ID NO:2) o 5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (SEQ ID NO:3).
- 20 También se describe en la presente memoria, el ARNbc que se administra al cerebro del paciente. También se describe en la presente memoria, el ARNbc que se administra por infusión intraestriatal. También se describe en la presente memoria que administrar el ARNbc al cerebro provoca una disminución en el ARNm del gen *HTT* en el cuerpo estriado. También se describe en la presente memoria que administrar el ARNbc al cerebro provoca una disminución en el ARNm del gen *HTT* en la corteza.
- 25 También se describe en la presente memoria un vector para inhibir la expresión del gen *HTT* en una célula. El vector que comprende una secuencia reguladora enlazada funcionalmente a una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARN sustancialmente complementaria a 5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (SEQ ID NO:2) o 5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (SEQ ID NO:3), en donde dicha molécula de ARN tiene una longitud entre 15 y 35 bases, y en donde dicha molécula de ARN, después de entrar en contacto con una célula que expresa dicho gen *HTT*, inhibe la expresión de dicho gen *HTT* en al menos 20 %.
- 30 También se describe en la presente memoria que la ARN molécula es ARNmc o ARNbc. También se describe en la presente memoria que el ARNbc comprende una cadena de sentido y una cadena de antisentido, en donde la cadena de antisentido comprende la región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a 5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (SEQ ID NO:2) o 5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (SEQ ID NO:3).
- 35 También se describe en la presente memoria una célula que comprende un vector para inhibir la expresión del gen *HTT* en una célula. El vector que comprende una secuencia reguladora enlazada funcionalmente a una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARN sustancialmente complementaria a 5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (SEQ ID NO:2) o 5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (SEQ ID NO:3), en donde dicha molécula de ARN tiene una longitud entre 15 y 35 bases, y en donde dicha molécula de ARN, después de entrar en contacto con una célula que expresa dicho gen *HTT*, inhibe la expresión de dicho gen *HTT* en al menos 20 %.
- 40 También se describe en la presente memoria que la ARN molécula es ARNmc o ARNbc. También se describe en la presente memoria que el ARNbc comprende una cadena de sentido y una cadena de antisentido, en donde la cadena de antisentido comprende la región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a 5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (SEQ ID NO:2) o 5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (SEQ ID NO:3).
- 45 También se describe en la presente memoria una molécula de ARN que tiene una longitud entre 15 y 35 bases. La molécula de ARN comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1), 5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (SEQ ID NO:2) o 5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (SEQ ID NO:3), y la molécula de ARN se dirige a una región no traducida (UTR, por sus siglas en inglés) hacia 3' del ARNm corto del gen *HTT*.
- 50 La UTR hacia 3' del ARNm corto del gen *HTT* es la siguiente:

AGCGCCAUGGUGGGAGAGACUGUGAGGGCGGCAGCUGGGGCCGGAGCCUUUGGAAGUCUCGCG
 CCUUGUGCCCUGCCUCCACCGAGCCAGCUUGGUCCUAUGGGCUUCCGCACAUGCCGCGGGC
 GGCCAGGCAACGUGCGUGUCUCUGCCAUGUGGCAGAAGUGCUCUUUGUGGCAGUGGCCAGGC
 AGGGAGUGUCUGCAGUCCUGGUGGGGCGUGAGCCUGAGGCCUCCAGAAAGCAGGAGCAGCUG
 UGCUGCACCCCAUGUGGGUGACCAGGUCCUUUCUCCUGAUAGUCACCUGCUGGUUGUUGCCA
 GGUUGCAGCUGCUCUUGCAUCUGGGCCAGAAGUCCUCCUCCUGCAGGCUGGCUGUUGGCC
 CUCUGCUGUCCUGCAGUAGAAGGUGCCGUGAGCAGGCUUUGGGAACACUGGCCUGGGUCUCC
 CUGGUGGGGUGUGCAUGCCACGCCCCGUGUCUGGAUGCACAGAUGCCAUGGCCUGUGCUGGG
 CCAGUGGCUGGGGUGCUAGACACCCGGCACCAUUCUCCUUCUCUUUUUCUUCUCAGGAU
 UUAUUUUUUUUUAUAUCAGUAAAGAGAUUAUUUUUAACGUAACUCUUUCUAUGCCCGUGUA

(SEQ ID NO:4)

5 También se describe en la presente memoria que la ARN molécula es ARNmc o ARNbc. También se describe en la presente memoria que el ARNbc comprende una cadena de sentido y una cadena de antisentido, en donde la cadena de antisentido comprende la región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1), 5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (SEQ ID NO:2) o 5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (SEQ ID NO:3).

10 También se describe en la presente memoria que se proporciona una molécula de ARNbc que tiene una longitud entre 15 y 35 bases, que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1), 5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (SEQ ID NO:2) o 5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (SEQ ID NO:3), en donde la molécula de ARN se dirige a un ARNm de *HTT* y comprende al menos un nucleótido modificado. También se describe en la presente memoria que el nucleótido modificado es un nucleótido terminal enlazado a un derivado de fosfatidilcolina.

15 También se describe en la presente un compuesto de ARN dirramificado que comprende dos moléculas de ARN que tienen una longitud entre 15 y 35 bases, que comprenden una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1), 5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (SEQ ID NO:2) o 5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (SEQ ID NO:3), en donde las dos molécula de ARN están conectadas entre sí mediante uno o más restos seleccionados independientemente de un enlazador, un espaciador y un punto de ramificación.

20 En cualquiera de los aspectos descritos en la presente memoria, la molécula de ARN es una molécula de antisentido (p. ej., ASO) o una molécula GAPMER. En ciertas instancias, la molécula de antisentido potencia la degradación de la región de complementariedad. En ciertas instancias, la degradación es degradación por nucleasa (p. ej., RNasa H).

Breve descripción de los dibujos

25 Las características y ventajas anteriores y otras de la presente invención se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones ilustrativas tomadas junto con los dibujos adjuntos. El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujo(s) a color previa solicitud y pago de la tasa necesaria.

Las Figuras 1A-B representan la composición estructural y química del ARNip hidrófobo y la internalización eficaz en neuronas corticales primarias. A) Esquema de los ARNip hidrófobamente modificados y estabilizados (ARNiph) B) ARNiph Cy3-HTT10150 (rojo), 0,5 μ M, se agregó a neuronas corticales primarias. Imágenes obtenidas mediante el microscopio confocal Zeiss, 63X, núcleos teñidos con tinte Hoechst (azul).

30 Las Figuras 2A-C representan un barrido esquemático de ARNiph no formulados dirigidos a ARNm de huntingtina graficados como un gráfico de líneas (A) o un gráfico de barras (B) y (C). Un panel de 94 ARNiph se agregaron a células HeLa en 1,5 μ M. El nivel de ARNm de huntingtina se midió al usar QUANTIGENE (Affymetrix) a las 72 horas, se normalizó con respecto a un gen de mantenimiento, PPIB (ciclofilina B) y se presentó como un porcentaje del testigo no tratado (n=3, media +/- DT). UNT - células no tratadas, NTC - testigo no dirigido. Los compuestos activos (rojo) se seleccionaron para un análisis adicional.

35 Las Figuras 3A-C representan el silenciamiento dependiente de la concentración del ARNm de huntingtina mediante HTT10150, en suministro pasivo (A) y mediado por lípido (B). Las modificaciones químicas permiten la captación pasiva sin el impacto negativo sobre la entrada en el RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) del ARNip. Las células HeLa se incubaron con HTT10150 modificado (que contenía modificaciones hidrófobas y químicas de base) o no modificado en concentraciones que se muestran en ausencia (A) y presencia (B) de RNAIMAX. El nivel de ARNm de huntingtina se midió al usar QUANTIGENE (Affymetrix) a las 72 horas, se normalizó con respecto a un gen

de mantenimiento, PPIB (ciclofilina B) y se presentó como un porcentaje del testigo no tratado (n=3, media +/- DT). UNT - células no tratadas. Se calcularon los valores de C150, según se describe en la presente memoria. (C) Es una tabla que resume estos resultados.

5 Las Figuras 4A-B representan gráficamente el silenciamiento del ARNm y la proteína huntingtina dependiente de la concentración mediante HTT10150 en neuronas primarias (captación pasiva). Se incubaron neuronas primarias con HTT10150 en las concentraciones que se muestran. El nivel de ARNm de huntingtina se midió al usar QUANTIGENE (Affymetrix), se normalizó con respecto a un gen de mantenimiento, PPIB (ciclofilina B) y se presentó como un porcentaje del testigo no tratado (n=3, media +/- DT). UNT - células no tratadas. A) En neuronas corticales y estriatales primarias, 1 semana. B) Los niveles de proteína huntingtina después de una semana de incubación con HTT10150 se detectaron mediante transferencia western y se normalizaron con respecto a β -Tubulina.

10 Las Figuras 5A-H representan una inyección intraestriatal simple de HTT10150 que está localizado en las neuronas y fascículos ipsilateral con respecto al sitio de la inyección después de 24 horas. Se inyectó 1 nmol de CY3-HTT10150 (Rojo) de manera unilateral en el cuerpo estriado de ratones WT (FVBNj). Se recogieron los cerebros después 24 horas, se impregnaron en parafina y se dividieron en secciones y se dividieron en secciones. (A) Imagen en mosaico de sección de cerebro coronal (16X). La mayor parte del HTT10150 se localizó en el sitio de la inyección con un gradiente de difusión nítido. (B) Imagen en mosaico de sección de cerebro sagital (16X), lado inyectado. (C) Imagen de sección de cerebro coronal (40X), lado no inyectado. (D) Imagen de sección de cerebro coronal (40X), lado inyectado. (E, G) Neuronas teñidas con NueN del lado no inyectado (60X). (F, H) Neuronas teñidas con NueN del lado inyectado (60X).

20 La Figura 6 representa gráficamente la evaluación de la eficacia de HTT10150 in vivo. Se inyectó HTT10150 (2 μ l) de manera unilateral en el cuerpo estriado de ratones WT (FVB). Los ratones se sacrificaron a las 120 horas. Los cerebros se cortaron en secciones de 300 μ m y se recogieron seis biopsias en sacabocados de 2 mm del cuerpo estriado de los lados Ipsilateral y Contralateral. El nivel de ARNm de huntingtina se midió al usar QUANTIGENE (Affymetrix), se normalizó con respecto a un gen de mantenimiento, PPIB (ciclofilina B) y se presentó como un porcentaje del testigo no tratado (n=24, media +/- EEM, 8 animales, 3 biopsias por región).

25 Las Figuras 7A-E representan que HTT10150 no exhibe toxicidad en neuronas positivas para DARPP-32 alrededor del sitio de inyección. Se inyectó HTT10150 de manera unilateral en el cuerpo estriado de ratones WT (FVB). Los cerebros se recogieron después de 5 días, se fijaron, se dividieron en secciones y se tiñeron con anticuerpos contra DARPP-32 (A-D). Imagen representativa del cuerpo estriado después de la inyección de ACSF, gammagrafía cerebral completa y ampliación 60X (A, B) o 12,5 μ g de HTT10150, gammagrafía cerebral completa y ampliación 60X (C, D). Cuantificación de neuronas positivas para DARPP-32 (E) (n=3 animales, media +/- DT).

30 La Figura 8 representa secuencias diana, oligonucleótidos modificadas y su eficacia.

35 La Figura 9 representa la captación e internalización eficaz de ARNiph en neuronas corticales primarias con el tiempo. Se agregó ARNiph Cy3-HTT10150 (rojo), 0,5 μ M, a neuronas corticales primarias. Imágenes obtenidas mediante el microscopio confocal Zeiss, 63X, núcleos teñidos con tinte Hoechst (azul).

40 Las Figuras 10A-B representan gráficamente el silenciamiento del ARNm de huntingtina dependiente de la concentración mediante HTT10150 en células HeLA. El nivel de ARNm de huntingtina se midió al usar QUANTIGENE (Affymetrix) a las 72 horas, se normalizó con respecto a un gen de mantenimiento, PPIB (ciclofilina B) y se presentó como un porcentaje del testigo no tratado (n=3, media +/- DT). UNT - células no tratadas, NTC - testigo no dirigido. A) Respuesta a la dosis de 16 secuencias activas en la captación pasiva (sin formulación). B) Respuesta a la dosis de ocho secuencias seleccionadas en captación mediada por lípidos (con el uso del reactivo de transfección LIPOFECTAMINE RNAIMAX de Invitrogen). Los datos de respuesta a la dosis se ajustaron mediante el uso de GraphPad Prism 6.03.

45 Las Figuras 11A-B representan gráficamente los niveles de ARNm de huntingtina. A) Se evaluó la viabilidad celular al usar ALAMAR BLUE (Life Technologies) después de la incubación de HTT10150 y NTC con neuronas corticales primarias durante 72 horas y una semana. B) Se incubaron neuronas corticales primarias con tres secuencias de ARNiph de HTT, HTT10150, HTT10146 y HTT1215 en las concentraciones que se muestran. El nivel de ARNm de huntingtina se midió al usar QUANTIGENE (Affymetrix), se normalizó con respecto a un gen de mantenimiento, PPIB (ciclofilina B) y se presentó como un porcentaje del testigo no tratado (n=3, media +/- DT). UNT - células no tratadas.

50 Las Figuras 12A-B representan gráficamente el silenciamiento del ARNm de huntingtina dependiente de la concentración mediante HTT10150 en neuronas primarias (captación pasiva). Se incubaron neuronas primarias con HTT10150 en las concentraciones que se muestran. El nivel de ARNm de huntingtina se midió al usar QUANTIGENE (Affymetrix), se normalizó con respecto a un gen de mantenimiento, PPIB (ciclofilina B) y se presentó como un porcentaje del testigo no tratado (n=3, media +/- DT). UNT - células no tratadas. A) Durante 72 horas y 1 semana. B) Durante 1, 2 y 3 semanas.

55

- 5 La Figura 13 representa gráficamente la eficacia del ARNiph contra ciclofilina B (PPIB) en neuronas corticales primarias. Se incubaron neuronas primarias con ARNiph dirigido a PPIB en las concentraciones que se muestran. El nivel de ARNm de PPIB se midió al usar QUANTIGENE (Affymetrix), se normalizó con respecto a un gen de mantenimiento, HTT y se presentó como un porcentaje del testigo no tratado (n=3, media +/- DT). UNT - células no tratadas durante 1 semana.
- La Figura 14 representa transferencias Western representativas de la reducción de Htt en neuronas corticales primarias. Se cultivaron neuronas corticales primarias a partir de cinco crías individuales (núms. 1-5) y se incubaron con HTT10150 en las concentraciones que se muestran durante una semana. Los niveles de proteína huntingtina se detectaron mediante transferencia Western al usar el anticuerpo AB1.
- 10 La Figuras 15A-B representan gráficamente la evaluación de la eficacia de HTT10150 in vivo. A) Se inyectó HTT10150 (2 µl) de manera unilateral en el cuerpo estriado de ratones WT (FVB). Los ratones se sacrificaron a las 120 horas. Los cerebros se cortaron en secciones de 300 µm y se recogieron seis biopsias en sacabocados de 2 mm del cuerpo estriado de los lados ipsilateral y contralateral. El nivel de ARNm de huntingtina se midió al usar QUANTIGENE (Affymetrix), se normalizó con respecto a un gen de mantenimiento, PPIB (ciclofilina B) y se presentó como un porcentaje del testigo no tratado (n=8 animales, media +/- DT). B) Cuantificación del silenciamiento de la proteína huntingtina mediante transferencia Western.
- 15 La Figura 16 representa gráficamente la evaluación de la citotoxicidad de HTT10150 in vivo. El marcador neuronal DARPP32 exhibió una afectación mínima por la inyección de HTT10150, lo que indica que no hay un impacto importante sobre la salud neuronal. Se inyectó HTT10150 de manera unilateral en el cuerpo estriado de ratones natural (FVB) en las dosis que se muestran. Los ratones se sacrificaron a las 120 horas. Los cerebros se cortaron en secciones de 300 µm y se recogieron seis biopsias en sacabocados (2 mm) del cuerpo estriado de los lados ipsilateral y contralateral. El nivel de expresión de ARNm de DARPP32 se midió al usar QUANTIGENE (Affymetrix), se normalizó con respecto a un gen de mantenimiento, PPIB (ciclofilina B) y se presentó como un porcentaje del testigo no tratado (n=24, media +/- DT).
- 20 Las Figuras 17A-C representan que HTT10150 exhibió un aumento del doble de la activación microglial en el sitio de inyección. Se inyectó HTT10150 de manera unilateral en el cuerpo estriado de ratones WT (FVB). Los cerebros se recogieron después de 6 horas (b) y 5 días (a y c), se fijaron, se dividieron en secciones y se tiñeron con anticuerpos contra IBA-1. (A) Imágenes representativas de activación (punta de flecha negra) y reposo (punta de flecha abierta) después de la inyección de 1 nmol de HTT10150 y ACSF 5 días después de la inyección. Ampliación 40X. (B) Cuantificación de microglías activadas y en reposo 6 h después de la inyección de ACSF (n=6) y 1nmol de HTT10150 (n=3). (c) Cuantificación de microglías activadas y en reposo 5 días después de la inyección de ACSF (n=4) y 1nmol de HTT10150 (n=3).
- 25 Las Figuras 18A-C representan que HTT10150 exhibió toxicidad limitada en el sitio de inyección en la dosis de 25 µg. Se inyectó HTT10150 de manera unilateral en el cuerpo estriado de ratones WT (FVB). Los cerebros se recogieron después de 5 días, se fijaron, se dividieron en secciones y se tiñeron con anticuerpos contra DARPP-32. Imagen representativa del cuerpo estriado después de la inyección de 25 µg, gammagrafía cerebral completa (A), ampliación 10X en el sitio de las inyecciones (B), ampliación 20X en el sitio de la inyección (C) y ampliación 60X.
- 30 La Figura 19 representa que HTT10150 no exhibió toxicidad para neuronas positivas para Darpp32 en concentraciones más bajas. Se inyectó HTT10150 de manera unilateral en el cuerpo estriado de ratones WT (FVB). Los cerebros se recogieron después de 5 días, se fijaron, se dividieron en secciones y se tiñeron con anticuerpos contra DARPP-32. Imagen representativa del cuerpo estriado después de la inyección de 25 µg, 12,5 µg y ACSF (ampliación 20X) ipsilateral y contralateral con respecto al sitio de la inyección.
- 35 Las Figuras 20A-B representan que HTT10150 provocó un ligero aumento en las microglías en reposo totales 5 días después de la inyección. Se inyectó HTT10150 de manera unilateral en el cuerpo estriado de ratones WT (FVB). Los cerebros se recogieron después de 6 horas y 5 días, se fijaron, se dividieron en secciones y se tiñeron con anticuerpos contra IBA-1. Cuantificación de microglías totales 6 h (A) y 5 días (B) después de la inyección de ACSF (n=6, A) (n=4, B) y 12,5 µg de HTT10150 (n=3, A, B).
- 40 La Figura 21 representa secuencias diana adicionales junto con modificaciones químicas y andamiajes estructurales.
- La Figura 22 representa la eficacia de ARNiph^{HTT} en neuronas corticales primarias (viabilidad celular) después de una semana al usar QUANTIGENE y ALAMAR BLUE. NTC = testigo no dirigido.
- 45 La Figura 23 representa la eficacia de ARNiph de HTT en neuronas estriatales primarias y neuronas corticales primarias naturales después de una semana al usar QUANTIGENE. NTC = testigo no dirigido.
- La Figura 24 representa la eficacia de ARNiph de HTT en neuronas primarias (duración del efecto) de una a tres semanas después del tratamiento a través de captación pasiva. La expresión de HTT se normalizó con respecto a PPIB. Los datos que se muestran son un porcentaje aproximado del testigo no dirigido. UNT = no tratadas.
- 50
- 55

- La Figura 25 representa gráficamente que ARNiph^{HTT}, pero no LNA-GAPMER, exhibe una meseta de silenciamiento en neuronas corticales después de 72 horas al usar QUANTIGENE. N = 3.
- La Figura 26 muestra la localización intracelular de htt y ppib en neuronas corticales primarias al usar RNA-SCOPE. ARNm de Htt, rojo; ARNm de ppib, verde; núcleos (DAPI), azul.
- 5 La Figura 27 valida en neuronas un conjunto de sondas de detección de htt, al afirmar la especificidad.
- La Figura 28 valida en neuronas un conjunto de sondas de detección de htt, al mostrar que la señal no es específica del intrón (validada para el intrón 60-61).
- La Figura 29 representa que la localización nuclear del ARNm de htt es específica para neuronas solo. El panel de la izquierda representa neuronas primarias; ARNm de ppib, verde; ARNm de htt, red, núcleos, azul.
- 10 La Figura 30 representa que el tratamiento con ARNiph^{HTT} de neuronas corticales elimina preferencialmente el ARNm de htt citoplasmático. ARNm de ppib, verde; ARNm de htt, red; núcleos, azul. Panel superior: no tratadas. Panel inferior, tratadas con 1,5 μ M de ARNiph^{HTT} durante tres días.
- La Figura 31 representa gráficamente que el tratamiento con ARNiph^{HTT} de neuronas corticales elimina preferencialmente el ARNm de htt citoplasmático.
- 15 La Figura 32 representa una transferencia Western que muestra el silenciamiento de la proteína HTT en neuronas corticales primarias naturales. ARNiph htt-10150; NTC = testigo no dirigido, 1 semana.
- La Figura 33 representa gráficamente los resultados de la inyección directa de HTT10150. No se observaron efectos sobre la viabilidad neuronal.
- La Figura 34 representa toxicidad adyacente al sitio de inyección después de la administración de colesterol-ARNiph.
- 20 Las Figuras 35A-C muestran que los ARNiph parcialmente modificados exhiben una duración del efecto corta y nula exposición sistémica.
- Las Figuras 36A-C representan la estabilización metabólica completa de ARNiph.
- Las Figuras 37A-C muestran que la estabilización metabólica completa no interfiere en la entrada en el RISC de los ARNiph.
- 25 Las Figuras 38A-38E representan la mejora por el ARNiph con estabilización metabólica completa (FM-ARNiph) del suministro local y la distribución.
- Las Figuras 39A-B representan la potencia y duración del efecto mejoradas mediadas por FM-ARNiph.
- La Figura 40 caracteriza lípidos de origen natural neuroactivos como bioconjugados de ARNiph.
- 30 La Figura 41 representa que la hidrofobicidad del ARNiph se correlaciona directamente con la distribución y retención cerebral. Inyección intraestriatal, 12,5 μ g (0,5 mg/kg), t = 24 horas, ratones FVB/NJ (N = 2).
- La Figura 42 representa la síntesis de ARNiph con ácido docosahexanoico (DHA, por sus siglas en inglés).
- La Figura 43 representa la internalización de DHA-ARNiph y col-ARNiph en neuronas corticales primarias. Captación: 0,5 μ M de Cy3-DHA-ARNiph (rojo), DAPI (azul).
- 35 La Figura 44 representa la colocalización de DHA-ARNiph con neuronas y astrocitos. Inyección intraestriatal, 12,5 μ g (0,5 mg/kg), t = 24 horas, ratones FVB/NJ (N = 2).
- La Figure 45 representa la localización de DHA-ARNiph en la región perinuclear en neuronas estriatales, mientras que col-ARNiph es indetectable. Inyección intraestriatal, 12,5 μ g (0,5 mg/kg), t = 24 horas, ratones FVB/NJ (N = 2).
- La Figura 46 representa la colocalización de DHA-ARNiph en neuronas y astrocitos en la corteza después de una inyección intraestriatal simple. Inyección intraestriatal, 12,5 μ g (0,5 mg/kg), t = 24 horas, ratones FVB/NJ (N = 2).
- 40 La Figure 47 representa la localización de DHA-ARNiph en la región perinuclear en neuronas corticales, mientras que col-ARNiph es indetectable.
- La Figura 48 represente la eficacia de silenciamiento contundente de DHA-ARNiph en el cuerpo estriado y la corteza. Inyección intraestriatal, 6-25 μ g (0,25-1, mg/kg), t = 5 días, ratones FVB/NJ (N = 8).
- 45 La Figura 49 representa la duración del efecto y recuperación en el cuerpo estriado después de una dosis intraestriatal simple de DHA-ARNiph.

- La Figura 50 representa un estudio de seguridad piloto que muestra que DHA-ARNip no afecta la integridad neuronal estriatal con un incremento de más de 20 veces con respecto a la dosis eficaz.
- La Figura 51 representa un estudio de seguridad piloto que muestra que DHA-ARNip provoca activación microglial estriatal mínima con un incremento de más de 20 veces con respecto a la dosis eficaz.
- 5 La Figura 52 representa la localización perinuclear provocada por la química oligonucleotídica.
- La Figura 53 representa la distribución de foci intranucleares provocada por la química oligonucleotídica.
- La Figura 54 muestra que el grado del silenciamiento estriatal de ARNm de htt se logra mediante la localización celular oligonucleotídica.
- La Figura 55 representa el suministro glial dirigido.
- 10 La Figura 56 representa el suministro neuronal dirigido.
- La Figura 57 muestra que el DHA-ARNip se distribuye de manera eficaz en todo el cerebro y silencia genes en el cuerpo estriado y la corteza. Inyección intraestriatal, 12,5 µg (0,5 mg/kg), t = 24 horas, ratones FVB/NJ (N = 2).
- La Figura 58 muestra la eficacia de ARNip en neuronas del hipocampo primarias naturales y neuronas del hipocampo primarias Q140. gel al 16 %.
- 15 La Figura 59 representa gráficamente la eficacia de ARNip en neuronas del hipocampo primarias naturales y neuronas del hipocampo primarias Q140.
- La Figura 60 muestra la eficacia de ARNip en neuronas del hipocampo primarias naturales y neuronas del hipocampo primarias Q140. gel al 7,5 %.
- La Figura 61 muestra que cada uno de PC-DHA-ARNip y col-ARNip silencia ARNm de htt mutante y natural.
- 20 La Figura 62 describe tres clases de químicas de ARNip: DHA-ARNip, PC-DHA-ARNip y col-ARNip.
- Las Figuras 63A-B representan gráficamente la potencia aumentada de PC-DHA-ARNip con respecto a DHA-ARNip en neuronas primarias corticales. 1 semana, analizado mediante QUANTIGENE, datos normalizados con respecto a PPIB.
- 25 La Figura 64 ilustra que col-ARNip tiene una química más eficaz para la modulación génica en neuronas corticales primarias con respecto a PC-DHA-ARNip y DHA-ARNip. 1 semana, analizado mediante QUANTIGENE, datos normalizados con respecto a PPIB.
- La Figura 65 muestra que PC-DHA-ARNip exhibe mejor retención y distribución más amplia en el cerebro que DHA-ARNip. Inyecciones intraestriatales de 2 o 10 nmol, N = 2, los cerebros se recogieron a las 48 horas.
- 30 La Figura 66 muestra aproximadamente 80 % de silenciamiento en el cuerpo estriado de ratón después de una inyección IS simple de PC-DHA-ARNip.
- La Figura 67 muestra aproximadamente 60 % de silenciamiento en la corteza de ratón después de una inyección IS simple de PC-DHA-ARNip.
- La Figura 68 representa la distribución en el cerebro de di-ARNip después de una inyección de bolo de CSF (250 µg), 48 horas.
- 35 La Figura 69 representa la distribución de di-ARNip después de una inyección IS simple.
- La Figura 70 representa el efecto de la ramificación sobre la distribución cerebral.
- La Figura 71 representa un diseño de estudio para someter a ensayo el silenciamiento génico in vivo después de inyecciones IS simples de di-ARNip.
- La Figura 72 representa el suministro neuronal de di-ARNip.
- 40 La Figura 73 representa la eficacia de di-ARNip en el cuerpo estriado y la corteza. Inyección IS, 2 nmol de di-ARNip, 1 semana, QuantiGene 2.0.
- La Figura 74 representa la distribución uniforme en la médula espinal de di-ARNip.
- La Figura 75 representa el silenciamiento del ARNm de htt en la médula espinal después de la administración de un bolo de di-ARNip^{HTT}. IT, 3 nmol, una semana, QuantiGene.

- La Figura 76 representa el silenciamiento in vitro mediado por di-ARNiph en células HeLa y neuronas corticales primarias.
- La Figura 77 representa la biodistribución de di-ARNiph. Inyección intraatrial de 2 nmol de Di-ARNip oligo (4 nmol de cadena de antisentido correspondiente). N=2 ratones por conjugado. Los cerebros se recogieron 48 horas después y se tiñeron con DAPI (núcleos, azul) y NeuN (marcador neuronal, verde). La imagen es representativa. Rojo-oligo.
- La Figura 78 representa la biodistribución de di-ARNiph. Inyección intraatrial de 2 nmol de Di-ARNip oligo (4 nmol de cadena de antisentido correspondiente). N=2 ratones por conjugado. Los cerebros se recogieron 48 horas después y se tiñeron con DAPI (núcleos, azul) y NeuN (marcador neuronal, verde). La imagen es representativa. Rojo-oligo.
- La Figura 79 representa la distribución cerebral de di-ARNiph, TEG-azida, TEG y vitamina D después de 48 horas. 2 nmoles inyectados IS, N=2 ratones por conjugado, los cerebros se recogieron 48 horas después.
- La Figura 80 representa la eficacia de la síntesis de vitamina D sobre la expresión de ARNm de htt.
- La Figura 81 representa una Fórmula química de un compuesto proporcionado en la presente memoria.
- La Figura 82 representa ejemplos de enlaces internucleotídicos de R³.
- La Figura 83 representa una realización de la Fórmula química de la Figura 81.
- La Figura 84 representa una Fórmula química de un compuesto proporcionado en la presente memoria.
- La Figura 85 representa una Fórmula química de un compuesto proporcionado en la presente memoria.
- La Figura 86 representa una realización del resto Y de la Figura 84 o la Figura 85.
- La Figura 87 representa una Fórmula química de un compuesto proporcionado en la presente memoria.
- La Figura 88 representa una realización de la Fórmula química de la Figura 87.
- La Figura 89 representa una Fórmula química de un compuesto proporcionado en la presente memoria.
- La Figura 90 representa una realización de la Fórmula química de la Figura 89.
- Las Figuras 91A-D representan el desarrollo de ARNiph con estabilización metabólica completa (FM-ARNiph). (A) Esquema de ARNiph parcialmente y completamente modificados. (B) ARNiph y FM-ARNiph tienen la misma capacidad para entrar en el RISC (HeLa, 72 horas). (C) El 5'-E-VP metabólicamente estable es tan activo como 5'-P. (D) 5'-E-VP permite el suministro prolongado a tejidos distantes (7 días después de la inyección, ensayo PNA).
- La Figura 92 representa que la evolución de la química permitió una amplia distribución de ARNiph en el cerebro de ratón después de una infusión de bolo de CSF (ICV, por sus siglas en inglés). Imágenes de secciones sagitales (paneles de la izquierda) de 48 horas después de la inyección ICV con 250 µg de variantes de ARNiph etiquetadas con Cy3 (paneles de la derecha). Imágenes tomadas con el microscopio de matriz en mosaico Leica 10x y a igual intensidad de láser. Núcleos (azul); Cy3-ARNiph (rojo). Col-ARNiph se mantuvo principalmente alrededor del ventrículo inyectado con distribución marginal a los lados distales del cerebro. DHA-ARNiph exhibe una distribución mejor. PC-DHA y Di-ARNiph muestra la distribución más difusa con un claro suministro a la corteza, cuerpo estriado e incluso el cerebelo. Barra de escala = 900 µm.
- La Figura 93 representa un protocolo sintético para el soporte sólido funcionalizado con PC-DHA.
- La Figura 94 representa un protocolo sintético para el soporte sólido funcionalizado con DI.
- Las Figuras 95A-C representan el descubrimiento de di-ARNiph. (A) Composición química de los cuatro subproductos a partir de la síntesis de calciferol-ARNiph (HPLC analítica de la síntesis del bruto). (B) Eficacia de los subproductos en células HeLa, 72 horas, QuantiGene®. Todos los compuestos fueron activos igualmente. (C) Una inyección intraestriatal unilateral simple (25 µg) de cada subproducto de Cy3-ARNiph, 48 horas. Solo los di-ARNiph exhibieron distribución amplia con captación neuronal preferencial.
- La Figura 96 representa un oligonucleótido de antisentido ANTÍDOTOiph que lleva una modificación de alta afinidad (LNA) diseñada para ser completamente complementaria a la región de partida de cadena de antisentido de ARNiph.
- La Figura 97 representa ARNiph conjugado con colesterol y péptido endocítico (esponja de protones).
- La Figura 98 representa un protocolo sintético en fase de disolución para un ARNiph conjugado con GM1.

La Figura 99 representa las estructuras químicas para los conjugados con DHA (g1DHA) y conjugados de ARNiph con PC-DHA (g2DHA).

La Figura 100 representa un protocolo sintético en fase sólida para conjugados de ARNiph con PC-DHA.

La Figura 101 representa un protocolo sintético en fase de disolución para conjugados de ARNiph con PC-DHA.

5 Las Figuras 102A-D representan que la estabilización metabólica completa fue esencial para el suministro y la duración del efecto del ARNiph mediado por conjugado in vivo. (A, B) En comparación con ARNiph (A), FM-ARNiph (B) exhibió una distribución y retención en tejidos significativamente mejoradas después de administración intravenosa (IV) y CSF (ICV). Ratonés gestantes naturales (E15) recibieron inyecciones de 10 mg/kg IV o 60 µg, ICV. Se obtuvieron imágenes de los tejidos 10x en un microscopio fluorescente en mosaico Leica a igual intensidad de láser. ARNiph (rojo); núcleos (azul). Barra de escala = 900 µm. (C) Cadena guía intacta en tejidos cuantificada 5 días después de inyección IV (n=3, media ± EEM). (D) FM-ARNiph silencian el ARNm de Htt en el cuerpo estriado de ratón un mes después de la inyección (12 µg, intraestriatal). Los ARNiph parcialmente modificados silencian durante menos de dos semanas.

15 Las Figuras 103A-C representan la eficacia y seguridad de PC-DHA-ARNiph en cerebro de ratón in vivo. (A) Niveles de ARNm de Htt en cuerpo estriado y corteza 1 semana después de la inyección de 25 o 50 µg de DHA-ARNiph. ***P <0,0001 con respecto a aCSF y NTC. (B) No se produjo activación inmunitaria innata detectable en los niveles de dosis 20 veces más altos que la dosis eficaz (se muestran los datos para la microglía total para DHA-ARNiph). (C) Viabilidad neuronal normal sobre la base de los niveles de DARP32. Observar la dosis tóxica (barra roja) para col-ARNiph.

20 Las Figuras 104A-C muestran que di-ARNiph exhibió amplia distribución y eficacia en cerebro de ratón. (A) Distribución contundente y uniforme de Cy3-Di-ARNiph en todo el cerebro, visualmente e histológicamente, con clara captación neuronal 48 horas después de la inyección ICV (250 µg, CSF, ambos lados), barra de escala = 100 µm. (B) Silenciamiento por ARNm de Htt en la corteza y el cuerpo estriado 7 días después de una inyección intraestriatal simple (25 µg). (C) Acumulación de ARNiph en tejidos 7 días después de la inyección (ensayo PNA).

25 Las Figuras 105A-B muestran que di-ARNiph exhibieron amplia distribución y eficacia en la médula espinal de ratón después de una inyección intratecal lumbar de bolo. (A) Col-ARNiph exhibieron un gradiente de difusión pronunciado desde fuera hacia dentro de la médula espinal, pero los Di-ARNiph se distribuyeron ampliamente en toda la médula espinal. Los animales recibieron inyecciones por vía intratecal de 75 µg de Cy3-Col-ARNiph o Cy3-Di-ARNiph. Barra de escala = 100 µm. (B) Se observó silenciamiento por ARNm de Htt contundente en todas las regiones de la médula espinal (7 días después de la inyección, n=6).

30 La Figura 106 representa un ensayo basado en PNA (ácido nucleico peptídico) para la detección de la cadena guía de ARNiph en tejidos de ratón. Los tejidos se lisaron, las partículas se separaron por precipitación y la estructura doble de PNA-cadena guía se purificó mediante HPLC (ADNPac P100, agua al 50 %, acetonitrilo al 50 %, gradiente de sal 0-1M NaClO₄).

La Figura 107 representa el direccionamiento hacia el riñón mediante PC-DHA-ARNiph.

35 La Figura 108 representa la internalización de GM1-ARNiph y el silenciamiento del ARNm de htt mediado por GM1-ARNiph.

La Figura 109 representa la distribución cerebral de GM1-ARNiph.

40 Las Figuras 110A-G muestra que el ARNiph completamente modificado (FM) administrado sistémicamente exhibe distribución en tejido y eficacia in vivo considerablemente mejorada. (a) Distribución en tejido de Cy3-ARNiph y Cy3-FM-ARNiphFLT1 (rojo) 10 mg/kg de inyección IV. Núcleos teñidos con DAPI (azul). Todas las imágenes se adquirieron en entornos idénticos. (b-e) Cuantificación de cadena guía mediante ensayo basado en hibridación de PNA (b) 10 mg/kg, IV, 24 horas (c) 10 mg/kg, SC, 24 horas (d) 2x20 mg/kg, IV, 120 horas, (n= 7) (e) 2x15 mg/kg, IV, 120 horas, (n=12). (f, g) Cuantificación del silenciamiento por ARNm de sFLT1 después de (f) 2x20 mg/kg, ratones C57B6, (n=3, PBS; n=7, FM-ARNiphFLT), (g) 2x15 mg/kg, ratones CD1. (n=12, para PBS; n=6, NTC; n=12, FM-ARNiphFLT1). Los niveles de ARNm se midieron 120 horas después de la inyección con el ensayo QuantiGene® (Affymetrix), se normalizaron con respecto al gen de mantenimiento FLT1 y se presentaron como un porcentaje del testigo tratado con PBS. Todas las barras de error representan la media ± DT. ***, P<0,001; ****, P<0,0001.

50 Las Figuras 111A-G muestran que los ARNiph completamente modificados se distribuyen ampliamente en todo el cerebro y demuestran potencia más alta y una duración más larga del silenciamiento después de la administración local. Se inyectaron ARNiphHTT (a) y FM-ARNiphHTT (b, c, d, e) ICV, se muestra la distribución a través de la sección sagital del cerebro después de 48 horas. Núcleos teñidos con DAPI (azul). Cy3-ARNiph (rojo). (f, g) Se inyectaron de manera unilateral ARNiphHTT y FM-ARNiphHTT en el cuerpo estriado y se midió nivel de ARNm de HTT al usar QuantiGene® (Affymetrix) después de (f) 5 días o (g) 7, 14 y 28 días, se normalizó con respecto a un gen de mantenimiento, PPIB y se presentó como un porcentaje del testigo no tratado (n=8 ratones, media +/- DT). NTC =

testigo no dirigido; CSF = líquido cefalorraquídeo artificial Todas las barras de error representan la media \pm DT. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$.

Descripción detallada de ciertas realizaciones ilustrativas

5 Se proporcionan nuevas secuencias diana de huntingtina. También se proporcionan nuevos ARNip que se dirigen a secuencias diana de huntingtina nuevas.

10 Generalmente, la nomenclatura usada en relación con el cultivo de células y tejido, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritos en la presente memoria son las conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Los métodos y técnicas proporcionados en la presente memoria generalmente se llevan a cabo según métodos convencionales conocidos en la técnica y como se describen en varias referencias generales y más específicas que se citan y describen a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique de cualquier otra manera. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se llevan a cabo según las especificaciones del fabricante, como se realizan comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. La nomenclatura usada en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en la presente memoria son las conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Se usan técnicas estándares para síntesis químicas, análisis químicos, preparación formulación y suministro farmacéutico, y tratamiento de pacientes.

15 A menos que se definan de cualquier otra manera en la presente memoria, los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la técnica. En el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente memoria prevalecerán sobre cualquier definición del diccionario o extrínseca. A menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. El uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique de cualquier otra manera. El uso del término "que incluye/n", así como otras formas, tales como "incluido/a" e "incluyendo" no es limitante.

Con el fin de que invención se entienda más fácilmente, primero se definen ciertos términos.

25 El término "nucleósido" se refiere a una molécula que tiene una base purina o pirimidina enlazada covalentemente a un azúcar ribosa o desoxirribosa. Los nucleósidos ilustrativos incluyen adenosina, guanosina, citidina, uridina y timidina. Los nucleósidos ilustrativos adicionales incluyen inosina, 1-metil inosina, pseudouridina, 5,6-dihidrouridina, ribotimidina, 2N-metilguanosina y 2,2N,N-dimetilguanosina (también denominados nucleósidos "raros"). El término "nucleótido" se refiere a un nucleósido que tiene uno o más grupos fosfato unidos en enlaces éster al resto azúcar. Los nucleótidos ilustrativos incluyen nucleósido monofosfatos, difosfatos y trifosfatos. Los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico" se usan de manera intercambiable en la presente memoria y se refieren a un polímero de nucleótidos unidos entre sí mediante un enlace fosfodiéster o fosforotioato entre los átomos de carbono hacia 5' y 3'.

35 El término "ARN" o "molécula de ARN" o "molécula de ácido ribonucleico" se refiere a un polímero de ribonucleótidos (p. ej., 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o más ribonucleótidos). El término "ADN" o "molécula de ADN" o molécula de ácido desoxirribonucleico" se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos. El ADN y el ARN se pueden sintetizar naturalmente (p. ej., mediante replicación de ADN o transcripción de ADN, respectivamente). El ARN se puede modificar después de la transcripción. El ADN y el ARN también se pueden sintetizar químicamente. El ADN y el ARN pueden ser monocatenarios (es decir, ARNmc y ADNmc, respectivamente) o multicatenarios (p. ej., bicatenarios, es decir, ARNbc y ADNbc, respectivamente). "ARNm" o "ARN mensajero" es ARN monocatenario que especifica la secuencia de aminoácidos de una o más cadenas polipeptídicas. Esta información se traduce durante la síntesis proteica cuando los ribosomas se unen al ARNm.

45 Según se usan en la presente memoria, el término "ARN interferente pequeño" ("ARNip") (también denominado en la técnica "ARN interferente corto") se refiere a un ARN (o análogo de ARN) que comprende entre aproximadamente 10-50 nucleótidos (análogos de o nucleótidos) que es capaz de dirigir o mediar la interferencia por ARN. Preferiblemente, un ARNip comprende entre aproximadamente 15-30 nucleótidos o análogos de nucleótidos, más preferiblemente, entre aproximadamente 16-25 nucleótidos (o análogos de nucleótidos), incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 18-23 nucleótidos (o análogos de nucleótidos) e, incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 19-22 nucleótidos (o análogos de nucleótidos) (p. ej., 19, 20, 21 o 22 nucleótidos o análogos de nucleótidos). El término ARNip "corto" se refiere a un ARNip que comprende aproximadamente 21 nucleótidos (o análogos de nucleótidos), por ejemplo, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos. El término ARNip "largo" se refiere a un ARNip que comprende aproximadamente 24-25 nucleótidos (o análogos de nucleótidos), por ejemplo, 23, 24, 25 o 26 nucleótidos. Los ARNip cortos pueden, en algunas instancias, incluir menos de 19 nucleótidos, p. ej., 16, 17 o 18 nucleótidos, siempre que el ARNip más corto conserve la capacidad de mediar la iARN. Asimismo, los ARNip largos pueden, en algunas instancias, incluir más de 26 nucleótidos, siempre que el ARNip más largo conserve la capacidad de mediar la iARN ausente de procesamiento adicional, p. ej., procesamiento enzimático, hasta un ARNip corto.

El término "análogo de nucleótido" o "nucleótido alterado" o "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido no estándar, incluidos ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos de origen no natural. Los análogos de nucleótidos ilustrativos están modificados en cualquier posición para alterar ciertas propiedades químicas del nucleótido, pero conservar todavía la capacidad del análogo de nucleótido para llevar a cabo su función prevista. Los ejemplos de posiciones del nucleótido que se puede derivar incluyen la posición 5, p. ej., 5-(2-amino)propil uridina, 5-bromo uridina, 5-propina uridina, 5-propenil uridina, etc.; la posición 6, p. ej., 6-(2-amino)propil uridina; la posición 8 para adenosina y/o guanosinas, p. ej., 8-bromo guanosina, 8-cloro guanosina, 8-fluoroguanosina, etc. Los análogos de nucleótidos también incluyen desaza nucleótidos, p. ej., nucleótidos 7-desaza-adenosina; modificados por O y N (p. ej., alquilo, p. ej., N6-metil adenosina, o como se conoce de cualquier otra manera en la técnica); y otros análogos de nucleótidos heterocíclicamente modificados tales como los descritos en Herdewijn, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2000 Aug. 10(4):297-310.

Los análogos de nucleótidos también pueden comprender modificaciones de la porción azúcar de los nucleótidos. Por ejemplo, el grupo 2' OH se puede reemplazar por un grupo seleccionado de H, O, R, F, Cl, Br, I, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, COOR u O, en donde R es alquilo C₁-C₆, alqueno, alquino, arilo sustituido o insustituido, etc. Otras posibles modificaciones incluyen las descritas en las patentes estadounidenses núms. 5.858.988 y 6.291.438.

El grupo fosfato del nucleótido también se puede modificar, p. ej., al sustituir uno o más de los oxígenos del grupo fosfato con azufre (p. ej., fosforotioato), o al hacer otras sustituciones que permiten que el nucleótido lleve a cabo su función prevista tal como se describe en, por ejemplo, Eckstein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000 Apr. 10(2):117-21, Ruszkowski et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000 Oct. 10(5):333-45, Stein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001 Oct. 11(5): 317-25, Vorobjev et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001 Apr. 11(2):77-85 y la patente estadounidense. núm. 5.684.143. Algunas de las modificaciones mencionadas anteriormente (p. ej., modificaciones del grupo fosfato) preferiblemente disminuyen el índice de hidrólisis de, por ejemplo, polinucleótidos que comprenden dichos análogos *in vivo* o *in vitro*.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polímero corto de nucleótidos y/o análogos de nucleótidos. El término "análogo de ARN" se refiere a un polinucleótido (p. ej., un polinucleótido químicamente sintetizado) que tiene al menos un nucleótido alterado o modificado en comparación con un ARN no alterado o no modificado correspondiente, pero que conserva la misma naturaleza o función o similar que el ARN no alterado o no modificado correspondiente. Según se describió anteriormente, los oligonucleótidos se pueden enlazar con enlaces que resultan en un índice de hidrólisis más bajo del análogo de ARN n comparación con una molécula de ARN con enlaces fosfodiéster. Por ejemplo, los nucleótidos del análogo pueden comprender enlaces metilenediol, etileno diol, oximetiltio, oxietiltio, oxicarbonilo, fosfordiamidato, fosforoamidato y/o fosforotioato. Los análogos de ARN preferidos incluyen ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos con cadena principal y/o azúcar modificado. Dichas alteraciones o modificaciones pueden incluir, además, la adición de material no nucleotídico, tal como al (a los) extremo(s) del ARN o internamente (en uno o más nucleótidos del ARN). Un análogo de ARN solo tiene que ser suficientemente similar al ARN natural de manera que tenga la capacidad de mediar (medie) la interferencia por ARN.

Según se usan en la presente memoria, el término "interferencia por ARN" ("iARN") se refiere a la degradación intracelular selectiva de ARN. La iARN se produce en células naturalmente para retirar ARN extraños (p. ej., ARN víricos). La iARN natural procede a través de fragmentos escindidos de ARNbc libre que dirigen el mecanismo degradante a otras secuencias de ARN similares. Alternativamente, el hombre puede iniciar la iARN, por ejemplo, para silenciar la expresión de genes diana.

Un agente de iARN, p. ej., un agente de silenciamiento por ARN, que tiene una cadena con una "secuencia suficientemente complementaria a una secuencia de ARNm diana para dirigir la interferencia por ARN específica para la diana (iARN)" significa que la cadena tiene una secuencia suficiente para desencadenar la destrucción del ARNm diana mediante la maquinaria o el proceso de iARN.

Según se usan en la presente memoria, el término "ARN aislado" (p. ej., "ARNip aislado" o "precursor de ARNip aislado") se refiere a moléculas de ARN que están sustancialmente libres de otro material celular, o medio de cultivo cuando se producen mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libres de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetizan químicamente.

Según se usan en la presente memoria, el término "silenciamiento por ARN" se refiere a un grupo de mecanismos reguladores específicos de secuencia (p. ej., interferencia por ARN (iARN), silenciamiento génico transcripcional (TGS, por sus siglas en inglés), silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, por sus siglas en inglés), extinción, cosupresión y represión de traducción) mediados por moléculas de ARN que provocan la inhibición o el "silenciamiento" de la expresión de un gen codificante de proteína correspondiente. El silenciamiento por ARN se ha observado en muchos tipos de organismos, incluidas plantas, animales y hongos.

El término "silenciamiento por ARN discriminatorio" se refiere a la capacidad de una molécula de ARN para inhibir sustancialmente la expresión de una secuencia polinucleotídica "primera" o "diana", mientras no inhibe sustancialmente la expresión de una secuencia polinucleotídica "segunda" o "no diana", p. ej., cuando ambas secuencias polinucleotídicas están presentes en la misma célula. En ciertas realizaciones, la secuencia

5 polinucleotídica diana corresponde a un gen diana, mientras que la secuencia polinucleotídica no diana corresponde a un gen no diana. En otras realizaciones, la secuencia polinucleotídica diana corresponde a un alelo diana, mientras que la secuencia polinucleotídica no diana corresponde a un alelo no diana. También se describe en la presente memoria que la secuencia polinucleotídica diana es la secuencia de ADN que codifica la región reguladora (p. ej., elementos promotores o potenciadores) de un gen diana. También se describe en la presente memoria que la secuencia polinucleotídica diana es un ARNm diana codificado por un gen diana.

El término "*in vitro*" tiene su significado reconocido en la técnica, p. ej., implica reactivos o extractos purificados, p. ej., extractos celulares. El término "*in vivo*" también tiene su significado reconocido en la técnica, p. ej., implica células vivas, p. ej., células inmortalizadas, células primarias, líneas celulares y/o células en un organismo.

10 Según se usa en la presente memoria, el término "transgén" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que se inserta por artefacto en una célula y se vuelve parte del genoma del organismo que se desarrolla a partir de la célula. Dicho transgén puede incluir un gen que es parcialmente o enteramente heterólogo (es decir, extraño) con respecto al organismo transgénico, o puede representar un gen homólogo a un gen endógeno del organismo. El término "transgén" también significa una molécula de ácido nucleico que incluye una o más secuencias de ácido nucleico
15 seleccionadas, p. ej., ADN, que codifican uno o más precursores de ARN genomanipulados, para expresarse en un organismo transgénico, p. ej., animal, que es parcialmente o enteramente heteróloga, es decir, extraña, con respecto al animal transgénico, u homóloga a un gen endógeno del animal transgénico, pero que está diseñada para insertarse en el genoma del animal en una localización que difiere de la del gen natural. Un transgén incluye uno o más
20 promotores y cualquier otro ADN, tal como intrones, necesarios para la expresión de la secuencia de ácido nucleico seleccionada, todos funcionalmente enlazados con la secuencia seleccionada, y puede incluir una secuencia potenciadora.

Un gen "implicado" en una enfermedad o trastorno incluye un gen, cuya expresión o función normal o aberrante produce o causa la enfermedad o trastorno o al menos un síntoma de dicha enfermedad o trastorno.

25 El término "mutación de ganancia funcional" según se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier mutación en un gen en la que la proteína codificada por dicho gen (es decir, la proteína mutante) adquiere una función no normalmente asociada a la proteína (es decir, la proteína natural) que causa o contribuye a una enfermedad o trastorno. La mutación de ganancia funcional puede ser una eliminación, adición o sustitución de un nucleótido o nucleótidos en el gen que provoca el cambio en la función de la proteína codificada. También se describe en la presente memoria que la mutación de ganancia funcional cambia la función de la proteína mutante o causa
30 interacciones con otras proteínas. También se describe en la presente memoria que la mutación de ganancia funcional provoca una disminución en o la eliminación de la proteína natural normal, por ejemplo, por la interacción de la proteína alterada, mutante con dicha proteína natural, normal.

35 Según se usa en la presente memoria, el término "gen diana" es un gen cuya expresión se debe inhibir o "silenciar" sustancialmente. Este silenciamiento se puede lograr mediante el silenciamiento por ARN, p. ej., al escindir el ARNm del gen diana o por la represión de la traducción del gen diana. El término "gen no diana" es un gen cuya expresión no se debe silenciar sustancialmente. En una realización, las secuencias polinucleotídicas del gen diana y no diana (p. ej., ARNm codificado por los genes diana y no diana) pueden diferir en uno o más nucleótidos. En otra realización, los genes diana y no diana pueden diferir en uno o más polimorfismos (p. ej., polimorfismos mononucleotídicos o SNP, por sus siglas en inglés). En otra realización, los genes diana y no diana pueden compartir menos del 100 % de la
40 identidad de secuencia. En otra realización, el gen no diana puede ser un homólogo (p. ej., un ortólogo o parólogo) del gen diana.

45 Un "alelo diana" es un alelo (p. ej., un alelo de SNP) cuya expresión se debe inhibir o "silenciar" selectivamente. Este silenciamiento se puede lograr mediante el silenciamiento por ARN, p. ej., al escindir el ARNm del gen diana o alelo diana mediante un ARNip. El término "alelo no diana" es un alelo cuya expresión no se debe silenciar sustancialmente. En ciertas realizaciones, los alelos diana y no diana pueden corresponder al mismo gen diana. En otras realizaciones, el alelo diana corresponde a, o se asocia a, un gen diana y el alelo no diana corresponde a, o se asocia a, un gen no diana. En una realización, las secuencias polinucleotídicas de los alelos diana y no diana pueden diferir en uno o más nucleótidos. En otra realización, los alelos diana y no diana pueden diferir en uno o más polimorfismos alélicos (p. ej., uno o más SNP). En otra realización, los alelos diana y no diana pueden compartir menos del 100 % de la identidad
50 de secuencia.

55 El término "polimorfismo" según se usa en la presente memoria, se refiere a una variación (p. ej., una o más eliminaciones, inserciones o sustituciones) en una secuencia génica que se identifica o detecta cuando se compara la misma secuencia génica de diferentes fuentes o sujetos (pero del mismo organismo). Por ejemplo, se puede identificar un polimorfismo cuando se compara la misma secuencia génica de sujetos diferentes. La identificación de dichos polimorfismos es habitual en la técnica, las metodologías son similares a las usadas para detectar, por ejemplo, mutaciones puntuales del cáncer de mama. La identificación se puede hacer, por ejemplo, a partir de ADN extraído de linfocitos de un sujeto, con la posterior amplificación de regiones polimórficas mediante el uso de cebadores

específicos para dicha región polimórfica. Alternativamente, se puede identificar el polimorfismo cuando se comparan dos alelos del mismo gen. En realizaciones particulares, el polimorfismo es un polimorfismo mononucleotídico (SNP).

Una variación en la secuencia entre dos alelos del mismo gen dentro de un organismo se denomina en la presente memoria un "polimorfismo alélico". En ciertas realizaciones, el polimorfismo alélico corresponde a un alelo de SNP. Por ejemplo, el polimorfismo alélico puede comprender una variación mononucleotídica entre los dos alelos de un SNP. El polimorfismo puede estar en un nucleótido dentro de una región codificante, pero debido a la degeneración del código genético, no se codifica ningún cambio en la secuencia de aminoácidos. Alternativamente, las secuencias polimórficas pueden codificar un aminoácido diferente en una posición particular, pero el cambio en el aminoácido no afecta la función de la proteína. Las regiones polimórficas también se pueden encontrar en regiones no codificantes del gen. En realizaciones ilustrativas, el polimorfismo se encuentra en una región codificante del gen o en una región no traducida (p. ej., una UTR hacia 5' o UTR hacia 3') del gen.

Según se usa en la presente memoria, el término "frecuencia alélica" es una medida (p. ej., proporción o porcentaje) de la frecuencia relativa de un alelo (p. ej., un alelo de SNP) en un único locus en una población de individuos. Por ejemplo, cuando una población de individuos tiene n loci de un locus cromosómico particular (y el gen que ocupa el locus) en cada una de sus células somáticas, entonces la frecuencia alélica de un alelo es la fracción o porcentaje de loci que el alelo ocupa dentro de la población. En realizaciones particulares, la frecuencia alélica de un alelo (p. ej., n alelo de SNP) es al menos 10 % (p. ej., al menos 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o más) en una población de muestra.

Según se usa en la presente memoria, el término "población de muestra" se refiere a una población de individuos que comprende una cantidad estadísticamente significativa de individuos. Por ejemplo, la población de muestra puede comprender 50, 75, 100, 200, 500, 1000 o más individuos. En realizaciones particulares, la población de muestra puede comprender individuos que comparten al menos un fenotipo de enfermedad común (p. ej., un trastorno de ganancia funcional) o mutación (p. ej., una mutación de ganancia funcional).

Según se usa en la presente memoria, el término "heterocigosis" se refiere a la fracción de individuos dentro de una población que son heterocigóticos (p. ej., contienen dos o más alelos diferentes) en un locus particular (p. ej., en un SNP). La heterocigosis se puede calcular para una población de muestra al usar métodos que son conocidos para los expertos en la técnica.

El término "dominio poliglutamina", según se usa en la presente memoria, se refiere a un segmento o dominio de una proteína que consiste en residuos glutamina consecutivos enlazados a uniones peptídicas. En una realización, la región consecutiva incluye al menos 5 residuos glutamina.

El término "dominio poliglutamina expandido" o "segmento poliglutamina expandido", según se usa en la presente memoria, se refiere a un segmento o dominio de una proteína que incluye al menos 35 residuos glutamina consecutivos enlazados mediante uniones peptídicas. Dichos segmentos expandidos se encuentran en sujetos que padecen un trastorno de poliglutamina, según se describe en la presente memoria, presente o no el sujeto síntomas manifiestos.

El término "repetición trinucleotídica" o "región de repetición trinucleotídica", según se usa en la presente memoria, se refiere a un segmento de una secuencia de ácido nucleico, p. ej.) que consiste en repeticiones consecutivas de una secuencia trinucleotídica particular. En una realización, la repetición trinucleotídica incluye al menos 5 secuencias trinucleotídicas consecutivas. Las secuencias trinucleotídicas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, CAG, CGG, GCC, GAA, CTG y/o CGG.

El término "enfermedades por repetición trinucleotídica", según se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por una región de repetición trinucleotídica expandida ubicada dentro de un gen, la región de repetición trinucleotídica expandida es causante de la enfermedad o trastorno. Los ejemplos de enfermedades por repetición trinucleotídica incluyen, pero no se limitan a, ataxia espinocerebelosa tipo 12, ataxia espinocerebelosa tipo 8, síndrome del cromosoma X frágil, retraso mental por cromosoma XE frágil, ataxia de Friedreich y distrofia miotónica. Las enfermedades por repetición trinucleotídica ilustrativas para tratamiento son aquellas caracterizadas o causadas por una región de repetición trinucleotídica expandida en el extremo hacia 5' de la región codificante de un gen, el gen que codifica una proteína mutante que causa o es causante de la enfermedad o trastorno. Ciertas enfermedades trinucleotídicas, por ejemplo, el síndrome del cromosoma X frágil, donde la mutación no está asociada a una región codificante pueden no ser adecuadas para el tratamiento según las metodologías como se describen en la presente memoria, ya que no hay un ARNm adecuado al cual dirigir la iARN. En cambio, una enfermedad tal como la ataxia de Friedreich puede ser adecuada para el tratamiento según las metodologías como se describen en la presente memoria porque, aunque la mutación causante no está dentro de una región codificante (es decir, se encuentra dentro de un intrón), la mutación puede estar dentro, por ejemplo, de un precursor de ARNm (p. ej., un precursor de ARNm preemplamado).

El término "trastorno de poliglutamina", según se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por una expansión de repeticiones (CAG) n en el extremo hacia 5' de la región codificante (que, por lo tanto, codifica una región de poliglutamina expandida en la proteína codificada). En una realización, los

trastornos de poliglutamina se caracterizan por una degeneración progresiva de las células nerviosas. Los ejemplos de trastornos de poliglutamina incluyen, pero no se limitan a: enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelosa tipo 1, ataxia espinocerebelosa tipo 2, ataxia espinocerebelosa tipo 3 (también conocida como enfermedad de Machado-Joseph) y ataxia espinocerebelosa tipo 6, ataxia espinocerebelosa tipo 7 y atrofia dentatorubral-palidoluisiana.

- 5 La frase "examinar la función de un gen en una célula u organismo" se refiere a examinar o estudiar la expresión, actividad, función o fenotipo que surge de esta.

Según se usa en la presente memoria, el término "agente de silenciamiento por ARN" se refiere a un ARN que es capaz de inhibir o "silenciar" la expresión de un gen diana. En ciertas realizaciones, el agente de silenciamiento por ARN es capaz de prevenir el procesamiento completo (p. ej., la traducción y/o expresión completa) de una molécula de ARNm a través de un mecanismo de silenciamiento postranscripcional. Los agentes de silenciamiento por ARN incluyen moléculas de ARN no codificantes pequeñas (<50 b.p.), por ejemplo, estructuras dobles de ARN que comprenden cadenas apareadas, así como ARN precursores a partir de los cuales se pueden generar dichos ARN no codificantes pequeños. Los ejemplos de agentes de silenciamiento por ARN ilustrativos incluyen, ARNip, miARN, estructuras dobles similares a ARNip, oligonucleótidos de antisentido, moléculas GAPMER y oligonucleótidos de doble función, así como precursores de estos. En una realización, el agente de silenciamiento por ARN es capaz de inducir la interferencia por ARN. En otra realización, el agente de silenciamiento por ARN es capaz de mediar la represión de la traducción.

Según se usa en la presente memoria, el término "nucleótido raro" se refiere a un nucleótido de origen natural que aparece de manera infrecuente, incluidos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos de origen natural que aparecen de manera infrecuente, p. ej., un ribonucleótido de origen natural que no es guanosina, adenosina, citosina ni uridina. Los ejemplos de nucleósidos raros incluyen, pero no se limitan a, inosina, 1-metil inosina, pseudouridina, 5,6-dihidrouridina, ribotimidina, ²N-metilguanosa y ^{2,2}N,N-dimetilguanosa.

El término "genomanipulado/a" como en un precursor de ARN genomanipulado, o una molécula de ácido nucleico genomanipulada, indica que el precursor o molécula no se encuentra en la naturaleza, en el sentido de que toda o una porción de la secuencia de ácido nucleico del precursor o molécula fue creada o seleccionada por un ser humano. Después de creada o seleccionada, la secuencia se puede replicar, traducir, transcribir o de cualquier otra manera procesar mediante mecanismos dentro de una célula. Por lo tanto, un precursor de ARN producido dentro de una célula a partir de un transgén que incluye una molécula de ácido nucleico genomanipulada es un precursor ARN genomanipulado.

Según se usa en la presente memoria, el término "microARN" ("miARN"), también denominado en la técnica "ARN temporal pequeño" ("ARNtp"), se refiere a un ARN pequeño (10-50 nucleótidos) que están genéticamente codificados (p. ej., mediante genomas vírico, de mamífero o planta) y son capaces de dirigir o mediar el silenciamiento por ARN. Un "trastorno de miARN" hará referencia a una enfermedad o trastorno caracterizado por una expresión o actividad aberrante de un miARN.

Según se usa en la presente memoria, el término "oligonucleótido doble funcional" se refiere a un agente de silenciamiento por ARN que tiene la fórmula T-L-μ, en donde T es un resto de direccionamiento de ARNm, L es un resto enlazador y μ es un resto que reúne miARN. Según se usan en la presente memoria, los términos "resto de direccionamiento de ARNm", "resto de direccionamiento," "porción de direccionamiento de ARNm" o "porción de direccionamiento" se refieren a un dominio, porción o región del oligonucleótido doble funcional que tiene suficiente tamaño y suficiente complementariedad con respecto a una porción o región de un ARNm elegido o diana para el silenciamiento (es decir, el resto tiene una secuencia suficiente para capturar el ARNm diana). Según se usa en la presente memoria, el término "resto enlazador" o "porción enlazadora" se refiere a un dominio, porción o región del agente de silenciamiento por ARN que se une o enlaza covalentemente al ARNm.

Según se usa en la presente memoria, el término "cadena de antisentido" de un agente de silenciamiento por ARN, p. ej., un agente de silenciamiento por ARNip o ARN, se refiere a una cadena que es sustancialmente complementaria a una sección de aproximadamente 10-50 nucleótidos, p. ej., aproximadamente 15-30, 16-25, 18-23 o 19-22 nucleótidos del ARNm del gen que es diana del silenciamiento. La cadena de antisentido o primera cadena tiene una secuencia suficientemente complementaria a una secuencia de ARNm diana deseada para dirigir el silenciamiento específico para la diana, p. ej., complementariedad suficiente para desencadenar la destrucción del ARNm diana deseado mediante la maquinaria o el proceso de iARN (interferencia por iARN) o complementariedad suficiente para desencadenar la represión de la traducción del ARNm diana deseado.

El término "cadena de sentido" o "segunda cadena" de un agente de silenciamiento por ARN, p. ej., un agente de silenciamiento por ARNip o ARN, se refiere a una cadena que es sustancialmente complementaria a la cadena de antisentido o primera cadena. Las cadenas de antisentido y sentido también se pueden denominar primera o segunda cadenas, la primera o segunda cadena tiene complementariedad con respecto a la secuencia diana y la segunda o primera cadena respectiva tiene complementariedad con respecto a dicha primera o segunda cadena. Los intermediarios de estructura doble de miARN o estructuras dobles similares a ARNip incluye una cadena de miARN que tiene suficiente complementariedad con respecto a una sección de aproximadamente 10-50 nucleótidos del ARNm

del gen que es diana del silenciamiento y una cadena de miARN que tiene suficiente complementariedad para formar una estructura doble con la cadena de miARN.

5 Según se usa en la presente memoria, el término "cadena guía" se refiere a una cadena de un agente de silenciamiento por ARN, p. ej., una cadena de antisentido de una estructura doble de ARNip o secuencia de ARNip, que ingresa en el complejo RISC y dirige la escisión del ARNm diana.

10 Según se usa en la presente memoria, el término "asimetría", como en la asimetría de la región de estructura doble de un agente de silenciamiento por ARN (p. ej., el tallo de un ARNhc), se refiere a una desigualdad de resistencia de unión o resistencia de apareamiento de bases entre los extremos terminales del agente de silenciamiento por ARN (p. ej., entre nucleótidos terminales en una primera cadena o porción de tallo y nucleótidos terminales en una segunda cadena o porción de tallo opuesta), de manera que el extremo hacia 5' de una cadena de la estructura doble está más frecuentemente en un estado transitorio no apareado, p. ej., monocatenario, que el extremo hacia 5' de la cadena complementaria. La diferencia estructural determina que una cadena de la estructura doble se incorpora preferencialmente en un complejo RISC. La cadena cuyo extremo hacia 5' está menos estrechamente apareado con la cadena complementaria se incorporará preferencialmente en RISC y mediará la iARN.

15 Según se usa en la presente memoria, el término "resistencia de unión" o "resistencia de par de bases" se refiere a la resistencia de la interacción entre pares de nucleótidos (o análogos de nucleótidos) en cadenas opuestas de una estructura doble oligonucleotídica (p. ej., una estructura doble de ARNip), debido principalmente a la unión por H, interacciones de van der Waals y similares entre dichos nucleótidos (o análogos de nucleótidos).

20 Según se usa en la presente memoria, el "extremo hacia 5'", como en el extremo hacia 5' de una cadena de antisentido, se refiere a los nucleótidos terminales hacia 5', p. ej., entre uno y aproximadamente 5 nucleótidos en el extremo hacia 5' de la cadena de antisentido. Según se usa en la presente memoria, el "extremo hacia 3'", como en el extremo hacia 3' de una cadena de sentido, se refiere a la región, p. ej., una región de entre uno y aproximadamente 5 nucleótidos que es complementaria a los nucleótidos en el extremo hacia 5' de la cadena de antisentido complementaria.

25 Según se usa en la presente memoria, el término "nucleótido desestabilizante" se refiere a un primer nucleótido o análogo de nucleótido capaz de formar un par de bases con un segundo nucleótido o análogo de nucleótido de manera que el par de bases tenga menor resistencia de unión que un par de bases convencional (es decir, un par de bases de Watson-Crick). En ciertas realizaciones, el nucleótido desestabilizante es capaz de formar un par de bases malapareado con el segundo nucleótido. En otras realizaciones, el nucleótido desestabilizante es capaz de formar un par de bases inestable con el segundo nucleótido. En todavía otras realizaciones, el nucleótido desestabilizante es capaz de formar un par de bases ambiguo con el segundo nucleótido.

30 Según se usa en la presente memoria, el término "par de bases" se refiere a la interacción entre pares de nucleótidos (o análogos de nucleótidos) en cadenas opuestas de una estructura doble oligonucleotídica (p. ej., una estructura doble formada por una cadena de un agente de silenciamiento por ARN y una secuencia de ARNm diana), debido principalmente a la unión por H, interacciones de van der Waals y similares entre dichos nucleótidos (o análogos de nucleótidos). Según se usa en la presente memoria, el término "resistencia de unión" o "resistencia de par de bases" se refiere a la resistencia del par de bases.

35 Según se usa en la presente memoria, el término "par de bases malapareado" se refiere a un par de bases que consiste en pares de bases no complementarios o distintos de Watson-Crick, por ejemplo, los pares de bases no normalmente complementarios G:C, A:T o A:U. Según se usa en la presente memoria, el término "par de bases ambiguo" (también conocido como par de bases no discriminatorio) se refiere a un par de bases formado por un nucleótido universal.

40 Según se usa en la presente memoria, el término "nucleótido universal" (también conocido como "nucleótido neutro") incluye aquellos nucleótidos (p. ej., ciertos nucleótidos desestabilizantes) que tienen una base (una "base universal" o "base neutra") que no discrimina significativamente entre bases en un polinucleótido complementario cuando se forma un par de bases. Los nucleótidos universales son predominantemente moléculas hidrófobas que pueden agrupar de manera eficaz en ácidos nucleicos de estructura doble antiparalelos (p. ej., ADN o ARN bicatenario) debido a interacciones de apilamiento. La porción de base de los nucleótidos universales típicamente comprende un resto heterocíclico aromático que contiene nitrógeno.

45 Según se usan en la presente memoria, los términos "suficiente complementariedad" o "suficiente grado de complementariedad" significa que el agente de silenciamiento por ARN tiene una secuencia (p. ej., en la cadena de antisentido, resto de direccionamiento de ARN o resto que reúne miARN) que es suficiente para unirse al ARN diana deseado, respectivamente, y para desencadenar el silenciamiento por ARN del ARNm diana.

50 Según se usa en la presente memoria, el término "represión de traducción" se refiere a una inhibición selectiva de la traducción del ARNm. La represión de la traducción natural procede a través de miARN escindidos de precursores de ARNhc. Tanto la iARN como la represión de la traducción son mediadas por RISC. Tanto la iARN como la represión

55

de la traducción se producen naturalmente o pueden ser iniciadas por el hombre, por ejemplo, para silenciar la expresión de genes diana.

5 Varias metodologías como se describen en la presente memoria incluyen la etapa que implica comparar un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc. con un "testigo adecuado", denominado de manera intercambiable en la presente memoria "testigo apropiado". Un "testigo adecuado" o "testigo apropiado" es cualquier testigo o estándar conocido para un experto en la técnica útil con fines de comparación. En una realización, un "testigo adecuado" o "testigo apropiado" es un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc. determinado antes de llevar a cabo una metodología de iARN, según se describe en la presente memoria. Por ejemplo, un índice de transcripción, nivel de ARNm, índice de traducción, nivel de proteína, actividad biológica, característica o propiedad celular, genotipo, fenotipo, etc. se puede determinar antes de introducir un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria en una célula u organismo. En otra realización, un "testigo adecuado" o "testigo apropiado" es un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc. determinado en una célula u organismo, p. ej., una célula u organismo testigo o normal, que exhibe, por ejemplo, atributos normales. En todavía otra realización, un "testigo adecuado" o "testigo apropiado" es un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc. predefinido.

15 A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica al cual corresponde la presente invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para poner en práctica o someter a prueba la presente invención, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones, prevalecerán. Además, los materiales, métodos y el ejemplo son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Se describen varios aspectos en mayor detalle en los siguientes apartados.

I. Trastornos de poliglutamina

25 Los trastornos de poliglutamina son una clase de enfermedad o trastornos caracterizados por una mutación genética común. En particular, la enfermedad o trastornos se caracterizan por una repetición expandida del trinucleótido CAG que da lugar, en la proteína codificada, a un alargamiento expandido de residuos glutamina. Los trastornos de poliglutamina son similares en el sentido de que las enfermedades se caracterizan por una degeneración progresiva de las células nerviosas. A pesar de las similitudes, los trastornos de poliglutamina se producen en diferentes cromosomas y, por lo tanto, se producen en segmentos completamente diferentes del ADN. Los ejemplos de trastornos de poliglutamina incluyen enfermedad de Huntington, atrofia dentatorubral-palidoluisiana, atrofia espinobulbar muscular, ataxia espinocerebelosa tipo 1, ataxia espinocerebelosa tipo 2, ataxia espinocerebelosa tipo 3, ataxia espinocerebelosa tipo 6 y ataxia espinocerebelosa tipo 7.

35 Los trastornos de poliglutamina según se describen en la presente memoria se caracterizan por, p. ej., dominios que tienen entre aproximadamente 30 a 35 residuos glutamina, entre aproximadamente 35 a 40 residuos glutamina, entre aproximadamente 40 a 45 residuos glutamina o que tienen aproximadamente 45 o más residuos glutamina. El dominio poliglutamina típicamente contiene residuos glutamina consecutivos (Q n>36).

II. Enfermedad de Huntington

40 Los agentes de silenciamiento por ARN según se describen en la presente memoria pueden diseñarse para dirigirse a polimorfismos (p. ej., polimorfismos mononucleotídicos) proteína huntingtina (htt) humana mutante para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

La enfermedad de Huntington, heredada como una enfermedad autosómica dominante, provoca capacidad intelectual alterada y enfermedad motora. Los pacientes pueden vivir más de una década con debilidad grave, antes de la muerte prematura por inanición o infección. La enfermedad comienza en la cuarta o quinta década en la mayoría de los casos, pero un subconjunto de pacientes manifiesta la enfermedad durante la adolescencia. La mutación genética para la enfermedad de Huntington es una repetición de CAG alargada en el gen huntingtina. Las repeticiones CAG varían en cantidad de 8 a 35 en individuos normales (Kremer et al., 1994). La mutación genética, p. ej., un aumento en la longitud de las repeticiones CAG con respecto a la normal (menos de 36 en el gen huntingtina hasta más de 36 en la enfermedad) se asocia a la síntesis de una proteína huntingtina mutante, que tiene más de 36 poliglutamatos (Aronin et al., 1995). En general, los individuos con 36 o más repeticiones CAG desarrollarán la enfermedad de Huntington. De manera prototípica para tantas como otras veinte enfermedades con una CAG alargada como la mutación subyacente, la enfermedad de Huntington todavía no cuenta con una terapia eficaz. Una variedad de intervenciones, tales como la interrupción de las vías apoptóticas, la adición de reactivos para reforzar la eficacia mitocondrial y el bloqueo de los receptores de NMDA, han sido alentadoras en cultivos celulares y el modelo de ratón de la enfermedad de Huntington. Sin embargo, en el mejor de los casos estas estrategias manifiestan una corta prolongación de la supervivencia de la célula o animal.

La enfermedad de Huntington cumple el dogma central de la genética: un gen mutante sirve como una plantilla para la producción de un ARNm mutante; el ARNm mutante después dirige la síntesis de una proteína mutante (Aronin et al., 1995; DiFiglia et al., 1997). Sin ánimo de ceñirse a la teoría científica, se cree que la proteína huntingtina mutante se acumula en neuronas selectivas en el cuerpo estriado y la corteza, altera actividades celulares como ya se ha determinado y provoca la disfunción y muerte neuronal (Aronin et al., 1999; Laforet et al., 2001). Debido a que una copia simple de un gen mutante es suficiente para causar la enfermedad de Huntington, el tratamiento más parsimonioso sería convertir el gen mutante en ineficaz. Las estrategias teóricas podrían incluir detener la transcripción génica de la huntingtina mutante, destruir el ARNm mutante y bloquear la traducción. Cada uno tiene el mismo resultado: la pérdida de la huntingtina mutante.

10 III. Gen huntingtina

El gen de la enfermedad relacionado con la enfermedad de Huntington se denomina Huntingtina o (*htt*). El locus de huntingtina es grande, abarca 180 kb y consiste en 67 exones. El gen huntingtina se expresa ampliamente y es necesario para el desarrollo normal. Se expresa como 2 formas alternativamente poliadeniladas que exhiben una abundancia relativa diferente en varios tejidos fetales y adultos. El transcrito más grande tiene aproximadamente 13,7 kb y se expresa predominantemente en el cerebro adulto y fetal, mientras que el transcrito más pequeño de aproximadamente 10,3 kb se expresa más ampliamente. Los dos transcritos difieren con respecto a sus regiones no traducidas hacia 3' (Lin et al., 1993). Se prevé que ambos mensajeros codifiquen una proteína de 348 kilodaltons que contiene 3144 aminoácidos. Se cree que el defecto genético que conduce a la enfermedad de Huntington confiere una nueva propiedad al ARNm o altera la función de la proteína.

20 La presente invención se dirige a la huntingtina (p. ej., huntingtina natural y/o mutante) mediante el uso de interferencia por ARN (Hutvagner et al., 2002). Una cadena de ARN bicatenario (ARNip) complementa a una secuencia diana dentro del ARNm de huntingtina. Después de la introducción del ARNip en las neuronas, el ARNip se desenrolla parcialmente, se une a la región polimórfica dentro del ARNm de huntingtina de manera específica para el sitio y activa una nucleasa de ARNm. Esta nucleasa escinde el ARNm de huntingtina y, de esta manera, detiene la traducción de la huntingtina (p. ej., huntingtina natural y/o mutante). Las células se deshacen del ARNm parcialmente digerido y, por lo tanto, obstaculizan la traducción, o las células digieren las proteínas parcialmente traducidas. En ciertas realizaciones, las neuronas sobreviven con la huntingtina natural del alelo normal y evitan la devastación de la huntingtina mutante al eliminar su producción.

30 También se describen en la presente memoria agentes de silenciamiento por ARN capaces de dirigirse a una o más de las secuencias diana indicadas en la Figura 8. También se describen en la presente memoria agentes de silenciamiento por ARN capaces de dirigirse a una o más de las secuencias diana en una o más secuencias diana indicadas en las posiciones génicas seleccionadas del grupo que consiste en 1214, 1218, 1219, 1257, 1894, 1907, 2866, 4041, 4049, 5301, 6016, 6579, 8603, 10125, 10146, 10150, 424, 456, 522, 527, 878, 879, 908, 1024, 1165, 1207, 1212, 1217, 1220, 1223, 1227, 1229, 1260, 1403, 1470, 1901, 1903, 2411, 2412, 2865, 3801, 4040, 4048, 4052, 4055, 4083, 4275, 4372, 4374, 4376, 4425, 4562, 4692, 4721, 5200, 5443, 5515, 8609, 10130, 10134, 10142, 10169, 35 10182, 10186, 10809, 11116, 11129, 11134, 11147, 11412, 11426, 11443, 11659, 11666, 11677, 11863, 11890, 11927, 11947, 12163, 12218, 12223, 12235, 12279, 12282, 12297, 12309, 12313, 12331, 13136, 13398, 13403, 13423, 13428 del gen *htt* humano (como se establecen en la Figura 8). También se describen en la presente memoria agentes de silenciamiento por ARN capaces de dirigirse a una o más de las secuencias diana en una o más secuencias diana indicadas en las posiciones génicas seleccionadas del grupo que consiste en 5301, 10125, 10146, 10150, 424, 40 878, 879, 4083, 4275, 4562, 4721, 5200, 10130, 10134, 10142, 11116, 11129, 11134, 11147, 11412, 11426, 11443, 11659, 11666, 11677, 11863, 11890, 11927, 11947, 12163, 12218, 12223, 12235, 12279, 12282, 12297, 12331, 13136, 13423 y 13428 del gen *htt* humano (como se establecen en la Figura 8). Las secuencias diana particularmente ilustrativas del gen *htt* humano se pueden encontrar en las posiciones 10150 (5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1)), 10146 (5' AUAUCAGUAAAGAGA 3' (SEQ ID NO:2)) y 10125 (5' CUCAGGAUUUAAAAU 3' (SEQ ID NO:3)). La secuencia genómica para cada secuencia diana se puede encontrar en, por ejemplo, la base de datos disponible públicamente mantenida por el NCBI.

50 También se describen en la presente memoria agentes de silenciamiento por ARN capaces de dirigirse a una o más de las secuencias diana en una o más secuencias diana como se establecen en la Tabla 1, a continuación, y en la Figura 21 (que también incluye modificaciones ilustrativas).

Tabla 1. Secuencias diana adicionales también descritas en la presente memoria.

GCUGCCGG GA	Número de acceso	Posició n	Región de direccionamiento (20 mer)	Región de direccionamiento (30 mer)
HTT	NM_002111 .6	1214	GUCCAGGUUUUAUGAACUG AC	AGCUUGUCCAGGUUUUAUGAACUGACGU UAC

ES 2 808 750 T3

GCUGCCGG GA	Número de acceso	Posició n	Región de direccionamiento (20 mer)	Región de direccionamiento (30 mer)
HTT	NM_002111 .6	1218	AGGUUUUAUGAACUGACGU UA	UGUCCAGGUUUUAUGAACUGACGUUACA UCA
HTT	NM_002111 .6	1219	GGUUUAUGAACUGACGUU AC	GUCCAGGUUUUAUGAACUGACGUUACAU CAU
HTT	NM_002111 .6	1257	ACCACAAUGUUGUGACCG GA	CCAAGACCACAAUGUUGUGACCGGAGC CCU
HTT	NM_002111 .6	1894	UGUGUUAGACGGUACCGA CA	GAAAUUGUGUUAGACGGUACCGACAAC CAG
HTT	NM_002111 .6	1907	ACCGACAACCAGUAAUUG GG	ACGGUACCGACAACCAGUAAUUGGGCC UGC
HTT	NM_002111 .6	2866	ACGAGUGCUCAAUAAUGU UG	CAAGAACGAGUGCUCAAUAAUGUUGUC AUC
HTT	NM_002111 .6	4041	UGAAAUCCUGCUUUAGUC GA	AUACCUGAAAUCCUGCUUUAGUCGAGA ACC
HTT	NM_002111 .6	4049	UGCUUUAGUCGAGAACCA AU	AAUCCUGCUUUAGUCGAGAACCAAUGA UGG
HTT	NM_002111 .6	5301	GGGACAGUACUUCAACGC UA	AGAUGGGGACAGUACUUCAACGCUAGA AGA
HTT	NM_002111 .6	6016	GGCAAUUCAGUCUCGUUG UG	AUCCAGGCAAUUCAGUCUCGUUGUGAA AAC
HTT	NM_002111 .6	6579	GCCUGCUAGCUCCAUGCU UA	CCUAAGCCUGCUAGCUCCAUGCUUAAG CCU
HTT	NM_002111 .6	8603	GCCCACUGCGUGAACAUU CA	GGAUCGCCACUGCGUGAACAUUCACA GCC
HTT	NM_002111 .6	10125	UUCUUCUCAGGAUUUAAA AU	CUCUUUUCUUCUCAGGAUUUAAAAUUU AAU
HTT	NM_002111 .6	10146	UAAUUUAUCAGUAAAGA GA	AAAUUUAAUUUAUCAGUAAAGAGAUUA AU
HTT	NM_002111 .6	10150	UAUAUCAGUAAAGAGAUU AA	UUAUUUAUCAGUAAAGAGAUUAAUUU UA
HTT	NM_002111 .6	424	ACUUUCAGCUACCAAGAA AG	AAAGAACUUUCAGCUACCAAGAAAGACC GU
HTT	NM_002111 .6	456	AUUGUCUGACAAUAUGUG AA	GAAUCAUUGUCUGACAAUAUGUGAAAA CAU
HTT	NM_002111 .6	522	UUCUGGGCAUCGCUAUGG AA	

ES 2 808 750 T3

GCUGCCGG GA	Número de acceso	Posició n	Región de direccionamiento (20 mer)	Región de direccionamiento (30 mer)
HTT	NM_002111 .6	527	GGCAUCGCUAUGGAACUU UU	UUCUGGGCAUCGCUAUGGAACUUUUUC UGC
HTT	NM_002111 .6	878	GCAAUGACAAUGAAUU AA	AUUUUGCAAUGACAAUGAAUUUAAGGU UU
HTT	NM_002111 .6	879	CAAAUGACAAUGAAUUAA G	UUUUGCAAUGACAAUGAAUUUAAGGU UUU
HTT	NM_002111 .6	908	AAGGCCUUCAUAGCGAAC CU	UGUUAAAGGCCUUCAUAGCGAACCUGA AGU
HTT	NM_002111 .6	1024	ACUAAAUGUGCUCUUAGG CU	UGGCUACUAAAUGUGCUCUUAGGCCUUA CUC
HTT	NM_002111 .6	1165	CGGAGUGACAAGGAAAGA AA	AGCUUCGGAGUGACAAGGAAAGAAAUG GAA
HTT	NM_002111 .6	1207	GCAGCUUGUCCAGGUUUA UG	GCAGAGCAGCUUGUCCAGGUUUUAUGAA CUG
HTT	NM_002111 .6	1212	UUGUCCAGGUUUUAUGAAC UG	GCAGCUUGUCCAGGUUUUAUGAACUGAC GUU
HTT	NM_002111 .6	1217	CAGGUUUUAUGAACUGACG UU	UUGUCCAGGUUUUAUGAACUGACGUUAC AUC
HTT	NM_002111 .6	1220	GUUUUAUGAACUGACGUUA CA	UCCAGGUUUUAUGAACUGACGUUACAUC AUA
HTT	NM_002111 .6	1223	UAUGAACUGACGUUACA CA	AGGUUUUAUGAACUGACGUUACAUCA CAC
HTT	NM_002111 .6	1227	AACUGACGUUACAUCA CA	UUUAUGAACUGACGUUACAUCAUACACA GCA
HTT	NM_002111 .6	1229	CUGACGUUACAUCAUCA CA	AUGAACUGACGUUACAUCAUACACAGCA CC
HTT	NM_002111 .6	1260	ACA AUGUUGUGACCGGAG CC	AGACCACAAUGUUGUGACCGGAGCCCU GGA
HTT	NM_002111 .6	1403	GGGAGUAUUGUGGAACUU AU	GUAGUGGGAGUAUUGUGGAACUUUAUG CUG
HTT	NM_002111 .6	1470	AAGGCAAAGUGCUCUUAG GA	ACAAAAAGGCAAAGUGCUCUUAGGAGA AGA
HTT	NM_002111 .6	1901	GACGGUACCGACAACCAG UA	UGUUAGACGGUACCGACAACCAGUAUU UGG
HTT	NM_002111 .6	1903	CGGUACCGACAACCAGUA UU	UUAGACGGUACCGACAACAGUAUUUG GGC

ES 2 808 750 T3

GCUGCCGG GA	Número de acceso	Posició n	Región de direccionamiento (20 mer)	Región de direccionamiento (30 mer)
HTT	NM_002111 .6	2411	UUGAACUACAUCGAUCAU GG	ACAUCUUGAACUACAUCGAUCAUGGAG ACC
HTT	NM_002111 .6	2412	UGAACUACAUCGAUCAUG GA	CAUCUUGAACUACAUCGAUCAUGGAGA CCC
HTT	NM_002111 .6	2865	AACGAGUGCUCAAUAAUG UU	GCAAGAACGAGUGCUCAAUAAUGUUGU CAU
HTT	NM_002111 .6	3801	GUCCUGUUACAACAAGUA AA	CUCAGGUCCUGUUACAACAAGUAAAUC CUC
HTT	NM_002111 .6	4040	CUGAAAUCCUGCUUUAGU CG	GAUACCUGAAAUCCUGCUUUAGUCGAG AAC
HTT	NM_002111 .6	4048	CUGCUUUAGUCGAGAACC AA	AAAUCCUGCUUUAGUCGAGAACCAAUG AUG
HTT	NM_002111 .6	4052	UUUAGUCGAGAACCAAUG AU	CCUGCUUUAGUCGAGAOC AAUGAUGG CAA
HTT	NM_002111 .6	4055	AGUCGAGAACCAAUGAUG GC	GCUUUAGUCGAGAACCAAUGAUGGCAA CUG
HTT	NM_002111 .6	4083	GUGUUAACAAUUGUUGA AG	UGUUUGUGUUAACAAUUGUUGAAGAC UCU
HTT	NM_002111 .6	4275	UGAGGAACAUGGUGCAGG CG	CAGCCUGAGGAACAUGGUGCAGGCGGA GCA
HTT	NM_002111 .6	4372	UGUCACAAAGAACCGUGC AG	ACGAGUGCACAAAGAAOCGUGCAGAU AAG
HTT	NM_002111 .6	4374	UCACAAAGAACCGUGCAG AU	GAGUGCACAAAGAACCGUGCAGAUAA GAA
HTT	NM_002111 .6	4376	ACAAAGAACCGUGCAGAU AA	GUGCACAAAGAACCGUGCAGAU AAGA AUG
HTT	NM_002111 .6	4425	UUGAACCUUUGUUUAA AA	UUUGUUUGAACCUUUGUUUAAAAGC UUU
HTT	NM_002111 .6	4562	UUUAUUGGCUUUGUAUUG AA	AGGUGUUUUAUUGGCUUUGUAUUGAAAC AGU
HTT	NM_002111 .6	4692	UCAUUGGAAUCCUAAAA UC	ACAGAUCAUUGGAAUCCUAAAAUCAUU CA
HTT	NM_002111 .6	4721	UGUGAUGGCAUCAUGGCC AG	AGCUCUGUGAUGGCAUCAUGGCCAGUG GAA
HTT	NM_002111 .6	5200	GAUUUCCCAGUCAACUGA AG	GUUCUGAUUUCCCAGUCAACUGAAGAU AUU

ES 2 808 750 T3

GCUGCCGG GA	Número de acceso	Posició n	Región de direccionamiento (20 mer)	Región de direccionamiento (30 mer)
HTT	NM_002111 .6	5443	GAGUGAGCAGCAACAUAC UU	GAAAUGAGUGAGCAGCAACAUACUUUC UUAU
HTT	NM_002111 .6	5515	GUCUGGAAUGUCCGGAG AA	UUCAAGUCUGGAAUGUCCGGAGAAUC ACA
HTT	NM_002111 .6	8609	UGCGUGAACAUUCACAGC CA	CCCACUGCGUGAACAUUCACAGCCAGC AGC
HTT	NM_002111 .6	10130	CUCAGGAUUUAAAAUUUA AU	UUCUUCUCAGGAUUUAAAAUUUAAUUUAU AU
HTT	NM_002111 .6	10134	GGAUUUAAAAUUUAAUUUA UA	UCUCAGGAUUUAAAAUUUAAUUUAUAUCA GU
HTT	NM_002111 .6	10142	AAUUUAAUUUAUAUCAGUAA A	UUUAAAAUUUAAUUUAUAUCAGUAAAGAG AU
HTT	NM_002111 .6	10169	AUUUUAAACGUAACUCUUU CU	GAUUAAUUUAAACGUAACUCUUUCUAU GCC
HTT	NM_002111 .6	10182	UCUUUCUAUGCCCGUGUA AA	GUAACUCUUUCUAUGCCCGUGUAAAGU AUG
HTT	NM_002111 .6	10186	UCUAUGCCCGUGUAAAGU AU	CUCUUUCUAUGCCCGUGUAAAGUAUGU GAA
HTT	NM_002111 .6	10809	CUUUUAGUCAGGAGAGUG CA	GACCCCUUUUAGUCAGGAGAGUGCAGA UCU
HTT	NM_002111 .6	11116	UGUUUUGGGUAUUGAAUG UG	GUCGAUGUUUUGGGUAUUGAAUGUGGU AAG
HTT	NM_002111 .6	11129	GAAUGUGGUAAGUGGAGG AA	GUUUUGAAUGUGGUAAGUGGAGGAAAU GUU
HTT	NM_002111 .6	11134	UGGUAAGUGGAGGAAAUG UU	GAAUGUGGUAAGUGGAGGAAAUGUUGG AAC
HTT	NM_002111 .6	11147	AAAUGUUGAACUCUGUG CA	GGAGGAAAUGUUGAACUCUGUGCAGG UGC
HTT	NM_002111 .6	11412	AUGUUUGAGGAGGCCCUU AA	GUCCGAUGUUUGAGGAGGCCCUUAAAGG GAA
HTT	NM_002111 .6	11426	CCUUAAGGGAAGCUACUG AA	GAGGCCCUUUAAGGGAAGCUACUGAAUU AUA
HTT	NM_002111 .6	11443	GAAUUUAACACGUAAGA AA	CUACUGAAUUUAACACGUAAGAAAUC AC
HTT	NM_002111 .6	11659	AUGUUUACAUUUGUAAGA AA	GCUAGAUGUUUACAUUUGUAAGAAUA ACA

ES 2 808 750 T3

GCUGCCGG GA	Número de acceso	Posición	Región de direccionamiento (20 mer)	Región de direccionamiento (30 mer)
HTT	NM_002111 .6	11666	CAUUUGUAAGAAUAACA CU	GUUUACAUUUGUAAGAAUAACACUGU GAA
HTT	NM_002111 .6	11677	AAUAACACUGUGAAUGUA AA	UAAGAAUAACACUGUGAAUGUAAAACA GA
HTT	NM_002111 .6	11863	AAUAUGAGCUCAUUAGUA AA	AGAUGAAUAUGAGCUCAUUAGUAAAAU GA
HTT	NM_002111 .6	11890	UCACCCACGCAUUAUACAU AA	UGACUUCACCCACGCAUUAUACAUAAAGU AU
HTT	NM_002111 .6	11927	AUAUAGACACAUCUAUAAU U	UGUGCAUUAUAGACACAUCUAUAAUUUUU CA
HTT	NM_002111 .6	11947	UUACACACACACCUCUCA AG	UAAUUUUACACACACACCUCUCAAGACG GA
HTT	NM_002111 .6	12163	GACUUUAUCAUGUUCUA AA	AGGAAGACUUUAUCAUGUUCUAAAAU CU
HTT	NM_002111 .6	12218	UUGUUGCAAUGUGAUUA AU	AAAUUUUGUUGCAAUGUGAUUAAUUU GGU
HTT	NM_002111 .6	12223	GCAAUGUGAUUAAUUUG GU	UUGUUGCAAUGUGAUUAAUUUGGUUG UCA
HTT	NM_002111 .6	12235	AAUUUGGUUGUCAAGUUU UG	UGAUUAAUUUGGUUGUCAAGUUUUGGG GGU
HTT	NM_002111 .6	12279	UUUGUUUCCUGCUGGUA AU	UUGCUIUUGUUUCCUGCUGGUAUUAU CGG
HTT	NM_002111 .6	12282	GUUUUCCUGCUGGUAUA UC	CUUUUGUUUCCUGCUGGUAUAUCGG GAA
HTT	NM_002111 .6	12297	AUAUCGGGAAAGAUUUUA AU	UGGUAAUAUCGGGAAAGAUUUUAAUGA AAC
HTT	NM_002111 .6	12309	AUUUUAAUGAAACCAGGG UA	GAAAGAUUUUAAUGAAACCAGGGUAGA AUU
HTT	NM_002111 .6	12313	UAAUGAAACCAGGGUAGA AU	GAUUUUAAUGAAACCAGGGUAGAAUUG UUU
HTT	NM_002111 .6	12331	AUUGUUUGCAAUGCACU GA	GUAGAAUUGUUUGCAAUGCACUGAAG CGU
HTT	NM_002111 .6	13136	OCOCUCAGUUGUUUCUAA GA	GCCUCCCCUCAGUUGUUUCUAAGAGC AGA
HTT	NM_002111 .6	13398	GGACUGACGAGAGAUGUA UA	GGGAAGGACUGACGAGAGAUGUAUAUU UAA

ES 2 808 750 T3

GCUGCCGGGA	Número de acceso	Posición	Región de direccionamiento (20 mer)	Región de direccionamiento (30 mer)
HTT	NM_002111.6	13403	GACGAGAGAUGUAUAUUUAA	GGACUGACGAGAGAUGUAUAUUUAAUUUUU
HTT	NM_002111.6	13423	UUUUUUAACUGCUGCAACA	UUUAAUUUUUUAACUGCUGCAACAUAUGUA
HTT	NM_002111.6	13428	UACUGCUGCAACAUAUGUA	UUUUUUAACUGCUGCAACAUAUGUACAUCC
HTT	NM_002111.6	152	ACCCUGGAAAAGCUGAUGAA	UGGCGACCCUGGAAAAGCUGAUGAAGGCCU
HTT	NM_002111.6	170	AAGGCCUUCGAGUCCUCAA	UGAUGAAGGCCUUCGAGUCCUCAAGUCCU
HTT	NM_002111.6	402	CGCUGCACCGACCAAAGAA	GGAGCCGUGCACCGACCAAAGAAAGAAACU
HTT	NM_002111.6	420	AAGAACUUUCAGCUACCAAG	AAAGAAAGAACUUUCAGCUACCAAGAAAGA
HTT	NM_002111.6	430	AGCUACCAAGAAAGACCGUG	CUUUCAGCUACCAAGAAAGACCGUGUGAAU
HTT	NM_002111.6	446	CGUGUGAAUCAUUGUCUGAC	AAGACCGUGUGAAUCAUUGUCUGACAAUAU
HTT	NM_002111.6	454	UCAUUGUCUGACAAUAUGUG	GUGAAUCAUUGUCUGACAAUAUGUGAAUAAAC
HTT	NM_002111.6	462	UGACAAUAUGUGAAAACAUA	UUGUCUGACAAUAUGUGAAAACAUAUGUGGGC
HTT	NM_002111.6	467	AUAUGUGAAAACAUAUGUGGC	UGACAAUAUGUGAAAACAUAUGUGGCACAGU
HTT	NM_002111.6	211	GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG

IV. Diseño de ARNip

También se describe en la presente memoria que los ARNip se diseñan de la siguiente forma. Primero, una porción del gen diana (p. ej., el gen *htt*), p. ej., una o más de las secuencias diana establecidas en la Figura 8, se selecciona, p. ej., 10150, 10146 y/o 10125 de la región no traducida hacia 5' de un gen diana. La escisión del ARNm en estos sitios debería eliminar la traducción de la proteína mutante correspondiente. Las cadenas de sentido se diseñaron en función de la secuencia diana. (Ver la Figura 8). Preferiblemente, la porción (y la cadena de sentido correspondiente) incluye aproximadamente 19 a 25 nucleótidos, p. ej., 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos. Más preferiblemente, la porción (y la cadena de sentido correspondiente) incluye 21, 22 o 23 nucleótidos. El experto en la técnica apreciará, sin embargo, que los ARNip que tienen una longitud de menos de 19 nucleótidos o más de 25 nucleótidos también pueden funcionar para mediar la iARN. Por consiguiente, los ARNip de dicha longitud también se describen en la presente memoria siempre que conserven la capacidad de mediar la iARN. Los agentes de iARN más largos han demostrado desencadenar una respuesta de interferón o PKR en ciertas células de mamífero que puede ser indeseable. Preferiblemente, los agentes de iARN como se describen en la presente memoria no desencadenan una respuesta PKR (es decir, tienen una longitud suficientemente corta). Sin embargo, agentes de iARN más largos pueden ser útiles, por ejemplo, en tipos de células incapaces de generar una respuesta PRK o en situaciones donde la respuesta PKR se ha reducido o atenuado por medios alternativos.

La secuencia de cadena de sentido se diseña de tal manera que la secuencia diana está esencialmente en el medio de la cadena. Mover la secuencia diana a una posición fuera del centro, en algunas instancias, puede reducir la eficacia de la escisión mediante el ARNip. Dichas composiciones, es decir, composiciones menos eficientes, pueden ser deseables para uso si se detecta un silenciamiento colateral del ARNm natural.

- 5 La cadena de antisentido tiene habitualmente la misma longitud que la cadena de sentido e incluye nucleótidos complementarios. En una realización, las cadenas son completamente complementarias, es decir, las cadenas tienen extremos romos cuando se alinean o aparean. En otra realización, las cadenas comprenden alineación o apareamiento de manera que se generan prolongaciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7-nucleótidos, es decir, el extremo hacia 3' de la cadena de sentido se extiende 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos más que el extremo hacia 5' de la cadena de antisentido y/o el extremo hacia 3' de la cadena de antisentido se extiende 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos más que el extremo hacia 5' de la cadena de sentido. Las prolongaciones pueden comprender (o consistir en) nucleótidos correspondientes a la secuencia del gen diana (o complemento de esta). Alternativamente, las prolongaciones pueden comprender (o consistir en) desoxirribonucleótidos, por ejemplo, dT, o análogos de nucleótidos, u otro material no nucleotídico adecuado.
- 10
- 15 Para facilitar el ingreso de la cadena de antisentido en el RISC (y, por lo tanto, aumentar o mejorar la eficacia de la escisión y el silenciamiento de la diana), se puede alterar la resistencia de par de bases entre el extremo hacia 5' de la cadena de sentido y el extremo hacia 3' de la cadena de antisentido, p. ej., disminuir o reducir, como se describe en detalle en las patentes estadounidenses núms. 7.459.547, 7.772.203 y 7.732.593, titulada "Methods and Compositions for Controlling Efficacy of RNA Silencing" (presentada el 2 de junio de 2003) y las patentes estadounidenses núms. 8.309.704, 7.750.144, 8.304.530, 8.329.892 y 8.309.705, titulada "Methods and Compositions for Enhancing the Efficacy and Specificity of RNAi" (presentada el 2 de junio de 2003). También se describe en la presente memoria que la resistencia del par de bases es menor debido a menos pares de bases G:C entre el extremo hacia 5' de la primera cadena o de antisentido y el extremo hacia 3' de la segunda cadena o de sentido que entre el extremo hacia 3' de la primera cadena o de antisentido y el extremo hacia 5' de la segunda cadena o de sentido. También se describe en la presente memoria que la resistencia del par de bases es menor debido a al menos un par de bases malapareado entre el extremo hacia 5' de la primera cadena o de antisentido y el extremo hacia 3' de la segunda cadena o de sentido. También se describe en la presente memoria que el par de bases malapareado se selecciona del grupo que consiste en G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C y U:U. También se describe en la presente memoria que la resistencia del par de bases es menor debido a al menos un par de bases inestable, p. ej., G:U, entre el extremo hacia 5' de la primera cadena o de antisentido y el extremo hacia 3' de la segunda cadena o de sentido. También se describe en la presente memoria que la resistencia del par de bases es menor debido a al menos un par de bases que comprende un nucleótido raro, p. ej., inosina (I). También se describe en la presente memoria que el par de bases se selecciona del grupo que consiste en I:A, I:U e I:C. También se describe en la presente memoria que la resistencia del par de bases es menor debido a al menos un par de bases que comprende un nucleótido modificado. En ciertas realizaciones ilustrativas, el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en 2-amino-G, 2-amino-A, 2,6-diamino-G y 2,6-diamino-A.
- 20
- 25
- 30
- 35

El diseño de ARNip adecuados para dirigirse a las secuencias diana de *htt* establecidas en la Figura 8 se describe en mayor detalle a continuación. Los ARNip se pueden diseñar según las enseñanzas ilustrativas indicadas anteriormente para cualesquiera otras secuencias diana que se encuentran en el gen *htt*. Además, la tecnología se puede aplicar para el direccionamiento hacia cualesquiera otras secuencias diana, p. ej., secuencias diana que no causan enfermedad.

40

Para validar la eficacia con la cual los ARNip destruyen los ARNm (p. ej., ARNm de huntingtina), el ARNip se puede incubar con ADNc (p. ej., ADNc de huntingtina) en un sistema de expresión de ARNm basado en *Drosophila in vitro*. Los ARNm recientemente sintetizados (p. ej., ARNm de huntingtina), radioetiquetados con ³²P, se detectan autorradiográficamente en un gel de agarosa. La presencia de ARNm escindido indica la actividad de nucleasa de ARNm. Los testigos adecuados incluyen la omisión del ARNip. Alternativamente, se seleccionan ARNip testigo que tienen la misma composición de nucleótidos que el ARNip seleccionado, pero sin la complementariedad de secuencia significativa con respecto al gen diana apropiado. Dichos testigos negativos se pueden diseñar al combinar aleatoriamente la secuencia de nucleótidos del ARNip seleccionado; se puede llevar a cabo una búsqueda de homología para garantizar que el testigo negativo carece de homología con respecto a cualquier otro gen en el genoma apropiado. Además, los ARNip testigos negativos se pueden diseñar mediante la introducción de uno o más malapareamientos de bases en la secuencia.

45

50

Los sitios de complementación ARNip-ARNm se seleccionan para que generen una especificidad de ARNm óptima y la máxima escisión del ARNm.

55 Aunque la presente invención presenta principalmente el direccionamiento hacia secuencias diana específicas de un gen (p. ej., en *htt*) distintas de la mutación de región CAG expandida, el experto en la técnica apreciará que el direccionamiento hacia la región mutante puede tener aplicabilidad como estrategia terapéutica en ciertas situaciones. El direccionamiento hacia la región mutante se puede lograr al usar el ARNip que complementa a CAG en serie. El ARNip^{CAG} se uniría a ARNm con complementación de CAG, pero se podría esperar que tuviera mayor oportunidad de

unirse a una serie de CAG extendida. Múltiples ARNip^{CAG} se unirían al ARNm de huntingtina mutante (en oposición a menos para el ARNm de huntingtina natural); por lo tanto, hay mayor probabilidad de que se escinda el ARNm de huntingtina mutante. La inactivación del ARNm satisfactoria mediante el uso de esta estrategia también eliminaría el ARNm de huntingtina normal o natural. También se podrían inactivar, al menos en alguna medida, otros genes normales (aproximadamente 70) que también tienen repeticiones CAG, donde sus ARNm podrían interactuar con el ARNip. Por lo tanto, esta estrategia dependería de una estrategia de desgaste, se destruiría más ARNm de huntingtina mutante que ARNm de huntingtina natural o los otros aproximadamente 69 ARNm que codifican poliglutaminas.

V. Agentes de iARN

También se describen en la presente memoria moléculas de ARNip diseñadas, por ejemplo, según se describió anteriormente. Las moléculas de ARNip, según se describieron en la presente memoria, se pueden sintetizar químicamente, o se pueden transcribir *in vitro* a partir de una plantilla de ADN, o *in vivo* a partir de, p. ej., ARNhc, o mediante el uso de la enzima DICER humana recombinante, para escindir las plantillas de ARNhc transcritas *in vitro* en concentraciones de ARN de estructura doble de 20, 21 o 23 bp que mediante la iARN. Las moléculas de ARNip se pueden diseñar mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica.

También se describe en la presente memoria que en lugar de que el agente de iARN sea un ácido ribonucleico interferente, p. ej., un ARNip o ARNhc, según se describieron anteriormente, el agente de iARN pueda codificar un ácido ribonucleico interferente, p. ej., un ARNhc, según se describió anteriormente. En otras palabras, el agente de iARN puede ser una plantilla de transcripción del ácido ribonucleico interferente. Por lo tanto, los agentes de iARN como se describen en la presente memoria también pueden incluir ARN horquillados cortos (ARNhc) y construcciones de expresión genomanipuladas para expresar los ARNhc. La transcripción de los ARNhc se inicia en un promotor de polimerasa III (pol III) y se cree que se termina en la posición 2 de un sitio de terminación de la transcripción 4-5-timina. Después de la expresión, se cree que los ARNhc se pliegan en una estructura de tallo-bucle con prolongaciones de UU hacia 3'; posteriormente, los extremos de estos ARNhc se procesan y los ARNhc se convierten en moléculas similares a ARNip de aproximadamente 21-23 nucleótidos (Brummelkamp et al., 2002; Lee et al., 2002, *Supra*; Miyagishi et al., 2002; Paddison et al., 2002, *supra*; Paul et al., 2002, *supra*; Sui et al., 2002 *supra*; Yu et al., 2002, *supra*. Se puede encontrar más información sobre el diseño y uso de ARNhc en internet en las siguientes direcciones: katandin.cshl.org:9331/RNAi/docs/BseRI-BamHI_Strategy.pdf y katandin.cshl.org:9331/RNAi/docs/Web_version_of_PCR-strategy1.pdf).

Las construcciones de expresión, como se describen en la presente memoria, incluyen cualquier construcción adecuada para su uso en el sistema de expresión apropiado e incluyen, pero no se limitan a, vectores retrovíricos, casetes de expresión lineal, plásmidos y vectores víricos o derivados víricamente, como se conocen en la técnica. Dichas construcciones de expresión pueden incluir uno o más promotores inducibles, sistemas de promotor de ARN Pol III tales como los promotores de ARNnp U6 o promotores HI ARN polimerasa III u otros promotores conocidos en la técnica. Las construcciones pueden incluir una o ambas cadenas del ARNip. Las construcciones de expresión que expresan ambas cadenas también pueden incluir estructuras de bucle que enlazan ambas cadenas, o cada cadena se puede transcribir por separado a partir de promotores separados dentro de la misma construcción. Cada cadena también se puede transcribir a partir de una construcción de expresión separada. (Tuschl, T., 2002, *Supra*).

Los ARNip sintéticos se pueden suministrar a células mediante métodos conocidos en la técnica, incluida transfección por liposoma catiónico y electroporación. Para obtener una supresión a largo plazo de los genes diana (es decir, genes *htt*) y facilitar el suministro en ciertas circunstancias, uno o más ARNip se pueden expresar dentro de células a partir de construcciones de ADN recombinantes. Dichos métodos para expresar estructuras dobles de ARNip dentro de células a partir de construcciones de ADN recombinantes para permitir la supresión a largo plazo del gen diana en células se conocen en la técnica, incluidos los sistemas del promotor Pol III en mamíferos (p. ej., los sistemas del promotor H1 o U6/ARNnp (Tuschl, T., 2002, *Supra*) capaces de expresar ARNip bicatenarios funcionales; (Bagella et al., 1998; Lee et al., 2002, *supra*; Miyagishi et al., 2002, *supra*; Paul et al., 2002, *supra*; Yu et al., 2002), *supra*; Sui et al., 2002, *supra*). La terminación de la transcripción mediante ARN Pol III se produce en extensiones de cuatro residuos T consecutivos en la plantilla de ADN, que proporciona un mecanismo para terminar el transcrito de ARNip en una secuencia específica. El ARNip es complementario a la secuencia del gen diana en las orientaciones 5'-3' y 3'-5', y las dos cadenas del ARNip se pueden expresar en la misma construcción o en construcciones separadas. Los ARNip horquillados, impulsados por el promotor de ARNnp HI o U6 y expresados en células, pueden inhibir la expresión del gen diana (Bagella et al., 1998; Lee et al., 2002, *supra*; Miyagishi et al., 2002, *supra*; Paul et al., 2002, *supra*; Yu et al., 2002), *supra*; Sui et al., 2002, *supra*). Las construcciones que contienen la secuencia de ARNip bajo el control de promotor T7 también producen ARNip funcionales cuando se cotransfectan en las células con un vector que expresa ARN polimerasa T7 (Jacque et al., 2002, *supra*). Una construcción simple puede contener múltiples secuencias que codifican ARNip, tales como múltiples regiones del gen que codifica *htt*, dirigidas al mismo gen o múltiples genes, y se pueden impulsar, por ejemplo, mediante sitios de promotor PolIII separados.

Las células animales expresan una gama de ARN no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos denominados micro ARN (miARN) que pueden regular la expresión génica a nivel postranscripcional o a nivel de traducción durante el desarrollo animal. Un rasgo común de los miARN es que todos se escinden de un ARN de tallo-bucle precursor de

aproximadamente 70 nucleótidos, probablemente mediante Dicer, una enzima de tipo RNasa III o un homólogo de esta. Al sustituir las secuencias tallo del precursor de miARN con una secuencia complementaria al ARNm diana, se puede usar una construcción de vector que expresa el precursor genomanipulado para producir ARNip para iniciar la iARN contra dianas de ARNm específicas en células de mamífero (Zeng et al., 2002, supra). Cuando se expresa mediante vectores de ADN que contienen promotores de polimerasa III, los micro ARN diseñados como horquillas pueden silenciar la expresión génica (McManus et al., 2002, supra). Los polimorfismos dirigidos a micro ARN también pueden ser útiles para bloquear la traducción de proteínas mutantes, en ausencia del silenciamiento génico mediado por ARNip. Dichas aplicaciones pueden ser útiles en situaciones, por ejemplo, donde un ARNip diseñado causa silenciamiento colateral de la proteína natural.

Los mecanismos de suministro mediados por virus también se pueden usar para inducir el silenciamiento específico de genes diana a través de la expresión de ARNip, por ejemplo, al generar adenovirus recombinantes que alojan el ARNip bajo el control de la transcripción por parte del promotor de ARN Pol II (Xia et al., 2002, supra). La infección de células HeLa mediante estos adenovirus recombinantes permite una expresión génica diana endógena disminuida. La inyección de los vectores de adenovirus recombinantes en ratones transgénicos que expresan los genes diana del ARNip provoca la reducción *in vivo* de la expresión del gen diana. *Id.* En un modelo animal, la electroporación del embrión entero puede suministrar de manera eficaz ARNip sintético en embriones de ratón después de la implantación (Calegari et al., 2002). En ratones adultos, el suministro eficiente de ARNip se puede lograr mediante una técnica de suministro de "alta presión", una inyección rápida (en 5 segundos) de un gran volumen de disolución que contiene ARNip en un animal a través de la vena de la cola (Liu et al., 1999, supra; McCaffrey et al., 2002, supra; Lewis et al., 2002). También se pueden usar nanopartículas y liposomas para suministrar el ARNip a animales. En ciertas realizaciones ilustrativas, los virus adenoasociados recombinantes (VAAr) y sus vectores asociados se pueden usar para suministrar uno o más ARNip a células, p. ej., células neurales (p. ej., células del cerebro) (Solicitudes de patente estadounidense 2014/0296486, 2010/0186103, 2008/0269149, 2006/0078542 y 2005/0220766).

Las composiciones de ácido nucleico como se describen en la presente memoria incluyen ARNip no modificado y ARNip modificado como se conocen en la técnica, tal como derivados de ARNip reticulados o derivados que no tienen restos nucleotídicos enlazados, por ejemplo, en sus extremos hacia 3' o 5'. Los derivados de ARNip modificadores de este modo pueden mejorar la captación celular o potenciar actividades de direccionamiento celulares del derivado de ARNip resultante en comparación con el ARNip correspondiente, son útiles para rastrear el derivado de ARNip en la célula, o mejorar la estabilidad del derivado de ARNip en comparación con el ARNip correspondiente.

Los precursores de ARN genomanipulados, introducidos en células u organismos enteros como se describe en la presente memoria, llevarán a la producción de una molécula de ARNip deseada. Dicha molécula de ARNip después se asociará a los componentes de la proteína endógena de la vía de iARN para unirse y dirigirse a una secuencia de ARNm específica para la escisión y destrucción. De este modo, el ARNm que será diana del ARNip generado a partir del ARN precursor genomanipulado se agotará en la célula u organismo, lo que llevará a una disminución en la concentración de la proteína codificada por dicho ARNm en la célula u organismo. Los precursores de ARN son típicamente moléculas de ácido nucleico que codifican individualmente una cadena de un ARNbc o codifican la secuencia de nucleótidos entera de una estructura de horquilla bucle de ARN.

Las composiciones de ácido nucleico como se describen en la presente memoria pueden estar no conjugadas o conjugadas con otro resto, tal como una nanopartícula, para potenciar una propiedad de las composiciones, p. ej., un parámetro farmacocinético como la absorción, eficacia, biodisponibilidad y/o semivida. La conjugación se puede lograr mediante métodos conocidos en la técnica, p. ej., al usar los métodos de Lambert et al., *Drug Deliv. Rev.*: 47(1), 99-112 (2001) (describe ácidos nucleicos cargados en nanopartículas de polialquiliacianoacrilato (PACA)); Fattal et al., *J. Control Release* 53(1-3):137-43 (1998) (describe ácidos nucleicos unidos a nanopartículas); Schwab et al., *Ann. Oncol. Suppl.* 4:55-8 (1994) (describe ácidos nucleicos enlazados a agentes intercalantes, grupos hidrófobos, policationes o nanopartículas PACA); y Godard et al., *Eur. J. Biochem.* 232(2):404-10 (1995) (describe ácidos nucleicos enlazados a nanopartículas).

Las moléculas de ácido nucleico como se describen en la presente memoria también se pueden etiquetar al usar cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las composiciones de ácido nucleico se pueden etiquetar con un fluoróforo, p. ej., Cy3, fluoresceína o rodamina. El etiquetado se puede llevar a cabo al usar un kit, p. ej., el kit de etiquetado de ARNip SILENCER™ (Ambion). Además, el ARNip se puede radioetiquetar, p. ej., al usar ³H, ³²P u otro isótopo apropiado.

Además, debido a que se cree que la iARN progresa a través de al menos un intermediario de ARN monocatenario, el experto en la técnica apreciará que también se pueden diseñar (p. ej., para síntesis química), generar (p. ej., enzimáticamente generados) o expresar (p. ej., a partir de un vector o plásmido) ARNip-mc (p. ej., la cadena de antisentido de un ARNip-bc) como se describen en la presente memoria y usar según las metodologías reivindicadas. Además, en invertebrados, la iARN se puede desencadenar de manera eficaz mediante ARNbc largos (p. ej., ARNbc de aproximadamente 100-1000 nucleótidos de longitud, preferiblemente, aproximadamente 200-500, por ejemplo, aproximadamente 250, 300, 350, 400 o 450 nucleótidos de longitud) que actúan como efectores de iARN. (Brondani et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Dec. 4; 98(25):14428-33. Epub 2001 Nov. 27.)

VI. Agente de silenciamiento por ARN anti-Htt

La presente invención presenta agentes de silenciamiento por ARN anti-huntingtina (p. ej., ARNip y ARNhc), métodos para producir dichos agentes de silenciamiento por ARN y métodos (p. ej., métodos de investigación y/o terapéuticos) para usar dichos agentes de silenciamiento por ARN mejorados (o porciones de estos) para el silenciamiento por ARN de la proteína huntingtina (p. ej., proteína huntingtina mutante). Los agentes de silenciamiento por ARN comprenden una cadena de antisentido (o porciones de esta), en donde la cadena de antisentido tiene suficiente complementariedad con respecto a un polimorfismo mononucleotídico heterocigótico para mediar el mecanismo de silenciamiento mediado por ARN (p. ej., iARN).

5 En ciertas realizaciones, se proporcionan compuestos de ARNip que tienen una o cualquier combinación de las siguientes propiedades: (1) completamente estabilizados químicamente (es decir, sin residuos 2'-OH no modificados); (2) asimetría; (3) estructuras dobles de 11-16 pares de bases; (4) patrón alternante de nucleótidos modificados químicamente (p. ej., modificaciones 2'-fluoro y 2'-metoxi); y (5) colas completamente modificadas por fosforotioato, monocatenarias, de 5-8 bases. La cantidad de modificaciones por fosforotioato modificaciones es esencial. Esta cantidad varía de 6 a 17 en total en diferentes realizaciones.

10 En ciertas realizaciones, los compuestos de ARNip descritos en la presente memoria se pueden conjugar con una variedad de agentes de direccionamiento, que incluyen, pero no se limitan a, colesterol, DHA, feniltropanos, cortisol, vitamina A, vitamina D, GalNac y gangliozidas. La versión modificada por colesterol mostró una mejora de 5-10 veces en la eficacia in vitro con respecto a patrones de estabilización química usados anteriormente (p. ej., en donde todas las purinas, pero no las pirimidinas, están modificadas) en una amplia gama de tipos celulares (p. ej., HeLa, neuronas, hepatocitos, trofoblastos).

15 Ciertos compuestos como se describen en la presente memoria que tienen las propiedades estructurales descritas anteriormente y en la presente memoria pueden denominarse "ARNiph-ASP" (ARN interferente pequeño, modificado hidrófobamente, con un patrón de estabilización avanzado). Además, este patrón ARNiph-ASP exhibió una distribución considerablemente mejorada en el cerebro, médula espinal, suministro al hígado, placenta, riñón, bazo y varios otros tejidos, lo que lo vuelve accesible para intervención terapéutica.

20 En el hígado, el suministro de ARNiph-ASP específicamente a células endoteliales y de kupper, pero no a hepatocitos, lo vuelve a este patrón de modificación química en complementario en lugar de una tecnología competitiva para los conjugados de GalNac.

25 Los compuestos como se describen en la presente memoria se pueden describir en los siguientes aspectos y realizaciones.

30 En un primer aspecto, se proporciona en la presente memoria un oligonucleótido de al menos 16 nucleótidos contiguos, dicho oligonucleótido tiene un extremo hacia 5', un extremo hacia 3' y complementariedad con respecto a una diana, en donde: (1) el oligonucleótido comprende 2'-metoxi-ribonucleótidos y 2'-fluoro-ribonucleótidos alternantes; (2) los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 desde el extremo hacia 5' no son 2'-metoxi-ribonucleotidós; (3) los nucleótidos están conectados a través de enlaces fosfodiéster o fosforotioato; y (4) los nucleótidos en las posiciones 1-6 desde el extremo hacia 3', o las posiciones 1-7 desde el extremo hacia 3' están conectadas a nucleótidos adyacentes a través de enlaces fosforotioato.

35 En un segundo aspecto, en la presente memoria se proporciona un ácido nucleico bicatenario, químicamente modificado, que comprende un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido, en donde: (1) el primer oligonucleótido es un oligonucleótido descrito en la presente memoria (p. ej., que comprende las SEQ ID NOs: 1, 2, 3 o 4); (2) una porción del primer oligonucleótido es complementaria a una porción del segundo oligonucleótido; (3) el segundo oligonucleótido comprende 2'-metoxi-ribonucleótidos y 2'-fluoro-ribonucleótidos alternantes; (4) los nucleótidos en las posiciones 2 y 14 desde el extremo hacia 3' del segundo oligonucleótido son 2'-metoxi-ribonucleotidós; y (5) los nucleótidos del segundo oligonucleótido están conectados a través de enlaces fosfodiéster o fosforotioato.

40 En un tercer aspecto, en la presente memoria se proporciona un oligonucleótido que tiene las estructuras:

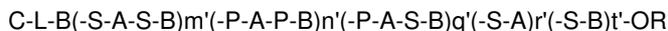


45 en donde: X es un grupo fosfato hacia 5'; A, para cada aparición, independientemente es un 2'-metoxi-ribonucleótido; B, para cada aparición, independientemente es un 2'-fluoro-ribonucleótido; L, para cada aparición independientemente es un enlazador fosfodiéster o fosforotioato; S es un enlazador fosforotioato; y R se selecciona de hidrógeno y un grupo protector (p. ej., un acilo tal como acetilo); j es 4, 5, 6 o 7; r es 2 o 3; y t es 0 o 1.

50 En un cuarto aspecto, en la presente memoria se proporciona un ácido nucleico bicatenario, químicamente modificado, que comprende un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido, en donde: (1) el primer oligonucleótido se

selecciona de los oligonucleótidos del tercer aspecto; (2) una porción del primer oligonucleótido es complementaria a una porción del segundo oligonucleótido; y (3)

el segundo oligonucleótido tiene la estructura:



5 en donde: C es una molécula hidrófoba; A, para cada aparición, independientemente es un 2'-metoxi-ribonucleótido; B, para cada aparición, independientemente es un 2'-fluoro-ribonucleótido; L es un enlazador que comprende una o más restos seleccionados del grupo que consiste en: 0-4 unidades de repetición de etilenglicol, un fosfodiéster y un fosforotioato; S es un enlazador fosforotioato; P es un enlazador fosfodiéster; R se selecciona de hidrógeno y un grupo protector (p. ej., un acilo tal como acetilo); m' es 0 o 1; n' es 4, 5 o 6; q' es 0 o 1; r' es 0 o 1; y t' es 0 o 1.

10 a) Diseño de moléculas de ARNip anti-Htt

Una molécula de ARNip como se describe en la presente memoria es una estructura doble que consiste en una cadena de sentido y una cadena de antisentido complementaria, la cadena de antisentido tiene suficiente complementariedad con respecto a un ARNm de htt para mediar la iARN. Preferiblemente, la molécula de ARNip tiene una longitud de aproximadamente 10-50 o más nucleótidos, es decir, cada cadena comprende 10-50 nucleótidos (o análogos de nucleótidos). Más preferiblemente, la molécula de ARNip tiene una longitud de aproximadamente 16-30, p. ej., 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos en cada cadena, en donde una de las cadenas es suficientemente complementaria a una región diana. Preferiblemente, las cadenas se alinean de manera que hay al menos 1, 2 o 3 bases en el extremo de las cadenas que no se alinean (es decir, para las cuales no hay bases complementarias en la cadena opuesta) de manera que se produce una prolongación de 1, 2 o 3 residuos en uno o ambos extremos de la estructura doble cuando las cadenas se aparean. Preferiblemente, la molécula de ARNip tiene una longitud de aproximadamente 10-50 o más nucleótidos, es decir, cada cadena comprende 10-50 nucleótidos (o análogos de nucleótidos). Más preferiblemente, la molécula de ARNip tiene una longitud de aproximadamente 16-30, p. ej., 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos en cada cadena, en donde una de las cadenas es suficientemente complementaria a una secuencia diana y la otra cadena es idéntica o sustancialmente idéntica a la primera cadena.

Generalmente, los ARNip se pueden diseñar mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante el uso del siguiente protocolo:

1. El ARNip debería ser específico para una secuencia diana, p. ej., una secuencia diana establecida en la Figura 8. También se describe en la presente memoria que una secuencia diana se encuentra en un alelo de huntingtina (htt) mutante, pero no en un alelo de huntingtina natural. También se describe en la presente memoria que una secuencia diana se encuentra tanto en un alelo de huntingtina (htt) mutante como en un alelo de huntingtina natural. También se describe en la presente memoria que una secuencia diana se encuentra en un alelo de huntingtina natural. La primera cadena debería ser complementaria a la secuencia diana y la otra cadena es sustancialmente complementaria a la primera cadena. (Ver en la Figura 8 cadenas de sentido y de antisentido ilustrativas). También se describe en la presente memoria que la secuencia diana está fuera de la repetición CAG expandida del alelo de huntingtina (htt) mutante. También se describe en la presente memoria que la secuencia diana está fuera de una región codificante del gen diana. Las secuencias diana ilustrativas se seleccionan de la región no traducida hacia 5' (5'-UTR) de un gen diana. La escisión del ARNm en estos sitios debería eliminar la traducción de la proteína mutante correspondiente. Las secuencias diana de otras regiones del gen htt son también adecuadas para direccionamiento. Una cadena de sentido se diseña en función de la secuencia diana. Además, los ARNip con contenido de G/C bajo (35-55 %) pueden ser más activos que aquellos con un contenido de G/C mayor que 55 %. También se describen en la presente memoria moléculas de ácido nucleico que tienen un contenido de G/C de 35-55 %.

2. La cadena de sentido del ARNip se diseña en función de la secuencia del sitio diana seleccionado. Preferiblemente, la cadena de sentido incluye aproximadamente 19 a 25 nucleótidos, p. ej., 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos. Más preferiblemente, la cadena de sentido incluye 21, 22 o 23 nucleótidos. El experto en la técnica apreciará, sin embargo, que los ARNip que tienen una longitud de menos de 19 nucleótidos o más de 25 nucleótidos también pueden funcionar para mediar la iARN. Por consiguiente, los ARNip de dicha longitud también se describen en la presente memoria siempre que conserven la capacidad de mediar la iARN. Los agentes de silenciamiento por ARN más largos han demostrado desencadenar una respuesta de interferón o proteína cinasa R (PKR, por sus siglas en inglés) en ciertas células de mamífero que puede ser indeseable. Preferiblemente, los agentes de silenciamiento por ARN como se describen en la presente memoria no desencadenan una respuesta PKR (es decir, tienen una longitud suficientemente corta). Sin embargo, los agentes de silenciamiento por ARN más largos pueden ser útiles, por ejemplo, en tipos de células incapaces de generar una respuesta PRK o en situaciones donde la respuesta PKR se ha reducido o atenuado por medios alternativos.

55 Las moléculas de ARNip como se describen en la presente memoria tienen suficiente complementariedad con la secuencia diana de manera que el ARNip puede mediar la iARN. En general, se prefieren secuencias de nucleótidos que contienen el ARNip suficientemente idénticas a una porción de secuencia diana del gen diana para provocar la

escisión mediada por RISC del gen diana. Por consiguiente, también se describe en la presente memoria que la cadena de sentido del ARNip se diseña para tener una secuencia suficientemente idéntica a una porción de la diana. Por ejemplo, la cadena de sentido puede tener 100 % de identidad con respecto al sitio diana. Sin embargo, no se requiere el 100 % de identidad. Se prefiere más de 80 % de identidad, p. ej., 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso 100 % de identidad, entre la cadena de sentido y la secuencia de ARN diana. Como se describe en la presente memoria, es la ventaja de ser capaz de tolerar ciertas variaciones de secuencia para potenciar la eficacia y la especificidad de la iARN. También se describe en la presente memoria que la cadena de sentido tiene 4, 3, 2, 1, o 0 nucleótido(s) malapareado(s) con una región diana, tal como una región diana que difiere en al menos un par de bases entre un alelo natural y mutante, p. ej., una región diana que comprende la mutación de ganancia funcional y la otra cadena es idéntica o sustancialmente idéntica a la primera cadena. Además, las secuencias de ARNip con pequeñas inserciones o eliminaciones de 1 o 2 nucleótidos puede ser también eficaz para mediar la iARN. Alternativamente, las secuencias de ARNip con sustituciones o inserciones de análogos de nucleótidos pueden ser eficaces para la inhibición.

La identidad de secuencia se puede determinar mediante la comparación de secuencias y algoritmos de alineación conocidos en la técnica. Para determinar el porcentaje identidad de dos secuencias de ácido nucleico (o de dos secuencias de aminoácidos), las secuencias se alinean para una comparación óptima (p. ej., se pueden introducir espacios en la primera secuencia o segunda secuencia para una alineación óptima). A continuación, se comparan nucleótidos (o residuos aminoácidos) en las posiciones de nucleótido (o aminoácido) correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en dicha posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = cantidad de posiciones idénticas / cantidad total de posiciones x 100), opcionalmente se penaliza la puntuación por la cantidad de espacios introducidos y/o la longitud de los espacios introducidos.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr al usar un algoritmo matemático. En una realización, la alineación generada en una cierta porción de la secuencia alineada tiene suficiente identidad, pero no en porciones que tienen bajo grado de identidad (es decir, una alineación local). Un ejemplo no limitante, preferido de un algoritmo de alineación local usado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77. Dicho algoritmo está incorporado en los programas BLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10.

También se describe en la presente memoria que la alineación se optimiza al introducir espacios apropiados y el porcentaje de identidad se determina a lo largo de la longitud de las secuencias alineadas (es decir, una alineación con espacios). Para obtener alineaciones con espacios para comparación, se puede usar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. También se describe en la presente memoria que la alineación se optimiza al introducir espacios apropiados y el porcentaje de identidad se determina a lo largo de toda la longitud de las secuencias alineadas (es decir, una alineación global). Un ejemplo no limitante, preferido de un algoritmo matemático usado para la comparación global de secuencias es el algoritmo de Myers and Miller, CABIOS (1989). Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de programa informático de alineación de secuencia GCG. Cuando se usa el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de peso de residuo PAM120, una penalización por longitud de espacio de 12 y una penalización por espacio de 4.

3. La cadena de antisentido o guía del ARNip tiene habitualmente la misma longitud que la cadena de sentido e incluye nucleótidos complementarios. En una realización, las cadenas guía y de sentido son completamente complementarias, es decir, las cadenas tienen extremos romos cuando se alinean o aparean. En otra realización, las cadenas del ARNip se pueden aparear de tal manera que tengan una prolongación hacia 3' de 1 a 7 (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6 o 7), o 1 a 4, p. ej., 2, 3 o 4 nucleótidos. Las prolongaciones pueden comprender (o consistir en) nucleótidos correspondientes a la secuencia del gen diana (o complemento de esta). Alternativamente, las prolongaciones pueden comprender (o consistir en) desoxirribonucleótidos, por ejemplo, dT, o análogos de nucleótidos, u otro material no nucleotídico adecuado. Por lo tanto, en otra realización, las moléculas de ácido nucleico pueden tener una prolongación hacia 3' de 2 nucleótidos, tal como TT. Los nucleótidos de la prolongación pueden ser ARN o ADN. Como se indicó anteriormente, es deseable elegir una región diana en donde el malapareamiento mutante:natural es un malapareamiento purina:purina.

4. Al usar cualquier método conocido en la técnica, se comparan las posibles dianas con la base de datos del genoma apropiado (humano, ratón, rata, etc.) y se eliminan cualesquiera secuencias diana con homología significativa con respecto a otras secuencias codificantes. Uno de dichos métodos para búsqueda de homología de secuencia se conoce como BLAST, que está disponible en el sitio web del National Center for Biotechnology Information.

5. Se seleccionan una o más secuencias que satisfacen los criterios para la evaluación.

Se puede encontrar más información general sobre el diseño y uso de ARNip en "The siRNA User Guide", disponible en el sitio web de The Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie.

Alternativamente, el ARNip se puede definir funcionalmente como una secuencia de nucleótidos (o secuencia de oligonucleótidos) que es capaz de hibridarse con la secuencia diana (p. ej., 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA, 50 °C o 70 °C para hibridación durante 12-16 horas; y posteriormente lavado). Las condiciones de hibridación preferidas adicionales incluyen hibridación a 70 °C en 1x SSC o 50 °C en 1xSSC, formamida al 50 % con posterior lavado a 70 °C en 0,3x SSC o hibridación a 70 °C en 4x SSC o 50 °C en 4x SSC, formamida al 50 % con posterior lavado a 67 °C en 1x SSC. La temperatura de hibridación para los híbridos que se anticipa que tendrán una longitud menor que 50 pares de bases debería ser 5-10 °C más baja que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, donde la T_m se determina según las siguientes ecuaciones. Para híbridos con una longitud menor que 18 pares de bases, $T_m(^{\circ}\text{C})=2(\text{cant. de bases A+T})+4(\text{cant. de bases G+C})$. Para híbridos con longitud entre 18 y 49 pares de bases, $T_m(^{\circ}\text{C})=81,5+16,6(\log 10[\text{Na}^+])+0,41(\% \text{ G+C})-(600/\text{N})$, donde N es la cantidad de bases en el híbrido y $[\text{Na}^+]$ es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación ($[\text{Na}^+]$ para 1x SSC=0,165 M). Se proporcionan ejemplos adicionales de condiciones de rigurosidad para hibridación de polinucleótidos en Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., capítulos 9 y 11 y *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F. M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4.

Los ARNip testigos negativos deberían tener la misma composición de nucleótidos que el ARNip seleccionado, pero sin la complementariedad de secuencia significativa con respecto al genoma apropiado. Dichos testigos negativos se pueden diseñar al combinar aleatoriamente la secuencia de nucleótidos del ARNip seleccionado. Se puede llevar a cabo una búsqueda de homología para garantizar que el testigo negativo carece de homología con respecto a cualquier otro gen en el genoma apropiado. Además, los ARNip testigos negativos se pueden diseñar mediante la introducción de uno o más malapareamientos de bases en la secuencia.

6. Para validar la eficacia con la cual los ARNip destruyen los ARNm diana (p. ej., ARNm de huntingtina natural o mutante), el ARNip se puede incubar con ADNc diana (p. ej., ADNc de huntingtina) en un sistema de expresión de ARNm basado en *Drosophila in vitro*. Los ARNm diana recientemente sintetizados (p. ej., ARNm de huntingtina), radioetiquetados con ^{32}P , se detectan autorradiográficamente en un gel de agarosa. La presencia de ARNm diana escindido indica la actividad de nucleasa de ARNm. Los testigos adecuados incluyen la omisión del ARNip y el uso de ADNc no diana. Alternativamente, se seleccionan ARNip testigo que tienen la misma composición de nucleótidos que el ARNip seleccionado, pero sin la complementariedad de secuencia significativa con respecto al gen diana apropiado. Dichos testigos negativos se pueden diseñar al combinar aleatoriamente la secuencia de nucleótidos del ARNip seleccionado. Se puede llevar a cabo una búsqueda de homología para garantizar que el testigo negativo carece de homología con respecto a cualquier otro gen en el genoma apropiado. Además, los ARNip testigos negativos se pueden diseñar mediante la introducción de uno o más malapareamientos de bases en la secuencia.

Los ARNip anti-htt se pueden diseñar para dirigirse a cualquiera de las secuencias diana descritas supra. Dichos ARNip comprenden una cadena de antisentido que es suficientemente complementaria a la secuencia diana para mediar el silenciamiento de la secuencia diana. En ciertas realizaciones, el agente de silenciamiento por ARN es un ARNip.

También se describe en la presente memoria que el ARNip comprende una cadena de sentido que comprende una secuencia establecida en la Figura 8, y una cadena de antisentido que comprende una secuencia establecida en la Figura 8.

Los sitios de complementación ARNip-ARNm se seleccionan para que generen una especificidad de ARNm óptima y la máxima escisión del ARNm.

b) Moléculas similares a ARNip

Las moléculas similares a ARNip como se describen en la presente memoria tienen una secuencia (es decir, tienen una cadena que tiene una secuencia) que es "suficientemente complementaria" a una secuencia diana de un ARNm de htt para dirigir el silenciamiento del gen por iARN o represión de la traducción. Las moléculas similares a ARNip se diseñan del mismo modo que las moléculas de ARNip, pero el grado de identidad de secuencia entre la cadena de sentido y el ARN diana se aproxima al observado entre un miARN y su diana. En general, a medida que se reduce el grado de identidad de secuencia entre una secuencia de miARN y la correspondiente secuencia del gen diana, aumenta la tendencia a mediar el silenciamiento génico postranscripcional por represión de la traducción en lugar de iARN. Por lo tanto, en una realización alternativa, cuando se desea el silenciamiento génico postranscripcional mediante represión de la traducción del gen diana, la secuencia de miARN tiene complementariedad parcial con respecto a la secuencia del gen diana. En ciertas realizaciones, la secuencia de miARN tiene complementariedad parcial con respecto a una o más secuencias cortas (sitios de complementariedad) dispersadas dentro del ARNm diana (p. ej., dentro de la 3'-UTR del ARNm diana) (Hutvagner and Zamore, *Science*, 2002; Zeng et al., *Mol. Cell*, 2002; Zeng et al., *RNA*, 2003; Doench et al., *Genes & Dev.*, 2003). Dado que el mecanismo de la represión de la

traducción es cooperativo, múltiples sitios de complementariedad (p. ej., 2, 3, 4, 5 o 6) pueden ser diana en ciertas realizaciones.

La capacidad de una estructura doble similar a ARNip para mediar la iARN o la represión de la traducción se puede predecir por la distribución de nucleótidos no idénticos entre la secuencia del gen diana y la secuencia de nucleótidos del agente de silenciamiento en el sitio de complementariedad. En una realización, cuando se desea el silenciamiento del gen mediante represión de la traducción, al menos un nucleótido no idéntico está presente en la porción central del sitio de complementariedad, de manera que la estructura doble formada por la cadena guía de miARN y el ARNm diana contenga una "protuberancia" central (Doench J G et al., Genes & Dev., 2003). También se describe en la presente memoria que se introducen 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos no idénticos contiguos o no contiguos. El nucleótido no idéntico se puede seleccionar de manera que forme un par de bases inestable (p. ej., G:U) o un par de bases malapareado (G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C, U:U). En una realización preferida adicional, la "protuberancia" está centrada en las posiciones de nucleótidos 12 y 13 desde el extremo hacia 5' de la molécula de miARN.

c) Moléculas de ARN horquilladas cortas (ARNhc)

También se describen en la presente memoria ARNhc capaces de mediar el silenciamiento por ARN de una secuencia diana de htt con selectividad mejorada. A diferencia de los ARNip, los ARNhc imitan a los precursores naturales de micro ARN (miARN) e ingresan al comienzo de la vía del silenciamiento génico. Por este motivo, se cree que los ARNhc median el silenciamiento génico de manera más eficaz cuando se introducen a través de la vía de silenciamiento génico natural entera.

Los miARN son ARN no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos que pueden regular la expresión génica a nivel postranscripcional o a nivel de traducción durante el desarrollo vegetal y animal. Un rasgo común de los miARN es que todos se escinden de un ARN de tallo-bucle precursor de aproximadamente 70 nucleótidos denominado pre-miARN, probablemente mediante Dicer, una enzima de tipo RNasa III o un homólogo de esta. Los precursores de miARN de origen natural (pre-miARN) tienen una cadena simple que forma un tallo de estructura doble que incluye dos porciones que son generalmente complementarias, y un bucle, que conecta las dos porciones del tallo. En los pre-miARN típicos, el tallo incluye una o más protuberancias, p. ej., nucleótidos adicionales que crean un "bucle" nucleotídico simple en una porción del tallo, y/o uno o más nucleótidos no apareados que crean un espacio en la hibridación de las dos porciones del tallo entre sí. Los ARN horquillados cortos, o precursores de ARN genomanipulados, como se describen en la presente memoria, son construcciones artificiales basadas en estos pre-miARN de origen natural, pero que están genomanipuladas para suministrar agentes de silenciamiento por ARN deseados (p. ej., ARNip como se describen en la presente memoria). Al sustituir las secuencias del tallo del pre-miARN con secuencia complementarias al ARNm diana, se forma un ARNhc. El ARNhc se procesa mediante la vía de silenciamiento génico entera de la célula y media, de este modo, la iARN de manera eficaz.

Los elementos necesarios de una molécula de ARNhc incluyen una primera porción y una segunda porción, que tengan suficiente complementariedad para aparearse o hibridarse para formar una porción de tallo de estructura doble o bicatenaria. Las dos porciones no deben ser completamente o perfectamente complementarias. La primera y segunda porciones de "tallo" están conectadas por una porción que tiene una secuencia que tiene insuficiente complementariedad de secuencia para aparearse o hibridarse con otras porciones del ARNhc. Esta última porción se denomina porción de "bucle" en la molécula de ARNhc. Las moléculas de ARNhc se procesan para generar ARNip. Los ARNhc también pueden incluir una o más protuberancias, es decir, nucleótidos adicionales que crean un pequeño "bucle" nucleotídico en una porción del tallo, por ejemplo, un bucle de uno, dos o tres nucleótidos. Las porciones de tallo pueden tener la misma longitud, o una porción puede incluir una prolongación de, por ejemplo, 1-5 nucleótidos. Los nucleótidos de la prolongación pueden incluir, por ejemplo, uracilos (U), p. ej., todos U. Dichos U están codificados particularmente por timidinas (T) en el ADN codificante de ARNhc que señalizan la terminación de la transcripción.

En ARNhc (o ARN precursor genomanipulado) como se describen en la presente memoria, una porción del tallo de estructura doble es una secuencia de ácido nucleico que es complementaria (o de antisentido) a la secuencia diana de htt. Preferiblemente, una cadena de la porción de tallo del ARNhc es suficientemente complementaria (p. ej., de antisentido) a una secuencia de ARN diana (p. ej., ARNm) para mediar la degradación o escisión de dicho ARN diana a través de interferencia por ARN (iARN). Por lo tanto, los precursores de ARN genomanipulados incluyen un tallo de estructura doble con dos porciones y un bucle que conecta las dos porciones del tallo. La porción de antisentido puede estar en el extremo hacia 5' o 3' del tallo. Las porciones de tallo de un ARNhc tienen preferiblemente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos. Preferiblemente, las dos porciones de tallo tienen una longitud de aproximadamente 18 o 19 a aproximadamente 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 37, 38, 39 o 40 o más nucleótidos. En realizaciones preferidas, la longitud de las porciones de tallo debería ser de 21 nucleótidos o mayor. Cuando se usan en células de mamíferos, la longitud de las porciones de tallo debería ser menor que aproximadamente 30 nucleótidos para evitar provocar respuestas no específicas como la vía del interferón. En células que no son de mamíferos, el tallo puede tener una longitud mayor que 30 nucleótidos. De hecho, el tallo puede incluir secciones complementarias mucho más largas con respecto al ARNm diana (hasta e incluso el ARNm entero). De hecho, una porción del tallo puede incluir secciones complementarias mucho más largas con respecto al ARNm diana (hasta e incluso el ARNm entero).

5 Las dos porciones del tallo de estructura doble deben ser suficientemente complementarias para hibridarse para formar el tallo de estructura doble. Por lo tanto, las dos porciones pueden ser, pero no deben ser, completamente o perfectamente complementarias. Además, las dos porciones de tallo pueden tener la misma longitud, o una porción puede incluir una prolongación de 1, 2, 3 o 4 nucleótidos. Los nucleótidos de la prolongación pueden incluir, por ejemplo, uracilos (U), p. ej., todos U. El bucle en los ARNhc o precursores de ARN genomanipulados pueden diferir de las secuencias de pre-miARN naturales al modificar la secuencia de bucle para aumentar o disminuir la cantidad de nucleótidos apareados, o reemplazar toda o parte de la secuencia de bucle con un tetrabucle u otras secuencias de bucle. Por lo tanto, el bucle en los ARNhc o precursores de ARN genomanipulados puede tener una longitud de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más, p. ej., 15 o 20, o más nucleótidos.

10 El bucle en los ARNhc o precursores de ARN genomanipulados pueden diferir de las secuencias de pre-miARN naturales al modificar la secuencia de bucle para aumentar o disminuir la cantidad de nucleótidos apareados, o reemplazar toda o parte de la secuencia de bucle con un tetrabucle u otras secuencias de bucle. Por lo tanto, la porción de bucle en el ARNhc puede tener una longitud de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 nucleótidos, es decir, una longitud de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más, p. ej., 15 o 20, o más nucleótidos. Un bucle preferido
15 consiste o comprenden una secuencia de "tetrabucle". Las secuencias de tetrabucle ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, las secuencias GNRA, donde N es cualquier nucleótido y R es un nucleótido purina, GGGG y UUUU.

También se describe en la presente memoria que los ARNhc incluyen las secuencias de una molécula de ARNip deseada descrita supra. También se describe en la presente memoria que la secuencia de la porción de antisentido de una ARNhc se puede diseñar esencialmente según se describió anteriormente o generalmente al seleccionar una
20 secuencia de 18, 19, 20, 21 nucleótidos, o más larga, de dentro del ARN diana (p. ej., ARNm de htt), por ejemplo, de una región 100 a 200 o 300 nucleótidos antes o después del inicio de la traducción. En general, la secuencia se puede seleccionar de cualquier porción del ARN diana (p. ej., ARNm) incluida la 5' UTR (región no traducida), secuencia codificante o 3' UTR, siempre que dicha porción esté distante del sitio de la mutación de ganancia funcional. Esta secuencia, opcionalmente, puede estar inmediatamente después de una región de un gen diana que contiene dos
25 nucleótidos AA adyacentes. Los últimos dos nucleótidos de la secuencia de nucleótidos se pueden seleccionar para que sean UU. Esta secuencia de 21 nucleótidos o aproximadamente se usa para crear una porción de un tallo de estructura doble en el ARNhc. Esta secuencia puede reemplazar una porción de tallo de una secuencia de pre-miARN natural, p. ej., enzimáticamente, o se incluye en una secuencia completa que se sintetiza. Por ejemplo, se pueden sintetizar oligonucleótidos de ADN que codifican el precursor de ARN genomanipulado de tallo-bucle entero, o que
30 codifican apenas la porción que se va a insertar en el tallo de estructura doble del precursor, y usar enzimas de restricción para crear la construcción de precursor de ARN genomanipulado, p. ej., a partir de un pre-miARN natural.

Los precursores de ARN genomanipulados incluyen en el tallo de estructura doble las secuencias de 21-22 nucleótidos o aproximadamente del ARNip o estructura doble similar a ARNip deseado para producir *in vivo*. Por lo tanto, la porción de tallo del precursor de ARN genomanipulado incluye al menos 18 o 19 pares de nucleótidos correspondientes a la
35 secuencia de una porción exónica del gen cuya expresión se va a reducir o inhibir. Los dos nucleótidos hacia 3' que flanquean esta región del tallo se eligen para maximizar la producción del ARNip a partir del precursor de ARN genomanipulado y para maximizar la eficacia del ARNip resultante para dirigirse al ARNm correspondiente para la represión de la traducción o destrucción por iARN *in vivo* e *in vitro*.

En ciertas realizaciones, los ARNhc como se describen en la presente memoria incluyen secuencias de miARN, opcionalmente, secuencias de miARN con extremo modificado, para potenciar el ingreso en el RISC. La secuencia de miARN puede ser similar o idéntica a la de cualquier miARN de origen natural (ver, p. ej., The miRNA Registry; Griffiths-Jones S, Nuc. Acids Res., 2004). Se han identificado más de mil miARN naturales hasta la fecha y se cree que juntos comprenden aproximadamente el 1 % de todos los genes previstos en el genoma. Muchos miARN naturales están
40 aglomerados entre sí en los intrones de pre-ARNm y se pueden identificar *in silico* al usar búsquedas basadas en homología (Pasquinelli et al., 2000; Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001) o algoritmos informáticos (p. ej., MiRScan, MiRSeeker) que predicen la capacidad de un gen de miARN candidato para formar la estructura de tallo bucle de un pri-ARNm (Grad et al., Mol. Cell., 2003; Lim et al., Genes Dev., 2003; Lim et al., Science, 2003; Lai E C et al., Genome Bio., 2003). Un registro en línea proporciona una base de datos para hacer búsquedas de todas las secuencias de miARN publicadas (The miRNA Registry en el sitio web del Sanger Institute; Griffiths-Jones S, Nuc. Acids Res., 2004). Los miARN naturales ilustrativos incluyen lin-4, let-7, miR-10, mirR-15, miR-16, miR-168,
45 miR-175, miR-196 y sus homólogos, así como otros miARN naturales de humanos y ciertos organismos de modelo que incluyen *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, zebrafish, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* como se describen en la publicación de PCT internacional núm. WO 03/029459.

Los miARN de origen natural se expresan mediante genes endógenos genes *in vivo* y se procesan a partir de un precursor en horquilla o tallo-bucle (pre-miARN o pri-miARN) por Dicer u otras RNAsas (Lagos-Quintana et al., Science, 2001; Lau et al., Science, 2001; Lee and Ambros, Science, 2001; Lagos-Quintana et al., Curr. Biol., 2002; Mourelatos et al., Genes Dev., 2002; Reinhart et al., Science, 2002; Ambros et al., Curr. Biol., 2003; Brennecke et al., 2003; Lagos-Quintana et al., RNA, 2003; Lim et al., Genes Dev., 2003; Lim et al., Science, 2003). Los miARN pueden existir transitoriamente *in vivo* como una estructura doble bicatenario, pero el complejo RISC solo absorbe una cadena
55 para dirigir el silenciamiento génico. Ciertos miARN, p. ej., miARN vegetales, tienen una complementariedad perfecta

o casi perfecta con respecto a su ARNm diana y, por lo tanto, dirigen la escisión del ARNm diana. Otros miARN tienen una complementariedad menos que perfecta con respecto a sus ARNm diana y, por lo tanto, dirigen la represión de la traducción de los ARNm diana. Se cree que el grado de complementariedad entre un miARN y su ARNm diana determina su mecanismo de acción. Por ejemplo, la complementariedad perfecta o casi perfecta entre un miARN y su ARNm diana es predictiva de un mecanismo de escisión (Yekta et al., Science, 2004), mientras que una complementariedad menos que perfecta es predictiva de un mecanismo de represión de la traducción. En realizaciones particulares, la secuencia de miARN es la de una secuencia de miARN de origen natural, cuya expresión o actividad aberrante se correlaciona con un trastorno de miARN.

d) Anclajes de oligonucleótidos doble funcionales

10 En otras realizaciones, los agentes de silenciamiento por ARN como se describen en la presente memoria incluyen anclajes de oligonucleótidos doble funcionales útiles para reunir de manera intracelular un miARN. Las células animales expresan una gama de miARN, ARN no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos que pueden regular la expresión génica a nivel postranscripcional o a nivel de traducción. Al unir un miARN unido al RISC y reunirlo con un ARNm diana, un anclaje de oligonucleótidos doble funcional puede reprimir la expresión de los genes involucrados, p. ej., en el proceso arterioesclerótico. El uso de anclajes de oligonucleótidos ofrece varias ventajas con respecto a las técnicas existentes para reprimir la expresión de un gen particular. En primer lugar, los métodos descritos en la presente memoria permiten que una molécula endógena (a menudo presente en abundancia), un miARN, medie el silenciamiento por ARN. Por consiguiente, los métodos descritos en la presente memoria obvian la necesidad de introducir moléculas extrañas (p. ej., ARNip) para mediar el silenciamiento por ARN. En segundo lugar, los agentes de silenciamiento por ARN y, en particular, el resto enlazador (p. ej., oligonucleótidos tales como el oligonucleótido 2'-O-metilo), pueden producirse para que sean estables y resistentes a la actividad de nucleasa. En consecuencia, los anclajes como se describen en la presente memoria se pueden diseñar para el suministro directo, obviando la necesidad del suministro indirecto (p. ej., vírico) de una molécula precursora o plásmido diseñado para producir el agente deseado dentro de la célula. En tercer lugar, los anclajes y sus respectivos restos se pueden diseñar para adaptarse a sitios de ARNm específicos y miARN específicos. Los diseños pueden ser específicos para células o productos génicos. En cuarto lugar, los métodos descritos en la presente memoria dejan el ARNm intacto, lo que permite a un experto en la técnica bloquear la síntesis de la proteína en impulsos cortos al usar la maquinaria de la propia célula. En consecuencia, estos métodos de silenciamiento por ARN son muy regulables.

Los anclajes de oligonucleótidos doble funcionales ("anclajes") como se describen en la presente memoria se diseñan de manera tal que reúnen miARN (p. ej., miARN celulares endógenos) para un ARNm diana para inducir la modulación de un gen de interés. En realizaciones preferidas, los anclajes tienen la fórmula T-L- μ , en donde T es un resto de direccionamiento de ARNm, L es un resto enlazador y μ es un resto que reúne miARN. Uno cualquiera o más restos pueden ser bicatenarios. Preferiblemente, sin embargo, cada resto es monocatenario.

Los restos dentro de los anclajes se pueden disponer o enlazar (en la dirección de 5' a 3') como se representa en la fórmula T-L- μ (es decir, el extremo hacia 3' del resto de direccionamiento enlazado al extremo hacia 5' del resto enlazador y el extremo hacia 3' del resto enlazador enlazado al extremo hacia 5' del resto que reúne miARN). Alternativamente, los restos se pueden disponer o enlazar en el anclaje de la siguiente manera: μ -T-L (es decir, el extremo hacia 3' del resto que reúne miARN enlazado al extremo hacia 5' del resto enlazador y el extremo hacia 3' del resto enlazador enlazado al extremo hacia 5' del resto de direccionamiento).

El resto de direccionamiento de ARNm, según se describió anteriormente, es capaz de capturar un ARNm diana específico. Según la invención, la expresión del ARNm diana es indeseable, y, por lo tanto, se desea la represión de la traducción del ARNm. El resto de direccionamiento de ARNm debería tener un tamaño suficiente para unirse de manera eficaz al ARNm diana. La longitud del resto de direccionamiento variará en gran medida dependiendo, en parte, de la longitud del ARNm diana y el grado de complementariedad entre el ARNm diana y el resto de direccionamiento. También se describe en la presente memoria que el resto de direccionamiento tiene una longitud menor que aproximadamente 200, 100, 50, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 nucleótidos. También se describe en la presente memoria que el resto de direccionamiento tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleótidos.

El resto que reúne miARN, según se describió anteriormente, es capaz de asociarse a un miARN. Según la invención, el miARN puede ser cualquier miARN capaz de reprimir el ARNm diana. Se ha informado que los mamíferos tienen más de 250 miARN endógenos (Lagos-Quintana et al. (2002) Current Biol. 12:735-739; Lagos-Quintana et al. (2001) Science 294:858-862; y Lim et al. (2003) Science 299:1540). En varias realizaciones, el miARN puede ser cualquier miARN reconocido en la técnica.

El resto enlazador es cualquier agente capaz de enlazar los restos de direccionamiento de manera que se mantenga la actividad de los restos de direccionamiento. Los restos enlazadores son preferiblemente restos oligonucleotídicos que comprenden una cantidad suficiente de nucleótidos de manera que los agentes de direccionamiento puedan interactuar suficientemente con sus respectivas dianas. Los restos enlazadores tienen escasa o ninguna homología

de secuencia con secuencias de ARNm o miARN celulares. Los restos enlazadores ilustrativos incluyen uno o más 2'-O-metilnucleótidos, p. ej., 2'-β-metiladenosina, 2'-O-metilimidina, 2'-O-metilguanosina o 2'-O-metiluridina.

e) Oligonucleótidos de silenciamiento génico

5 En ciertas realizaciones ilustrativas, la expresión génica (es decir, la expresión génica de *htt*) se puede modular al usar compuestos basados en oligonucleótidos que comprenden dos o más oligonucleótidos de antisentido monocatenarios que están enlazados a través de sus extremos hacia 5' lo que permite la presencia de dos o más extremos hacia 3' accesibles para inhibir o disminuir de manera eficaz la expresión génica de *htt*. Dichos oligonucleótidos enlazados también se conocen como oligonucleótidos de silenciamiento génico (GSO, por sus siglas en inglés). (Ver, p. ej., US 8.431.544 otorgado a Idera Pharmaceuticals, Inc.).

10 El enlace en los extremos hacia 5' de los GSO es independiente de los otros enlaces oligonucleotídicos y puede ser directamente a través de grupos hidroxilo 5', 3' o 2', o indirectamente, a través de un enlazador no nucleotídico o un nucleósido, al usar las posiciones de hidroxilo 2' o 3' del nucleósido. Los enlaces también pueden usar un azúcar o nucleobase funcionalizado de un nucleótido terminal hacia 5'.

15 Los GSO pueden comprender dos secuencias idénticas o diferentes conjugadas en sus extremos hacia 5'-5' a través de un fosfodiéster, fosforotioato o enlazador no nucleosídico. Dichos compuestos pueden comprender 15 a 27 nucleótidos que son complementarios a porciones de dianas de ARNm de interés para la reducción de antisentido del producto génico. Los GSO pueden comprender secuencias idénticas que se pueden unir a un ARNm específico a través de interacciones de unión de hidrógeno de Watson-Crick e inhibir la expresión de la proteína. Los GSO pueden comprender diferentes secuencias que son capaces de unirse a dos o más regiones diferentes de uno o más ARNm diana e inhibir la expresión de la proteína. Dichos compuestos están comprendidos por secuencias heteronucleotídicas complementarias al ARNm diana y forman estructuras dobles estables a través de uniones de hidrógeno de Watson-Crick. En ciertas condiciones, los GSO que contienen dos extremos hacia 3' libres (el antisentido acoplado hacia 5'-5') pueden ser inhibidores más potentes de la expresión génica que los que contienen un único extremo hacia 3' libre o ningún extremo hacia 3' libre.

25 En algunas realizaciones, el enlazador no nucleotídico es glicerol o un homólogo del glicerol de fórmula HO--(CH₂)_o--CH(OH)--(CH₂)_p--OH, en donde o y p independientemente son números enteros de 1 a aproximadamente 6, de 1 a aproximadamente 4 o de 1 a aproximadamente 3. En algunas otras realizaciones, el enlazador no nucleotídico es un derivado de 1,3-diamino-2-hidroxiopropano. Algunos de dichos derivados tienen la fórmula HO--(CH₂)_m--C(O)NH--CH₂--CH(OH)--CH₂--NHC(O)--(CH₂)_m--OH, en donde m es un número entero de 0 a aproximadamente 10, de 0 a aproximadamente 6, de 2 a aproximadamente 6 o de 2 a aproximadamente 4.

30 Algunos enlazadores no nucleotídicos permiten el acoplamiento de más de dos componentes de GSO. Por ejemplo, el glicerol enlazador no nucleotídico tiene tres grupos hidroxilo a los cuales se pueden acoplar covalentemente componentes de GSO. Algunos compuestos basados en oligonucleótidos, como se describen en la presente memoria, por lo tanto, comprenden dos o más oligonucleótidos enlazados a un nucleótido o un enlazador no nucleotídico. Se dice que dichos oligonucleótidos, como se describen en la presente memoria, están "ramificados".

35 En ciertas realizaciones, los GSO tienen una longitud de al menos 14 nucleótidos. En ciertas realizaciones ilustrativas, los GSO tienen una longitud de 15 a 40 nucleótidos o una longitud de 20 a 30 nucleótidos. Por lo tanto, los oligonucleótidos componentes de los GSO pueden tener independientemente una longitud de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos.

40 Estos oligonucleótidos se pueden preparar mediante métodos reconocidos en la técnica tales como química de fosforamidato o H-fosfonato que se pueden llevar a cabo manualmente o mediante un sintetizador automatizado. Estos oligonucleótidos también se pueden modificar de varios modos sin comprometer su capacidad de hibridarse con el ARNm. Dichas modificaciones pueden incluir al menos un enlace internucleotídico del oligonucleótido que es un alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, éster de fosfato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, fosfato hidroxilo, acetamidato o éster de carboximetilo o una combinación de estos y otros enlaces internucleotídicos entre el extremo hacia 5' de un nucleótido y el extremo hacia 3' de otro nucleótido, en el que el enlace fosfodiéster del nucleótido hacia 5' se ha reemplazado con cualquier cantidad de grupos químicos.

VII. Agente de silenciamiento por ARN anti-Htt modificados

50 En ciertos aspectos de la invención, un agente de silenciamiento por ARN (o cualquier porción de este) como se describió supra se puede modificar de tal manera que la actividad del agente se mejore adicionalmente. Por ejemplo, los agentes de silenciamiento por ARN descritos en la Sección II supra se pueden modificar con cualquiera de las modificaciones descritas infra. Las modificaciones pueden servir, en parte, para mejorar adicionalmente la discriminación de la diana, para mejorar la estabilidad del agente (p. ej., para prevenir la degradación), para promover la captación celular, para mejorar la eficacia del direccionamiento, para mejorar la eficacia de la unión (p. ej., a las dianas), para mejorar la tolerancia del paciente al agente y/o para reducir la toxicidad.

1) Modificaciones para mejorar la discriminación de la diana

En ciertas realizaciones, los agentes de silenciamiento por ARN como se describen en la presente memoria se pueden sustituir con un nucleótido desestabilizante para mejorar la discriminación de la diana mononucleotídica (ver la solicitud de los EE. UU. núm. de serie 11/698.689, presentada el 25 de enero de 2007 y la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 60/762.225 presentada el 25 de enero de 2006). Dicha modificación puede ser suficiente para suprimir la especificidad del agente de silenciamiento por ARN para un ARNm no diana (p. ej., ARNm natural), sin afectar de manera apreciable la especificidad del agente de silenciamiento por ARN para un ARNm diana (p. ej., ARNm mutante de ganancia funcional).

En realizaciones preferidas, los agentes de silenciamiento por ARN como se describen en la presente memoria se modifican por la introducción de al menos un nucleótido universal en la cadena de antisentido de estos. Los nucleótidos universales comprenden porciones de base que son capaces de aparear bases indiscriminadamente con cualquiera de las cuatro bases nucleotídicas convencionales (p. ej., A, G, C, U). Un nucleótido universal se prefiere porque tiene un efecto relativamente menor sobre la estabilidad de la estructura doble de ARN o la estructura doble formada por la cadena guía del agente de silenciamiento por ARN y el ARNm diana. El nucleótido universal ilustrativo incluye aquellos que tienen una porción de base de inosina o una porción de base de análogo de inosina seleccionados del grupo que consiste en desoxiinosina (p. ej. 2'-desoxiinosina), 7-desaza-2'-desoxiinosina, 2'-aza-2'-desoxiinosina, PNA-inosina, morfolino-inosina, LNA-inosina, fosforamidato-inosina, 2'-O-metoxi-inosina y 2'-OMe-inosina. En realizaciones particularmente preferidas, el nucleótido universal es un residuo inosina o un análogo de origen natural de este.

En ciertas realizaciones, los agentes de silenciamiento por ARN como se describen en la presente memoria se modifican por la introducción de al menos un nucleótido desestabilizante a 5 nucleótidos desde un nucleótido determinante de especificidad (es decir, el nucleótido que reconoce el polimorfismo relacionado con la enfermedad). Por ejemplo, el nucleótido desestabilizante se puede introducir en una posición que está a 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótido(s) de un nucleótido determinante de la especificidad. En realizaciones ilustrativas, el nucleótido desestabilizante se introduce en una posición que está a 3 nucleótidos del nucleótido determinante de especificidad (es decir, de manera que hay 2 nucleótidos estabilizantes entre el nucleótido desestabilizante y el nucleótido determinante de la especificidad). En agentes de silenciamiento por ARN que tienen dos cadenas o porciones de cadena (p. ej., ARNip y ARNhc), el nucleótido desestabilizante se puede introducir en la cadena o porción de cadena que no contiene el nucleótido determinante de especificidad. En realizaciones preferidas, el nucleótido desestabilizante se introduce en la misma cadena o porción de cadena que contiene el nucleótido determinante de especificidad.

2) Modificaciones para mejorar la eficacia y la especificidad

En ciertas realizaciones, los agentes de silenciamiento por ARN como se describen en la presente memoria se pueden alterar para facilitar la eficacia y especificidad mejoradas en mediar la iARN según las reglas del diseño de asimetría (ver las patentes estadounidenses núms. 8.309.704, 7.750.144, 8.304.530, 8.329.892 y 8.309.705). Dichas alteraciones facilitar el ingreso de la cadena de antisentido del ARNip (p. ej., un ARNip diseñado mediante el uso de los métodos como se describen en la presente memoria o un ARNip producido a partir de ARNhc) en el RISC en favor de la cadena de sentido, de manera que la cadena de antisentido preferencialmente guía la escisión o represión de la traducción de un ARNm diana y, por lo tanto, aumenta o mejora la eficacia de la escisión y silenciamiento de la diana. Preferiblemente, la asimetría de un agente de silenciamiento por ARN se mejora al reducir la resistencia de par de bases entre el extremo hacia 5' de la cadena de antisentido (AS 5') y el extremo hacia 3' de la cadena de sentido (S 3') del agente de silenciamiento por ARN con respecto a la resistencia de unión o resistencia de par de bases entre el extremo hacia 3' de la cadena de antisentido (AS 3') y el extremo hacia 5' de la cadena de sentido (S 5') de dicho agente de silenciamiento por ARN.

En una realización, la asimetría de un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria se puede mejorar de tal manera que haya menos pares de bases G:C entre el extremo hacia 5' de la primera cadena o de antisentido y el extremo hacia 3' de la porción de cadena de sentido que entre el extremo hacia 3' de la primera cadena o de antisentido y el extremo hacia 5' de la porción de cadena de sentido. En otra realización, la asimetría de un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria se puede mejorar de tal manera que haya al menos un par de bases malapareado entre el extremo hacia 5' de la primera cadena o de antisentido y el extremo hacia 3' de la porción de cadena de sentido. Preferiblemente, el par de bases malapareado se selecciona del grupo que consiste en G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C y U:U. En otra realización, la asimetría de un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria se puede mejorar de tal manera que haya al menos un par de bases inestable, p. ej., G:U, entre el extremo hacia 5' de la primera cadena o de antisentido y el extremo hacia 3' de la porción de cadena de sentido. En otra realización, la asimetría de un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria se puede mejorar de tal manera que haya al menos un par de bases que comprende un nucleótido raro, p. ej., inosina (I). Preferiblemente, el par de bases se selecciona del grupo que consiste en un I:A, I:U e I:C. En todavía otra realización, la asimetría de un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria se puede mejorar de tal manera que haya al menos un par de bases que comprende un nucleótido modificado. En realizaciones preferidas, el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en 2-amino-G, 2-amino-A, 2,6-diamino-G y 2,6-diamino-A.

3) Agentes de silenciamiento por ARN con estabilidad mejorada

Los agentes de silenciamiento por ARN como se describen en la presente memoria se pueden modificar para mejorar la estabilidad en suero o en medio de crecimiento para cultivos celulares. Para mejorar la estabilidad, los residuos 3' se pueden estabilizar contra la degradación, p. ej., se pueden seleccionar de tal manera que consistan en nucleótidos de purina, particularmente, nucleótidos de adenosina o guanosina. Alternativamente, la sustitución de nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, p. ej., la sustitución de uridina por 2'-desoxitimidina se tolera y no afecta la eficacia de la interferencia por ARN.

También se describen en la presente memoria agentes de silenciamiento por ARN que incluyen primera y segunda cadenas en donde la segunda cadena y/o primera cadena se modifica mediante la sustitución de nucleótidos internos con nucleótidos modificados, de manera que se mejora la estabilidad *in vivo* en comparación con un agente de silenciamiento por ARN correspondiente no modificado. Como se define en la presente memoria, un nucleótido "interno" es un que aparece en cualquier posición distinta del extremo hacia 5' o el extremo hacia 3' de la molécula de ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido. Un nucleótido interno puede estar dentro de una molécula monocatenario o dentro de una cadena de una molécula de estructura doble o bicatenaria. En una realización, la cadena de sentido y/o la cadena de antisentido se modifica mediante la sustitución de al menos un nucleótido interno. En otra realización, la cadena de sentido y/o la cadena de antisentido se modifica mediante la sustitución de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos internos. En otra realización, la cadena de sentido y/o la cadena de antisentido se modifica por la sustitución de al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de los nucleótidos internos. En todavía otra realización, la cadena de sentido y/o la cadena de antisentido se modifica mediante la sustitución de todos los nucleótidos internos.

En una realización preferida de la presente invención, los agentes de silenciamiento por ARN pueden contener al menos un análogo de nucleótido modificado. Los análogos de nucleótidos se pueden ubicar en posiciones donde la actividad de silenciamiento específica para la diana, p. ej., la actividad que media la iARN o la actividad de represión de la traducción no se lleva a cabo sustancialmente, p. ej., en una región en el extremo hacia 5' y/o el extremo hacia 3' de la molécula de ARNip. Particularmente, los extremos se pueden estabilizar al incorporar análogos de nucleótidos modificados.

Los análogos de nucleótidos ilustrativos incluyen ribonucleótidos modificados en el azúcar y/o cadena principal (es decir, incluyen modificaciones en la cadena principal de fosfato-azúcar). Por ejemplo, los enlaces fosfodiéster del ARN natural se pueden modificar para incluir al menos uno de un heteroátomo de nitrógeno o azufre. En ribonucleótidos modificados en la cadena principal ilustrativos, el grupo fosfoéster que conecta los ribonucleótidos adyacentes se reemplaza por un grupo modificado, p. ej., de grupo fosfotioato. En ribonucleótidos modificados en el azúcar ilustrativos, el grupo 2' OH se puede reemplazar por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ u ON, en donde R es alquilo C₁-C₆, alquenoilo, alquinoilo y halo es F, Cl, Br o I.

En realizaciones particulares, las modificaciones son modificaciones 2'-fluoro, 2'-amino y/o 2'-tio. Las modificaciones particularmente preferidas incluyen 2'-fluoro-citidina, 2'-fluoro-uridina, 2'-fluoro-adenosina, 2'-fluoro-guanosina, 2'-amino-citidina, 2'-amino-uridina, 2'-amino-adenosina, 2'-amino-guanosina, 2,6-diaminopurina, 4-tio-uridina y/o 5-amino-alil-uridina. En una realización particular, los ribonucleótidos 2'-fluoro son cada uridina y citidina. Las modificaciones ilustrativas adicionales incluyen 5-bromo-uridina, 5-yodo-uridina, 5-metil-citidina, ribo-timidina, 2-aminopurina, 2'-amino-butiril-pireno-uridina, 5-fluoro-citidina y 5-fluoro-uridina. Los 2'-desoxi-nucleótidos y 2'-Ome nucleótidos también se pueden usar dentro de restos de agentes de silenciamiento por ARN modificados como se describen en la presente memoria. Los residuos modificados adicionales incluyen desoxi-abásico, inosina, N3-metil-uridina, N6,N6-dimetil-adenosina, pseudouridina, ribonucleósido purina y ribavirina. En una realización preferida particularmente, el resto 2' es un grupo metilo de manera tal que el resto enlazador es un oligonucleótido 2'-O-metilo.

En una realización ilustrativa, el agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria comprende ácidos nucleicos bloqueados (LNA, por sus siglas en inglés). Los LNA comprenden nucleótidos modificados en el azúcar que resisten actividades de nucleasa (son muy estable) y poseen discriminación mononucleotídica para el ARNm (Elmen et al., Ácidos Nucleicos Res., (2005), 33(1): 439-447; Braasch et al. (2003) Biochemistry 42:7967-7975, Petersen et al. (2003) Trends Biotechnol 21:74-81). Estas moléculas tienen ácidos nucleicos puenteados a 2'-O,4'-C-etileno, con posibles modificaciones tales como 2'-desoxi-2"-fluorouridina. Además, los LNA aumentan la especificidad de los oligonucleótidos al restringir el resto azúcar en la conformación 3'-endo y preorganizar así el nucleótido para el apareamiento de bases y aumentar la temperatura de fusión del oligonucleótido tanto como 10 °C por base.

En otra realización ilustrativa, el agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria comprende ácidos nucleicos peptídicos (PNA, por sus siglas en inglés). Los PNA comprenden nucleótidos modificados en los que la porción azúcar-fosfato del nucleótido se reemplaza con un resto 2-amino etilglicina neutro capaz de formar una cadena principal de poliamida que es muy resistente a la digestión por nucleasa e imparte especificidad de unión mejorada con la molécula (Nielsen, et al., Science, (2001), 254: 1497-1500).

También se prefieren los ribonucleótidos modificados en la nucleobase, es decir, ribonucleótidos, que contienen al menos una nucleobase de origen no natural en lugar de una nucleobase de origen natural. Las bases se pueden modificar para bloquear la actividad de adenosina desaminasa. Las nucleobases modificadas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, uridina y/o citidina modificada en la posición 5, p. ej., 5-(2-amino)propil uridina, 5-bromo uridina; adenosina y/o guanosinas modificadas en la posición 8, p. ej., 8-bromo guanosina; nucleótidos desaza, p. ej., 7-desaza-adenosina; los nucleótidos O- y N-alquilados, p. ej., N6-metil adenosina son adecuados. Cabe señalar que las modificaciones indicadas anteriormente se pueden combinar.

En otras realizaciones, se pueden emplear la reticulación para alterar la farmacocinética del agente de silenciamiento por ARN, por ejemplo, para aumentar la semivida en el cuerpo. Por lo tanto, también se describen en la presente memoria agentes de silenciamiento por ARN que tienen dos cadenas complementarias de ácido nucleico, en donde las dos cadenas están reticuladas. También se describen en la presente memoria agentes de silenciamiento por ARN que están conjugados o no conjugados (p. ej., en su extremo hacia 3') con otro resto (p. ej., un resto distinto de ácido nucleico tal como un péptido), un compuesto orgánico (p. ej., un tinte), o similares). Los derivados de ARNip modificadores de este modo pueden mejorar la captación celular o potenciar actividades de direccionamiento celulares del derivado de ARNip resultante en comparación con el ARNip correspondiente, son útiles para rastrear el derivado de ARNip en la célula, o mejorar la estabilidad del derivado de ARNip en comparación con el ARNip correspondiente.

Otras modificaciones ilustrativas incluyen: (a) modificación 2', p. ej., suministro de un resto 2' OMe en una U en una cadena de sentido o de antisentido, pero especialmente en una cadena de sentido, o el suministro de un resto 2' OMe en una prolongación hacia 3', p. ej., en el extremo hacia 3' (el extremo hacia 3' significa en el átomo hacia 3' de la molécula o en el resto más hacia 3', p. ej., la P más hacia 3' o la posición 2', según lo indique el contexto); (b) modificación de la cadena principal, p. ej., con el reemplazo de un O con un S, en la cadena principal de fosfato, p. ej., el suministro de una modificación de fosforotioato, en la U o la A o ambos, especialmente en una cadena de antisentido; p. ej., con el reemplazo de un O con un S; (c) reemplazo de la U con un enlazador C5 amino; (d) reemplazo de una A con una G (se prefiere que los cambios en secuencia estén ubicados en la cadena de sentido y no en la cadena de antisentido); y (d) modificación en la posición 2', 6', 7' u 8'. Las realizaciones ilustrativas son aquellas en las que una o más de estas modificaciones están presentes en la cadena de sentido, pero no en la cadena de antisentido, o realizaciones donde la cadena de antisentido tiene menos de dichas modificaciones. Otras modificaciones ilustrativas adicionales incluyen el uso de una P metilada en una prolongación hacia 3', p. ej., en el extremo hacia 3'; la combinación de una modificación en 2', p. ej., el suministro de un resto 2' O Me y la modificación de la cadena principal, p. ej., con el reemplazo de un O con un S, p. ej., el suministro de una modificación de fosforotioato, o el uso de una P metilada, en una prolongación hacia 3', p. ej., en el extremo hacia 3'; modificación con un alquilo 3'; modificación con una pirrolidona abásica en una prolongación hacia 3', p. ej., en el extremo hacia 3'; modificación con naproxeno, ibuprofeno u otros restos que inhiben la degradación en el extremo hacia 3'.

4) Modificaciones para mejorar la captación celular

En otras realizaciones, los agentes de silenciamiento por ARN se pueden modificar con restos químicos, por ejemplo, para mejorar la captación celular por parte de células diana (p. ej., células neuronales). Por lo tanto, también se describen en la presente memoria agentes de silenciamiento por ARN que están conjugados o no conjugados (p. ej., en su extremo hacia 3') con otro resto (p. ej., un resto distinto de ácido nucleico tal como un péptido), un compuesto orgánico (p. ej., un tinte), o similares. La conjugación se puede lograr mediante métodos conocidos en la técnica, p. ej., al usar los métodos de Lambert et al., *Drug Deliv. Rev.*: 47(1), 99-112 (2001) (describe ácidos nucleicos cargado en nanopartículas de polialquiloacrilato (PACA)); Fattal et al., *J. Control Release* 53(1-3):137-43 (1998) (describe ácidos nucleicos unidos a nanopartículas); Schwab et al., *Ann. Oncol.* 5 Suppl. 4:55-8 (1994) (describe ácidos nucleicos enlazados a agentes intercalantes, grupos hidrófobos, policationes o nanopartículas PACA); y Godard et al., *Eur. J. Biochem.* 232(2):404-10 (1995) (describe ácidos nucleicos enlazados a nanopartículas).

En una realización particular, un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria se conjuga con un resto lipófilo. En una realización, el resto lipófilo es un ligando que incluye un grupo catiónico. En otra realización, el resto lipófilo está acoplado a una o ambas cadenas de un ARNip. En una realización ilustrativa, el resto lipófilo está acoplado a un extremo de la cadena de sentido del ARNip. En otra realización ilustrativa, el resto lipófilo está acoplado al extremo hacia 3' de la cadena de sentido. En ciertas realizaciones, el resto lipófilo se selecciona del grupo que consiste en colesterol, vitamina E, vitamina K, vitamina A, ácido fólico o un tinte catiónico (p. ej., Cy3). En una realización ilustrativa, el resto lipófilo es un colesterol. Otros restos lipófilos incluyen ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litolólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina.

5) Ligandos anclados

Otras entidades se pueden anclar a un agente de silenciamiento por ARN. Por ejemplo, un ligando anclado a un agente de silenciamiento por ARN para mejorar la estabilidad, la termodinámica de la hibridación con un ácido nucleico diana, el direccionamiento hacia un tipo de tejido o célula particular o la permeabilidad celular, p. ej., mediante un mecanismo

dependiente o independiente de endocitosis. Los ligandos y modificaciones asociadas también pueden aumentar la especificidad de secuencia y, en consecuencia, disminuir el direccionamiento colateral. Un ligando anclado puede incluir una o más bases o azúcares modificados que pueden funcionar como intercaladores. Estos se ubican preferiblemente en una región interna, tal como en una protuberancia de la estructura doble de agente de silenciamiento por ARN/diana. El intercalador puede ser un compuesto aromático, p. ej., un compuesto policíclico aromático o heterocíclico aromático. Un intercalador policíclico puede tener capacidades de apilamiento y puede incluir sistemas con 2, 3 o 4 anillos fusionados. Las bases universales descritas en la presente memoria pueden incluirse en un ligando. En una realización, el ligando puede incluir un grupo de escisión que contribuye a la inhibición del gen diana mediante la escisión del ácido nucleico diana. El grupo de escisión puede ser, por ejemplo, una bleomicina (p. ej., bleomicina-A5, bleomicina-A2 o bleomicina-B2), pireno, fenantrolina (p. ej., O-fenantrolina), una poliamina, un tripéptido (p. ej., el tripéptido lys-tyr-lys) o un grupo quelante de ion metálico. El grupo quelante de ion metálico puede incluir, p. ej., un complejo macrocíclico de Lu(III) o EU(III), un derivado de Zn(II) 2,9-dimetilfenantrolina, una Cu(II) terpiridina o acridina, que puede promover la escisión selectiva del ARN diana en el sitio de la protuberancia mediante iones metálicos libres, tales como Lu(III). En algunas realizaciones, un ligando peptídico se puede anclar a un agente de silenciamiento por ARN para promover la escisión del ARN diana, p. ej., en la región de protuberancia. Por ejemplo, se puede conjugar 1,8-dimetil-1,3,6,8,10,13-hexaazaciotetradecani (ciclám) con un péptido (p. ej., mediante un derivado de aminoácido) para promover la escisión del ARN diana. Un ligando anclado puede ser un ligando de aminoglucósido, que puede provocar que un agente de silenciamiento por ARN tenga propiedades de hibridación mejoradas o especificidad de secuencia mejorada. Los aminoglucósidos ilustrativos incluyen polilisina glicosilada, polilisina galactosilada, neomicina B, tobramicina, kanamicina A y conjugados de acridina de aminoglucósidos, tales como Neo-N-acridina, Neo-S-acridina, Neo-C-acridina, Tobra-N-acridina y KanaA-N-acridina. El uso de un análogo de acridina puede aumentar la especificidad de secuencia. Por ejemplo, la neomicina B tiene una alta afinidad por ARN en comparación con ADN, pero especificidad de secuencia baja. Un análogo de acridina, neo-5-acridina tiene una afinidad aumentada por el elemento de respuesta Rev (RRE, por sus siglas en inglés) de VIH. En algunas realizaciones, el análogo de guanidina (el guanidinoglucósido) de un ligando de aminoglucósido está anclado a un agente de silenciamiento por ARN. En un guanidinoglucósido, el grupo amina en el aminoácido se intercambia por un grupo guanidina. El acoplamiento de un análogo de guanidina puede mejorar la permeabilidad celular de un agente de silenciamiento por ARN. Un ligando anclado puede ser un péptido, peptoide o peptidomimético de poli-arginina, que puede mejorar la captación celular de un agente oligonucleotídico.

Los ligandos ilustrativos se acoplan, preferiblemente de manera covalente, ya sea directamente o indirectamente, a través de un anclaje interviniente, a un portador conjugado con ligando. En realizaciones ilustrativas, el ligando se acopla al portador a través de un anclaje interviniente. En realizaciones ilustrativas, un ligando altera la distribución, direccionamiento o vida útil de un agente de silenciamiento por ARN en el cual se incorpora. En realizaciones ilustrativas, un ligando proporciona una afinidad mejorada por una diana seleccionada, p. ej., molécula, célula o tipo de célula, compartimiento, p. ej., un compartimiento celular u orgánico, tejido, órgano o región del cuerpo, en comparación con, p. ej., una especie que carece de dicho ligando.

Los ligandos ilustrativos pueden mejorar las propiedades de transporte, hibridación y especificidad y también pueden mejorar la resistencia a nucleasa del agente de silenciamiento por ARN natural o modificado resultante, o una molécula polimérica que comprende cualquier combinación de monómeros descritos en la presente memoria y/o ribonucleótidos naturales o modificados. Los ligandos, en general, pueden incluir modificadores terapéuticos, p. ej., para mejorar la captación; compuestos de diagnóstico o grupos indicadores, p. ej., para monitorizar la distribución; agentes de reticulación; restos que confieren resistencia a nucleasa; y nucleobases naturales o inusuales. Los ejemplos generales incluyen lipófilos, lípidos, esteroides (p. ej., uvaol, hecigenina, diosgenina), terpenos (p. ej., triterpenos, p. ej., sarsasapogenina, Friedelina, ácido litocólico derivado de epifriedelanol), vitaminas (p. ej., ácido fólico, vitamina A, biotina, piridoxal), carbohidratos, proteínas, agentes de unión a proteína, moléculas dirigidas a integrina, policatiónicos, péptidos, poliaminas e imitadores peptídicos. Los ligandos pueden incluir una sustancia de origen natural (p. ej., seroalbúmina humana (HSA, por sus siglas en inglés), lipoproteína de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) o globulian); carbohidrato (p. ej., un dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico); aminoácido o un lípido. El ligando puede ser también una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, p. ej., un ácido poliamino sintético. Los ejemplos de ácidos poliamino incluyen ácido poliamino que es una polilisina (PLL), ácido poli L-aspártico, ácido poli L-glutámico, copolímero anhídrido de ácido estireno-maleico, copolímero de poli(L-láctido-co-glicólido), copolímero anhídrido de divinil éter-maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrilico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. El ejemplo de poliaminas incluye: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poli-amina, peptidomimético poliamina, dendrímero poliamina, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o un péptido alfa helicoidal.

Los ligandos también pueden incluir grupos de direccionamiento, p. ej., un agente de direccionamiento a célula o tejido, p. ej. una lectina, glicoproteína, lípido o proteína, p. ej., un anticuerpo, que se une a un tipo de célula especificada tal como una célula renal. Un grupo direccionador puede ser una tirotopina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína tensioactiva A, carbohidrato mucina, lactosa multivalente galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente,

transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, biotina o un péptido RGD o un péptido mimético RGD. Otros ejemplos de ligandos incluyen tintes, agentes intercalantes (p. ej., acridinas y acridinas sustituidas), reticuladores (p. ej., psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Sappirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (p. ej., fenazina, dihidrofenazina, fenantrolina, pirenos),
 5 tripéptido lys-tyr-lys, aminoglucósidos, guanidío aminoglucodios, endonucleasas artificiales (p. ej., EDTA), moléculas lipófilas, p. ej., colesterol (y análogos tio de este), ácido cólico, ácido colánico, ácido litocólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pireni butírico, dihidrotestosterona, glicerol (p. ej., ésteres de ácido mono, bis o tris graso, p. ej., ácidos grasos C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉ o C₂₀) y éteres de estos, p. ej., alquilo C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉ o C₂₀; p. ej., 1,3-bis-O(hexadecil)glicerol, 1,3-bis-O(octaadecil)glicerol), grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido esteárico (p. ej., diestearato de glicerilo), ácido oleico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitrilo o fenoxazina) y conjugados peptídicos (p. ej., péptido antenapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (p. ej., PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radioetiquetados, enzimas, haptenos (p. ej., biotina), facilitadores de transporte/absorción (p. ej., aspirina, naproxeno, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (p. ej., imidazol, bisimidazol, histamina, aglomeraciones de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos Eu³⁺ de tetraazamacrociclos), dinitrofenilo, HRP o AP.

Los ligandos pueden ser proteínas, p. ej., glicoproteínas o péptidos, p. ej., moléculas que tienen una afinidad específica por un coligando, o anticuerpos, p. ej., un anticuerpo, que se une a un tipo de célula especificado tal como una célula cancerosa, célula endotelial o célula ósea. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores de hormonas.
 20 También pueden incluir especies no peptídicas, tales como lípidos, lectinas, carbohidratos, vitaminas, cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente o fucosa multivalente. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de p38 MAP cinasa o un activador de NF-κB.

El ligando puede ser una sustancia, p. ej., un fármaco, que puede aumentar la captación del agente de silenciamiento por ARN en la célula, por ejemplo, al alterar el citoesqueleto de la célula, p. ej., al alterar los microtúbulos, microfilamentos y/o filamentos intermediarios de la célula. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxón, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, jlaplaquinolido, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina o mioservina. El ligando puede aumentar la captación del agente de silenciamiento por ARN en la célula al activar una respuesta inflamatoria, por ejemplo. Los ligandos ilustrativos que tendrían dicho efecto incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα, por sus siglas en inglés), interleucina-1 beta o interferón gamma. En un aspecto, el ligando es un lípido o una molécula basada en un lípido. Dicho lípido o molécula basada en lípido preferiblemente se une a una proteína sérica, p. ej., seroalbúmina humana (HSA). Un ligando que se une a HSA permite la distribución del conjugado a un tejido diana, p. ej., un tejido diana distinto de renal del cuerpo. Por ejemplo, el tejido diana puede ser el hígado, incluidas células parenquimatosas del hígado. Otras moléculas que se pueden unir a HSA también se pueden usar como
 30 ligandos. Por ejemplo, se pueden usar neproxina o aspirina. Un ligando lipídico o basado en lípido puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar el direccionamiento el transporte hacia una célula o membrana celular diana y/o (c) se puede usar para ajustar la unión a una proteína sérica, p. ej., HSA. Un ligando basado en lípido se puede usar para modular, p. ej., controlar la unión del conjugado a un tejido diana. Por ejemplo, un ligando lipídico o basado en lípido que se une a HSA con más intensidad tendrá menos probabilidad de ser direccionado al riñón y, por lo tanto, menos probabilidad de aclararse del cuerpo. Un ligando lipídico o basado en lípido que se une a HSA con menos intensidad se puede usar para dirigir el conjugado al riñón. En una realización preferida, el ligando basado en lípido se une a HSA. Un ligando basado en lípido se puede unir a HSA con una afinidad suficiente de manera que el conjugado se distribuirá preferiblemente a un tejido distinto del renal. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan intensa que la unión de HSA-ligando no pueda revertirse. En otra realización preferida, el ligando basado en lípido se une a HSA de manera débil o nula, de manera que el conjugado se distribuirá preferiblemente al riñón. Otros restos que se dirigen a células renales también se pueden usar en lugar de o además del ligando basado en lípido.

En otro aspecto, el ligando es un resto, p. ej., una vitamina, que es absorbido por una célula diana, p. ej., una célula proliferante. Estos son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por una proliferación celular indeseada, p. ej., de tipo neoplásico o no neoplásico, p. ej., células cancerosas. Las vitaminas ilustrativas incluyen vitamina A, E, y K. Otras vitaminas ilustrativas incluyen vitamina B, p. ej., ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes absorbidos por células cancerosas. También se incluyen HSA y la lipoproteína de baja densidad (LDL).

En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación celular, preferiblemente, un agente de permeación celular helicoidal. Preferiblemente, el agente es anfipático. Un agente ilustrativo es un péptido tal como tat o antenopedia. Si el agente es un péptido, se puede modificar, incluido un peptidomimético, invertómeros, enlaces no peptídicos o pseudopeptídicos y el uso de aminoácidos D. El agente helicoidal es preferiblemente un agente alfa-helicoidal, que tiene preferiblemente una fase lipófila y lipófila.

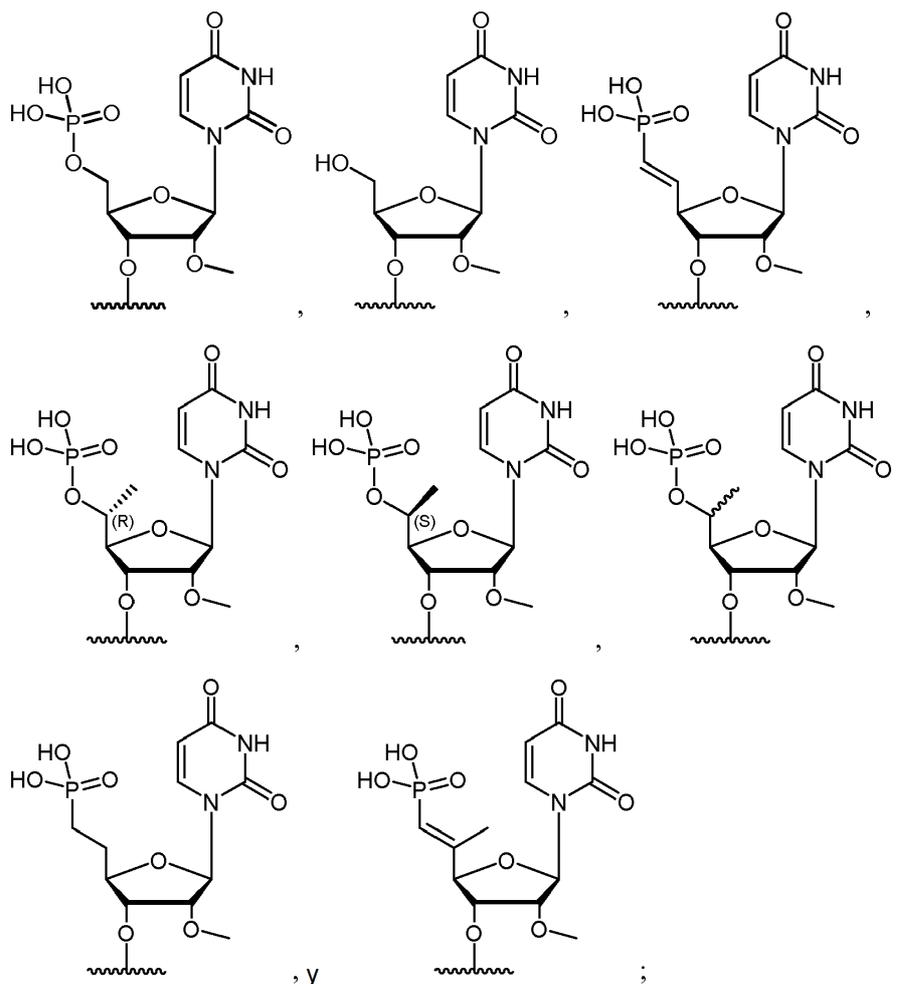
El ligando puede ser un péptido o peptidomimético. Un peptidomimético (también denominado en la presente memoria un oligopeptidomimético) es una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a un

péptido natural. El acoplamiento del péptido y peptidomimético a agentes oligonucleotídicos puede afectar la distribución farmacocinética del agente de silenciamiento por ARN, tal como al mejorar el reconocimiento y la absorción celulares. El resto peptídico o peptidomimético puede tener una longitud de aproximadamente 5-50 aminoácidos, p. ej., una longitud de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 aminoácidos. Un péptido o peptidomimético puede ser, por ejemplo, un péptido de permeación celular, péptido catiónico, péptido anfipático o péptido hidrófobo (p. ej., que consiste principalmente en Tyr, Trp o Phe). El resto peptídico puede ser un dendrímero péptido, restringido a péptido o péptido reticulado. El resto peptídico puede ser un péptido L o péptido D. En otra alternativa, el resto peptídico puede incluir una secuencia de translocación de membrana (MTS, por sus siglas en inglés) hidrófoba. Un péptido o peptidomimético se puede codificar mediante una secuencia aleatoria de ADN, tal como un péptido identificado a partir de una biblioteca de visualización en fagos, o una biblioteca combinatoria de una-perla-un-compuesto (OBOC, por sus siglas en inglés) (Lam et al., *Naturaleza* 354:82-84, 1991). En realizaciones ilustrativas, el péptido o peptidomimético anclado a un agente de silenciamiento por ARN a través de una unidad monomérica incorporada es un péptido de direccionamiento celular tal como un péptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) o imitador de RGD. Un resto peptídico puede variar en longitud de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos. Los restos peptídicos pueden tener una modificación estructural, tal como estabilidad aumentada o propiedades de conformación directas. Cualquiera de las modificaciones estructurales descritas más adelante se puede usar.

6) Compuestos

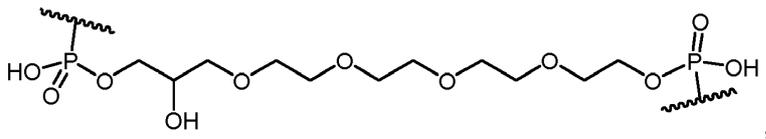
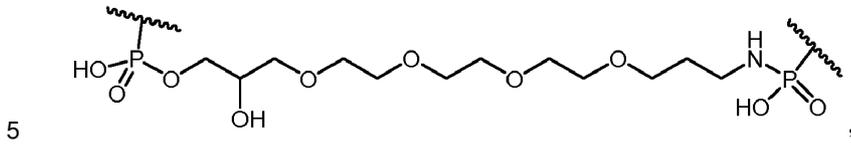
En un aspecto, se proporciona en la presente memoria un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 81, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para uso terapéutico en la inhibición de la expresión del gen *Huntingtina (HTT)* en un organismo o el uso de un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 81, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para inhibir la expresión del gen *Huntingtina (HTT)* en una célula in vitro, en donde

R¹ se selecciona del grupo que consiste en:



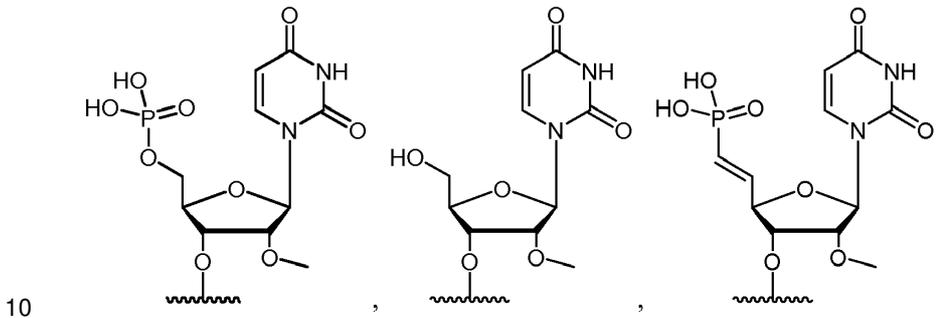
R³ se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un enlazador internucleotídico como se muestra en la Figura 82; y

L es un enlazador que conecta dos restos, en donde el enlazador se selecciona del grupo que consiste en una cadena de etilenglicol, una cadena de alquilo, un péptido, un ARN, un ADN,

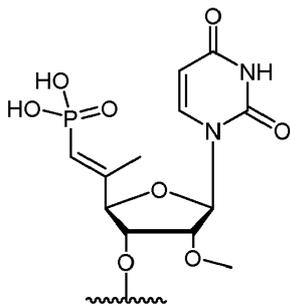


o una combinación de estos.

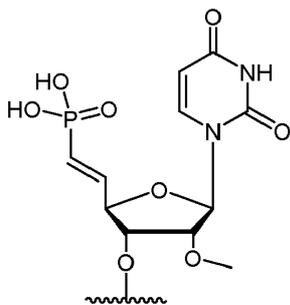
En una realización, R¹ se selecciona del grupo que consiste en



y



En otra realización, R¹ es



En otra realización, R^3 es un enlazador internucleotídico que se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un fosfortioato, un fosforoditioato, un metilfosfonato, un metilnofosfonato, un fosfotriéster y un boranofosfato.

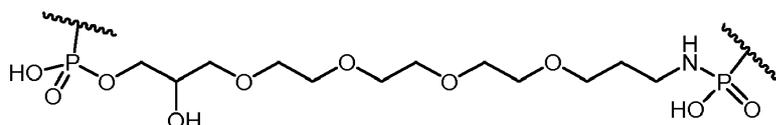
5 En otra realización, R^3 es un enlazador internucleotídico que se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un fosfortioato, un fosforoditioato y un boranofosfato.

En otra realización, R^3 es fosfortioato.

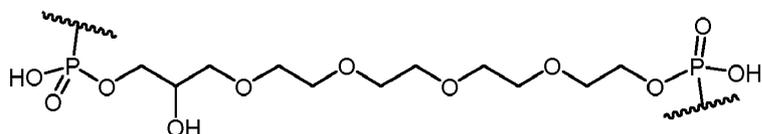
En otra realización, L se selecciona del grupo que consiste en una cadena de etilenglicol, una cadena de alquilo y un péptido.

En otra realización, L se selecciona de una cadena de etilenglicol o un péptido.

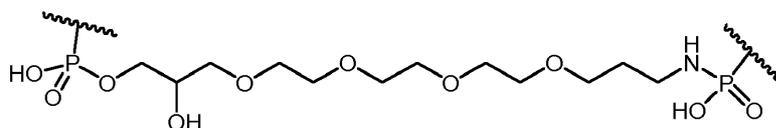
10 En todavía otra realización, L es



o

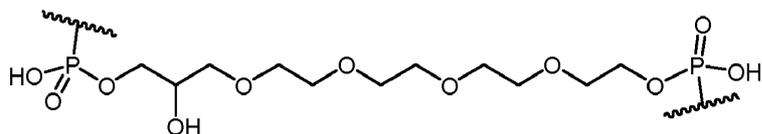


En todavía otra realización, L es



15

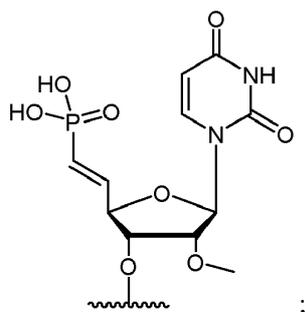
En otra realización, L es



En una realización, el compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 81 es un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 83.

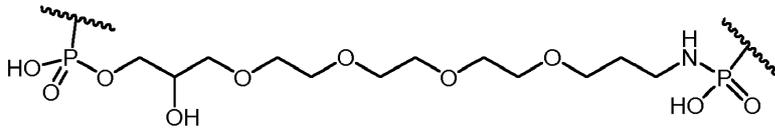
20 En otra realización, el compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 81 es un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 83 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde

R^1 es



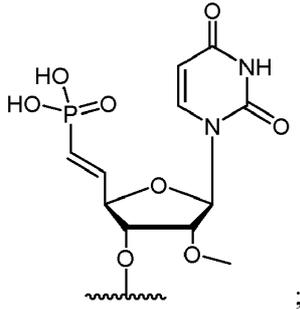
y

L es



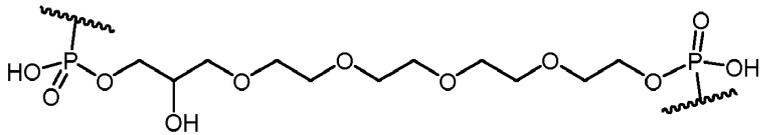
En otra realización, el compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 81 es un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 83 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde

5 R¹ es

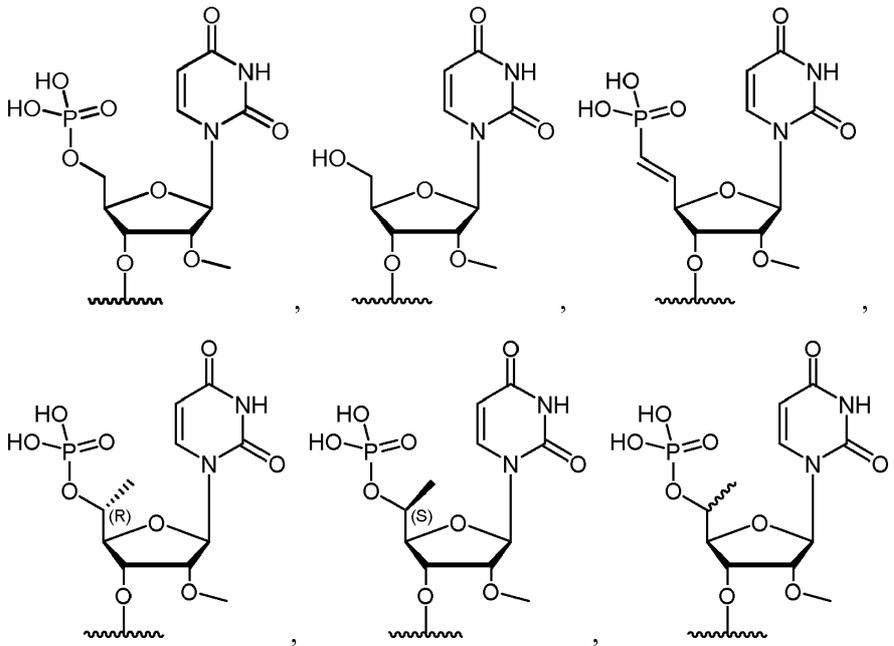


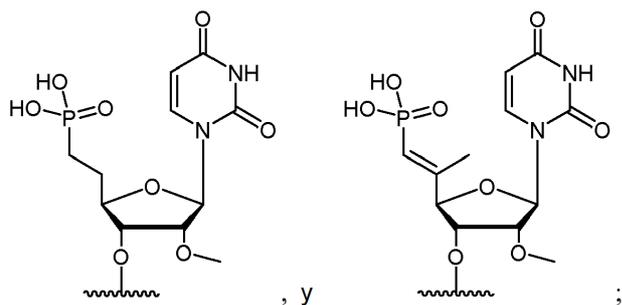
y

L es



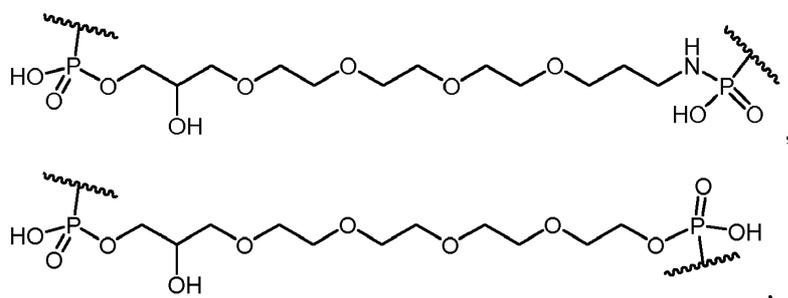
10 En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 84 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde R¹ se selecciona del grupo que consiste en





R³ se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un enlazador internucleotídico como se muestra en la Figura 82;

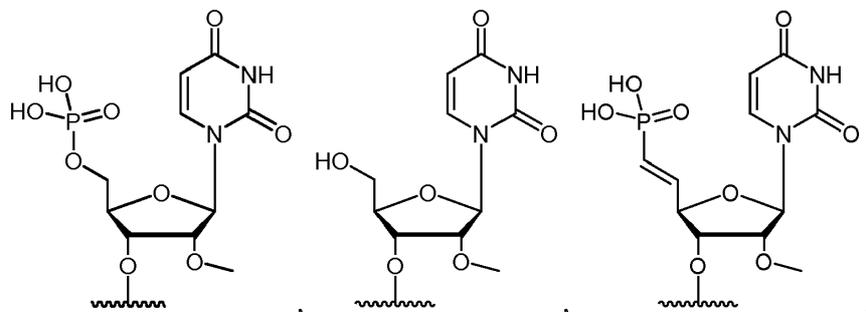
5 L es un enlazador que conecta dos restos, en donde el enlazador se selecciona del grupo que consiste en una cadena de etilenglicol, una cadena de alquilo, un péptido, un ARN, un ADN,



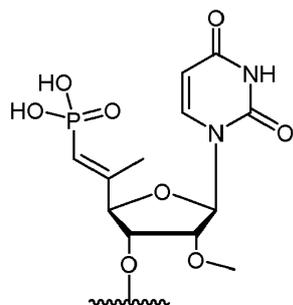
o una combinación de estos; y

10 B es un punto de ramificación entre dos o más enlazadores, en donde el punto de ramificación se selecciona del grupo que consiste en un glicol, un aminoácido o cualquier especie orgánica polivalente.

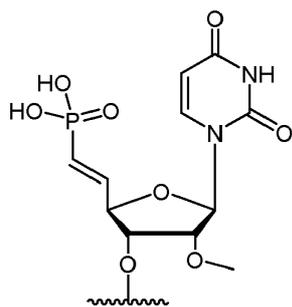
En una realización, R¹ se selecciona del grupo que consiste en



y



15 En otra realización, R¹ es



En otra realización, R^3 es un enlazador internucleotídico que se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato, un metilfosfonato, un metileno fosfonato, un fosfotriéster y un boranofosfato.

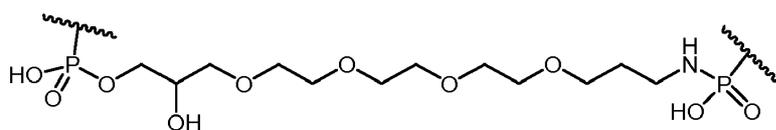
- 5 En otra realización, R^3 es un enlazador internucleotídico que se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato y un boranofosfato.

En otra realización, R^3 es fosforotioato.

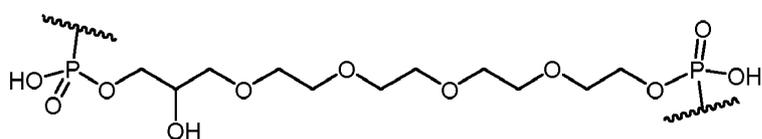
En otra realización, L se selecciona del grupo que consiste en una cadena de etilenglicol, una cadena de alquilo y un péptido.

- 10 En otra realización, L se selecciona de una cadena de etilenglicol o un péptido.

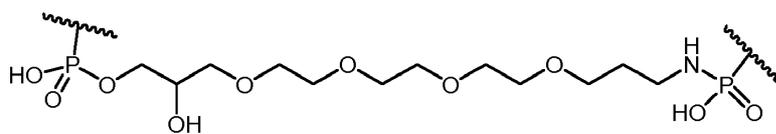
En todavía otra realización, L es



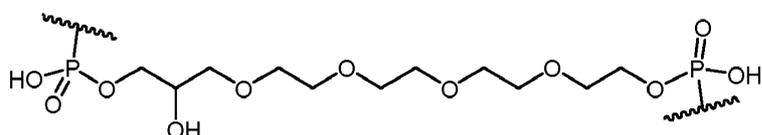
o



- 15 En todavía otra realización, L es



En otra realización, L es

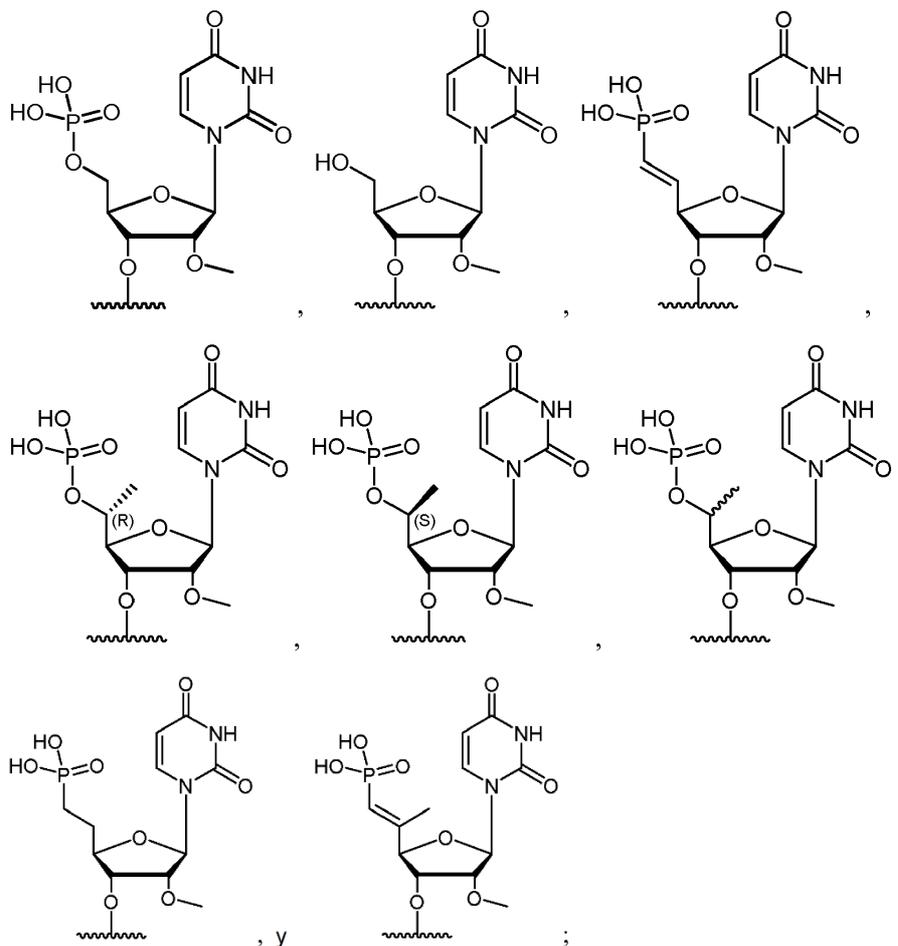


- 20 En una realización, B es un punto de ramificación entre dos o más enlazadores, en donde el punto de ramificación se selecciona de un glicol o un aminoácido. En otra realización, el punto de ramificación es un glicol. En otra realización, el punto de ramificación es un aminoácido.

En otra realización del compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 84, Y se define como se muestra en la Figura 86.

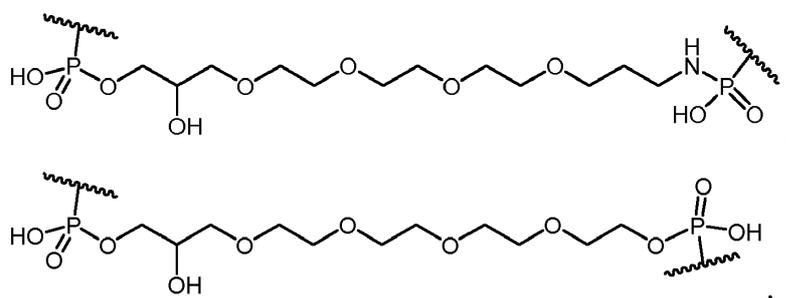
- 25 En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 85 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde

R¹ se selecciona del grupo que consiste en



- 5 R³ se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un enlazador internucleotídico como se muestra en la Figura 82;

L es un enlazador que conecta dos restos, en donde el enlazador se selecciona del grupo que consiste en una cadena de etilenglicol, una cadena de alquilo, un péptido, un ARN, un ADN,

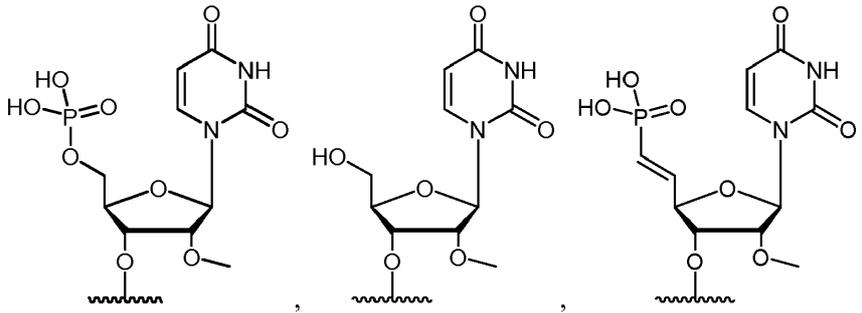


10

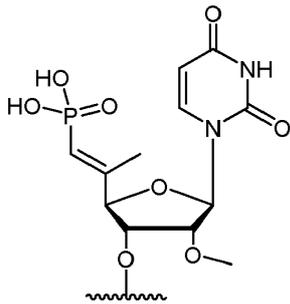
o una combinación de estos; y

B es un punto de ramificación entre dos o más enlazadores, en donde el punto de ramificación se selecciona del grupo que consiste en un glicol, un aminoácido o cualquier especie orgánica polivalente.

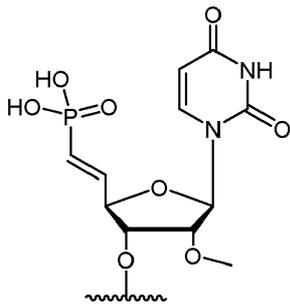
En una realización, R¹ se selecciona del grupo que consiste en



y



En otra realización, R¹ es



5

En otra realización, R³ es un enlazador internucleotídico que se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato, un metilfosfonato, un metileno fosfonato, un fosfotriéster y un boranofosfato.

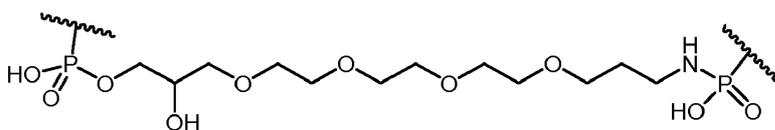
10 En otra realización, R³ es un enlazador internucleotídico que se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato y un boranofosfato.

En otra realización, R³ es fosforotioato.

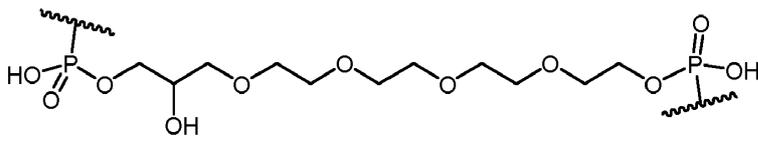
En otra realización, L se selecciona del grupo que consiste en una cadena de etilenglicol, una cadena de alquilo y un péptido.

En otra realización, L se selecciona de una cadena de etilenglicol o un péptido.

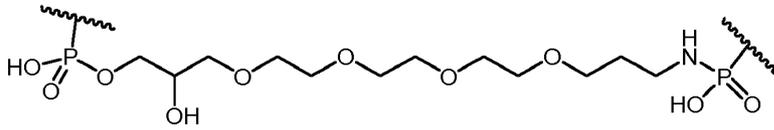
15 En todavía otra realización, L es



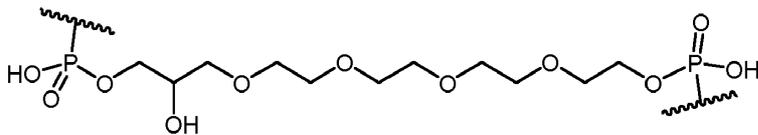
o



En todavía otra realización, L es



En otra realización, L es



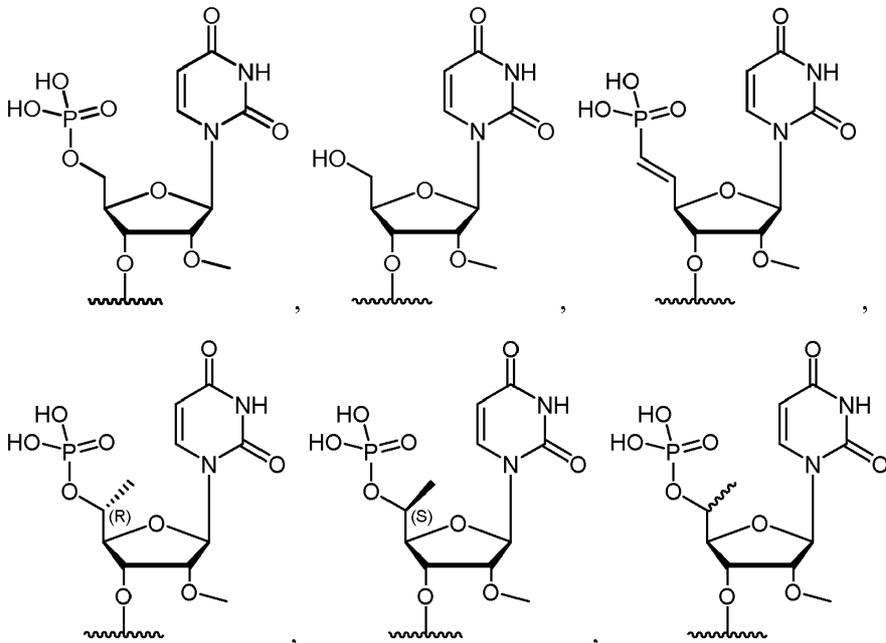
5

En una realización, B es un punto de ramificación entre dos o más enlazadores, en donde el punto de ramificación se selecciona de un glicol o un aminoácido. En otra realización, el punto de ramificación es un glicol. En otra realización, el punto de ramificación es un aminoácido.

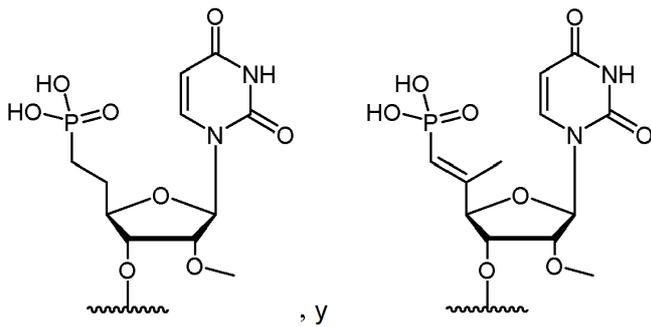
10 En una realización del compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 85, Y se define como se muestra en la Figura 86.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 87 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde

R¹ se selecciona del grupo que consiste en

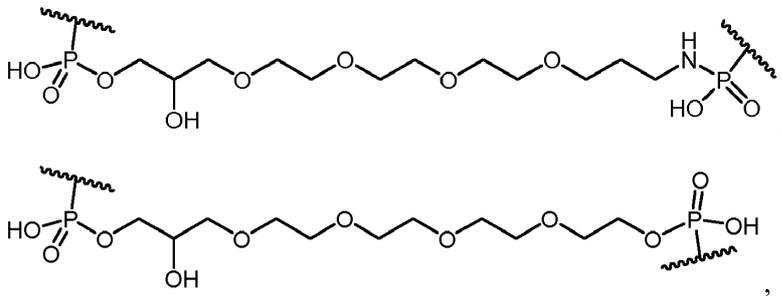


15



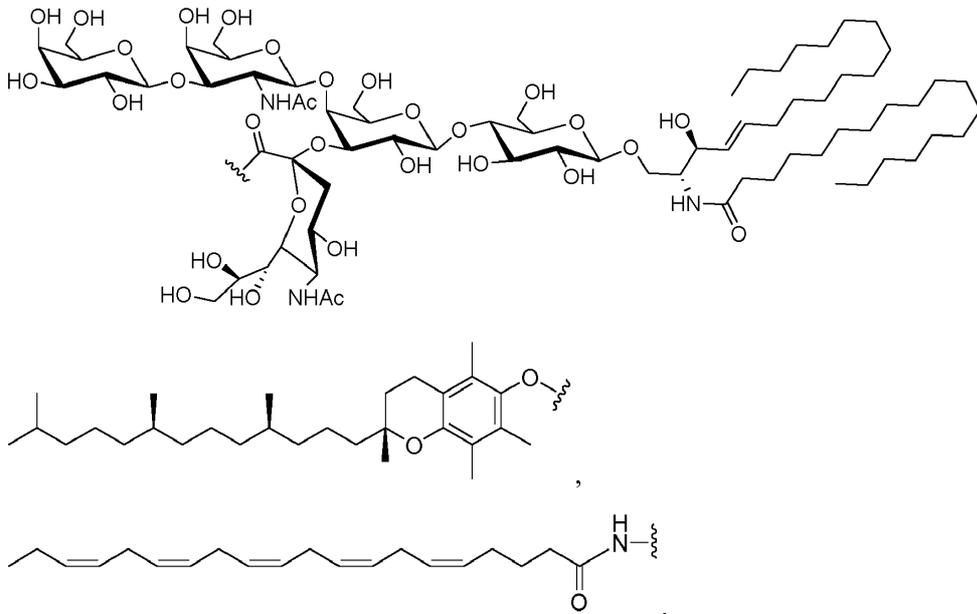
R³ se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un enlazador internucleotídico como se muestra en la Figura 82;

5 L es un enlazador que conecta dos restos, en donde el enlazador se selecciona del grupo que consiste en una cadena de etilenglicol, una cadena de alquilo, un péptido, un ARN, un ADN,

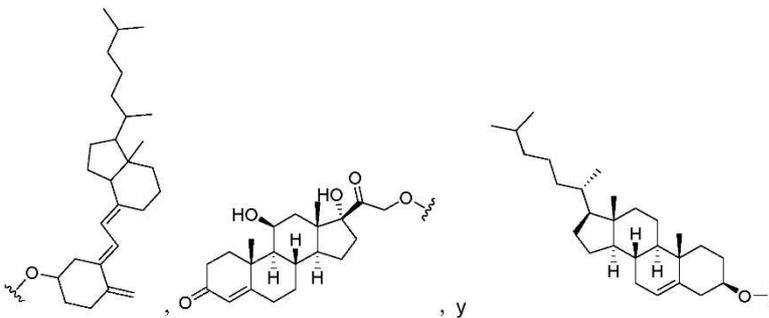
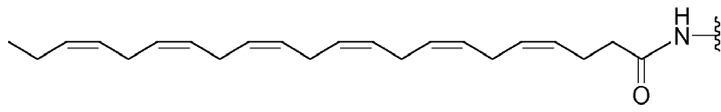
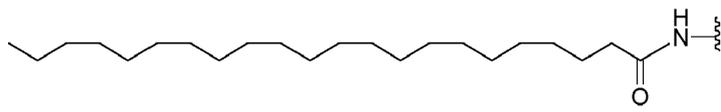
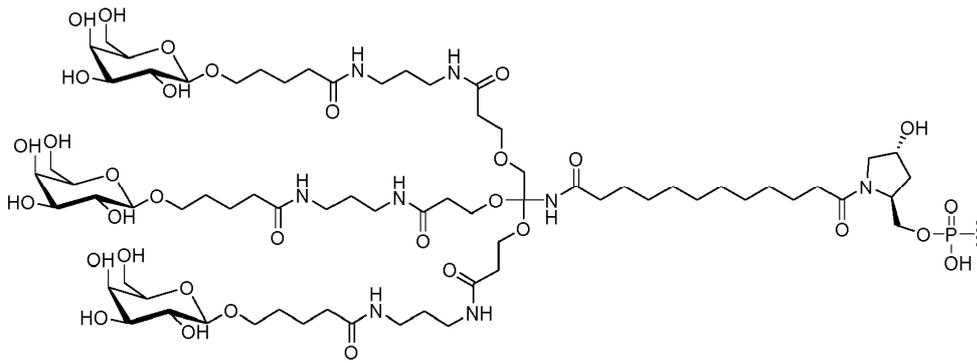
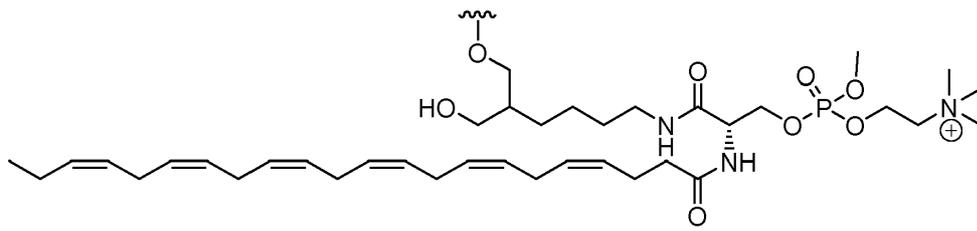


o una combinación de estos; y

10 R² se selecciona del grupo que consiste en una cadena alquilo (p. ej., C₁₋₆, C₁₋₁₀, C₁₋₂₀, C₁₋₃₀ o C₁₋₄₀), una vitamina, un ligando, un péptido, un conjugado bioactivo (que incluye, pero no se limita a, glucoesfingolípidos, ácidos grasos poliinsaturados, secoesteroides, hormonas esteroideas o lípidos esterol),

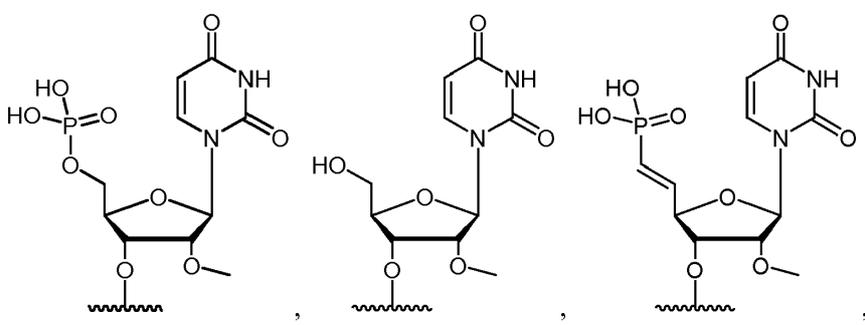


15

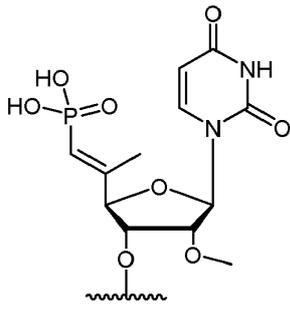


5

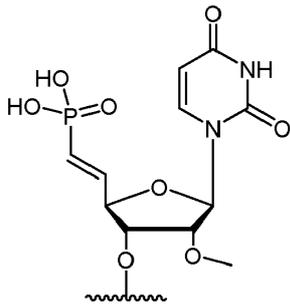
En una realización, R¹ se selecciona del grupo que consiste en



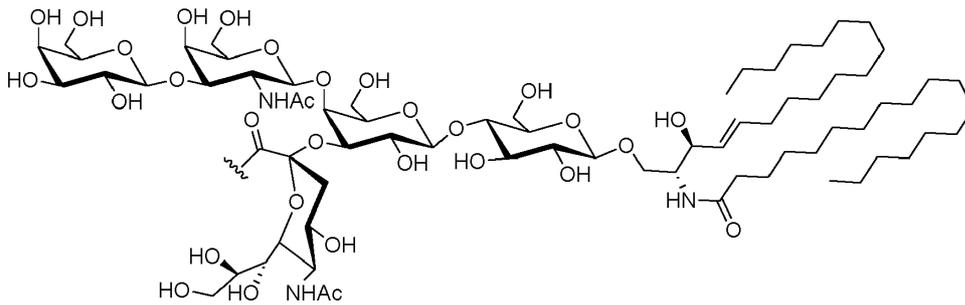
y



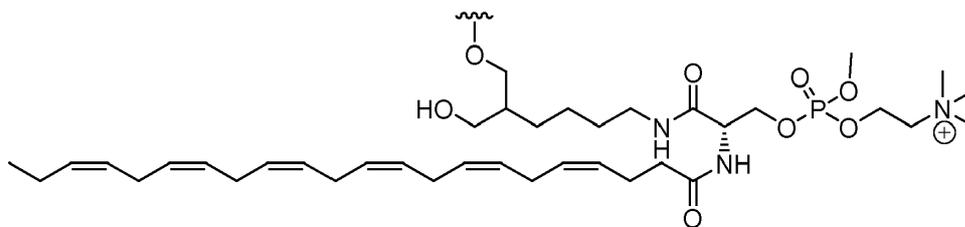
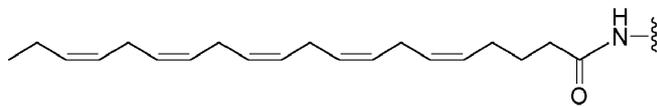
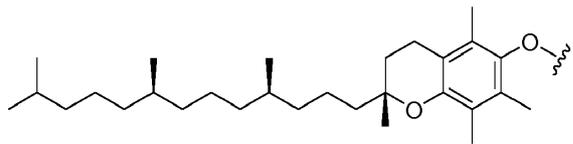
En otra realización, R¹ es

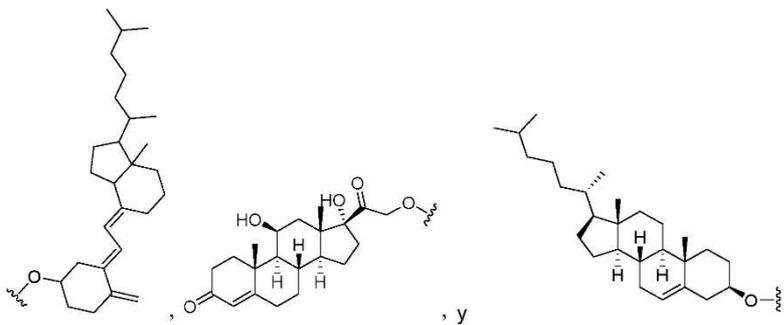
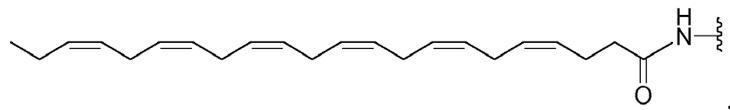
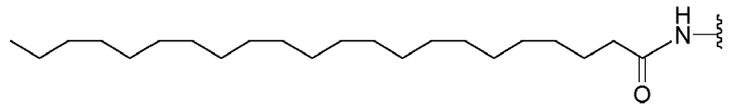
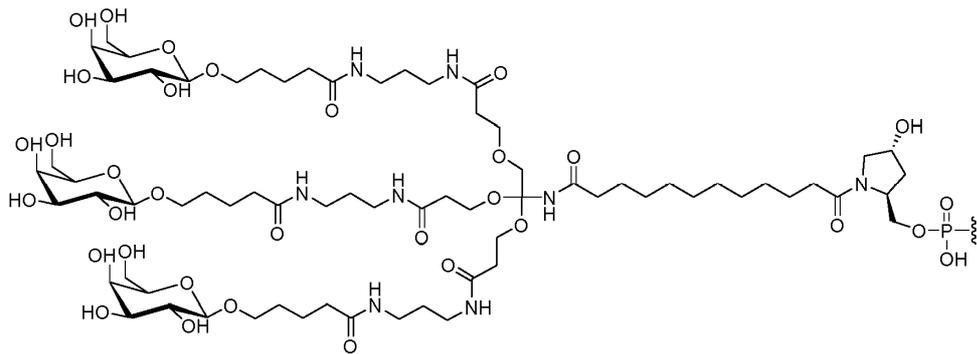


En otra realización, R² se selecciona del grupo que consiste en



5





- 5 En otra realización, R^3 es un enlazador internucleotídico que se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un fosfortioato, un fosforoditioato, un metilfosfonato, un metilnofosfonato, un fosfotriéster y un boranofosfato.

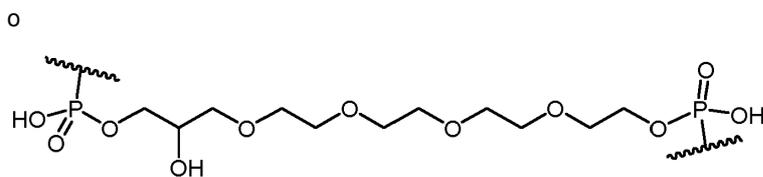
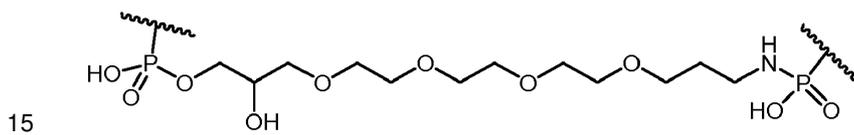
En otra realización, R^3 es un enlazador internucleotídico que se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un fosfortioato, un fosforoditioato y un boranofosfato.

- 10 En otra realización, R^3 es fosfortioato.

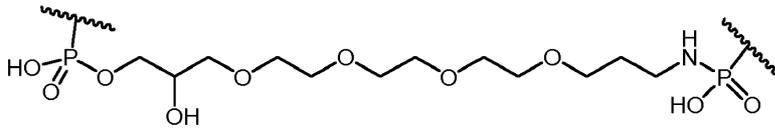
En otra realización, L se selecciona del grupo que consiste en una cadena de etilenglicol, una cadena de alquilo y un péptido.

En otra realización, L se selecciona de una cadena de etilenglicol o un péptido.

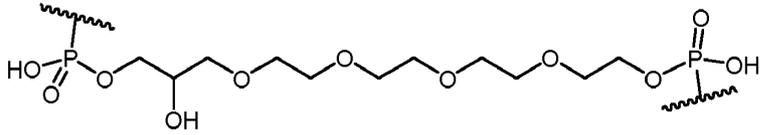
En todavía otra realización, L es



En todavía otra realización, L es



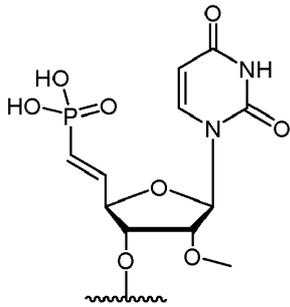
En otra realización, L es



5 En una realización, el compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 87 es un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 88.

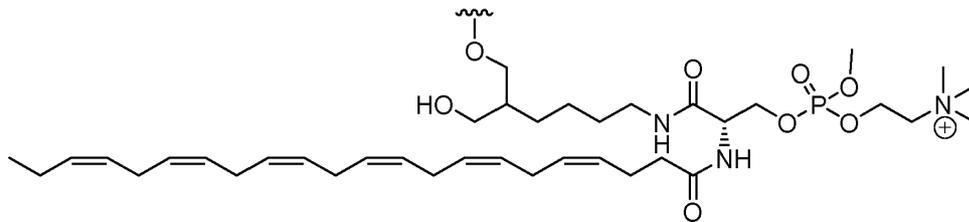
En otra realización, el compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 87 es un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 88 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde

R¹ es



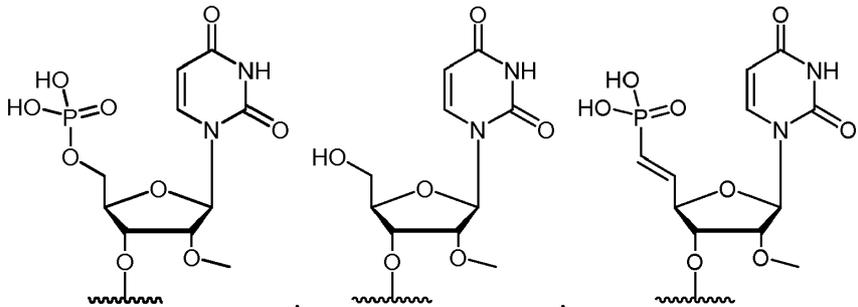
10 y

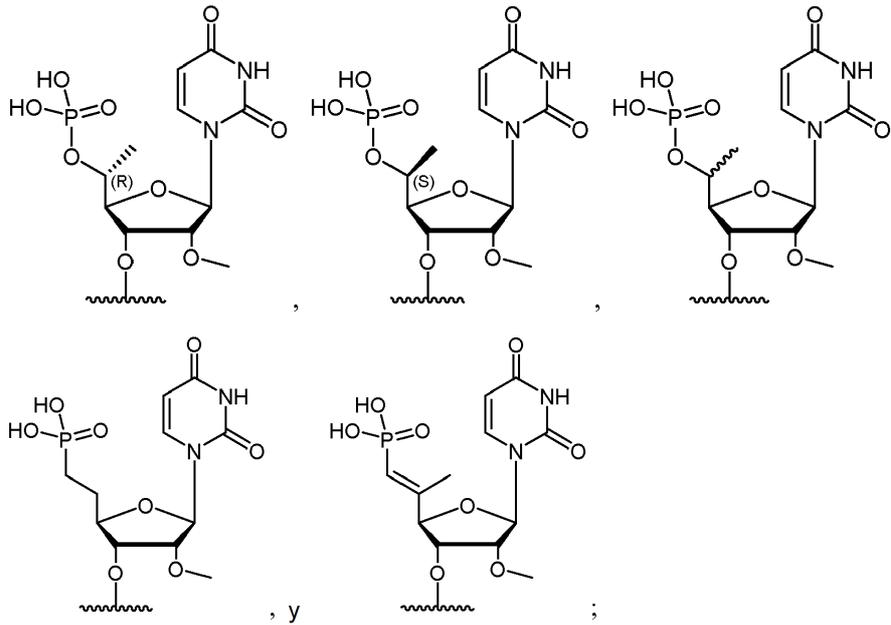
R² es



En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 89 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde

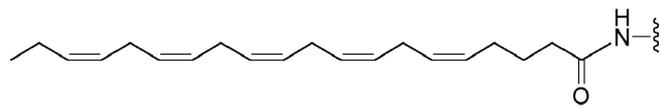
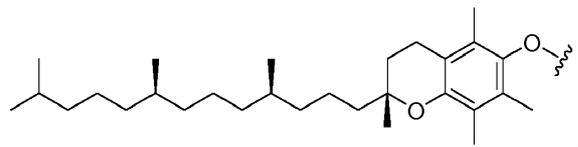
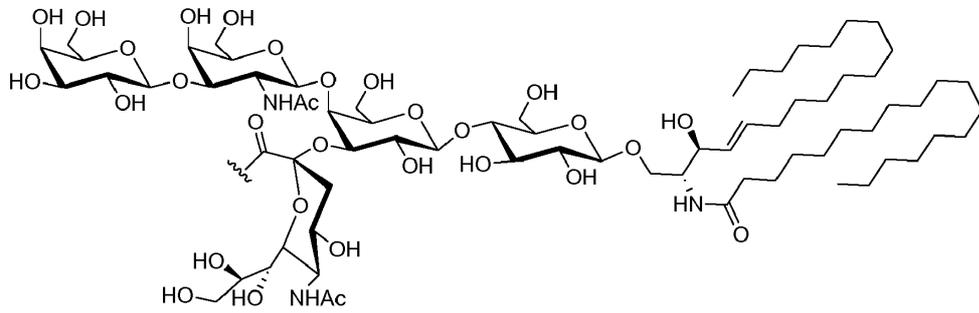
15 R¹ se selecciona del grupo que consiste en



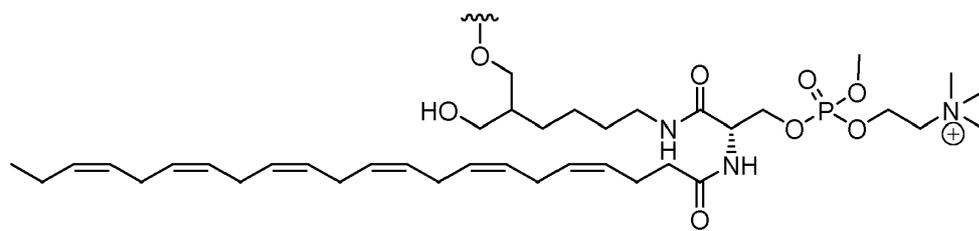


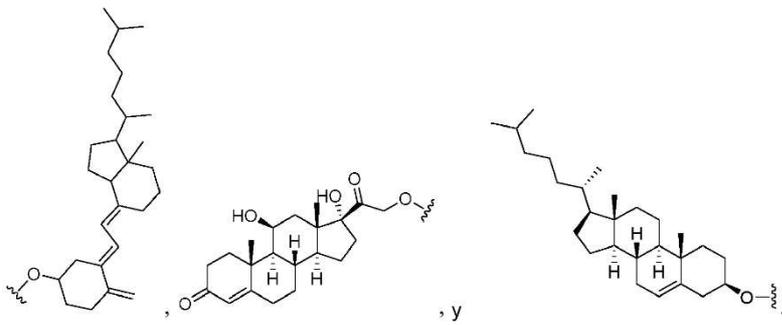
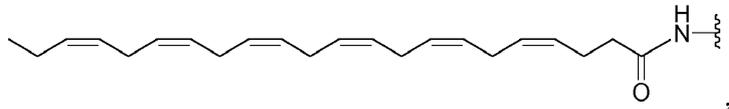
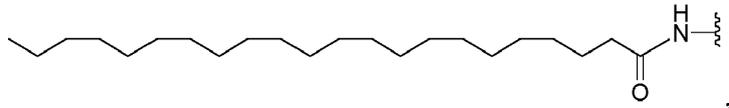
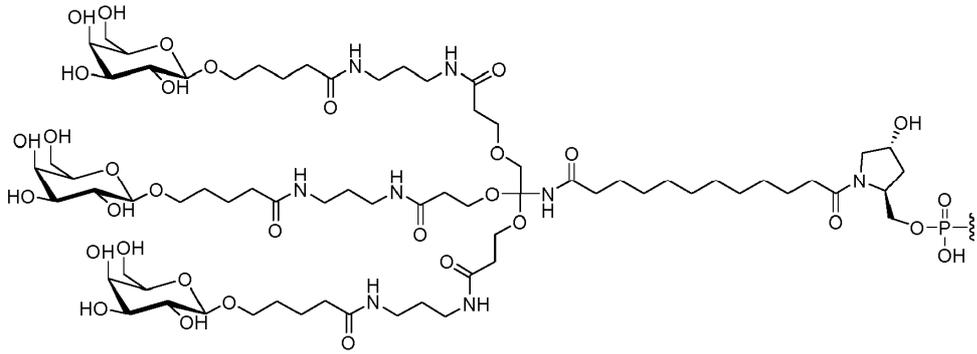
R³ se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un enlazador internucleotídico como se muestra en la Figura 82; y

- 5 R² se selecciona del grupo que consiste en una cadena alquilo (p. ej., C₁₋₆, C₁₋₁₀, C₁₋₂₀, C₁₋₃₀ o C₁₋₄₀), una vitamina, un ligando, un péptido, un conjugado bioactivo (que incluye, pero no se limita a, glucoesfingolípidos, ácidos grasos poliinsaturados, secoesteroides, hormonas esteroideas o lípidos esteroles),

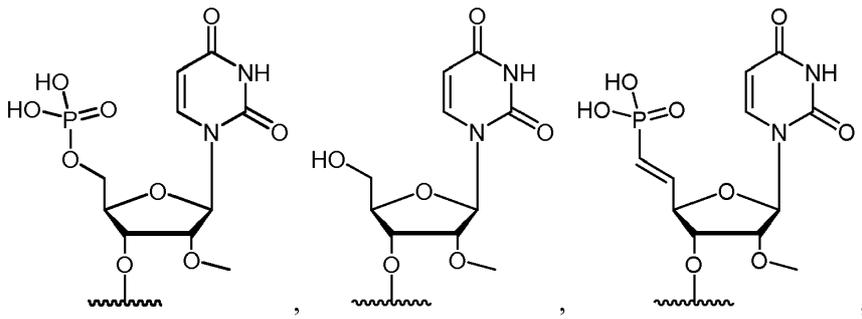


10

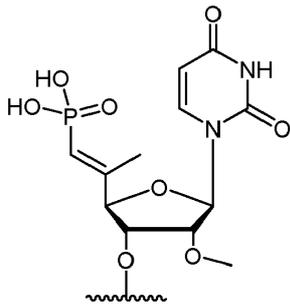




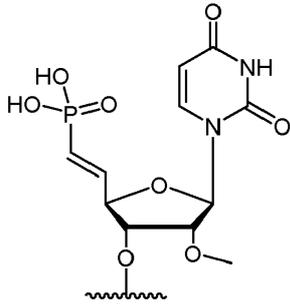
5 En una realización, R¹ se selecciona del grupo que consiste en



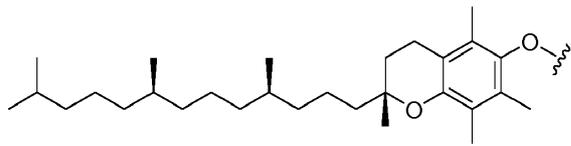
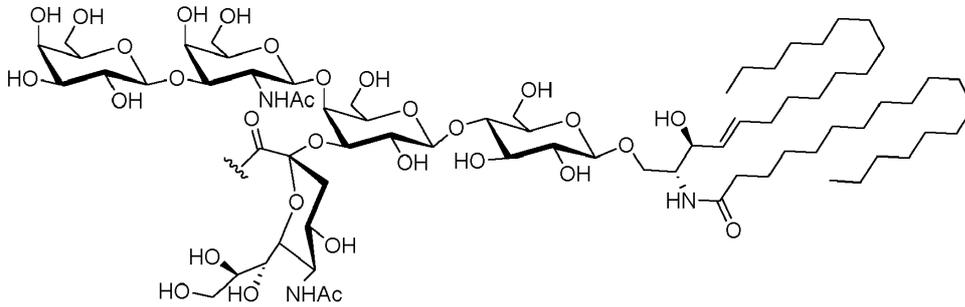
y



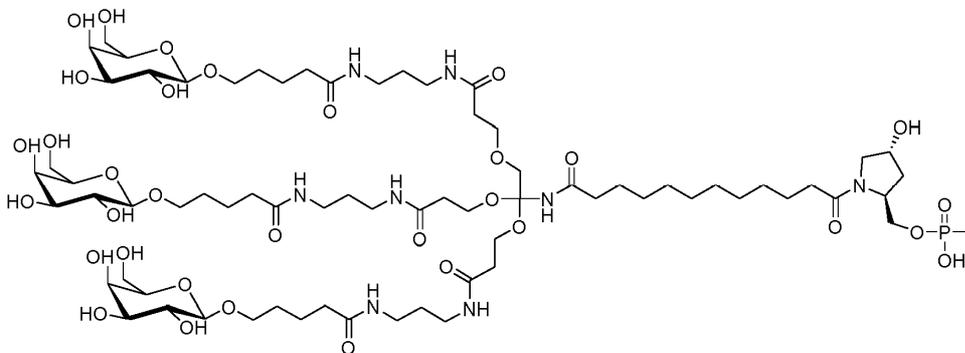
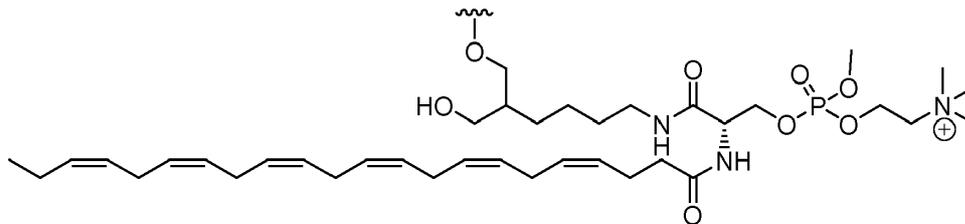
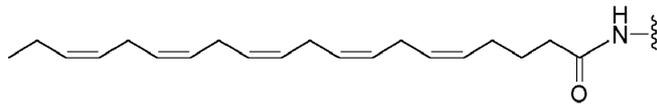
En otra realización, R¹ es

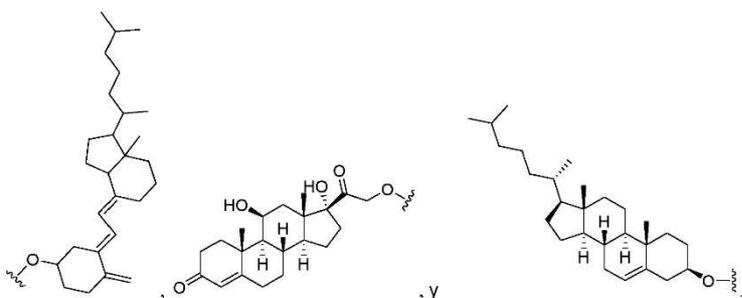
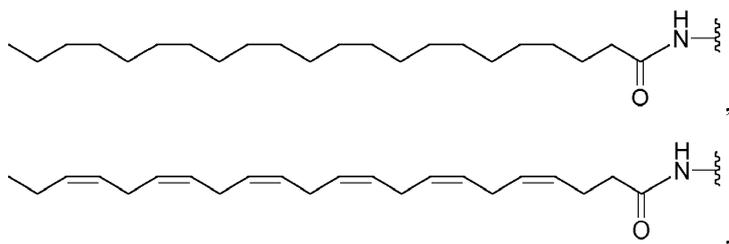


En otra realización, R² se selecciona del grupo que consiste en



5





5 En otra realización, R^3 es un enlazador internucleotídico que se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato, un metilfosfonato, un metilnofosfonato, un fosfotriéster y un boranofosfato.

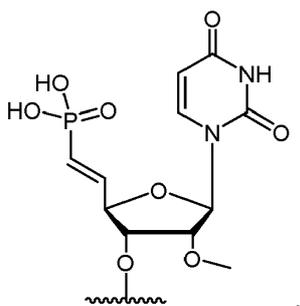
En otra realización, R^3 es un enlazador internucleotídico que se selecciona independientemente, en cada aparición, del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato y un boranofosfato.

En otra realización, R^3 es fosforotioato.

10 En una realización, el compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 89 es un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 90.

En una realización, el compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 89 es un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 90 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde

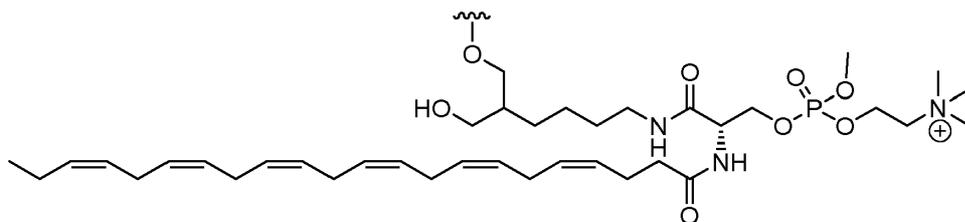
R^1 es



15

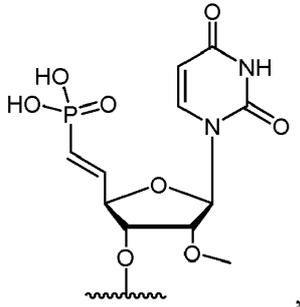
y

R^2 es



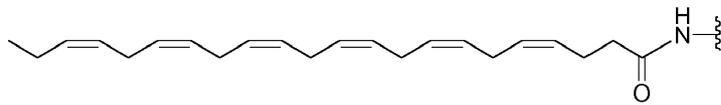
20 En una realización, el compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 89 es un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 90 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde

R¹ es



y

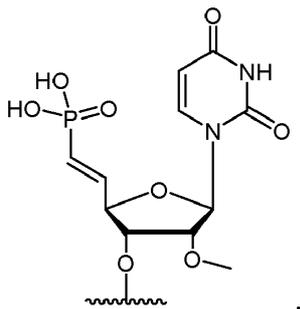
R² es



5

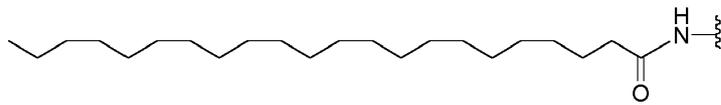
En una realización, el compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 89 es un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 90 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde

R¹ es



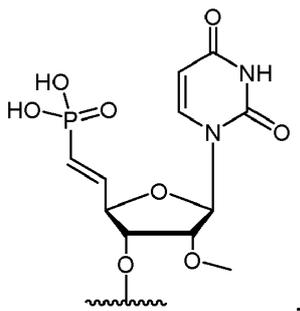
10 y

R² es



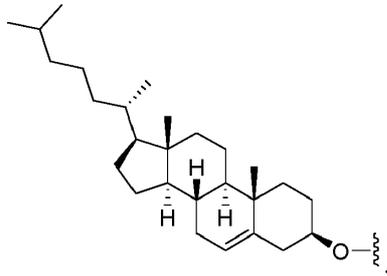
En una realización, el compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 89 es un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 90 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde

15 R¹ es



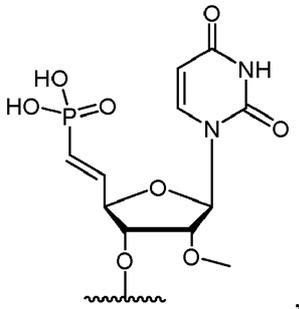
y

R² es



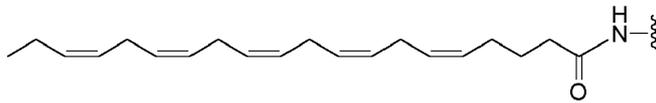
5 En una realización, el compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 89 es un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 90 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde

R¹ es



y

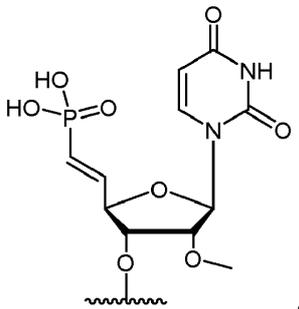
R² es



10

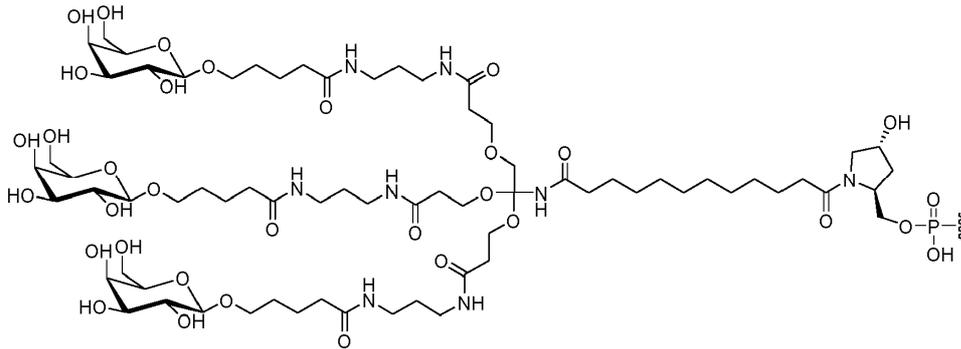
En una realización, el compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 89 es un compuesto de la Fórmula que se muestra en la Figura 90 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde

R¹ es



15 y

R² es



VIII. Métodos para introducir ácidos nucleicos, vectores y células hospedantes

Los agentes de silenciamiento por ARN como se describen en la presente memoria se pueden introducir directamente en la célula (p. ej., una célula neural) (es decir, intracelularmente); o se pueden introducir extracelularmente en una cavidad, espacio intersticial, en la circulación de un organismo, se puede introducir oralmente, o se puede introducir al bañar una célula u organismo en una disolución que contiene el ácido nucleico. La circulación vascular o extravascular, el sistema circulatorio o linfático y el líquido cefalorraquídeo son sitios donde se puede introducir el ácido nucleico.

Los agentes de silenciamiento por ARN como se describen en la presente memoria se pueden introducir al usar métodos de suministro de ácido nucleico conocidos en la técnica, incluida la inyección de una disolución que contiene el ácido nucleico, bombardeo mediante partículas cubiertas por el ácido nucleico, inmersión de la célula u organismo en una disolución del ácido nucleico, o electroporación de membranas celulares en presencia del ácido nucleico. Se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos en células, tales como transporte de portador mediado por lípido, transporte mediado por química y transfección con liposoma catiónico tal como fosfato cálcico y similares. El ácido nucleico se puede introducir junto con otros componentes que llevan a cabo una o más de las siguientes actividades: mejorar la captación de ácido nucleico por la célula o de cualquier otra manera aumentar la inhibición del gen diana.

Los métodos físicos para introducir ácidos nucleicos incluyen inyección de una disolución que contiene el ARN, bombardeo mediante partículas cubiertas por el ARN, inmersión de la célula u organismo en una disolución del ARN, o electroporación de membranas celulares en presencia del ARN. Una construcción vírica cargada en una partícula vírica lograría tanto la introducción eficaz de una construcción de expresión en la célula como la transcripción del ARN codificado mediante la construcción de expresión. Se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos en células, tales como transporte de portador mediado por lípido, transporte mediado por química, tal como fosfato cálcico y similares. Por lo tanto, el ARN se puede introducir junto con componentes que llevan a cabo una o más de las siguientes actividades: mejorar la captación de ARN por la célula, inhibir el apareamiento de cadenas simples, estabilizar las cadenas simples o de cualquier otra manera aumentar la inhibición del gen diana.

El ARN se puede introducir directamente en la célula (es decir, intracelularmente); o se puede introducir extracelularmente en una cavidad, espacio intersticial, en la circulación de un organismo, se puede introducir oralmente, o se puede introducir al bañar una célula u organismo en una disolución que contiene el ARN. La circulación vascular o extravascular, el sistema circulatorio o linfático y el líquido cefalorraquídeo son sitios donde se puede introducir el ARN.

La célula que tiene el gen diana puede ser de la línea germinal o somática, totipotente o pluripotente, divisibles o no divisibles, del parénquima o epitelio, inmortalizada o transformada o similares. La célula puede ser una célula madre o una célula diferenciada. Los tipos de células que son diferenciadas incluyen adipocitos, fibroblastos, miocitos, cardiomiocitos, endotelio, neuronas, glía, células sanguíneas, megacariocitos, linfocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, leucocitos, granulocitos, queratinocitos, condrocitos, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos y células de glándulas endocrinas o exocrinas.

Dependiendo del gen diana particular y la dosis del material de ARN bicatenario suministrada, este proceso puede proporcionar la pérdida parcial o completa de la función del gen diana. Una reducción o pérdida de la expresión génica de al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % o más de las células diana es ilustrativa. La inhibición de la expresión génica se refiere a la ausencia (o la disminución observable) en el nivel de la proteína y/o producto de ARNm de un gen diana. La especificidad se refiere a la capacidad para inhibir el gen diana sin manifestar efectos sobre otros genes de la célula. Las consecuencias de la inhibición se pueden confirmar al examinar las propiedades externas de la célula u organismo (como se presentan a continuación en los ejemplos) o mediante técnicas bioquímicas tales como hibridación con disolución de ARN, protección contra nucleasa, hibridación Northern, transcripción inversa, monitorización de la expresión génica con una micromatriz, unión a anticuerpo, ensayo de inmunoadsorción enzimática

(ELISA, por sus siglas en inglés), transferencia Western, Radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés), otros inmunoensayos y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés).

Para la inhibición mediada por ARN en una línea celular u organismo entero, la expresión génica se somete a ensayo convenientemente mediante el uso de un gen indicador o de resistencia a fármaco cuyo producto proteico se somete a ensayo fácilmente. Dichos genes indicadores incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS, por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina (AP, por sus siglas en inglés), beta galactosidasa (LacZ), beta glucoronidasa (GUS), cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS) y derivados de estas. Hay múltiples marcadores seleccionables disponibles que confieren resistencia a la ampicilina, bleomicina, cloramfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Dependiendo del ensayo, la determinación cuantitativa de la cantidad de expresión génica permite determinar un grado de inhibición que es mayor que 10 %, 33 %, 50 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula no tratada según la presente invención. Las dosis más bajas del material inyectado y tiempos más prolongados después de la administración del agente de iARN pueden provocar una inhibición en una fracción más pequeña de células (p. ej., al menos 10 %, 20 %, 50 %, 75 %, 90 % o 95 % de las células diana). La cuantificación de la expresión génica en una célula puede mostrar cantidades similares de inhibición al nivel de acumulación del ARNm diana o traducción de la proteína diana. Como ejemplo, la eficacia de la inhibición se puede determinar al evaluar la cantidad de producto génico en la célula; el ARNm se puede detectar con una sonda de hibridación que tiene una secuencia de nucleótidos fuera de la región usada para el ARN bicatenario inhibidor, o el polipéptido traducido se puede detectar con un anticuerpo generado contra la secuencia polipeptídica de dicha región.

El ARN se puede introducir en una cantidad que permite el suministro de al menos una copia por célula. Las dosis más altas (p. ej., al menos 5, 10, 100, 500 o 1000 copias por célula) de material pueden proporcionar una inhibición más eficaz; las dosis más bajas también pueden ser útiles para aplicaciones específicas.

En un aspecto ilustrativo, la eficacia de un agente de iARN como se describe en la presente memoria (p. ej., un ARNip dirigido a una secuencia diana de htt) se somete a prueba para determinar su capacidad para degradar específicamente ARNm mutante (p. ej., ARNm de htt y/o la producción de proteína huntingtina) en células, en particular, en neuronas (p. ej., líneas clonales neuronales estriatales o corticales y/o neuronas primarias). También son adecuadas para ensayos de validación basados en células otras células fácilmente transfectables, por ejemplo, células HeLa o células COS. Las células se transfectan con ADNc humanos naturales o mutantes (p. ej., ADNc de huntingtina humano natural o mutante). Se cotransfectan el ARNip estándar, el ARNip modificado o vectores capaces de producir ARNip a partir de ARNm en bucle de U. Se mide la reducción selectiva en el ARNm diana (p. ej., ARNm de huntingtina) y/o proteína diana (p. ej., proteína huntingtina). La reducción del ARNm o proteína diana se puede comparar con niveles de ARNm o proteína diana en ausencia de un agente de iARN o en presencia de un agente de iARN que no se dirige al ARNm de htt. El ARNm o proteína introducido exógenamente (o ARNm o proteína endógeno) se puede someter a ensayo para hacer una comparación. Cuando se usan células neuronales, que se sabe que son un tanto resistentes a las técnicas de transfección estándares, puede ser deseable introducir los agentes de iARN (p. ej., ARNip) mediante captación pasiva.

Virus adenoasociados recombinantes y vectores

Como se describe en la presente memoria, los virus adenoasociados recombinantes (VAAr) y sus vectores asociados se pueden usar para suministrar uno o más ARNip a células, p. ej., células neurales (p. ej., células del cerebro). El VAAV es capaz de infectar muchos tipos de células diferentes, aunque la eficacia de la infección varía según el serotipo, que lo determina la secuencia de la proteína de la cápside. Se han identificado varios serotipos de VAA naturales, donde los serotipos 1-9 son los más comúnmente usados para VAA recombinante. El VAA-2 es el tipo más estudiado en profundidad y publicado. El sistema de VAA-DJ incluye los serotipos AAV-DJ y AAV-DJ/8. Estos serotipos se crearon a través de transposición de ADN de múltiples serotipos de VAA para producir VAA con cápsides híbridas que tienen eficacias de transducción mejoradas *in vitro* (AAV-DJ) e *in vivo* (AAV-DJ/8) en una variedad de células y tejidos.

Como se describe en la presente memoria, el suministro generalizado al sistema nervioso central (SNC) se puede lograr mediante suministro intravascular del virus adenoasociado 7 recombinante (VAA7r), VAA9R y VAA10r u otros VAAr adecuados (Zhang et al. (2011) Mol. Ther. 19(8):1440-8. doi: 10.1038/mt.2011.98. Epub 2011 May 24). Los VAAVr y sus vectores asociados se conocen en la técnica y se describen en las solicitudes de patente estadounidense 2014/0296486, 2010/0186103, 2008/0269149, 2006/0078542 y 2005/0220766.

Los VAAr se pueden suministrar a un sujeto en composiciones según cualesquiera métodos apropiados conocidos en la técnica. Un VAAr se puede suspender un portador fisiológicamente compatible (es decir, en una composición) y se puede administrar a un sujeto, es decir un animal hospedante, tal como un ser humano, ratón, rata, gato, perro, oveja, conejo, caballo, vaca, cabra, cerdo, cobayo, hámster, gallina, pavo, un primate no humano (p. ej., macaco) o similares. En ciertas realizaciones, el animal hospedante es un animal hospedante no humano.

El suministro de uno o más VAAr a un sujeto mamífero se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante inyección intramuscular o mediante administración en el torrente circulatorio del sujeto mamífero. La administración en el torrente circulatorio puede ser mediante inyección en una vena, una arteria o cualquier otro conducto vascular. En ciertas realizaciones, uno o más VAAr se administran al torrente circulatorio por medio de una perfusión de extremidad aislada, una técnica conocida en las técnicas quirúrgicas, el método posibilita esencialmente que el experto aisle una extremidad de la circulación sistémica antes de la administración de los viriones del VAAr. Una variante de la técnica de perfusión de extremidad aislada, descrita en la patente estadounidense núm. 6.177.403, también puede ser empleada por el experto en la técnica para administrar viriones en la vasculatura de una extremidad aislada para mejorar potencialmente la transducción en las células o tejido muscular. Además, en ciertas instancias, puede ser deseable suministrar viriones al sistema nervioso central (SNC) de un sujeto. Por "SNC" se entiende todas las células y tejido del cerebro y la médula espinal de un vertebrado. Por lo tanto, el término incluye, pero no se limita a, células neuronales, células gliales, astrocitos, líquido cefalorraquídeo (CSF), espacios intersticiales, hueso, cartilago y similares. Los VAA recombinantes se pueden suministrar directamente al SNC o el cerebro mediante inyección en, p. ej., la región ventricular, así como al cuerpo estriado (p. ej., el núcleo caudado o putamen del cuerpo estriado), médula espinal y unión neuromuscular, o lóbulo cerebeloso, con una aguja, catéter o dispositivo relacionado, al usar técnicas neuroquirúrgicas conocidas en la técnica, tales como mediante inyección estereotáctica (ver, p. ej., Stein et al., *J Virol* 73:3424-3429, 1999; Davidson et al., *PNAS* 97:3428-3432, 2000; Davidson et al., *Nat. Genet.* 3:219-223, 1993; y Alisky and Davidson, *Hum. Gene Ther.* 11:2315-2329, 2000).

Las composiciones como se describen en la presente memoria pueden comprender un VAAr solo o en combinación con uno o más virus distintos (p. ej., un segundo VAAr codificante que tiene uno o más transgenes diferentes). En ciertas realizaciones, una composición comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más VAAr, donde cada uno tiene uno o más transgenes diferentes.

Una cantidad eficaz de un VAAr es una cantidad suficiente para infectar de manera direccionada a un animal, direccionada un tejido deseado. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz de un VAAr es una cantidad suficiente para producir un modelo de animal transgénico somático estable. La cantidad eficaz dependerá principalmente de factores tales como la especie, la edad, el peso, la salud del sujeto y el tejido diana y, por lo tanto, puede variar entre los animales y tejidos. Por ejemplo, una cantidad eficaz de uno o más VAAr está generalmente en el intervalo aproximadamente 1 ml a aproximadamente 100 ml de disolución que contiene de aproximadamente 10^9 a 10^{16} copias del genoma. En algunos casos, una dosificación entre aproximadamente 10^{11} a 10^{12} copias de genoma de VAAr es apropiada. En ciertas realizaciones, 10^{12} copias de genoma de VAAr es eficaz para dirigirse a tejidos del corazón, hígado y páncreas. En algunos casos, se producen animales transgénicos estables mediante múltiples dosis de un VAAr.

En algunas realizaciones, las composiciones de VAAr se formulan para reducir la aglomeración de partículas de VAA en la composición, particularmente, donde hay altas concentraciones de VAAr presentes (p. ej., aproximadamente 10^{13} copias del genoma/ml o más). Los métodos para reducir la aglomeración de VAAr se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, la adición de tensioactivos, ajuste del pH, ajuste de la concentración de sal, etc. (Ver, p. ej., Wright et al. (2005) *Molecular Therapy* 12:171-178)

Los "vectores de VAA recombinante(VAAr)" comprenden, como mínimo, un transgén y sus secuencias reguladoras, y repeticiones terminales invertidas (ITR, por sus siglas en inglés) de VAA hacia 5' y 3'. Este vector de VAA recombinante es el que se carga en una proteína de cápside y se suministra a una célula diana seleccionada. En algunas realizaciones, el transgén es una secuencia de ácido nucleico, heteróloga con respecto a las secuencias del vector, que codifica un polipéptido, proteína, molécula de ARN funcional (p. ej., ARNip) u otro producto génico, de interés. La secuencia codificante de ácido nucleico está funcionalmente enlazada a componentes reguladores de tal manera que permite la transcripción, traducción y/o expresión del transgén en una célula de un tejido diana.

Las secuencias de VAA del vector típicamente comprenden secuencias de repetición terminal invertida (ITR) hacia 5' y 3' que actúan en cis (Ver, p. ej., B. J. Carter, en "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, págs. 155 168 (1990)). Las secuencias de ITR tienen normalmente una longitud de aproximadamente 145 pares de bases. En ciertas realizaciones, sustancialmente se usan las secuencias enteras que codifican las ITR en la molécula, aunque se permite algún grado de modificación menor de estas secuencias. La capacidad de modificar estas secuencias de ITR está dentro de las habilidades de la técnica. (Ver, p. ej., textos tales como Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989); y K. Fisher et al., *J Virol.*, 70:520 532 (1996)). Un ejemplo de dicha molécula empleada en la presente invención es un plásmido que "actúa en cis" que contiene el transgén, en el que la secuencia del transgén seleccionada y asociada a elementos reguladores está flanqueada por las secuencias de ITR del VAA hacia 5' y 3'. Las secuencias de ITR de VAA se pueden obtener a partir de cualquier VAA conocido, incluidos tipos de VAA de mamíferos descritos adicionalmente en la presente memoria.

IX. Métodos de tratamiento

También se describen en la presente memoria métodos profilácticos y terapéuticos para tratar a un sujeto en riesgo de (o susceptible a) una enfermedad o trastorno causado, en su totalidad o en parte, por una proteína mutante de

ganancia de función. La enfermedad o trastorno puede ser una enfermedad o trastorno de repetición de trinucleótido. La enfermedad o trastorno puede ser un trastorno de poliglutamina. Según la invención, la enfermedad o trastorno es un trastorno asociado a la expresión de huntingtina y en el que la alteración de huntingtina, especialmente la amplificación de la cantidad de copias de la repetición CAG, conduce a un defecto en el gen huntingtina (estructura o función) o proteína huntingtina (estructura o función o expresión), de manera que dichas manifestaciones clínicas incluyen las observadas en pacientes con la enfermedad de Huntington.

"Tratamiento" o "tratar", según se usa en la presente memoria, se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico (p. ej., un agente de ARN o vector o transgén que lo codifica) a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido o línea celular aislado de un paciente, que padece la enfermedad o trastorno, un síntoma de la enfermedad o trastorno o una predisposición hacia una enfermedad o trastorno, con el objetivo de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, restablecer o afectar la enfermedad o trastorno, los síntomas de la enfermedad o trastorno, o la predisposición hacia la enfermedad.

También se describe en la presente memoria un método para prevenir en un sujeto, una enfermedad o trastorno según se describieron anteriormente, al administrar al sujeto un agente terapéutico (p. ej., un agente de iARN o vector o transgén que lo codifica). Los sujetos en riesgo de padecer la enfermedad se pueden identificar mediante, por ejemplo, cualquier o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico, como se describen en la presente memoria. La administración de un agente profiláctico se puede producir antes de la manifestación de síntomas característicos de la enfermedad o trastorno, de manera que se previene la enfermedad o trastorno o, alternativamente, se retarda su progresión.

También se describen en la presente memoria métodos para tratar a sujetos terapéuticamente, es decir, alterar la aparición de síntomas de la enfermedad o trastorno. El método modulador, como se describe en la presente memoria, puede implicar poner en contacto una célula que expresa un mutante de ganancia funcional con un agente terapéutico (p. ej., un agente de iARN o vector o transgén que lo codifica) que es específico para una secuencia diana dentro del gen (p. ej., SEQ ID NO:1, 2 o 3), de manera que se logra una interferencia específica para secuencia con el gen. Estos métodos se pueden llevar a cabo *in vitro* (p. ej., al cultivar la célula con el agente) o, alternativamente, *in vivo* (p. ej., al administrar el agente a un sujeto).

En relación con los métodos profiláctico y terapéutico de tratamiento, dichos tratamientos se pueden adaptar o modificar específicamente, en función del conocimiento obtenido del campo de la farmacogenómica. "Farmacogenómica", según se usa en la presente memoria, se refiere a la aplicación de tecnologías genómicas tales como secuenciación de gen, genética estadística y análisis de expresión génica a fármacos en desarrollo clínico y en el mercado. Más específicamente, el término se refiere al estudio de cómo los genes de un paciente determinan su respuesta a un fármaco (p. ej., un "fenotipo de respuesta a fármaco" o "genotipo de respuesta a fármaco" de un paciente). Por lo tanto, también se describen en la presente memoria métodos para adaptar un tratamiento profiláctico terapéutico de un individuo con moléculas de gen diana, como se describen en la presente memoria, o moduladores de gen diana según dicho genotipo de respuesta a fármaco del individuo. La farmacogenómica permite a un médico o profesional de la salud dirigir los tratamientos profilácticos o terapéuticos a los pacientes que más se beneficiarán con el tratamiento y evitar el tratamiento de pacientes que experimentarán efectos secundarios relacionados con el fármaco tóxicos.

Los agentes terapéuticos se pueden someter a prueba en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, un agente de iARN (o vector de expresión o transgén que lo codifica) como se describe en la presente memoria se puede usar en un modelo animal para determinar la eficacia, toxicidad o los efectos secundarios del tratamiento con dicho agente. Alternativamente, un agente terapéutico se puede usar en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de dicho agente. Por ejemplo, un agente se puede usar en un modelo animal para determinar la eficacia, toxicidad o los efectos secundarios del tratamiento con dicho agente. Alternativamente, un agente se puede usar en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de dicho agente.

Una composición farmacéutica que contiene un agente de silenciamiento por ARN se puede administrar a cualquier paciente diagnosticado con o en riesgo de desarrollar un trastorno neurológico, tal como la enfermedad de Huntington. También se describe en la presente memoria que el paciente recibe el diagnóstico de un trastorno neurológico y el paciente de cualquier otra manera tiene una buena salud en general. Por ejemplo, la paciente no está terminalmente enfermo y es probable que el paciente viva al menos 2, 3, 5 o más años después del diagnóstico. Se puede tratar al paciente inmediatamente después del diagnóstico, o el tratamiento se puede retardar hasta que el paciente experimente más síntomas debilitantes, tales como fluctuaciones motoras y disquinesia en pacientes con enfermedad de Parkinson. También se describe en la presente memoria al paciente que no ha alcanzado una etapa avanzada de la enfermedad.

Un agente de silenciamiento por ARN modificado para captación mejorada en células neurales se puede administrar en una dosificación unitaria menor que aproximadamente 1,4 mg por kg de peso corporal, o menor que 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005 o 0,00001 mg por kg de peso corporal, y menor que 200 nmoles de agente de ARN (p. ej., aproximadamente $4,4 \times 10^{16}$ copias) por kg de peso corporal, o menor que 1500,

750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15, 0,075, 0,015, 0,0075, 0,0015, 0,00075, 0,00015 nmoles de agente de silenciamiento por ARN por kg de peso corporal. La dosificación unitaria, por ejemplo, se puede administrar mediante inyección (p. ej., intravenosa o intramuscular, intratecalmente, o directamente en el cerebro), una dosis inhalada o una aplicación tópica. Las dosificaciones particularmente preferidas son menores que 2, 1, o 0,1 mg/kg de peso corporal.

5 El suministro de un agente de silenciamiento por ARN directamente a un órgano (p. ej., directamente al cerebro) puede ser en una dosificación en el orden de aproximadamente 0,00001 mg a aproximadamente 3 mg por órgano, o preferiblemente aproximadamente 0,0001-0,001 mg por órgano, aproximadamente 0,03-3,0 mg por órgano, aproximadamente 0,1-3,0 mg por ojo o aproximadamente 0,3-3,0 mg por órgano. La dosificación puede ser una cantidad eficaz para tratar o prevenir un trastorno o enfermedad neurológico, p. ej., la enfermedad de Huntington. La
10 dosificación unitaria se puede administrar menos frecuentemente que una vez al día, p. ej., menos de cada 2, 4, 8 o 30 días. La dosificación unitaria puede no administrarse con una frecuencia (p. ej., una frecuencia no regular). Por ejemplo, la dosificación unitaria se puede administrar en una sola vez. La dosis eficaz se puede administrar con otras modalidades terapéuticas tradicionales.

15 También se describe en la presente memoria que se administra a un sujeto una dosis inicial, y una o más dosis de mantenimiento de un agente de silenciamiento por ARN. La dosis o dosis de mantenimiento son generalmente menores que la dosis inicial, p. ej., la mitad menor que la dosis inicial. Un régimen de mantenimiento puede incluir tratar al sujeto con una dosis o dosis que varían de 0,01 µg a 1,4 mg/kg de peso corporal por día, p. ej., 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, o 0,00001 mg por kg de peso corporal por día. Las dosis de mantenimiento se administran preferiblemente no más de una vez cada 5, 10 o 30 días. Además, el régimen de tratamiento puede durar un período de tiempo que
20 variará dependiente de la naturaleza de la enfermedad particular, su gravedad y la condición general del paciente. La dosificación se puede administrar no más de una vez por día, p. ej., no más de una vez cada 24, 36, 48 o más horas, p. ej., no más de una vez cada 5 u 8 días. Después del tratamiento, se pueden monitorizar al paciente para determinar cambios en su condición y el alivio de los síntomas del estado de enfermedad. La dosificación del compuesto se puede aumentar en el caso de que el paciente no responda significativamente a los niveles de dosificación actuales, o la
25 dosis se puede reducir si se observa un alivio de los síntomas del estado de enfermedad, si el estado de enfermedad se ha eliminado o si se observan efectos secundarios indeseados.

La dosis eficaz se puede administrar en una única dosis o en dos o más dosis, según se desee o considere apropiada según las circunstancias específicas. Si se desea facilitar las infusiones repetidas o frecuentes, puede ser recomendable la implantación de un dispositivo de suministro, p. ej., una bomba, una endoprótesis semipermanente (p. ej., intravenosa, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular), o depósito. En una realización, una composición
30 farmacéutica incluye una pluralidad de especies de agente de silenciamiento por ARN. En otra realización, la especie de agente de silenciamiento por ARN tiene secuencias que no se superponen y no están adyacentes a otras especies con respecto a una secuencia diana de origen natural. En otra realización, la pluralidad de especies de agente de silenciamiento por ARN es específica para diferentes genes diana de origen natural. En otra realización, el agente de
35 silenciamiento por ARN es específico para un alelo. En otra realización, la pluralidad de especies de agente de silenciamiento por ARN se dirige a dos o más secuencias diana (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis o más secuencias diana)

Después del tratamiento satisfactorio, puede ser deseable hacer que el paciente se someta a una terapia de mantenimiento para prevenir la recidiva del estado de enfermedad, en donde el compuesto como se describe en la
40 presente memoria se administra en una dosis de mantenimiento que varía de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal (ver la patente estadounidense núm. 6.107.094).

La concentración de la composición del agente de silenciamiento por ARN es una cantidad suficiente para ser eficaz en el tratamiento o la prevención de un trastorno o para regular una afección fisiológica en humanos. La concentración o cantidad de agente de silenciamiento por ARN administrada dependerá de los parámetros determinados para el
45 agente y el método de administración, p. ej. nasal, bucal o pulmonar. Por ejemplo, las formulaciones nasales tienden a requerir concentraciones mucho más bajas de algunos ingredientes para evitar la irritación o quemadura de los pasajes nasales. Algunas veces es deseable diluir una formulación oral hasta 10-100 veces para proporcionar una formulación nasal adecuada.

Ciertos factores pueden influir sobre la dosificación requerida para tratar de manera eficaz a un sujeto incluso, pero sin limitarse a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de silenciamiento por ARN puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de
50 tratamientos. También se apreciará que la dosificación eficaz de un agente de silenciamiento por ARN para el tratamiento puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosificación pueden resultar y volverse evidentes a partir de los resultados de ensayos de diagnóstico como se describen en la presente memoria. Por ejemplo, se puede monitorizar al sujeto después de administrarle una composición de agente de silenciamiento por ARN. En función de la información de la monitorización, se puede administrar una cantidad
55 adicional de la composición de agente de silenciamiento por ARN.

La dosificación depende de la gravedad y capacidad de respuesta la condición de enfermedad que se trata, donde el transcurso del tratamiento dura de varios días a varios meses, o hasta que se produce una cura o se lograr una disminución del estado de enfermedad. Las pautas de dosificación óptimas se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente. Las personas con experiencia pueden determinar fácilmente las dosificaciones, metodologías de dosificación y índices de repetición óptimos. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de compuestos individuales, y generalmente se pueden estimar en función de la CE50 que se halló que es eficaz en modelos animales in vitro e in vivo. También se describe en la presente memoria que los modelos animales incluyen animales transgénicos que expresan un gen humano, p. ej., un gen que produce un ARN diana, p. ej., un ARN expresado en una célula neural. El animal transgénico puede tener una deficiencia del ARN endógeno correspondiente. En otra realización, la composición para evaluar incluye un agente de silenciamiento por ARN que es complementario, al menos en una región interna, a una secuencia que se conserva entre el ARN diana en el modelo animal y el ARN diana en un humano.

X. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

La invención se refiere a usos de los agentes descritos anteriormente para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos como se describieron *Infra*. Por consiguiente, los moduladores (p. ej., agentes de iARN) como se describen en la presente memoria se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Dichas composiciones típicamente comprenden la molécula de ácido nucleico, proteína, anticuerpo o compuesto modulador y un portador farmacéuticamente aceptable. Según se usa en la presente memoria, se pretende que la frase "portador farmacéuticamente aceptable" incluya todos y cualesquiera disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardante de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de estos en las composiciones. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica como se describe en la presente memoria se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral, p. ej., intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, oral (p. ej., inhalación), transdérmica (tópica) y transmucosal. Una composición farmacéutica como se describe en la presente memoria se puede suministrar al líquido cefalorraquídeo (CSF) mediante una vía de administración que incluye, pero no se limita a, administración intraestrial (IS), administración intracerebroventricular (ICV) y administración intratecal (IT) (p. ej., a través de una bomba, una infusión o similares). Las disoluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio y dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede alojar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o una dispersión inyectable estéril. Para la administración intravenosa, IS, ICV e/o IT, los portadores adecuados incluyen disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). En todos los casos, la composición deber ser estéril y debe ser fluida en la medida que exista la capacidad de aplicarse fácilmente con jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y durante el almacenamiento y debe estar conservada contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de estos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr al incluir en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, y posterior esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos para la preparación son secado al vacío y liofilización que proporciona un polvo del

ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución de estos previamente esterilizada por filtración.

5 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Se pueden encapsular en cápsulas de gelatina o comprimir hasta formar comprimidos. A los efectos de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usar en la forma de comprimidos, tabletas o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar al usar un portador fluido para su uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y se borbotea y expectora o traga. Se pueden incluir agentes aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Los comprimidos, pastillas, cápsulas, tabletas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o
10 compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un fluidificante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta piperita, salicilato de metilo o saborizante de naranja.

15 Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de un pulverizador en aerosol a partir de un contenedor o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, p. ej., un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

La administración sistémica también se puede hacer por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan penetradores apropiados para la barrera que se va a permear
20 en la formulación. Dichos penetrados se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr a través del uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan como ungüentos, bálsamos, geles o cremas como se conocen generalmente en la técnica.

25 Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (p. ej., con bases para supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para suministro rectal.

Los agentes de silenciamiento por ARN también se pueden administrar mediante transfección o infección al usar métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, los métodos descritos en McCaffrey et al. (2002), Nature, 418(6893), 38-9 (transfección hidrodinámica); Xia et al. (2002), Nature Biotechnol., 20(10), 1006-10 (suministro
30 mediado por virus); o Putnam (1996), Am. J. Health Syst. Pharm. 53(2), 151-160, errata en Am. J. Health Syst. Pharm. 53(3), 325 (1996).

Los agentes de silenciamiento por ARN también se pueden administrar mediante cualquier método adecuado para la administración de agentes de ácido nucleico, tales como una vacuna de ADN. Estos métodos incluyen cañones de genes, bioinyectores y parches cutáneos, así como métodos sin aguja tales como la tecnología de vacuna de ADN con micropartículas descrita en patente estadounidense núm. 6.194.389, y la vacunación sin aguja transdérmica para
35 mamíferos con vacuna en forma de polvo como se describe en la patente estadounidense núm. 6.168.587. Además, es posible el suministro intranasal, como se describe en, inter alia, Hamajima et al. (1998), Clin. Immunol. Immunopathol., 88(2), 205-10. También se pueden usar liposomas (p. ej., como se describe en la patente estadounidense núm. 6.472.375) y microencapsulación. También se pueden usar sistemas de suministro de micropartículas dirigibles biodegradables (p. ej., como se describe en la patente estadounidense núm. 6.471.996).

En una realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán al compuesto contra la rápida eliminación del cuerpo, tales como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles tales como etilenvinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la
45 preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones de liposomas (incluidos liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos víricos) también se pueden usar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense núm. 4.522.811.

50 Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria, según se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de activo compuesto calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosificación unitarias como se describen en la presente memoria es indicada y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea alcanzar, y las limitaciones inherentes a la técnica de producir compuestos con tal compuesto activo para el tratamiento de individuos.
55

La toxicidad y eficacia terapéutica de dichos compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación DL50/DE50. Se prefieren los compuestos que exhiben índices terapéuticos grandes. Aunque se pueden usar compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debería tener cuidado para diseñar un sistema de suministro que dirige dichos compuestos hacia el sitio de tejido afectado para minimizar el daño potencial a células no infectadas y reducir, de este modo, los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de ensayos en cultivo celular y estudios con animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones en la circulación que incluyen la DE50 con escasa o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración usada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos con cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática en la circulación que incluyen la CE50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza la mitad de la respuesta máxima) como se determina en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar de manera precisa dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un contenedor, empaque o dispensador junto con instrucciones opcionales para la administración.

Como se define en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de silenciamiento por ARN (es decir, una dosificación eficaz) depende del agente de silenciamiento por ARN seleccionado. Por ejemplo, si se selecciona un plásmido que codifica ARNhc, se puede administrar una dosis simple en cantidades en el intervalo de aproximadamente 1 µg a 1000 mg; se pueden administrar 10, 30, 100 o 1000 µg. Se pueden administrar 1-5 g de las composiciones. Las composiciones se pueden administrar de una a una o más veces por día a una o más veces por semana; incluso una vez cada dos días. El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir sobre la dosificación y el tiempo requeridos para tratar de manera eficaz a un sujeto incluso, pero sin limitarse a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína, polipéptido o anticuerpo puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos.

Las moléculas de ácido nucleico como se describen en la presente memoria se pueden insertar en construcciones de expresión construcciones, p. ej., vectores víricos, vectores retrovíricos, casetes de expresión o vectores de plásmido vírico, p. ej., al usar métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Xia et al., (2002), *Supra*. Las construcciones de expresión se pueden suministrar a un sujeto mediante, por ejemplo, inhalación, oralmente, inyección intravenosa, administración local (ver la patente estadounidense núm. 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (ver p. ej., Chen et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de suministro puede incluir el vector en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se incorpora el vehículo de suministro. Alternativamente, cuando se puede producir el vector de suministro completo intacto a partir de células recombinantes, p. ej., células retrovíricas, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de suministro génico.

Las moléculas de ácido nucleico como se describen en la presente memoria también pueden incluir ARN horquillados cortos (ARNhc) y construcciones de expresión genomanipuladas para expresar los ARNhc. La transcripción de los ARNhc se inicia en un promotor de polimerasa III (pol III) y se cree que se termina en la posición 2 de un sitio de terminación de la transcripción 4-5-timina. Después de la expresión, se cree que los ARNhc se pliegan en una estructura de tallo-bucle con prolongaciones de UU hacia 3'; posteriormente, los extremos de estos ARNhc se procesan y los ARNhc se convierten en moléculas similares a ARNip de aproximadamente 21 nucleótidos. Brummelkamp et al. (2002), Science, 296, 550-553; Lee et al. (2002), supra; Miyagishi and Taira (2002), Nature Biotechnol., 20, 497-500; Paddison et al. (2002), supra; Paul (2002), supra; Sui (2002) supra; Yu et al. (2002), supra.

Las construcciones de expresión pueden ser cualquier construcción adecuada para su uso en el sistema de expresión apropiado e incluyen, pero no se limitan a, vectores retrovíricos, casetes de expresión lineal, plásmidos y vectores víricos o derivados víricamente, como se conocen en la técnica. Dichas construcciones de expresión pueden incluir uno o más promotores inducibles, sistemas de promotor de ARN Pol III tales como los promotores de ARNnp U6 o promotores HI ARN polimerasa III u otros promotores conocidos en la técnica. Las construcciones pueden incluir una o ambas cadenas del ARNip. Las construcciones de expresión que expresan ambas cadenas también pueden incluir estructuras de bucle que enlazan ambas cadenas, o cada cadena se puede transcribir por separado a partir de promotores separados dentro de la misma construcción. Cada cadena también se puede transcribir a partir de una construcción de expresión separada, Tuschl (2002), *Supra*.

Una composición que incluye un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria se puede suministrar al sistema nervioso mediante una variedad de vías. Las vías ilustrativas incluyen suministro intratecal, parenquimatoso (p. ej., en el cerebro), nasal y ocular. La composición también se puede suministrar sistémicamente, p. ej., mediante inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, que es particularmente útiles para el suministro de los agentes de silenciamiento por ARN a neuronas periféricas. Una vía de suministro preferida es directamente al cerebro, p. ej., en los ventrículos o el hipotálamo del cerebro, o en las áreas laterales o dorsales del cerebro. Los agentes de silenciamiento por ARN para suministro a células neurales se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración.

Por ejemplo, las composiciones pueden incluir una o más especies de un agente de silenciamiento por ARN y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas como se describen en la presente memoria se pueden administrar de varios modos dependiendo si se desea un tratamiento local o sistémico y del área que se va a tratar. La administración puede ser tópica (incluida oftálmica, intranasal, transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye goteo intravenoso, inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular, administración intratecal o intraventricular (p. ej., intracerebroventricular). Un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria se puede administrar a través de la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés) mediante el uso de una variedad de composiciones y métodos adecuados descritos en la presente memoria.

La vía de suministro puede depender del trastorno del paciente. Por ejemplo, se puede administrar a un sujeto con diagnóstico de enfermedad de Huntington un agente de silenciamiento por ARN anti-htt como se describe en la presente memoria directamente en el cerebro (p. ej., en el globo pálido o el cuerpo estriado de los núcleos basales, y cerca de las neuronas de proyección estriatal del cuerpo estriado). Además de un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria, se puede administrar a un paciente una segunda terapia, p. ej., una terapia paliativa y/o terapia específica para la enfermedad. La terapia secundaria puede ser, por ejemplo, sintomática (p. ej., para aliviar los síntomas), neuroprotectora (p. ej., para ralentizar o detener la progresión de la enfermedad) o restauradora (p. ej., para revertir el proceso de la enfermedad). Para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, por ejemplo, las terapias sintomáticas pueden incluir los fármacos haloperidol, carbamazepina o valproato. Otras terapias pueden incluir psicoterapia, fisioterapia, foniatría, auxilio para la comunicación y la memoria, servicios de apoyo y asesoramiento nutricional.

Un agente de silenciamiento por ARN se puede suministrar a las células neurales del cerebro. Se pueden usar métodos de suministro que no requieren el pasaje de la composición a través de la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene un agente de silenciamiento por ARN se puede suministrar al paciente mediante inyección directamente en el área que contiene las células afectadas por la enfermedad. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede suministrar mediante inyección directamente en el cerebro. La inyección puede ser mediante inyección estereotáctica en una región particular del cerebro (p. ej., la sustancia negra, la corteza, el hipocampo, el cuerpo estriado o el globo pálido). El agente de silenciamiento por ARN se puede suministrar en múltiples regiones del sistema nervioso central (p. ej., en múltiples regiones del cerebro y/o en la médula espinal). El agente de silenciamiento por ARN se puede suministrar en regiones difusas del cerebro (p. ej., suministro difuso a la corteza del cerebro).

El agente de silenciamiento por ARN se puede suministrar por medio de una cánula u otro dispositivo de suministro que tiene un extremo implantado en un tejido, p. ej., el cerebro, p. ej., la sustancia negra, la corteza, el hipocampo, el cuerpo estriado o el globo pálido del cerebro. La cánula se puede conectar a un depósito de agente de silenciamiento por ARN. El flujo o suministro se puede mediar mediante una bomba, p. ej., una bomba osmótica o minibomba, tal como una bomba de Alzet (Durect, Cupertino, CA). Se pueden implantar una bomba y un depósito en un área distante del tejido, p. ej., en el abdomen, y el suministro se lleva a cabo mediante un conducto que conduce desde la bomba o depósito hasta el sitio de liberación. Los dispositivos para suministro al cerebro se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses núms. 6.093.180 y 5.814.014.

Un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria se puede modificar adicionalmente de manera que sea capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, el agente de silenciamiento por ARN se puede conjugar con una molécula que permite que el agente atraviese la barrera. Dichos agentes de silenciamiento por ARN modificados se pueden administrar mediante cualquier método deseado, tal como inyección intraventricular o intramuscular, o mediante suministro pulmonar, por ejemplo.

Se pueden usar exosomas para suministrar un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria. Los exosomas pueden cruzar la BBB y suministrar ARNip, oligonucleótidos de antisentido, agentes quimioterapéuticos y proteínas específicamente a neuronas después de la inyección sistémica (Ver, Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* 2011 Apr;29(4):341-5. doi: 10.1038/nbt.1807; El-Andaloussi S, Lee Y, Lakhali-Littleton S, Li J, Seow Y, Gardiner C, Alvarez-Erviti L, Sargent IL, Wood MJ.(2011). Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat Protoc.* 2012 Dec;7(12):2112-26. doi: 10.1038/nprot.2012.131; EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 May;12(5):347-57. doi: 10.1038/nrd3978; El Andaloussi S, Lakhali S, Mäger I, Wood MJ. (2013).

Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Mar;65(3):391-7. doi: 10.1016/j.addr.2012.08.008).

5 Se pueden usar una o más moléculas lipófilas para posibilitar el suministro de un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria a través de la BBB (Alvarez-Ervit (2011)). El agente de silenciamiento por ARN después se activaría, p. ej., mediante degradación enzimática del disfraz lipófilo para liberar el fármaco en su forma activa.

10 Se pueden usar uno o más compuestos permeabilizantes mediados por receptor para aumentar la permeabilidad de la BBB para posibilitar el suministro de un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria. Estos fármacos aumentan la permeabilidad de la BBB de manera temporal al aumentar la presión osmótica en la sangre que afloja las uniones estrechas entre las células endoteliales ((El-Andaloussi (2012)). Al aflojar las uniones estrechas se puede llevar a cabo una inyección intravenosa normal de un agente de silenciamiento por ARN.

15 Los sistemas de suministro basados en nanopartículas se pueden usar para suministrar un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria a través de la BBB. Según se usa en la presente memoria, "nanopartículas" se refiere a nanopartículas poliméricas que son típicamente sistemas coloidales, sólidos, biodegradables que se han investigado ampliamente como portadores de fármacos o genes (S. P. Egusquiaguirre, M. Igartua, R. M. Hernandez, and J. L. Pedraz, "Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research," *Clinical and Translational Oncology*, tomo 14, núm. 2, págs. 83-93, 2012). Las nanopartículas poliméricas se clasifican en dos categorías principales, polímeros naturales y polímeros sintéticos. Los polímeros naturales para el suministro de ARN incluyen, pero no se limitan a, ciclodextrina, quitosano y atelocolágeno (Y. Wang, Z. Li, Y. Han, L. H. Liang, and A. Ji, "Nanoparticle-based delivery system for application of siRNA in vivo," *Current Drug Metabolism*, tomo 11, núm. 2, págs. 182-196, 2010). Los polímeros sintéticos incluyen, pero no se limitan a polietilenimina (PEI), poli(di-láctido-co-glicólido) (PLGA) y dendrímeros que se han investigado exhaustivamente (X. Yuan, S. Naguib, and Z. Wu, "Recent advances of siRNA delivery by nanoparticles," *Expert Opinion on Drug Delivery*, tomo 8, núm. 4, págs. 521-536, 2011). Para acceder a una revisión de nanopartículas y otros sistemas de suministro adecuados, ver Jong-Min Lee, Tae-Jong Yoon, and Young-Seok Cho, "Recent Developments in Nanoparticle-Based siRNA Delivery for Cancer Therapy," *BioMed Research International*, tomo 2013, ID. de artículo 782041, 10 páginas, 2013. doi:10.1155/2013/782041.

30 Un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria se puede administrar ocularmente, para tratar un trastorno retinal, p. ej., una retinopatía. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden aplicar a la superficie del ojo o tejido cercano, p. ej., el interior del párpado. Se pueden aplicar tópicamente, p. ej., por pulverización, en gotas, como colirio o un ungüento. Los ungüentos o líquidos que admiten goteo se pueden suministrar mediante sistemas de suministro ocular conocidos en la técnica tales como aplicadores o goteros para el ojo. Dichas composiciones pueden incluir mucomiméticos tales como ácido hialurónico, sulfato de condroitina, hidroxipropil metilcelulosa o poli(alcohol vinílico), conservantes tales como ácido sórbico, EDTA o cloruro de bencilcronio y las cantidades habituales de diluyentes y/o portadores. La composición farmacéutica también se puede administrar al interior del ojo y se puede introducir mediante una aguja u otro dispositivo de suministro que la puede introducir en un área o estructura seleccionada. La composición que contiene el agente de silenciamiento por ARN también se puede aplicar a través de un parche ocular.

40 En general, un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria se puede administrar mediante cualquier método adecuado. Según se usa en la presente memoria, el suministro tópico hace referencia a la aplicación directa del agente de silenciamiento por ARN a cualquier superficie del cuerpo, incluido el ojo, una membrana mucosal, superficies de una cavidad corporal o a cualquier superficie interna. Las formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, pulverizaciones y líquidos. Pueden ser necesarios o deseables portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares. La administración tópica también se puede usar como medio para suministrar selectivamente el agente de silenciamiento por ARN a la epidermis o dermis de un sujeto, o a estratos específicos de estas, o a un tejido subyacente.

50 Las composiciones para administración intratecal o intraventricular (p. ej., intracerebroventricular) pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Las composiciones para administración intratecal o intraventricular preferiblemente no incluyen un reactivo de transfección ni un resto lipófilo adicional además de, por ejemplo, el resto lipófilo acoplado al agente de silenciamiento por ARN.

55 Las formulaciones para administración parenteral pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. La inyección intraventricular se puede facilitar mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, acoplado a un depósito. Para uso intravenoso, la concentración total de los solutos se debería controlar para que la preparación sea isotónica.

Un agente de silenciamiento por ARN como se describe en la presente memoria se puede administrar a un sujeto mediante un suministro pulmonar. Las composiciones de suministro pulmonar se pueden suministrar mediante la inhalación de una dispersión, de manera que la composición dentro de la dispersión puede alcanzar el pulmón donde

se puede absorber fácilmente a través de la región alveolar directamente hacia la circulación sanguínea. El suministro pulmonar puede ser eficaz para el suministro sistémico y para el suministro localizado para tratar enfermedades de los pulmones. Un agente de silenciamiento por ARN administrado por suministro pulmonar se puede modificar de manera que sea capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

- 5 El suministro pulmonar se puede lograr mediante diferentes estrategias que incluyen el uso de formulaciones nebulizadas, aerosolizadas, micelulares y basadas en polvo seco. El suministro se puede lograr con nebulizadores de líquidos, inhaladores basados en aerosol y dispositivos de dispersión de polvo seco. Se prefieren los dispositivos dosificadores. Uno de los beneficios de usar un atomizador o inhalador es que se minimiza la posible contaminación ya que los dispositivos están autocontenidos. Los dispositivos de dispersión de polvo seco, por ejemplo, suministran fármacos que se pueden formular fácilmente como polvos secos. Una composición de agente de silenciamiento por ARN se puede almacenar de manera estable como polvos liofilizados o secados por pulverización en sí mismos o en combinación con portadores de polvo adecuados. El suministro de una composición para inhalación se puede mediar mediante un elemento de programación de dosificación que puede incluir un cronómetro, un contador de dosis, un dispositivo para medir el tiempo o un indicador del tiempo que cuando se incorpora en el dispositivo permite hacer un seguimiento de la dosis, monitorizar el cumplimiento y/o disparar una dosis en un paciente durante la administración del medicamento en aerosol.

Los tipos de excipientes farmacéuticos que son útiles como portadores incluyen estabilizadores tales como seroalbúmina humana (HSA), espesantes tales como carbohidratos, aminoácidos y polipéptidos; reguladores del pH o tampones; sales tales como cloruro de sodio; y similares. Estos portadores pueden estar en forma cristalina o amorfa o pueden ser una mezcla de las dos.

Los espesantes que son particularmente valiosos incluyen carbohidratos, polipéptidos, aminoácidos o combinaciones de estos compatibles. Los carbohidratos adecuados incluyen monosacáridos tales como galactosa, D-manose, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, trehalosa y similares; ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil-.beta. ciclodextrina; y polisacáridos, tales como rafinosa, maltodextrinas, dextranos y similares; alditoles, tales como manitol, xilitol y similares. Un grupo de carbohidratos preferido incluye lactosa, trehalosa, rafinosa maltodextrinas y manitol. Los polipéptidos adecuados incluyen aspartamo. Los aminoácidos incluyen alanina y glicina, donde se prefiere la glicina.

Los reguladores de pH o tampones adecuados incluyen sales orgánicas preparadas a partir de ácidos y bases orgánicas, tales como citrato de sodio, ascorbato de sodio y similares; se prefiere el citrato de sodio.

- 30 Un agente de silenciamiento por ARN se puede administrar mediante suministro oral y nasal. Por ejemplo, los fármacos administrados a través de estas membranas tienen un rápido inicio de la acción, proporcionan niveles en plasma terapéuticos, evitan el efecto de primer paso del metabolismo hepático y evitan la exposición del fármaco al entorno gastrointestinal (GI) hostil. Las ventajas adicionales incluyen fácil acceso a los sitios de las membranas, de manera que el fármaco se puede aplicar, localizar y retirar fácilmente. Un agente de silenciamiento por ARN administrado por suministro oral o nasal puede haber sido modificado para ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

Las dosis unitarias o dosis medidas de una composición que incluye agentes de silenciamiento por ARN se pueden dispensar mediante un dispositivo implantado. El dispositivo puede incluir un sensor que monitoriza un parámetro dentro de un sujeto. Por ejemplo, el dispositivo puede incluir una bomba, tal como una bomba osmótica y, por ejemplo, circuitos electrónicos asociados.

- 40 Un agente de silenciamiento por ARN se puede cargar en una cápside natural vírica o en una cápside o estructura artificial producida químicamente o enzimáticamente derivada de esta.

XI. Kits

También se describen en la presente memoria kits que incluyen un contenedor adecuado que contiene una formulación farmacéutica de un agente de silenciamiento por ARN, p. ej., un agente de silenciamiento por ARN bicatenario o un agente de sARN, (p. ej., un precursor, p. ej., un agente de silenciamiento por ARN grande que se puede procesar en un agente de sARN, o y un ADN que codifica un agente de silenciamiento por ARN, p. ej., un agente de silenciamiento por ARN bicatenario o un agente de sARN, o precursor de este). Los componentes individuales de la formulación farmacéutica se pueden proporcionar en un contenedor. Alternativamente, puede ser deseable proporcionar los componentes de la formulación farmacéutica por separado en dos o más contenedores, p. ej., un contenedor para una preparación de agente de silenciamiento por ARN y al menos otro para un compuesto portador. El kit se puede envasar en una variedad de configuraciones diferentes tales como uno o más contenedores en una sola caja. Los diferentes componentes se pueden combinar, p. ej., según las instrucciones proporcionadas con el kit. Los componentes se pueden combinar según un método descrito en la presente memoria, p. ej., para preparar y administrar una composición farmacéutica. El kit también puede incluir un dispositivo de suministro.

- 55 Tras haber descrito ciertas realizaciones en detalle, las mismas se entenderán más claramente por referencia al siguiente ejemplo, que se incluye con fines de ilustración solamente y no se debe interpretar como limitante.

Ejemplos

Ejemplo 1. Reducción de Huntingtina en neuronas primarias y cerebro de ratón con ARNip no formulados, estabilizados, hidrófobos

Se analizó el uso de híbridos de ASO-ARNip hidrófobamente modificados, que tienen el potencial de ofrecer mejor eficacia y distribución *in vivo* y atenuación en neuronas primarias *in vitro*. El gen huntingtina se usó como una diana para la atenuación del ARNm. La enfermedad de Huntington es monogénica (Mangiarini, L. et al. Exon 1 of the HTT gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493-506 (1996)) con varios mecanismos celulares que conducen a la patología de la enfermedad (Zuccato, C., Valenza, M. & Cattaneo, E. *Molecular Mechanisms and Potential Therapeutic Targets in Huntington's Disease*. *Physiological Reviews* 90, 905-981 (2010)) lo cual la convierte en un excelente candidato para posibles futuros agentes terapéuticos oligonucleotídicos.

Se desarrolló un panel de ARNip hidrófobamente modificados dirigidos al gen huntingtina. Se observaron eficacia y potencia tanto en neuronas primarias *in vitro* como *in vivo* en el cerebro de ratón después de una inyección simple de dosis baja sin ninguna formulación para el suministro. Estos compuestos combinan varias modificaciones químicas y estructurales diferentes que se encuentran en ARNiph de modelo inicial y ARNiph, así como en ASO. Estas propiedades, que incluyen modificaciones de base estabilizantes, conjugación con colesterol y una cola monocatenaria completamente modificada por fosforotioato, hace que estos ARNiph sean excelentes herramientas para estudiar la función génica en células primarias y órganos difíciles como dianas que se pueden adaptar para su uso en varios sistemas biológicamente relevantes diferentes.

1.1 Neuronas primarias internalizaron de manera eficaz híbridos de ARNiph - ARNip modificado hidrófobamente/de antisentido

Los ARNiph fueron compuestos asimétricos con una región de estructura doble corta (15 pares de bases) y una cola monocatenaria completamente modificada por fosforotioato. Todas las pirimidinas en estos compuestos estuvieron modificadas por 2'-Fluoro y 2'-O-Metilo (que proporciona estabilización) y el extremo hacia 3' de la cadena pasajera se conjugó con TEG-Colesterol (Figura 1A, Figura 8) 13. El conjugado con colesterol permitió una rápida asociación a la membrana, mientras que la cola monocatenaria modificada por fosforotioato fue necesaria para la internalización celular mediante un mecanismo similar al usado mediante oligonucleótidos de antisentido convencionales. La adición de ARNiph etiquetados con Cy3 a neuronas corticales primarias resultó en la inmediata (en minutos) asociación celular (Figura 1B). De manera interesante, la captación primero se observó preferencialmente en las dendritas, con posterior relocalización en el cuerpo celular (Figura 9). La captación fue uniforme en todas las células en la placa, lo que confirma la internalización eficaz.

1.2 Identificación de ARNiph dirigidos a huntingtina

Se diseñó y sintetizó un panel de 94 compuestos de ARNiph (Figura 8) dirigidos a ARNm de huntingtina. Estas secuencias abarcaban el gen y se seleccionaron para que cumplieran con los parámetros de diseño de ARNip estándares (Birmingham, A. et al. A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. *Nat Protoc* 2, 2068-2078 (2007)) incluida la evaluación del contenido de GC, la especificidad y la baja frecuencia de complementación del original (Anderson, E. M. et al. Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity. *RNA* 14, 853-861 (2008)), eliminación de secuencias que contienen orígenes de miARN y análisis del desvío termodinámico (Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* 115, 209-216 (2003); Schwarz, D. S. et al. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* 115, 199-208 (2003)). Más del 50 % de las bases estuvieron químicamente modificadas, para proporcionar estabilidad *in vivo* y minimización de la respuesta inmunitaria (Judge, A., Bola, G., Lee, A. & MacLachlan, I. Design of Noninflammatory Synthetic siRNA Mediating Potent Gene Silencing *In Vivo*. *Molecular Therapy* 13, 494-505 (2006)). Las modificaciones impusieron restricciones adicionales en el espacio de secuencia, lo que redujo el índice de coincidencias. El impacto sobre la expresión del ARNm de huntingtina se midió después de 72 horas de exposición a 1,5 μ M de ARNiph (captación pasiva, sin formulación) en células HeLa mediante el ensayo QUANTIGENE (Figura 2), con 7 % de secuencias que mostraron más de 70 % de silenciamiento. Los sitios diana funcionales estuvieron dispersos por el gen con la excepción del parte distal de la 3'UTR, que después se explicó por la expresión preferencial de la isoforma de htt más corta en células HeLa (Li, S. H. et al. Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *NEURON* 11, 985-993 (1993)). Se identificaron los valores de CI50 para dieciséis secuencias activas, seleccionadas en función de la actividad de barrido primaria y la conservación cruzada entre especies (Figura 10). Los valores de CI50 variaron de 90 a 766 nM en la captación pasiva (sin formulación) y de 4 a 91 pM en la captación mediada por lípido (Figura 8). Los compuestos activos completamente optimizados químicamente se identificaron fácilmente, lo que indicó que una biblioteca mucho más pequeña sería suficiente para barridos futuros para otros genes, aunque el índice de coincidencias es probable que sea variable de diana a diana. Se usó la posición de direccionamiento de ARNiph 10150 (HTT10150 (es decir, 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1))) para estudios adicionales. Para garantizar que el andamiaje químico del ARNiph no impactase negativamente sobre la eficacia y potencia de HTT10150, se evaluaron versiones modificadas

y no modificadas del compuesto en ensayos de silenciamiento pasivos y mediados por lípido (Figura 3). Como se esperaba, solo la secuencia modificada logró el suministro celular satisfactorio y el silenciamiento de Htt por captación pasiva (CI50 = 82,2 nM), mientras que tanto los compuestos modificados como los no modificados exhibieron valores de CI50 similares en el suministro mediado por lípido (4 pM y 13 pM, respectivamente) lo que sugiere que las modificaciones del andamiaje de ARNiph no interfirieron en la carga del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).

1.3 Silenciamiento génico potente y específico con ARNiph no formulados en neuronas primarias

Se evaluó HTT10150 adicionalmente para determinar el silenciamiento del ARNm en neuronas primarias aisladas a partir de ratones FVBN. Se observó eficacia tanto a las 72 horas como una semana después de la adición del compuesto no formulado simple a neuronas corticales (Figura 4A) donde el máximo silenciamiento (70 %) se observó con la concentración de 1,25 μ M. El HTT10150 también exhibió un silenciamiento similar en neuronas estriatales primarias (Figura 4B). Los niveles de proteína se midieron después de una semana mediante transferencia Western (Figura 14) y confirmaron los datos de ARNm con una reducción del 85 % de la proteína después del tratamiento con 1,25 μ M de compuesto (Figura 4C). Los genes de mantenimiento (PPIB, GAPDH) y la viabilidad celular general medida por el ensayo ALAMARBLUE (Figuras 11B y 14) no se vieron afectados en estas concentraciones. En otros experimentos, se observó un ligero impacto sobre la viabilidad celular con 3 μ M.

Para evaluar la duración del efecto después de un único tratamiento con HTT10150, se midió el silenciamiento en intervalos de una semana, dos semanas y tres semanas (Figura 4D). La semivida del complejo RISC cargado fue de semanas (Song, E. et al. Sustained Small Interfering RNA-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inhibition in Primary Macrophages. *Journal of Virology* 77, 7174-7181 (2003)) y se esperó que el silenciamiento tuviese larga duración en las células no divisibles. De hecho, un único tratamiento con ARNiph fue suficiente para inducir el silenciamiento de htt en todos los tiempos evaluados. Tres semanas fue lo máximo que se pudo mantener en cultivo a las neuronas primarias. Se usarán otros sistemas para experimentos a plazos más largos.

Para demostrar la aplicabilidad general de los ARNiph como una herramienta para el silenciamiento génico neuronal y para confirmar este andamiaje químico como válido para suministro neuronal, se llevaron a cabo experimentos similares con varios otros ARNiph dirigidos a HTT y con uno dirigido al gen de mantenimiento PPIB (Ciclofilina B) (Figuras 11A y 13). Se logró un silenciamiento tan alto como de 70 y 90 % con HTT y PPIB, respectivamente.

En resumen, estos datos demuestran que el ARNiph hidrófobamente modificado es una estrategia simple y directa para el silenciamiento génico en neuronas primarias y se puede adaptar para múltiples dianas génicas.

1.4 Distribución *in vivo* de ARNiph en cerebro de ratón después de una única inyección

Diferentes tipos de neuronas internalizan los ARNiph de manera eficaz *in vitro*. El ARNiph seleccionado, HTT10150, se evaluó adicionalmente para determinar su potencial para silenciar la expresión génica en el cerebro *in vivo*. Para determinar el perfil de distribución de HTT10150 después de la distribución *in vivo*, se inyectaron intraestriatalmente 12,5 μ g de ARNiph etiquetado con Cy3 (ver la Figura 8 para la secuencia) y, después 24 horas, el cerebro se sometió a perfusión, se dividió y se visualizó la distribución del oligonucleótido mediante microscopía con fluorescencia (Leica DM5500 - DFC365FX). Las muestras inyectadas de CSF artificial procesadas simultáneamente se usaron para fijar la configuración de obtención de imágenes microscópicas para controlar la epifluorescencia del tejido de fondo.

La mayor parte del compuesto exhibió un gradiente de difusión pronunciado lejos del sitio de la inyección, con la mayor parte del cuerpo estriado ipsilateral cubierto (Figura 5A, 5B). De manera interesante, se detectaron ARNiph en el lado no inyectado (contralateral) del cerebro (corteza y cuerpo estriado), aunque las concentraciones relativas fueron mucho más bajas. Las imágenes con gran ampliación mostraron una asociación significativa del ARNiph con tractos de fibra, muy probablemente debido a la presencia de una modificación hidrófoba. Este aspecto del ARNiph puede volverlo útil como un reactivo de etiquetado para visualizar la arquitectura de señalización cerebral (Figura 5C, 5D). Además de los tractos de fibras y etiquetado de axones, el ARNiph podría detectarse como tinción puenteadada en el espacio perinuclear de diferentes tipos de células, incluidas neuronas, como es evidente a partir de la colocalización con células teñidas con NeuN (marcador neuronal) (Figura 5E) solo 24 horas después de la inyección.

El efecto de la vitamina D sobre la distribución del ARNiph se representa en las Figuras 79 y 80.

1.5 Eficacia *in vivo* de ARNiph en cerebro de ratón después de una única inyección

Para determinar la eficacia de HTT10150a *in vivo*, ratones FVBN naturales recibieron dosis intraestriatalmente con una única inyección de entre 3 y 25 μ g (0,1-0,9 mg/kg) de compuesto y se examinó el silenciamiento de ARNm tanto ipsilateral como contralateral con respecto al sitio de inyección. Ocho animales por grupo de tratamiento recibieron dosis y se tomaron tres trozos individuales de cada lado del cuerpo estriado para la cuantificación del ARNm y la proteína. El nivel de expresión de huntingtina se midió por el ensayo QUANTGENE y se normalizó con respecto a un gen de mantenimiento (detalles en métodos en línea).

- El análisis estadístico se llevó a cabo mediante comparación ANOVA unidireccional con respecto al testigo CSF o PBS con correcciones de Bonferroni para mediciones repetidas mediante el uso de GraphPad Prism (ver los métodos en línea para acceder a los detalles). Todos los grupos indujeron el silenciamiento que fue significativo contra animales tratados CSF, PBS y con testigo no dirigido. Los datos brutos de 24 trozos individuales por grupo de tratamiento (8 animales, 3 trozos por animal) se pueden observar en la Figura 15. En el sitio de la administración (lado ipsilateral), se observó un silenciamiento dependiente de la dosis que alcanzó la significación estadística en todas las concentraciones. El tratamiento con 25 µg indujo 77 % de silenciamiento ($p < 0,0001$) y el tratamiento con 12,5 µg se repitió con dos grupos de animales en días diferentes y exhibió un silenciamiento estadísticamente significativo de 66 % y 42 % (Figura 6).
- 5 Aunque los estudios de distribución iniciales exhibieron un gradiente de difusión pronunciado lejos del sitio de la inyección con una mínima cantidad de compuesto que migró al lado contralateral, el tratamiento con la dosis más alta de 25 µg y 12,5 µg resultó en un silenciamiento estadísticamente significativo ($p < 0,0001$) en el lado no inyectado. Sin embargo, el nivel de silenciamiento fue significativamente menor (solo 36 % para el grupo con 25 µg) que en el lado tratado del cerebro.
- 10 En resumen, estos datos muestran que una única inyección intraestriatal de ARNiph es suficiente para inducir un potente silenciamiento génico alrededor del sitio de administración. Este efecto fue reproducible en todos los diferentes grupos de tratamiento y experimentos independientes.

1.6 Viabilidad neuronal después de una única inyección de ARNiph en el cerebro de ratón

- La modificación con colesterol de ARNip no marcado, no modificado se usó anteriormente para la mejora de la distribución cerebral del ARNip, con toxicidad en dosis altas que se identificó como una posible limitación. Para evaluar el grado de efectos relacionados con la química no específicos sobre el cerebro, se investigó la expresión de DARPP32, un marcador establecido para la expresión del receptor de dopamina en neuronas de proyección estriatal en el cuerpo estriado y representativo de la viabilidad neuronal. Además, se llevó a cabo una posible inducción de una respuesta inmunitaria al evaluar la medida de la activación de la microglía después de la inyección del ARNiph.
- 20 No se observó un impacto significativo sobre la expresión de DARPP32 para dosis de hasta 12,5 µg, lo que sugiere una viabilidad neuronal persistente (Figuras 7A, 7B, 16). De manera similar, se visualizó una activación microglial mínima con la dosis de 12,5 µg (Figura 7C, 7D) que indica una respuesta inmunitaria limitada en presencia del ARNiph modificado. La dosis de 25 µg indujo algo de reducción en DARPP32 apenas alrededor del sitio de la inyección, lo que indica toxicidad y establece los niveles de dosis máxima para este andamiaje químico después de la vía de administración indicada. Una única administración de 10-12,5 µg de ARNiph silenció de manera eficaz el ARNm de HTT en tres estudios independientes, bien desarrollados, con un silenciamiento contundente de 62, 42 y 52 % sin toxicidad. Estos datos indican que esta tecnología se puede usar ampliamente para estudios funcionales de otras dianas neurológicamente importantes.
- 25 30

1.7 Caracterización adicional en neuronas

- Se logró un silenciamiento sostenido durante 21 días en neuronas terminalmente diferenciadas (Figura 24). Se observó una meseta de silenciamiento con iARN (citoplasmática) pero no con compuestos de RNasaH (predominantemente nuclear) (Figura 25). La meseta observada fue específica para el gen *htt*. Aproximadamente el 60 % del ARNm de *htt* se localiza en los núcleos (Figura 26).
- 35 Los conjuntos de sondas se validaron en neuronas (Figura 27). La mayoría de la señal detectada fue específica para el ARNm de *htt*. Se observó una alta fracción de área amarillas (tinción colocalizada). Sin ánimo de estar ceñidos a la teoría científica, el alto grado de señal roja se puede relacionar con concentraciones desiguales de los dos conjuntos sondeados.
- 40 Se validaron conjuntos de sondas adicionales para el intrón 60-61 en neuronas (Figura 28). Las sondas específicas para el intrón exhibieron uno a dos puntos amarillos en los núcleos específicos para los sitios de transcripción. Las sondas específicas para el exón exhibieron un grado más alto de superposición.
- 45 La localización nuclear del ARNm de *htt* fue específica para neuronas y no para fibroblastos (Figura 29). El tratamiento con ARNiph^{HTT} de neuronas corticales eliminó preferencialmente el ARNm de *htt* citoplasmático (Figuras 30 y 31).
- Se observó un silenciamiento casi completo de la proteína HTT en neuronas corticales primarias (Figura 32).
- 50 La inyección directa de HTT10150 no causó cambios detectables en las cantidades neuronales (Figura 33). El colesterol-ARNiph exhibió una pequeña área de toxicidad adyacente al sitio de inyección (Figura 34).
- Las Figuras 58-60 describen la eficacia de ARNiph en neuronas del hipocampo primarias naturales y Q140.

1.8 Discusión

Este estudio demuestra que el uso de ARNip hidrófobamente modificado para el suministro a células primarias es una herramienta valiosa para posibilitar estudios funcionales y genómicos de vías neuronales y trastornos neurológicos.

La capacidad de causar el silenciamiento génico en neuronas primarias sin el uso de una formulación tóxica tiene un impacto significativo sobre la investigación neurocientífica, y facilita un estudio más exhaustivo de los trastornos neurológicos en el contexto de las líneas celulares primarias y proporciona, en última instancia, una comprensión más relevante de la función y patología *in vivo*. La mayoría de los estudios neuronales se llevan a cabo en líneas celulares estables debido a la facilidad de suministro y mantenimiento celular, pero el uso de sistemas celulares artificiales puede conducir a artefactos en los datos que se pueden atribuir a la manipulación de estas líneas celulares, un problema que se puede evitar mediante el uso de células primarias (Cheung, Y.-T. et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *NeuroToxicology* 30, 127-135 (2009); Gilany, K. et al. The proteome of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: An enlarged proteome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1784, 983-985 (2008); Lopes, F. M. et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Research* 1337, 85-94 (2010); Zhang, W. et al. Cyclohexane 1,3-diones and their inhibition of mutant SOD1-dependent protein aggregation and toxicity in PC12 cells. *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY* 1-17 (2011). doi:10.1016/j.bmc.2011.11.039). Los métodos actuales de suministro de ARNip a neuronas primarias incluyen el uso de vectores lentivíricos, virus adenoasociados (VAA) o transfección mediada por Lipofectamine™ (Karra, D. & Dahm, R. Transfection Techniques for Neuronal Cells. *Journal of Neuroscience* 30, 6171-6177 (2010)). Al conjugar un resto hidrófobo tal como colesterol directamente con el propio ARNip y al usar una cola monocatenario modificada por fosforotioato adicional para potenciar la captación, se ha demostrado en la presente memoria que, no solo se puede suministrar el ARNip de manera eficaz en neuronas primarias *in vitro* con toxicidad mínima, sino que también sigue siendo un potente silenciador de ARNm.

Sin ánimo de estar ceñidos a la teoría científica, una de las principales ventajas del ARNip con respecto a la tecnología de antisentido es que se espera que el RISC cargado permanezca activo durante un largo período de tiempo en células no divisibles (Bartlett, D. W. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Research* 34, 322-333 (2006)). Además, una cantidad limitada de RISC cargados es suficiente para la inducción del silenciamiento mediado por iARN (Stalder, L. et al. The rough endoplasmic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing. *The EMBO Journal* 32, 1115-1127 (2013)). Los datos presentados en la presente memoria demuestran el silenciamiento durante hasta tres semanas *in vitro* en neuronas corticales primarias tras un único tratamiento con ARNiph, lo que respalda la noción de que el silenciamiento mediado por iARN puede ser eficaz y de larga duración. Los datos presentados en la presente memoria también muestran que estos compuestos se pueden usar para dirigirse a múltiples regiones en dos genes diferentes, lo que demuestra la adaptabilidad del ARNiph para el estudio de vías y enfermedades neurológicas alternativas.

Aunque una única inyección intraestriatal de ARNiph resultó en un potente silenciamiento génico cerca del sitio de la inyección *in vivo*, el efecto no estuvo diseminado uniformemente en todo el cerebro. Aunque de manera limitada, la diseminación a otras áreas del cerebro (demostrada por los estudios de eficacia *in vivo*) podría suceder a través de varios mecanismos. Estos incluyen el movimiento en el CSF, la diseminación a través de los tractos de fibras que se mostró que tenían una gran densidad visual de ARNiph etiquetado con Cy3 en estudios de distribución o posiblemente a través de transporte retrógrado (Stewart, G. R. & Sah, D. Retrograde Transport of siRNA and Therapeutic Uses to Treat Neurological Disorders. *Publicación de solicitud de patente de los EE. UU.* US 2008/0039415 A1, 1-18 (2008)), aunque se llevarán a cabo estudios adicionales para determinar el mecanismo real.

La tecnología presentada en la presente memoria es útil para entender la genómica funcional de regiones del cerebro particulares, así como para estudiar las relaciones entre regiones del cerebro. Además, el estudio de algunos trastornos neurológicos (por ejemplo, trastornos de la memoria (Samuelson, K. W. Post-traumatic stress disorder and declarative memory functioning: a review. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 13, 346-351 (2011))) puede beneficiarse de la distribución limitada y dirigida regionalmente y del silenciamiento. Sin embargo, debido a su perfil de distribución, el ARNiph como existe en la actualidad no es un agente terapéutico viable para trastornos neurológicos generales como la enfermedad de Huntington. Múltiples inyecciones pueden funcionar para aumentar el silenciamiento general en pequeños roedores, pero para adaptar esta tecnología para uso en cerebros de animales más grandes y seres humanos, y para lograr una distribución uniforme y extensa, se usarán otras modificaciones químicas y métodos de suministro terapéuticos. Existen varios modos en que esto podría abordarse. En primer lugar, se pueden hacer ajustes químicos a la propia composición de ARNiph. Estas incluyen conjugarlo con un lípido diferente, complementar la cadena principal con grupos fosforotioato adicionales o mediante la adición de restos hidrófobos a los propios nucleótidos (Vaught, J. D., Dewey, T. & Eaton, B. E. T7 RNA Polymerase Transcription with 5-Position Modified UTP Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 11231-11237 (2004)). Todas estas modificaciones podrían respaldar una gama de hidrofobicidades que permitirían una distribución mejorada a través de una distancia mayor. La biodisponibilidad aumentada también podría lograrse con diferentes modos de inyección, tales como en el CSF en lugar de intraestriatalmente, lo que aumentaría la probabilidad de exposición a todo el cerebro. Sin embargo, el suministro a través del CSF podría favorecer la localización del ARNiph en regiones del cerebro distintas del cuerpo estriado, lo que lo hace un método de suministro menos que ideal para el tratamiento de la enfermedad de Huntington. Otra

posibilidad es el suministro formulado al cargar estos ARNip modificados hidrófobamente en exosomas y liposomas (menos tóxicos que las actuales formulaciones con Lipofectamine™) y usar estos nanoportadores naturales y sintéticos para suministrar la carga de manera distribuida más uniformemente (Alvarez-Erviti, L. et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 1-7 (2011). doi:10.1038/nbt.1807; Marcus, M. & Leonard, J. FedExosomes: Engineering Therapeutic Biological Nanoparticles that Truly Deliver. *Pharmaceuticals* 6, 659-680 (2013)). Sin embargo, la potencia y eficacia del ARNiph suministrado todavía debe validarse para estos métodos.

En conclusión, HTT10150 fue eficaz para dirigirse al ARNm de huntingtina en neuronas primarias *in vitro* y localmente en el cerebro de ratón *in vivo*. Este compuesto no requirió ninguna formulación para el suministro a células primarias y permitió estudios funcionales génicos para la huntingtina, así como para otras dianas, lo que lo convierte en una herramienta muy útil para el estudio de trastornos neurológicos. Los posibles avances de esta tecnología deberían permitir que el ARNiph funcione como un tratamiento terapéutico para la enfermedad de Huntington, así como para otras enfermedades neurológicas en el futuro.

1.9 Métodos

15 Cultivo celular

Se mantuvieron células HeLa en DMEM (Corning Cellgro) complementado con suero fetal bovino al 10 % (Gibco) y 100 U / mL de penicilina / estreptomicina (Invitrogen) y se cultivaron a 37 °C y CO₂ al 5 %. Las células se dividieron cada 2-5 días hasta el pasaje 15 y después se descartaron.

Cultivo celular para captación pasiva

20 Las células se colocaron en placas en DMEM con FBS al 6 % en 10.000 células / pocillo en placas de 96 pocillos de cultivo de tejido tratadas. El ARNiph se diluyó en OptiMEM (Gibco) hasta una concentración final de 2X y se agregaron 50 µL de ARNiph diluido a 50 µL de células para FBS al 3 % final. Las células se incubaron durante 72 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Cultivo celular para captación mediada por lípido

25 Las células se colocaron en placas en DMEM con FBS al 6 % en 10.000 células / pocillo en placas de 96 pocillos de cultivo de tejido tratadas. El ARNiph se diluyó en OptiMEM (Gibco) hasta una concentración final de 4X. Se diluyó el reactivo de transfección LIPOFECTAMINE RNAiMAX (Invitrogen núm. 13778150) hasta una concentración final de 4X (final = 0,3 µL/25 µL / pocillo). Se mezclaron RNAiMAX y el ARNiph 1:1 y se agregaron 50 µL a 50 µL de células para FBS al 3 % final. Las células se incubaron durante 72 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %.

30 Preparación de neuronas primarias

Las neuronas corticales primarias se obtuvieron de embriones de ratón E15.5 de ratones naturales (FVBN). Las hembras gestantes se anestesiaron mediante inyección IP de Avertin (250 mg/kg peso) y posteriormente se procedió a la dislocación cervical. Los embriones se retiraron y transfirieron a una placa de Petri con medio DMEM/F12 helado (Invitrogen). Los cerebros se retiraron y las meninges se desprendieron cuidadosamente. Las cortezas se aislaron y transfirieron a un tubo de 1,5 ml con disolución de papaína precalentada durante 25 minutos a 37 °C y CO₂ al 5 % para disolver el tejido. La disolución de papaína se preparó de la siguiente manera: se disolvió papaína (Worthington núm. 54N15251) en 2 mL de HibernateE (Brainbits) y 1 mL de EBSS (Worthington). Por separado, se resuspendió DNasa (Worthington núm. 54M15168) en 0,5 mL de HibernateE. Después, se transfirieron 0,25 mL de DNasa resuspendida a la papaína resuspendida para la disolución final. Después de 25 minutos de incubación, la disolución de papaína se retiró y se agregó 1 mL de NbActiv4 (Cerebral) complementado con FBS al 2,5 % al tejido. A continuación, las cortezas se disociaron al pipetear hacia arriba y hacia abajo con una pipeta Pasteur de cristal pulida al fuego. Las neuronas corticales se contaron y colocaron en placas a 1x10⁶ células / ml. Para estudios de obtención de imágenes de células vivas, las placas celulares se prerrecubrieron con poli-L-lisina (Sigma #P4707) y se agregaron 2x10⁵ células al centro de cristal de cada placa. Para los ensayos de silenciamiento, las neuronas se colocaron en placas sobre placas de 96 pocillos prerrecubiertas con poli-L-lisina (BD BIOCOAT núm. 356515) a 1x10⁵ células por pocillo. Después de la incubación durante toda la noche a 37 °C y CO₂ al 5 %, se agregó al cultivo neuronal un volumen igual de NbActiv4 (Cerebral) complementado con antimetabólicos, 0,484 µL/mL de 5'UtP (Sigma núm. U6625) y 0,2402 µL/mL de 5'FdU (Sigma núm. F3503), para prevenir la multiplicación de las células no neuronales. La mitad del volumen de los medios se reemplazó cada 48 horas (con nuevo NbActiv4 con antimetabólicos) hasta que las neuronas se trataron con ARNip. Después de que las células se trataron, no se retiraron los medios, solo se agregaron. Todas las adiciones de medios posteriores contenían antimetabólicos.

Cuantificación de ARNm

El ARNm se cuantificó al usar el ensayo QuantiGene 2.0 (Affymetrix núm. QS0011). Las células se lisaron en 250 µL de mezcla de lisis diluida (Affymetrix núm. 13228), 1 parte de mezcla de lisis, 2 partes de H₂O, con 0,167 µg / µL de

proteínasa K (Affymetrix núm. QS0103) durante 30 minutos a 55 °C. Los lisados celulares se mezclaron completamente y se agregaron 40 µL (aproximadamente 8000 células) de lisado a la placa de captura junto con 40 µL de mezcla de lisis diluida adicional sin proteínasa K. Los conjuntos de sondas se diluyeron como está especificado en el protocolo de Affymetrix. Para las células HeLa, se agregaron 20 µL de conjunto de sonda de HTT o PPIB humana (Affymetrix núm. SA-50339, núm. SA-10003) a los pocillos apropiados para un volumen final de 100 µL. Para las neuronas primarias, se usaron 20 µL de conjunto de sonda de HTT o PPIB de ratón (Affymetrix núm. SB-14150, núm. SB-10002).

Los tejidos se trataron de manera similar, al usar 300 µL de Homogenizing Buffer (tampón homogeneizante, Affymetrix núm. 10642) con 2 µg/µL de proteínasa K para un trozo de tejido de 5 mg. Los tejidos después se homogeneizaron en un formato de placa de 96 pocillos en QIAGEN TissueLyser II y se agregaron 40 µL a la placa de captura. Los conjuntos de sondas se diluyeron como está especificado en el protocolo de Affymetrix y se agregaron 60 µL de los conjuntos de sondas de HTT o PPIB (Affymetrix núm. SB-14150, núm. SB-10002) a cada pocillo de la placa de captura para un volumen final de 100 µL. Para la cuantificación de DARPP32, se agregaron solo 10 µL e muestra de tejido y 30 µL de tampón homogeneizante a cada pocillo con 60 µL de conjunto de sonda de Ppp1r1b de ratón (Affymetrix núm. SB-21622). La señal se amplificó según el protocolo de Affymetrix. La luminiscencia se detectó en el Veritas Luminometer o el Tecan M 1000.

Tinción de célula viva

Para monitorizar la captación de ARNⁱph de la célula viva, las células se colocaron en placas a una densidad de 2x10⁵ células por placa de fondo de cristal de 35 mm como se describió en la preparación de neuronas primarias anteriormente. Antes de la obtención de imágenes, los núcleos celulares se tiñeron con NbActiv4 libre de rojo de fenol al usar NUCBLUE (Molecular Probes de Life Technologies núm. R37605) como lo indicaba el fabricante. La obtención de imágenes se llevó a cabo en NbActiv4 libre de rojo de fenol. Las células se trataron con 0,5 µM de ARNⁱph etiquetado con Cy3 y la obtención de imágenes de células vivas se llevó a cabo con el tiempo. Todas las imágenes confocales de células vivas se adquirieron con un microscopio confocal Zeiss y las imágenes se procesaron con el uso del programa informático ImageJ (1.47v).

Inmunohistoquímica/Inmunofluorescencia

Para los estudios de distribución, se inyectó 1 nmol (12,5 µg) de ARNⁱph etiquetado con Cy3 en los cerebros. Después de 24 horas, los ratones se sacrificaron y se retiraron los cerebros y se enviaron al DERC Morphology Core en la Facultad de Medicina de UMASS para embeberlos en parafina y cortarlos en secciones de 4 µm y montarlos en portaobjetos de cristal. Las secciones se desparafinizaron durante 8 minutos en xileno dos veces. A continuación, las secciones se rehidrataron con diluciones en etanol en serie (100 %, 95 %, 80 %) durante 4 minutos cada una, después se lavaron dos veces durante dos minutos con PBS. Para la tinción con NueN, los portaobjetos se hirvieron durante 5 minutos en tampón de recuperación de antígeno y después se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos, con un lavado posterior de 5 minutos con PBS. A continuación, los portaobjetos se bloquearon con suero de cabra normal al 5 % en PBS + Tween20 al 0,05 % durante 1 hora y se lavaron una vez con PBS + Tween20 al 0,05 % durante 5 minutos. El anticuerpo primario (dilución 1:1000 en PBS + Tween20 al 0,05 %) se agregó a los portaobjetos para una incubación de 1 hora y posteriormente tres lavados de 5 minutos con PBS + Tween20 al 0,05 %. El anticuerpo secundario (dilución 1:1000 en PBS + Tween20 al 0,05 %) se agregó a los portaobjetos para una incubación de 30 minutos en la oscuridad y posteriormente tres lavados de 5 minutos con PBS + Tween20 al 0,05 %. Los portaobjetos después se tiñeron con DAPI (Molecular Probes de Life Technologies núm. D3571), se diluyeron hasta 250 ng/mL en PBS, durante un minuto y posteriormente tres lavados de 1 minuto con PBS. Se aplicaron los medios de montaje y las cubiertas a los portaobjetos y se dejaron secar durante toda la noche antes de la obtención de imágenes en el microscopio Leica DM5500 - DFC365FX con ampliación indicada.

Para los estudios de toxicidad y activación de microglía, los cerebros extraídos y sometidos a perfusión se cortaron en secciones de 40 µm en el Leica 2000T Vibratome en PBS helado. La inmunohistoquímica se llevó a cabo en cada 6^a sección con respecto a DARPP32 (Millipore, dilución 1:10.000) e IBA-1 (Millipore, dilución 1:500). Las secciones se montaron y visualizaron mediante microscopio óptico. Se tomaron cuatro imágenes a 20X en el cuerpo estriado de los lados inyectados y no inyectados de cada sección. La cantidad de neuronas positivas para DARPP32 se cuantificó al usar ImageJ. Las microglías activadas se cuantificaron por la morfología de las células teñidas para IBA-1.

Animales, inyecciones estereotáxicas

Ratones naturales (FVBN) recibieron microinyecciones mediante colocación estereotáctica en la estría a la derecha (las coordenadas (con respecto a bregma) fueron 1,0 mm anterior, 2,0 mm lateral y 3,0 mm ventral). Los animales se anestesiaron profundamente antes de la inyección de Avertin al 1,2 %. Para los estudios de toxicidad (DARPP32) y eficacia, los ratones recibieron inyecciones de PBS o líquido cefalorraquídeo artificial (2 μ L por estría, N = 8 ratones), 12,5 μ g de ARNiph NTC (2 μ L de disolución concentrada 500 μ M por estría, N = 8 ratones), 25 μ g de ARNiph HTT10150 (2 μ L de disolución concentrada 1 mM por estría, N = 8 ratones), 12,5 μ g de ARNiph HTT10150 (2 μ L de disolución concentrada 500 μ M por estría, N = 16 ratones en total, dos conjuntos de 8 ratones en dos días diferentes), 6,3 μ g de ARNiph HTT10150 (2 μ L de disolución concentrada 250 μ M por estría, N = 8 ratones) o 3,1 μ g de ARNiph HTT10150 (2 μ L de disolución concentrada 125 μ M por estría, N = 8 ratones) y se sometieron a eutanasia 5 días después. Los cerebros se recogieron y se produjeron tres secciones coronales de 300 μ m. Se tomó un trozo de 2 mm por lado (inyectado y no inyectado) para cada sección y se colocaron en RNAlater (Ambion núm. AM7020) durante 24 horas a 4 °C. Cada trozo se procesó como una muestra individual para el análisis por ensayo QuantiGene. Todos los procedimientos con animales recibieron la aprobación del Medical School Institutional Animal Care and Use Committee de la University of Massachusetts (IACUC, número de protocolo A-2411).

Análisis estadístico

Los análisis de datos se llevaron a cabo con el uso del programa informático GraphPad Prism 6 versión 6.04 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Para la curva dependiente de la concentración CI50, se ajustó una curva al usar log(inhibidor) con respecto a respuesta - pendiente variable (cuatro parámetros). La parte inferior de la curva se fijó para no fuera menor que cero y la parte superior de la curva se fijó para que no fuera mayor que 100. Para cada experimento de ratón independiente, el nivel de atenuación en cada dosis se normalizó con respecto a la media del grupo testigo, que fue el lado no inyectado de los grupos con PBS o CSF artificial, de manera que todos los datos se expresaron como una proporción del testigo. Los datos *in vivo* se analizaron mediante el uso de la prueba Kruskal-Wallis (ANOVA unidireccional) con correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples. Las diferencias en todas las comparaciones se consideraron significativas con valores de P menores que 0,05.

Cultivo celular para captación pasiva (barrido primario y respuesta a la dosis)

Las células se colocaron en placas en DMEM (Gibco) con FBS (Gibco) al 6 % en 10.000 células / pocillo en placas de 96 pocillos de cultivo de tejido tratadas. El ARNiph se diluyó en OptiMEM (Gibco) hasta una concentración final de 2X y se agregaron 50 μ L de ARNiph diluido a 50 μ L de células para FBS al 3 % final. Las células se incubaron durante 72 horas a 37 C y CO₂ al 5 %.

Cultivo celular para captación mediada por lípido

Las células se colocaron en placas en DMEM (Gibco) con FBS (Gibco) al 6 % en 10.000 células / pocillo en placas de 96 pocillos de cultivo de tejido tratadas. El ARNiph se diluyó en OptiMEM (Gibco) hasta una concentración final de 4X. Se diluyó el reactivo de transfección LIPOFECTAMINE RNAiMAX (Invitrogen núm. de cat. 13778150) hasta una concentración final de 4X (final = 0,3 μ L / 25 μ L / pocillo). Se mezclaron RNAiMAX y el ARNiph 1:1 y se agregaron 50 μ L a 50 μ L de células para FBS al 3 % final. Las células se incubaron durante 72 horas a 37 C y CO₂ al 5 %.

Cuantificación de ARNm

El ARNm se cuantificó al usar el ensayo QuantiGene 2.0 (Affymetrix núm. QS0011). Las células se lisaron en 250 μ L de mezcla de lisis diluida, 1 parte de mezcla de lisis, 2 partes de H₂O, con 0,167 μ g / μ L de proteinasa K (Affymetrix núm. QS0103) durante 30 minutos a 55 C. Los lisados celulares se mezclaron completamente y se agregaron 40 μ L (~8000 células) de lisado a la placa de captura junto con 40 μ L de mezcla de lisis diluida adicional sin proteinasa K. Los tejidos se trataron de manera similar, al usar 300 μ L de Homogenizing Buffer (Affymetrix) con 2 μ g/ μ L de proteinasa K para un trozo de tejido de 5 mg. Los tejidos después se homogeneizaron en un formato de placa de 96 pocillos en Qiagen TissueLyser y se agregaron 40 μ L a la placa de captura. Los conjuntos de sondas se diluyeron como está especificado en el protocolo de Affymetrix y se agregaron 20 μ L de los conjuntos de sondas de HTT o PPIB (Affymetrix: SA-50339, SA-10003) a cada pocillo de la placa de captura para un volumen final de 100 μ L. La señal se amplificó según el protocolo del fabricante. La luminiscencia se detectó en el Veritas Luminometer o el Tecan M 1000.

Tinción de célula viva e inmunotinción de secciones del cerebro

Para monitorizar la captación de células vivas, las células se colocaron en placas a una densidad de 2×10^5 células por placa de fondo de cristal de 35 mm y se cultivaron durante toda la noche. Antes de la obtención de imágenes, se tiñeron los orgánulos celulares en HBSS (Gibco) al usar reactivos de tinción adquiridos a Life Technologies a menos que se especifique: los núcleos celulares, el retículo endoplasmático y los lisosomas se tiñeron respectivamente con el uso de los reactivos NUCBLUE Live READYPROBE, ER-TRACKER Green (Bodipy FL Glibenclamide) y LYSOTRACKER Deep Red según la indicación del fabricante. La obtención de imágenes se llevó a cabo en DMEM

no complementado sin rojo de fenol (Invitrogen). Las células se trataron con 0,5 μM de ARNiph etiquetado con Cy3 y la obtención de imágenes de células vivas se llevó a cabo con el tiempo.

Obtención de imágenes confocales

5 Todas las imágenes confocales se adquirieron con un cabezal de barrido CSU10B Spinning Disk Confocal System (Solamere Technology Group) montado en un microscopio invertido TE-200E2 (Nikon) con una lente 60x Plan/APO oil y una cámara Coolsnap HQ2 (Roper). Las imágenes se procesaron con el uso del programa informático ImageJ (1.47v). La cantidad de neuronas sin o con ARNiph se contó mediante el uso del programa informático ImageJ. Las imágenes de secciones del cerebro se adquirieron con una separación en el eje z de 1 μm .

Ejemplo 2. La retención y distribución del ARNiph está directamente relacionada con la hidrofobicidad

10 Aunque los FM-ARNiph exhibieron retención y acumulación mejoradas en el cerebro y la médula espinal e inducen un silenciamiento máximo con una dosis 10 veces más baja que los ARNiph parcialmente estabilizados, se retuvieron en gran medida cerca del sitio de la inyección (Figura 102; Col-ARNiph). Se hipotetizó que la distribución limitada de los ARNiph podría deberse a la unión preferencial del ARNiph a las estructuras de mielina enriquecidas con lípido y mielinizadas debido a la fuerte hidrofobicidad del conjugado con colesterol, y que ajustar la hidrofobicidad de los
 15 conjugados de ARNiph mejoraría la distribución a través de la médula espinal y el cerebro. Para someter a prueba la idea, se sometió a barrido un panel de moléculas hidrófobas de origen natural con capacidad de tráfico neuronal activo, que incluyó: (i) esteroides neuroactivos, es decir, esteroides endógenos que atraviesan la barrera hematoencefálica y se unen a una variedad de canales dependientes de iones y receptores expresados por neuronas (Rupprecht R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. Psychoneuroendocrinology. 2003; 28:139-68. PMID: 12510009), incluido GABA (Lan NC, Gee KW. Neuroactive steroid actions at the GABAA receptor. Hormones and behavior. 1994; 28:537-44. PMID: 7729823); (ii) glucolípidos neuroprotectores de gangliósidos esenciales para la plasticidad y reparación neuronal (Aureli M, Mauri L, Ciampa MG, Prinetti A, Toffano G, Secchieri C, Sonnino S. GM1 Ganglioside: Past Studies and Future Potential. Molecular neurobiology. 2015. PMID: 25762012); y (iii) lípidos neuromodulares de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga similares a
 20 endocannabinoides reconocidos por receptores que participan en el apetito, el dolor, el estado de ánimo y la memoria (Dyall SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. Frontiers in aging neuroscience. 2015; 7:52. PMID: 25954194; PMCID: PMC4404917; Janssen CI, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. Progress in lipid research. 2014; 53:1-17. PMID: 24334113; Figueroa JD, De Leon M. Neurorestorative targets of dietary long-chain omega-3 fatty acids in neurological injury. Molecular neurobiology. 2014; 50:197-213. PMID: 24740740; PMCID: PMC4183712).

La estrategia más sólida para la síntesis de conjugados oligonucleotídicos fue acoplar el conjugado activado con un soporte modificado por amino. La estructura y longitud del enlazador se variaron (p. ej., ramificaron) y el soporte se funcionalizó cuando fue posible. Las variaciones de las estrategias sintéticas señaladas en las Figuras 93 y 94 se usaron para sintetizar ARNiph conjugados con cortisol, ácido docosahexanoico (DHA), calciferol, colesterol y gangliósido GM1 (Figuras 98 y 99). Todos los compuestos se purificaron mediante HPLC y sus identidades se confirmaron mediante espectrometría de masas. El soporte funcionalizado con calciferol fue inestable y dio como resultado una mezcla de varias variantes que se evaluaron *in vivo* (descritas *infra*).
 35

Como se esperaba, los compuestos exhibieron diferentes grados de hidrofobicidad en función del tiempo de retención durante la cromatografía de fase inversa. La inyección de conjugados de ARNiph etiquetados con Cy3 en estrías o ICV (Figura 92) de ratones naturales reveló grados variables de distribución y retención de ARNiph que se correlacionan fuertemente con la hidrofobicidad. Los ARNiph no conjugados o solo con enlazador exhibieron una retención mínima en el cerebro (similar a la de los oligonucleótidos de antisentido) y los compuestos más hidrófobos, colesterol y GM1, se retuvieron principalmente cerca del sitio de la inyección. La retención/distribución óptima se logró con los conjugados de DHA y calciferol (*infra*), que tienen perfiles de hidrofobicidad intermedios. El DHA-ARNiph se estudió en detalle y exhibió gran eficacia y seguridad sin precedentes (índice terapéutico >20 veces) (Nikan et al., 2016; Molecular Therapy, en revisión, ver Anexo). En resumen, los datos presentados en la presente memoria muestran que ajustar la hidrofobicidad de los conjugados es una estrategia válida para identificar conjugados que proporcionan una retención, distribución y seguridad óptimas en tejidos cerebrales.
 45

50 El GM1-ARNiph se internalizó de manera eficaz e indujo el silenciamiento del ARNm de huntingtina en neuronas corticales primarias (Figura 108). El GM1-ARNiph exhibió una distribución limitada en el cerebro de ratón después de inyección intraestriatal (Figura 109).

Ejemplo 3. DHA-ARNiph

55 Los ARNiph parcialmente modificados demostraron una duración del efecto corta y nula exposición sistémica (Figuras 35A-C). Se investigó adicionalmente la estabilización metabólica (Figura 36). La estabilización metabólica completa no interfirió en la entrada en el RISC de los ARNiph (Figura 37). Los ARNiph completamente estabilizados

metabólicamente (FM-ARNiph) mejoraron el suministro y distribución locales y posibilitaron una duración del efecto más prolongada (Figuras 38, 39A-B, 91, 110 y 111 El término "nucleósido").

Los lípidos de origen natural (es decir, glicoesfingolípidos, ácidos grasos poliinsaturados, secoesteroides, hormonas esteroideas y lípidos de esteroles) se investigaron como bioconjugados de ARNiph (Figura 40). Los bioconjugados lipídicos tuvieron un efecto pronunciado sobre la hidrofobicidad de la cadena de sentido del ARNiph^{HTT}.

Se diseñó un estudio para estudiar la distribución *in vivo* de los conjugados de ARNiph. Se llevó a cabo una inyección intraestriatal unilateral (2 nmol/ 2 µl) en ratones naturales FVBN con conjugados de ARNiph CY3 estabilizados por P2 en aCSF. 48 horas después de la inyección, los animales se sometieron a perfusión con PBS y formalina al 10 %. Se retiraron sus cerebros y se fijaron posteriormente durante 48 horas. Se prepararon cortes de 4 µm coronales y sagitales y se tiñeron con DAPI. La obtención de imágenes se llevó a cabo de un microscopio fluorescente Leica DM 5500 (CY3 y DAPI). Se determinó que la hidrofobicidad del ARNiph se correlaciona directamente con la distribución y retención cerebral (Figura 41). Una propiedad clave fue el equilibrio entre la distribución y la retención.

Se sintetizaron ARNiph con ácido docosahexanoico (DHA) (Figura 42). El DHA es un ácido graso omega-3 que es uno de los principales componentes del cerebro humano (70 %). El DHA atraviesa la barrera hematoencefálica (BBB) y las neuronas y otros tipos de células se internalizan activamente. Es un complemento clínico no tóxico que se ha demostrado que mejora la función cognitiva en pacientes con HD y ALS. El DHA es significativamente menos hidrófobo que el colesterol.

Se demostró la internalización de DHA-ARNiph y col-ARNiph en neuronas corticales primarias (Figura 43). El DHA-ARNiph se colocaliza en neuronas y astrocitos (Figura 44) y se localizó en la región perinuclear de las neuronas estriatales (el col-ARNiph no fue detectable en neuronas estriatales) (Figura 45). El DHA-ARNiph se colocalizó en neuronas y astrocitos en la corteza después de una inyección intraestriatal simple (Figura 46). El DHA-ARNiph se localizó en la región perinuclear en neuronas corticales, mientras que col-ARNiph fue indetectable (Figura 47). El DHA-ARNiph se distribuyó de manera eficaz en todo el cerebro y silenció genes en el cuerpo estriado y la corteza (Figura 57).

El DHA-ARNiph exhibió una eficacia contundente en el cuerpo estriado y la corteza (Figuras 48 y 49). Hasta 200 µg de DHA-ARNiph no tuvieron efecto sobre los niveles de DARPP-32, lo cual indica la seguridad del compuesto (Figura 50). En cambio, 25 µg (1 mg/kg) fue la dosis intraestriatal máxima tolerada de col-ARNiph. Hasta 200 µg de DHA-ARNiph no causaron un aumento significativo en la microglía activada, lo que indica una estimulación inmunitaria mínima (Figura 51).

El ARNiph permite un silenciamiento génico simple y eficaz en neuronas primarias *in vivo* en el cerebro. La hidrofobicidad del oligonucleótido define la retención y distribución en el tejido cerebral. Se demostró que la química del oligonucleótido influye sobre el suministro y la distribución celulares (Figuras 52-56). Los conjugados de DHA-ARNiph representan una nueva clase de oligonucleótidos con amplia eficacia *in vivo* y un amplio índice terapéutico.

Ejemplo 4. PC-DHA-ARNiph (PC-DHA-ARNiph)

El amplio índice terapéutico de los DHA-ARNiph fomentó una investigación en mayor detalle del DHA y conjugados relacionados. El DHA en la circulación está en su mayoría presente como un éster de lisofosfatidilcolina, que es la única forma traficada activamente a través de la barrera hematoencefálica a través del transportador Mfsd2a específico (Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, Wenk MR, Goh EL, Silver DL. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. Nature. 2014; 509:503-6. PMID: 24828044).

El éster de lisofosfatidilcolina de DHA es inestable, de manera que se sintetizó una amida de lisofosfatidilcolina (PC) de DHA (Figuras 93, 94, 100 y 101). El PC-DHA es un análogo metabólicamente estable compatible con la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. Su identidad se confirmó mediante RNM y espectrometría de masas. Al someter a prueba la idea de que la lisofosfatidilcolina mejoraría el tráfico del DHA-ARNiph, se determinó que los PC-DHA-ARNiph exhibieron una distribución más amplia y eficacia mejorada en el tejido cerebral con respecto a los DHA-ARNiph (Figuras 92 y 103). De manera importante, como una clase, los conjugados de DHA exhibieron un amplio índice terapéutico con una activación inmunitaria innata no obvia ni degeneración neuronal en concentraciones 20 más altas que la dosis mínima eficaz (Figura 92). En comparación, el col-ARNiph exhibió toxicidad significativa con inyecciones de 25 µg (Figura 92C). Por último, una infusión de CSF (ICV) en bolo respaldó una amplia distribución en el cerebro, abarcando el cuerpo estriado, la corteza e incluso llegando a las regiones más posteriores y ventrales del cerebro (Figura 92). Debido a sus características excepcionales, el PC-DHA-ARNiph se seleccionó como química líder para la investigación.

El PC-DHA es un análogo metabólicamente activo del DHA (Figura 62). El PC-DHA-ARNiph demuestra un silenciamiento neuronal mejorado *in vitro*, distribución mejorada en el cerebro y potencia mejorada *in vivo* (sin signos de toxicidad) con respecto a DHA-ARNiph.

Se demostró que cada uno de PC-DHA-ARNiph y col-ARNiph silencia de manera eficaz el ARNm de *htt* mutante y natural (Figura 61). El col-ARNiph demostró toxicidad (3 de 6 animales murieron). Los animales vivos demostraron una expresión de *htt* humana muy baja (3 veces con respecto al fondo).

5 El PC-DHA-ARNiph, cuando se suministró a neuronas primarias, demostró potencia mejorada con respecto a DHA-ARNiph (Figura 63). Aunque el col-ARNiph fue más eficaz para reducir la expresión génica de *htt* en neuronas primarias (Figura 64), el PC-DHA-ARNiph exhibió una retención cerebral superior y distribución más amplia (Figura 65).

10 El PC-DHA-ARNiph exhibió aproximadamente 80 % de silenciamiento en el cuerpo estriado de ratón después de una inyección intersticial (IS) simple (Figura 66) y exhibió aproximadamente 60 % de silenciamiento en la corteza de ratón después de una inyección IS simple (Figura 67). No hubo indicación de toxicidad. El silenciamiento se limitó al sitio inyectado del cerebro.

El riñón es la principal diana del PC-DHA-ARNiph (Figura 107). El PC-DHA-ARNiph se acumuló en los túbulos contorneados proximales.

Ejemplo 5. Descubrimiento de Di-ARNiph

15 Los oligonucleótidos ramificados representan una nueva clase de agentes terapéuticos oligonucleotídicos. Se acoplaron de dos a ocho oligonucleótidos entre sí a través de un enlazador hidrófobo, donde se prefieren 2-3 oligonucleótidos acoplados entre sí. Se usó típicamente estabilización química sustancial (al menos 40 % de bases modificadas, se prefieren completamente modificadas. Se usó típicamente una cola monocatenaria modificada por fosforotioato de 2-20 (donde se prefiere de 8-10).

20 El descubrimiento de compuestos de ARNiph dirramificados (di-ARNiph) se produjo de forma puramente casual. El calciferol se oxida fácilmente y el soporte sólido demostró ser inestable, lo que complicaba la QC y purificación. Una agrupación de cuatro subproductos principales se inyectó en las estrias de ratones naturales. Tuvo un mejor rendimiento que cualquier compuesto inyectado anteriormente en el SNC. Los productos exhibieron amplia difusión, gran retención y captación preferencial en neuronas en la corteza, el cuerpo estriado y la médula espinal, que es un perfil casi ideal. La caracterización detallada mediante HPLC y espectrometría de masas identificó los subproductos presentes en la mezcla bruta: el conjugado de calciferol-ARNiph deseado, un ARNiph protegido con un enlazador de trietilenglicol (TEG) y dos ARNiph conectados mediante un enlazador TEG. El último compuesto se originó a partir del calciferol que se retiró por escisión durante la carga del soporte y dejó dos grupos activos en los cuales multiplicar las cadenas pasajeras del ARNiph (Figura 95A). Después de purificar cada subproducto se determinó que cada uno podría ingresar de manera eficaz en el RISC *in vitro* (Figura 95B), pero solo los Di-ARNiph exhibieron la amplia distribución y la captación neuronal preferencial (Figura 95C). Se concibió una vía para sintetizar directamente el Di-ARNiph con >70 % de rendimiento (Figuras 93 y 94), confirmado por espectrometría de masas (Figuras 100 y 101).

30 Una infusión ICV de bolo de Di-ARNiph respaldó el suministro a través de todo el cerebro. Se determinó que los compuestos de ARNiph dirramificados (di-ARNiph) proporcionan una amplia distribución en el cerebro (Figuras 68, 69 y 104A). Obsérvese que el cerebro en el que se inyectó el Cy3-Di-ARNiph en la Figura 104A está rosado en todas partes. Una inyección simple de di-ARNiph se detectó hacia el lado ipsilateral y contralateral con respecto al sitio de la inyección, lo que indica que la diseminación no se limita al hemisferio inyectado, sino que también se produce pasando la línea media hacia el lado no inyectado. El menor grado de acumulación de di-ARNiph en el lado contralateral, aunque significativo, puede requerir inyecciones bilaterales para un silenciamiento en todo el cerebro. Los métodos alternativos de inyección incluida la intracerebral-ventricular pueden facilitar la distribución bilateral con solo una inyección.

40 Se determinó que la ramificación es esencial para la distribución cerebral mejorada (Figura 70). El Di-ARNiph se distribuyó a todo el hemisferio inyectado del cerebro de ratón después de la inyección intraestriatal. Aunque un ARNiph simple no conjugado pueden silenciar el ARNm en neuronas primarias, la estructura del di-ARNiph fue esencial para una distribución en el tejido distribución y retención en el tejido mejoradas de los oligonucleótidos modificados. Otros conjugados tales como el colesterol, aunque se retuvieron, exhibieron un gradiente de difusión pronunciado lejos del sitio de la inyección. La sutil hidrofobicidad de las dos colas monocatenarias modificadas por fosforotioato respaldaron la retención en el tejido, mientras que también posibilitaron la distribución amplia y uniforme por todo el hemisferio ipsilateral del cerebro inyectado.

50 Se estudió el silenciamiento génico *in vivo* después de inyecciones IS simples de di-ARNiph (Figura 71). La inyección simple de di-ARNiph indujo un silenciamiento contundente en el cuerpo estriado y la corteza del cerebro de ratón (Figuras 72 y 73). Este nivel de eficacia no se había demostrado nunca anteriormente para ARNiph no conjugados. Aunque el di-ARNiph visualmente asociado a tractos de fibras en el cuerpo estriado, la eficacia observada indica claramente que las neuronas estriatales internalizaron el di-ARNiph en un grado significativo.

55 El Di-ARNiph también respaldó la distribución uniforme en la médula espinal (Figura 74). Una inyección IT de bolo de di-ARNiph respaldó el silenciamiento de *htt* en médulas espinales (Figura 75). El di-ARNiph exhibió un silenciamiento contundente y uniforme en toda la médula espinal después de inyección intratecal. Una inyección simple de di-ARNiph

en la región lumbar de la médula espinal silenció el ARNm con el mismo grado en las regiones cervical, torácica y lumbar, lo que indica una distribución uniforme y de gran alcance. Este método aceptado para el suministro de fármaco permitirá el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que afectan a las neuronas en la médula espinal.

5 El Di-ARNip exhibió una distribución celular única cuando se inyectó intraestriatal en el cerebro (Figura 76). El di-ARNip etiquetado de forma fluorescente pareció localizarse preferencialmente en neuronas en la corteza. Esta característica selectiva fue específica para estos compuestos y no se produjo en otros conjugados de ARNip, tales como con colesterol, que no exhibió preferencia por un tipo celular.

10 El di-ARNip exhibió localización en los tractos de fibras en el cuerpo estriado, pero estuvo presente dentro de los cuerpos celulares de las neuronas en la corteza (Figura 77). Sin ánimo de ceñirse a la teoría científica, el movimiento hacia la corteza podría ser por difusión o podría resultar del transporte retrógrado a través de los tractos de fibras estriatales. La teoría de que el transporte retrógrado es parcialmente responsable tiene el respaldo del hecho de que algunas áreas de la corteza exhibieron una penetración neuronal completa, mientras que las neuronas en áreas adyacentes no exhibieron asociación al di-ARNip.

15 La inyección intratecal del di-ARNip produjo de manera similar resultados impresionantes para la médula espinal (Figura 105A). Mientras que el col-ARNip (el conjugado de ARNip original) exhibió un gradiente de distribución pronunciado con una cantidad relativamente pequeña que llegó a la materia gris y las neuronas motoras, el di-ARNip se distribuyó uniformemente por toda la médula espinal y se colocó en las neuronas motoras (ampliadas en la Figura 105A).

20 La amplia distribución del di-ARNip después una inyección simple se asoció a un silenciamiento mayor que el 85 % en el cuerpo estriado, un silenciamiento del 70 % en la corteza (Figura 104B) y un silenciamiento de aproximadamente 50 % en la médula espinal (Figura 105B). Aunque se acumularon cantidades significativas de di-ARNip con el tiempo en el cuerpo estriado, la corteza, el hígado y los riñones (Figura 104C), no se detectó ningún indicio de inflamación ni degeneración neuronal con la dosis más alta evaluada (es decir, 400 µg ICV y 150 µg IT), que es muy superior a la dosis eficaz mínima. En estos niveles, los col-ARNip son tóxicos. En función de estos datos, los di-ARNip se seleccionaron como una segunda clase de química para la caracterización detallada, optimización y validación. Una caracterización detallada de los di-ARNip se llevará a cabo para determinar la respuesta a la dosis, la máxima dosis tolerada y el índice terapéutico. Se usarán ensayos celulares, moleculares y bioquímicos para medir adicionalmente la distribución y acumulación *in vivo* de los compuestos y el grado de regulación del gen diana.

Ejemplo 6. Indicio de que el transporte axónico contribuye a la distribución del Di-ARNip en el cerebro

30 El suministro preferencial de di-ARNip a las neuronas, especialmente distal con respecto al sitio de inyección, fue alentador. En ratones que recibieron inyección intraestriatal de Cy3-di-ARNip (Figura 95C), se detectó el Di-ARNip en cada célula positiva para NeuN (neuronas) de la corteza, pero no en otros tipos de células no neuronales (p. ej., glías). Una interpretación de esta observación es que los di-ARNip se transportan preferencialmente a lo largo de los axones hacia las neuronas distales. ¿Por qué los oligonucleótidos ramificados tendrían un efecto tan profundo en su
35 distribución? Se hipotetizó que se debe a una función de unión cooperativa, por la cual un ARNip se une débilmente a un receptor y un segundo evento de unión independiente promueve la internalización (Alves ID, Ciano KA, Boguslavski V, Varga E, Salamon Z, Yamamura HI, Hraby VJ, Tollin G. Selectivity, cooperativity, and reciprocity in the interactions between the delta-opioid receptor, its ligands, and G-proteins. The Journal of biological chemistry. 2004; 279:44673-82. PMID: 15317820). La unión cooperativa mediante ARNip enlazados covalentemente podría mejorar
40 considerablemente el índice de captación celular y, en consecuencia, la retención en el tejido. Esta y otras hipótesis se someterán a prueba y se llevarán a cabo estudios detallados de la relación estructura-actividad de los di-ARNip.

Ejemplo 7. Indicio de los conjugados PC-DHA y Di-ARNip: dos nuevas clases de oligonucleótidos activos en el SNC.

45 Como se describe en los datos indicados anteriormente, se diseñaron dos nuevas clases químicamente diferenciadas de ARNip terapéuticos, PC-DHA-ARNip y Di-ARNip, que proporcionan una amplia distribución y un potente silenciamiento génico en tejidos del SNC después de infusión en CSF. Los Di-ARNip parecen prometedores, pero actualmente carecen de datos sobre seguridad e índice terapéutico. Los PC-DHA-ARNip tienen una amplia ventana terapéutica (Figura 103). Esto es importante porque los oligonucleótidos de antisentido en los ensayos clínicos para indicaciones del SNC tienen un índice terapéutico reducido.

50 Para mitigar el posible riesgo, ambas clases de compuestos se evaluarán en detalle. El objetivo es lograr más de un 70 % de silenciamiento del gen diana con una dosis menor que 200 µg/inyección, un índice terapéutico mayor que 10 veces y una duración del efecto de 1 mes a 3 meses con una inyección de bolo a través del CSF. El desarrollo de una plataforma de tecnología simple que permite el silenciamiento directo y de larga duración en el cerebro y la médula espinal de un animal pequeño hará avanzar al campo de la investigación neurocientífica de manera significativa. Permitirá el análisis funcional directo de una gama de dianas nuevas con supuesta participación en la biología cerebral
55 y la progresión de la enfermedad neurodegenerativa. Los datos descritos en la presente memoria demuestran que la química define la distribución, eficacia y seguridad de los oligonucleótidos. Se evaluarán variantes químicas de PC-DHA-ARNip y di-ARNip para identificar andamiajes con mayor eficacia e índices terapéuticos más amplios,

características que son esenciales para la futura traducción de esta plataforma de tecnología hacia la terapia en seres humanos. Por último, se validará el rendimiento de varios compuestos en modelos animales establecidos para enfermedad neurodegenerativa, mediante el silenciamiento de *HTT* en HD.

5 Ejemplo 8: Caracterización de la distribución, eficacia y seguridad de PC-DHA y Di-ARNiph en el cerebro y la médula espinal

Síntesis de oligonucleótidos

Los ARNiph y Di-ARNiph se sintetizarán (0,2 gramos, +/- Cy3) y purificarán mediante HPLC como ARNiph completamente estables metabólicamente (incluido 5'-E-VP como un análogo de fosfato terminal), con posterior caracterización por espectrometría de masas. Se sometió a barrido una variedad de enlazadores y se identificaron andamiajes óptimos para la conjugación de PC-DHA y di-ARNiph. Los soportes funcionalizados se sintetizarán como se muestra en las Figuras 93 y 94. Los siguientes compuestos se usarán: *HTT-10150* (HD) y *PPIB-437* (testigo de mantenimiento). Los números denotan la posición del ARNm humano diana del nucleótido hacia 5' de la cadena guía. Todos los compuestos se identificaron anteriormente mediante el uso de parámetros bioinformáticos optimizados (Birmingham A, Anderson E, Sullivan K, Reynolds A, Boese Q, Leake D, Karpilow J, Khvorova A. A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. *Nature protocols*. 2007; 2:2068-78. PMID: 17853862) y barridos experimentales exhaustivos. Cada ARNiph se dirige a y silencia los ARNm de humano, ratón y mono correspondientes, lo que simplificará el desarrollo clínico futuro.

Además de los sistemas de síntesis de oligonucleótidos estándares, es decir, Mermaid12 y Expedite, se ha establecido una capacidad de síntesis de ARN a mediana escala (patrocinada a través de una subvención S10), incluido un OligoPilot 100, HPLC preparativas y LC-MS de alta resolución. Se sintetizarán grandes lotes de los nuevos compuestos necesarios para los estudios *in vivo* propuestos a continuación.

Optimización de la vía de administración

Se compararon varias vías de administración y se determinó que una infusión de bolo a través del CSF (infusión ICV e IT) proporciona el mejor grado de retención y distribución del compuesto en tejidos del SNC. El suministro en el CSF a través de estas vías es análogo a una "punción lumbar", una vía de administración clínicamente aceptable. Una comparación directa de la retención en el tejido y la eficacia se comparó cuando se suministraron dosis equivalentes mediante inyección de bolo o mediante bomba ALZET durante un período de una semana. Se observaron retención en tejido y eficacia mejores significativamente con las inyecciones de bolos, datos que son congruentes con los datos informados para ASO (Rigo F, Chun SJ, Norris DA, Hung G, Lee S, Matson J, Fey RA, Gaus H, Hua Y, Grundy JS, Krainer AR, Henry SP, Bennett CF. Pharmacology of a central nervous system delivered 2'-O-methoxyethyl-modified survival of motor neuron splicing oligonucleotide in mice and nonhuman primates. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2014; 350:46-55. PMID: 24784568; PMCID: PMC4056267). Sin ánimo de ceñirse a la teoría científica, el mejor rendimiento de la administración por bolo con respecto a la administración por bomba podría estar relacionado con el mecanismo de captación del oligonucleótido. Por ejemplo, los enlaces oligonucleotídicos no productivos podrían saturarse más rápidamente mediante el bolo que con la infusión por bomba y posibilitar, de este modo, que el exceso de oligonucleótidos se transporte más fácilmente.

Para cuantificar directamente la cadena guía intacta en los tejidos, desarrollamos e implementamos un nuevo de ensayo de hibridación de ácido nucleico peptídico (PNA) cuantitativo (Figura 106). Este ensayo es altamente sensible, con un límite de detección menor que 10 fmoles de ARNiph por gramo de tejido. Los metabolitos de ARNiph con cadena guía de longitud completa, parcialmente degradada, fosforilada en 5' y desfosforilada en 5' se podrían cuantificar sin inconvenientes como picos o valles en las trazas de HPLC. Al usar este ensayo, se cuantificará la cinética de la retención de la cadena guía en biopsias en sacabocados de 2 mm tomadas de regiones de toda la médula espinal y el cerebro.

En función de la experiencia previa, la acumulación de 1 a 5 µg de oligonucleótido por gramo de tejido una semana después de la inyección es normalmente suficiente para proporcionar el silenciamiento productivo de la diana (Figuras 104B, 104C). Los ensayos de fluorescencia y PNA permiten el mapeo de la distribución y cantidad de conjugado ARNiph suministrado. Estos estudios complementarán los análisis funcionales y establecerán una base para los estudios de eficacia del silenciamiento.

Identificar la dosis máxima tolerada

50 En estudios piloto, se estableció que 200 µg de DHA-ARNiph y di-ARNiph es una dosis segura para la inyección intraestriatal (los datos para DHA están presentes en las Figuras 103B y 103C), se estableció que 150 µg es una dosis segura para la inyección intratecal y se estableció que 400 µg es una dosis segura para inyección intracerebroventricular. Al comenzar con estos niveles, la dosis se aumentará en incrementos de dos veces hasta que los animales muestren cualquier indicación de toxicidad o hasta que se alcancen los límites de solubilidad del fármaco de aproximadamente 20 mM para PC-DHA-ARNiph y aproximadamente 50 mM para Di-ARNiph. Tres semanas después de la inyección (tiempo óptimo requerido para observar la toxicidad del oligonucleótido), se recogerá tejido

cerebral y se evaluará la cantidad y viabilidad de las neuronas mediante tinción para los marcadores neuronales NeuN y DARPP-32 (Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* (Cambridge, Inglaterra). 1992; 116:201-11. PMID: 1483388; Weyer A, Schilling K. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *Journal of neuroscience research*. 2003; 73:400-9. PMID: 12868073; Ouimet CC, Miller PE, Hemmings HC, Jr., Walaas SI, Greengard P. DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1984; 4:111-24. PMID: 6319625). La activación microglial (activación inmunitaria innata) también se evaluará mediante tinción para IBA1 (Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2006; 13:494-505. PMID: 16343994; Marques JT, Williams BR. Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nature biotechnology*. 2005; 23:1399-405. PMID: 16273073). Para evaluar si los compuestos desencadenan una respuesta inflamatoria a corto plazo, reversible, ratones recibirán inyecciones con la dosis máxima tolerada y se estudiará la activación glial 6 horas después de la administración. La finalización de este estudio generará datos sobre la dosis máxima tolerada para las dos nuevas clases de ARNiph terapéuticos descritas en la presente memoria.

Estimar los perfiles de aclaramiento de PC-DHA y Di-ARNiph

Se determinará el tiempo de residencia de los ARN en el CSF y la sangre. La extracción repetitiva de CSF en ratones no es viable, por lo tanto, los estudios de aclaramiento del CSF se llevarán a cabo con ratas y se ajustará la dosis en consecuencia. Se extraerán 10 µl de CSF 1, 6, 12 y 24 horas y 1 semana después de la administración de PC-DHA y Di-ARNiph mediante el uso de grupos superpuestos de animales. De manera similar, se recogerán 20 µL de sangre a los 5 y 30 min, y 1, 4, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección. Para minimizar los problemas relacionadas con las extracciones repetitivas de sangre en períodos de tiempo cortos y minimizar la cantidad de animales necesarios para obtener datos precisos, se usará una cateterización de la vena yugular.

En función de los estudios farmacocinético previos con compuestos de ARNiph relacionados, se espera que se observe cinética de aclaramiento bifásica, donde la fase rápida se completa en cuatro a seis horas. En función de estudios piloto, podría llevar un mes(es) para completar el aclaramiento del fármaco. Sin embargo, un estudio piloto de una semana es suficiente para estimar el perfil de aclaramiento. La finalización de este estudio generará datos piloto sobre los perfiles de aclaramiento para las dos nuevas clases de ARNiph terapéuticos descritas en la presente memoria.

Establecer la respuesta a la dosis

Se llevarán a cabo estudios de respuesta a la dosis para determinar la dosis óptima para el silenciamiento en áreas del cerebro que exhiben acumulación significativa de oligonucleótidos. Los experimentos se llevarán a cabo de manera similar a los presentados en las Figuras 103, 104 y 105. Se recogerán biopsias en sacabocados de 3 mm del cerebro y la médula espinal de ratones que recibieron inyecciones con dosis crecientes de PC-DHA y Di-ARNiph, los niveles del ARNm de *HTT* o testigo se medirán mediante el uso del ensayo QUANTIGENE®.

QUANTIGENE® es un ensayo basado en 96 pocillos de alta sensibilidad que usa amplificación de señal para detectar ARNm en lisados de tejidos o células directamente. Recientemente se estableció un protocolo que describe una versión automatizada, de alto rendimiento (96 pocillos) del ensayo que conecta directamente TissueLyser y QUANTIGENE® (Coles AH, Osborn MF, Alterman JF, Turanov AA, Godinho BM, Kennington L, Chase K, Aronin N, Khvorova A. A High-Throughput Method for Direct Detection of Therapeutic Oligonucleotide-Induced Gene Silencing In Vivo. *Nucleic acid therapeutics*. 2015. PMID: 26595721). Por lo tanto, se puede llevar a cabo la cuantificación simultánea del ARNm de *HTT* y de mantenimiento para muchos tejidos y/o animales. En estudios piloto, se determinó que ocho ratones por grupo fueron suficientes para detectar una reducción del 40 % en la expresión del gen diana con 80 % de confianza. *Id.*

Los niveles de ARNm de *HTT* se normalizarán con respecto al ARNm del mantenimiento testigo. Se usarán CSF artificial y testigos no dirigidos (NTC, por sus siglas en inglés) de la misma composición química como testigos para eventos específicos no relacionados con la secuencia. El ARNiph NTC solo se inyectará en la concentración no tóxica más alta para limitar la cantidad de animales usados. Aunque el NTC es un testigo negativo mejor, un segundo ARNiph dirigido (p. ej., dirigido a *PPIB*) proporcionará datos sobre dos dianas diferentes con la misma cantidad de animales. La confirmación del silenciamiento a nivel de proteína es esencial antes de pasar a modelos animales de la enfermedad, de modo que se llevará a cabo transferencia Western de manera similar a la llevada a cabo para col-ARNiph (Alterman JF, Hall LM, Coles AH, Hassler MR, Didiot MC, Chase K, Abraham J, Sottosanti E, Johnson E, Sapp E, Osborn MF, Difiglia M, Aronin N, Khvorova A. Hydrophobically Modified siRNAs Silence Huntingtin mRNA in Primary Neurons and Mouse Brain. *Molecular therapy Nucleic acids*. 2015; 4:e266. PMID: 26623938). La finalización de este estudio identificaría dosis que posibilitan el silenciamiento génico funcional en diferentes regiones del SNC para las dos nuevas clases de ARNiph terapéuticos descritas en la presente memoria.

Duración del silenciamiento por PC-DHA y Di-ARNiph después de una única administración

La mayoría de los modelos de trastornos y enfermedades neurodegenerativas presentan una aparición tardía de los síntomas (p. ej., 3 a 9 meses en ratones). Se debería determinar la duración del silenciamiento a partir de una inyección y cuántas inyecciones serán necesarias para proporcionar 6 a 9 meses de silenciamiento. En general, se espera que el silenciamiento inducido por ARNip en células no divisibles dure mes(es). La semivida del complejo RISC cargado es de varias semanas (Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. Nature reviews Drug discovery. 2009; 8:129-38. PMID: 19180106) y menos de 1000 moléculas de RISC cargadas por célula son suficientes para inducir el silenciamiento (Stalder L, Heusermann W, Sokol L, Trojer D, Wirz J, Hean J, Fritzsche A, Aeschimann F, Pfanzagl V, Basselet P, Weiler J, Hintersteiner M, Morrissey DV, Meisner-Kober NC. The rough endoplasmatic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing. The EMBO journal. 2013; 32:1115-27. PMID: 23511973; PMCID: 3630355; Pei Y, Hancock PJ, Zhang H, Bartz R, Cherrin C, Innocent N, Pomerantz CJ, Seitzer J, Koser ML, Abrams MT, Xu Y, Kuklin NA, Burke PA, Sachs AB, Sepp-Lorenzino L, Barnett SF. Quantitative evaluation of siRNA delivery in vivo. Rna. 2010; 16:2553-63. PMID: 20940339; PMCID: 2995415).

Además, los FM-ARNiph pueden proporcionar otra ventaja. Una célula normalmente absorbe millones de ARNiph, pero la amplia mayoría queda atrapada en lisosomas. Los ARNiph convencionales, parcialmente modificados atrapados en lisosomas se degradan, pero los FM-ARNiph no. Como resultado, los FM-ARNiph atrapados transitoriamente en los lisosomas forman un "depósito" intracelular que libera lentamente FM-ARNiph, lo que los vuelve disponibles para la carga de RISC. Los datos de los ensayos con Alnylam GalNAc indican que el suministro optimizado al hígado proporciona una eficacia de hasta seis meses a partir de una única inyección subcutánea. Los datos presentados en la presente memoria son congruentes con esta observación; una única inyección de FM-ARNiph proporciona un silenciamiento máximo durante al menos un mes (Figura 2D).

Para medir la retención del ARNiph y la duración del silenciamiento, tres ratones recibirán inyecciones con la dosis más alta tolerada de PC-DHA o di-ARNiph, y se medirán los niveles de cadena guía intacta en tejidos 1, 2 y 4 semanas y 2, 3, 4 y 6 meses después mediante el uso del ensayo de PNA (Figura 106). Tan pronto como los niveles de cadena guía intacta caigan por debajo de 1 µg de ARNiph por gramo de tejido, el estudio se terminará. Los niveles de ARNm de *HTT* se medirán en los puntos de tiempo donde la concentración de la cadena guía está por encima de un µg por gramo de tejido en un estudio separado (n=8) para detectar de manera fiable los efectos del silenciamiento. Aunque se espera que la duración del silenciamiento dure al menos tres meses, se desea la validación experimental.

Explorar mecanismos de captación celular y tráfico de Di-ARNiph

Los ARNiph dirramificados exhibieron retención y distribución significativamente mejoradas en los tejidos del SNC en comparación con una dosis igual de ARNip simple unido a enlazador, lo que indica que la unión cooperativa mediante el ARNip enlazado covalentemente o la dimerización del receptor impulsan la captación celular (Figura 95C). La captación diferencial se visualizará y caracterizará mediante el uso de una combinación de microscopía TESM (microscopía de estructura de epifluorescencia con resolución temporal) y espectrometría de masas.

Desarrollo de "antídotos" para compuestos de HTT

En la actualidad, se están tomando en consideración las estrategias de terapia génica (es decir, el silenciamiento génico permanente) para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, de modo que una duración de 1 a 6-meses de silenciamiento parece relativamente segura. Sin embargo, un "antídoto" para revertir el silenciamiento resolvería los problemas relacionados con la seguridad. Un "antídoto" también es una gran herramienta para estudiar la función génica *in vivo*, ya que permite evaluar cuánto tiempo se debe disminuir la expresión de un gen para producir fenotipos asociados.

Para resolver problemas similares planteados por la FDA, Alnylam ha desarrollado una tecnología denominada "REVERSIR®", que permite revertir el silenciamiento de largo plazo. El concepto implica el desarrollo de un MIXMER® de antisentido de alta afinidad (LNA y 2'-O-metilo/desoxi) completamente complementaria a la región original del ARNiph funcional. Se diseñará y sintetizará un panel WA de ANTÍDOTOSiph dirigidos a HTT10150 (y eventualmente otros compuestos) y se evaluará su capacidad para revertir el silenciamiento *in vitro* e *in vivo* (Figura 96). Los antídotos se sintetizarán en el contexto del conjugado de PC-DHA para posibilitar propiedades de distribución similares a las del PC-DHA-ARNiph. La finalización de este estudio generará antídotos contra compuestos de ARNiph líderes que posibilitarán revertir su actividad *in vivo*, si se desea.

Estrategia alternativa: Evaluar si la conjugación con PC-DHA y la estructura dirramificada mejoran el silenciamiento mediado por antisentido en el cerebro

Los oligonucleótidos de antisentido para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos están en etapas de desarrollo avanzadas clínicamente (Evers MM, Toonen LJ, van Roon-Mom WM. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. Advanced drug delivery reviews. 2015. PMID: 25797014; Kordasiewicz HB, Stanek LM, Wancewicz EV, Mazur C, McAlonis MM, Pytel KA, Artates JW, Weiss A, Cheng SH, Shihabuddin LS, Hung G, Bennett CF, Cleveland DW. Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. Neuron. 2012; 74:1031-44. PMID: 22726834; PMCID: PMC3383626). IONIS-HTT_{Rx} es una química de antisentido de generación 2.5 propiedad de Ionis y no disponible generalmente para la comunidad académica.

Sin embargo, se ha desarrollado un GapmeR de ácido nucleico bloqueado (LNA) altamente potente dirigido a *HTT*. Para evaluar si la conjugación con PC-DHA y/o la dirramificación pueden mejorar la distribución y retención de los oligonucleótidos de antisentido en tejidos cerebrales y reducir sus eficaces, se sintetizarán GapmeR PC-DHA- y di-LNA dirigidos a *HTT*.

- 5 La finalización de este ejemplo resultará en la caracterización completa de los dos nuevos conjugados oligonucleotídicos (es decir, PC-DHA y di-ARNiph) descritos en la presente memoria en el SNC (cerebro y médula espinal), incluida la vía de suministro óptima, aclaramiento y retención del fármaco, seguridad, respuesta a la dosis y duración del efecto. La experimentación descrita en la presente memoria permitirá el uso de estas químicas para estudios de silenciamiento génico y validación de la diana en el SNC *in vivo*, así como proporcionará una base sólida
10 hacia el desarrollo de nuevas terapias para HD.

Ejemplo 9. Síntesis y caracterización de un panel de variantes químicas de PC-DHA y Di-ARNiph para mejorar la distribución y el índice terapéutico

- 15 Los datos presentados en la presente memoria (Figuras 92, 103, 104 y 105) indican que la química de PC-DHA- y di-ARNiph será suficiente para alcanzar un objetivo de duración del efecto de 1 mes a 3 meses en la médula espinal, cuerpo estriado y corteza, que es suficiente para estudios genómicos funcionales *in vivo*. Esto solo es un logro significativo, pero la traducción futura de esta plataforma de tecnología hacia la terapia en seres humanos representa otro nivel de complejidad. Antes de traducir la tecnología, optimizaremos la química para (i) el índice terapéutico más amplio posible y (ii) distribución mejorada para respaldar el suministro a cerebros grandes.

- 20 Ligeros cambios en el andamiaje químico de un conjugado pueden afectar profundamente la distribución en el tejido, como se demostró por la funcionalización de DHA con fosfatidilcolina (Figura 92). Tomando como ejemplo estas plataformas sintéticas, se sintetizará un panel de variantes de PC-DHA- y di-ARNiph para optimizar adicionalmente el índice terapéutico y una amplia distribución en el tejido.

Optimización de PC-DHA

- 25 Existen dos componentes esenciales en la estructura de PC-DHA estructuras: la fosfatidilcolina y el DHA (ver la estructura en la Figura 92). La estrategia de síntesis descrita en la presente memoria (Figuras 93 y 94) permitirá variar estas químicas independientemente. Existe escasa a nula información en la literatura sobre la relación estructura-función de los conjugados oligonucleotídicos, pero existe un gran conjunto de información que describe cómo las estructuras poliméricas y los compuestos lipídicos afectan la formación de la partícula lipídica⁴⁸. Los estudios indican que la longitud del lípido tiene un gran impacto sobre la eficacia de la formulación general.

- 30 Las uniones poliinsaturadas son esenciales para la distribución mejorada del ARNiph en tejidos del SNC. La conjugación de DCA, un análogo completamente saturado de DHA, no promueve la amplia distribución en el SNC. La conjugación de EPA, dos carbonos más corto que DHA, conduce a un interesante perfil de distribución, pero todavía no se ha evaluado la eficacia. Se sintetizará un panel de variantes de ácido graso poliinsaturado modificadas por fosfatidilcolina, al cambiar la longitud de la cola lipídica de 10 a 22 carbonos y la cantidad de uniones poliinsaturadas de 0 a 4. Los precursores para estas reacciones de síntesis están disponibles comercialmente. Estos compuestos
35 revelarán como la longitud de la cola lipídica y la cantidad de uniones poliinsaturadas afectan la distribución de los oligonucleótidos en el SNC.

- 40 En segundo lugar, se llevará a cabo una sustitución sistemática de la entidad colina en una gama de modificaciones, en su mayoría favoreciendo los andamiajes químicos de origen natural, p. ej., fosfatidilserina, fosfatidilinositol y fosfatidil amina. La mayoría de estas síntesis se puede llevar a cabo en paralelo, para crear una biblioteca de compuestos con composición de cola lipídica fija y una variedad de grupos principales. Esta biblioteca se usará para definir la importancia de los grupos principales en el rendimiento *in vivo* de los conjugados de ARNiph.

- 45 Se sabe que, independientemente de la naturaleza de la química o la formulación para suministro, la amplia mayoría de los oligonucleótidos internalizados no están biológicamente disponibles. Arrowhead Research Corporation ha usado polímeros modificados por péptidos endosomolíticos (Wong SC, Klein JJ, Hamilton HL, Chu Q, Frey CL, Trubetskoy VS, Hegge J, Wakefield D, Rozema DB, Lewis DL. Co-injection of a targeted, reversibly masked endosomolytic polymer dramatically improves the efficacy of cholesterol-conjugated small interfering RNAs *in vivo*. Nucleic acid therapeutics. 2012; 22:380-90. PMID: 23181701) para mejorar la eficacia sistémica de los compuestos de ARNiph modificados por colesterol coadministrados. A partir de este concepto, se sintetizó una biblioteca de
50 enlazadores que varían en la cantidad y composición de péptidos endosomolíticos. La mayoría de las variantes no tuvieron impacto sobre la eficacia de col-ARNiph, pero el mejor líder (Figura 97A) mejoró el silenciamiento después de la captación pasiva más de 10 veces (Figura 97B). Sin ánimo de ceñirse a la teoría científica, la actividad mejorada probablemente resulta de la mayor biodisponibilidad del col-ARNiph internalizado, ya que el enlazador modificado no aumentó la eficacia de la captación mediada por lípido (Figura 97B) ni la cantidad global de oligonucleótido
55 internalizado. Este enlazador se combinará con la combinación más óptima de longitud de lípido y grupo principal.

Optimización de Di-ARNiph

Los dos ARNiph en el compuesto de di-ARNiph están conectados asimétricamente: uno mediante una unión fosfato y el otro mediante una unión fosforamidato (Figuras 93, 94 y 103A). Para establecer si la unión fosforamidato es necesaria, actualmente se está evaluando un compuesto dirramificado en el que los ARNiph están ambos conectados al enlazador a través de fosfatos (el esquema de síntesis modificado está basado en el de las Figuras 93 y 94).

5 Demostrar que la unión fosforamidato no es esencial simplificaría los estudios de la relación estructura-actividad, dado que se puede usar una gran cantidad de precursores disponibles comercialmente. Sin embargo, un requisito de la unión fosfoamida sería interesante porque la fosfoamida es mucho menos estable en condiciones ácidas y se espera que promueva la liberación de compuestos de los endosomas.

Se sintetizará un panel de variantes para evaluar los siguientes parámetros: cantidad de ARNiph (2, 3, 4 o 6, al usar divisores de dos y tres ramas disponibles de Glen Research); y la naturaleza química del enlazador que conecta los oligonucleótidos (TEG, cadena alquilo saturada y no saturada, cargada, no cargada, longitudes de 3 a 30 carbonos y esponjas de protones). También se identificará la cantidad mínima de uniones fosforotioato necesaria para la captación. Ya se determinó que las uniones fosforotioato fueron esenciales para la captación pasiva y la eficacia del ARNiph, de manera que se supone que la unión cooperativa de dos colas de fosforotioato impulsa la distribución y captación mejoradas de los Di-ARNiph. Sin embargo, las uniones fosforotioato también impulsan la toxicidad de los oligonucleótidos de antisentido (Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;87:46-51). Por lo tanto, optimizar y reducir la cantidad de fosforotioatos es una vía razonable para mejorar el índice terapéutico.

Evaluación de la eficacia de las variantes de PC-DHA- y Di-ARNiph

20 Se usarán experimentos con cultivo tisular para confirmar la seguridad y eficacia del ingreso en el complejo RISC. Cada compuesto después se inyectará por ICV en las dosis mínimas eficaces y máximas toleradas establecidas como se describe en la presente memoria. Los compuestos que son eficaces a concentraciones más bajas y/o no tóxicos a concentraciones más altas se seleccionarán para estudios detallados. Por último, se evaluó la capacidad de los compuestos más prometedores para distribuirse en un cerebro grande (p. ej., oveja). Se ha diseñado un modelo de

25 oveja para evaluar la distribución de los vectores de VAA-htt. El ensayo de PNA descrito en la presente memoria se usará para medir los niveles del compuesto en biopsias de diferentes regiones del cerebro de oveja después de una infusión ICV de bolo.

La finalización de este ejemplo se espera que: (i) informe sobre estructuras químicas que definen la eficacia *in vivo* de PC-DHA- y Di-ARNiph; y (ii) genere versiones de estos compuestos con distribución, eficacia e índice terapéutico mejorados.

Ejemplo 10. Desarrollo de compuestos preclínicos candidatos para modelos de la enfermedad de Huntington

Evaluación de nuevo conjugado de ARNiph HTT10150 en modelos animales de la enfermedad de Huntington

En la presente memoria se describe el FM-ARNiph hiperfuncional para *Htt*, HTT-10150. Se usarán múltiples modelos animales de HD que se están estudiando en su laboratorio (Chang R, Liu X, Li S, Li XJ. Transgenic animal models for study of the pathogenesis of Huntington's disease and therapy. *Drug design, development and therapy*. 2015; 9:2179-88. PMID: 25931812; PMCID: PMC4404937), incluidos YAC128 (Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, Smith DJ, Bissada N, McCutcheon K, Nasir J, Jamot L, Li XJ, Stevens ME, Rosemond E, Roder JC, Phillips AG, Rubin EM, Hersch SM, Hayden MR. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*. 1999; 23:181-92. PMID: 10402204), BACHD (Hult S, Soylu R, Bjorklund T, Belgardt BF, Mauer J, Bruning JC, Kirik D, Petersen A. Mutant huntingtin causes metabolic imbalance by disruption of hypothalamic neurocircuits. *Cell metabolism*. 2011;13:428-39. PMID: 21459327; Hult Lundh S, Nilsson N, Soylu R, Kirik D, Petersen A. Hypothalamic expression of mutant huntingtin contributes to the development of depressive-like behavior in the BAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics*. 2013; 22:3485-97. PMID: 23697793; Gray M, Shirasaki DI, Cepeda C, Andre VM, Wilburn B, Lu XH, Tao J, Yamazaki I, Li SH, Sun YE, Li XJ, Levine MS, Yang XW. Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008; 28:6182-95. PMID: 18550760; PMCID: PMC2630800) y las series alélicas recientemente establecidas que incluyen Q140 (sitio web: chdifoundation.org).

En función de los parámetros óptimos identificados como se describen en la presente memoria, se administrará una inyección ICV de bolo de HTT-10150 en cada modelo de ratón de Huntington y los ratones se someterán a ensayo para determinar el silenciamiento de *Htt*, el comportamiento de Huntington y/o la aparición de los fenotipos asociados a Huntington y parámetros histológicos validados. Se ha diseñado un conjunto de ensayos validados para detectar la expresión diferencial de los ARNm mutantes de YAC128 y Q140 y el ARNm de *Htt* natural. Se ha diseñado un panel de ensayos para evaluar la función motora, incluidos ensayos de rotarod, plataforma elevada y campo abierto (Sah DW, Aronin N. Oligonucleotide therapeutic approaches for Huntington disease. *The Journal of clinical investigation*. 2011; 121:500-7. PMID: 21285523; PMCID: 3026739; Kordasiewicz HB, Stanek LM, Wancewicz EV, Mazur C, McAlonis MM, Pytel KA, Artates JW, Weiss A, Cheng SH, Shihabuddin LS, Hung G, Bennett CF, Cleveland DW. Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. *Neuron*. 2012;

- 74:1031-44. PMID: 22726834; PMCID: PMC3383626). Un grupo de ratones se tratará a los tres meses de edad para evaluar la prevención de la enfermedad y otro grupo de ratones se tratará a los seis meses de edad para evaluar la corrección de la enfermedad. Se evaluarán las aglomeraciones de HTT mediante tinción inmunohistoquímica con el uso de un anticuerpo antipoliglutamina disponible comercialmente (3B5H10). Los conjugados de ARNiph HTT-10150 se readministrarán, en caso de ser necesario. Los grupos testigo incluirán ratones inyectados con PBS y compuesto testigo no dirigido que tiene química idéntica a la del conjugado de ARNiph HTT-10150. El mejor líder será evaluado nuevamente por otro grupo independientemente en varios modelos de comportamiento de la enfermedad de Huntington.
- La finalización de este ejemplo, junto con los estudios de eficacia, seguridad y duración del efecto generarán un conjunto de datos suficiente para pasar el ARNiph optimizado HTT-10150 al desarrollo preclínico. En la actualidad, el mejor programa disponible para el tratamiento basado en oligonucleótidos de la enfermedad de Huntington es el GapmeR de 2'-O-metoxietilo (ld.), que se usará como referencia. Recientemente se iniciaron ensayos clínicos de fase 1 con el compuesto IONIS-HTT_{Rx} en los que pacientes reciben una inyección por punción lumbar de bolo y una reducción en los niveles de HTT en el CSF sirve como marcador para la prueba de concepto. Esto establece una trayectoria clínica para el desarrollo de agentes terapéuticos oligonucleotídicos para tratar la enfermedad de Huntington. Inicialmente, se planea silenciar el *Htt* mutante y el natural, de manera similar a la estrategia de IONIS. El andamiaje descrito en la presente memoria también se usará para generar compuestos que silencian selectivamente el HTT mutante mediante discriminación de SNP. De hecho, hay cinco alelos de SNP conectados con la expansión tóxica de CAG en 75 % de las mutaciones de pacientes con Huntington (Pfister EL, Kennington L, Straubhaar J, Wagh S, Liu W, DiFiglia M, Landwehrmeyer B, Vonsattel JP, Zamore PD, Aronin N. Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients. *Current biology*: CB. 2009;19:774-8. PMID: 19361997; PMCID: PMC2746439).
- La descripción empleará, a menos que se indique de cualquier otra manera, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular y biología celular, que se conocen en la técnica.
- La presente descripción también se refiere a técnicas conocidas en el campo de la biología molecular y el suministro de fármacos. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, técnicas descritas en las siguientes publicaciones:
- Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 1997, 270: 26-35;
- Ausubel et al. (eds.), *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley & Sons, NY (1993);
- Ausubel, F.M. et al. eds., *SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X);
- CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);
- Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, *CRYSTALLIZATION OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS, a Practical Approach*, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999);
- Goodson, in *MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE*, vol. 2, pp. 115-138 (1984);
- Hammerling, et al., in: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981);
- Harlow et al., *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);
- Kabat et al., *SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991);
- Kabat, E.A., et al. (1991) *SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;
- Kontermann and Dubel eds., *ANTIBODY ENGINEERING* (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).
- Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990);
- Lu and Weiner eds., *CLONING AND EXPRESSION VECTORS FOR GENE FUNCTION ANALYSIS* (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).
- MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);

Old, R.W. & S.B. Primrose, PRINCIPLES OF GENE MANIPULATION: AN INTRODUCTION TO GENETIC ENGINEERING (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).

5 Sambrook, J. et al. eds., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).

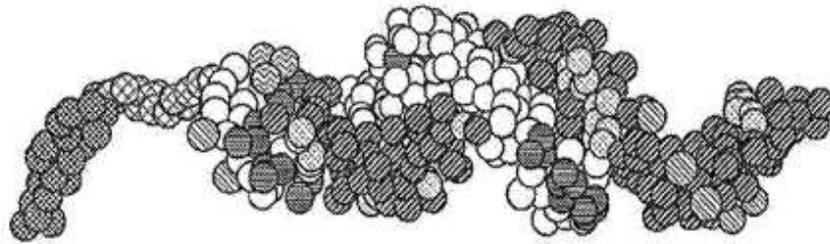
SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978

Winnacker, E.L. FROM GENES TO CLONES: INTRODUCTION TO GENE TECHNOLOGY (1987) VCH Publishers, NY (traducido por Horst Ibelgaufts). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

10

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ARN que tiene una longitud entre 15 y 35 bases, que comprende una región de complementariedad que es completamente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1) para su uso en terapia al inhibir la expresión del gen Huntingtina (*HTT*).
- 5 2. Uso de una molécula de ARN que tiene una longitud entre 15 y 35 bases, que comprende una región de complementariedad que es completamente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1) para inhibir la expresión del gen Huntingtina (*HTT*) en una célula *in vitro*.
3. La molécula de ARN para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la molécula de ARN de la reivindicación 2, en donde dicha molécula de ARN es ARN monocatenario (mc) o ARN bicatenario (bc).
- 10 4. La molécula de ARN para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la molécula de ARN de la reivindicación 2, en donde dicha molécula de ARN es ARNbc comprende una cadena de sentido y una cadena de antisentido, en donde la cadena de antisentido comprende la región de complementariedad que es completamente complementaria a 5' CAGUAAAGAGAUUAA 3' (SEQ ID NO:1).
- 15 5. La molécula de ARN para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la molécula de ARN de la reivindicación 2, en donde dicha molécula de ARN es ARNbc y en donde dicho ARNbc tiene una longitud de entre 30 y 35 pares de bases.
6. La molécula de ARN para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la molécula de ARN de la reivindicación 2, en donde dicha molécula de ARN es ARNbc y en donde dicho ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado.
7. Un vector para uso en terapia al inhibir la expresión del gen *HTT* en una célula *in vivo*, dicho vector comprende una secuencia reguladora enlazada funcionalmente a una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARN según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y en donde dicha molécula de ARN, después de entrar en contacto con una célula que expresa dicho gen *HTT*, inhibe la expresión de dicho gen *HTT* en al menos 20 %.
- 20 8. Uso de un vector para inhibir la expresión del gen *HTT* en una célula *in vitro*, dicho vector comprende una secuencia reguladora enlazada funcionalmente a una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARN según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y en donde dicha molécula de ARN, después de entrar en contacto con una célula que expresa dicho gen *HTT*, inhibe la expresión de dicho gen *HTT* en al menos 20 %.
- 25 9. El vector de la reivindicación 7 o el uso del vector de la reivindicación 8, en donde dicho vector es un vector de virus adenoasociado recombinante.
10. Un virus adenoasociado recombinante (VAAr) para su uso en terapia al inhibir la expresión del gen *HTT*, que comprende la molécula de ARN o el vector según se definieron en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 30 11. Un uso de composición farmacéutica en terapia al inhibir la expresión del gen *HTT*, que comprende un ARNbc según se definió en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, un vector según se definió en cualquiera de las reivindicaciones 7 o 9 o el VAAr según se definió en la reivindicación 10, y un portador farmacéuticamente aceptable.
12. La molécula de ARN para su uso según la reivindicación 1, el vector para su uso según la reivindicación 7 o 9, o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, que se administrará al cerebro del paciente.
- 35 13. La molécula de ARN, el vector o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, que se administrará mediante infusión intraestriatal.
14. La molécula de ARN, el vector o la composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 12, en donde la administración al cerebro provoca una disminución en el ARNm del gen *HTT* en el cuerpo estriado.
- 40 15. La molécula de ARN, el vector o la composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 12, en donde la administración al cerebro provoca una disminución en el ARNm del gen *HTT* en la corteza.



- ARN 2'-O-Metilo
- ARN 2'-Fluoro
- Cadena de sentido
- Cadena de antisentido
- Colesterol
- ⊗ Enlazador TEG
- Fosforotioato
- 5'-Fosfato

Fig. 1A

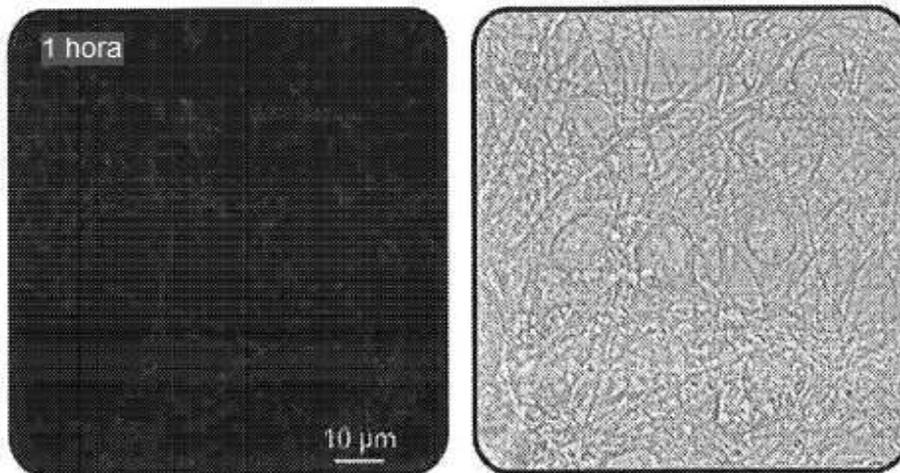
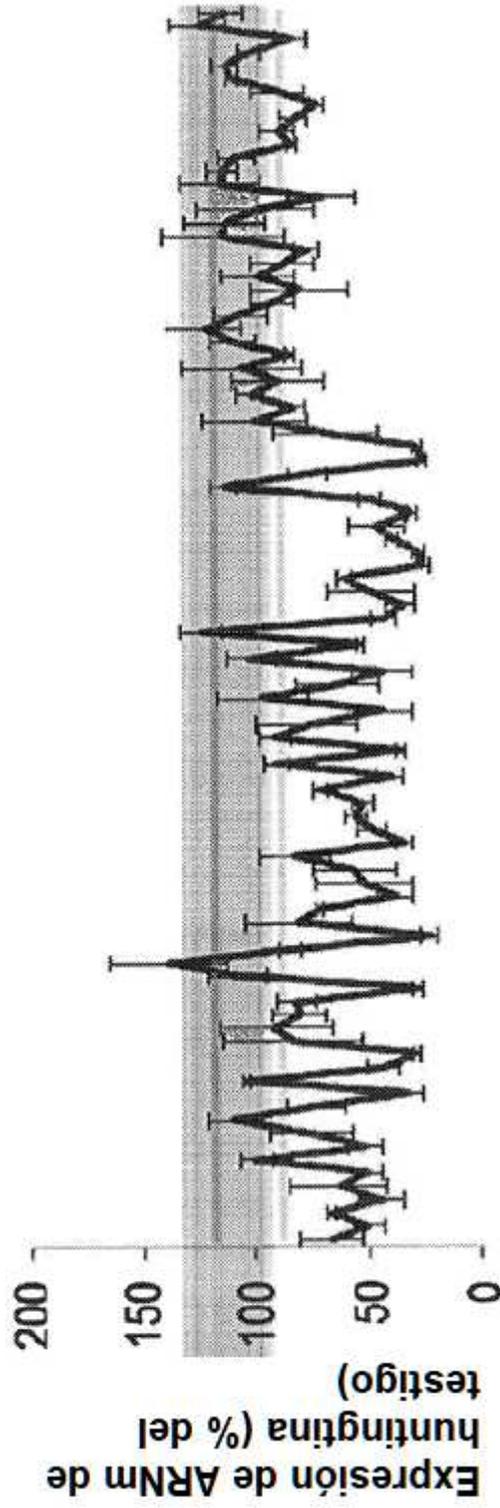
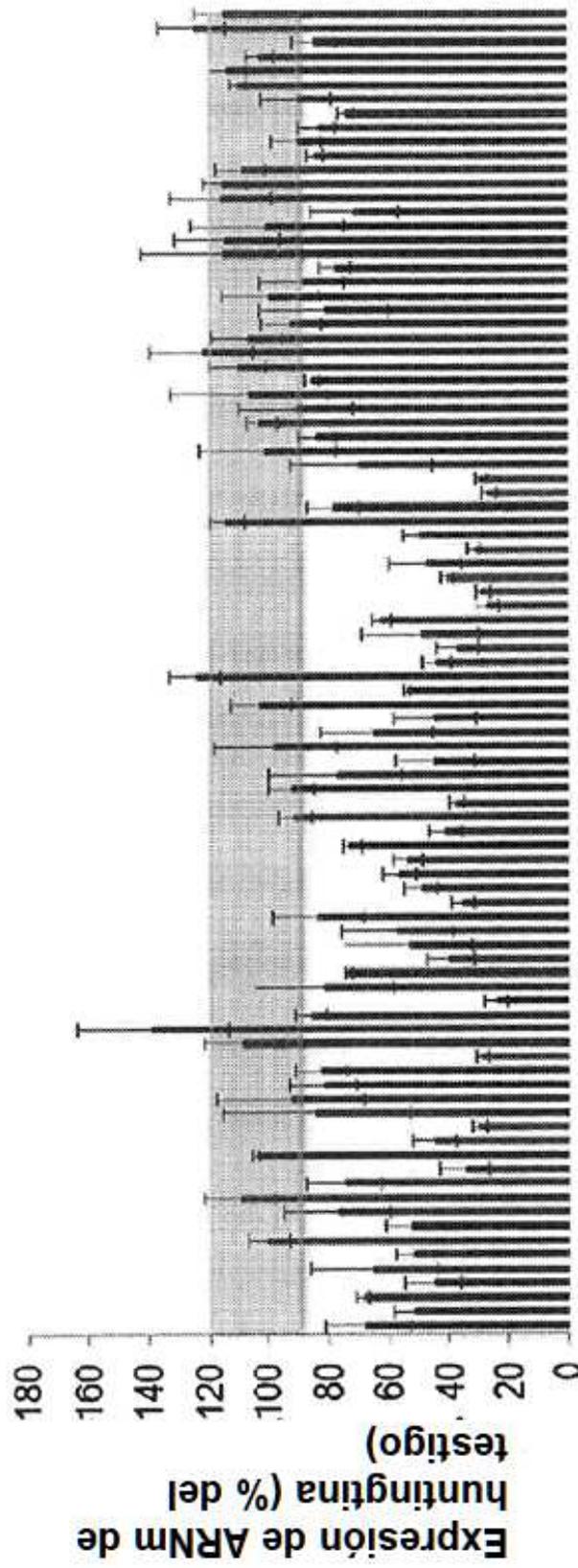


Fig. 1B



Ubicación de la secuencia diana en el gen HTT

Fig. 2A



Ubicación de la secuencia diana en el gen HTT
Fig. 2B

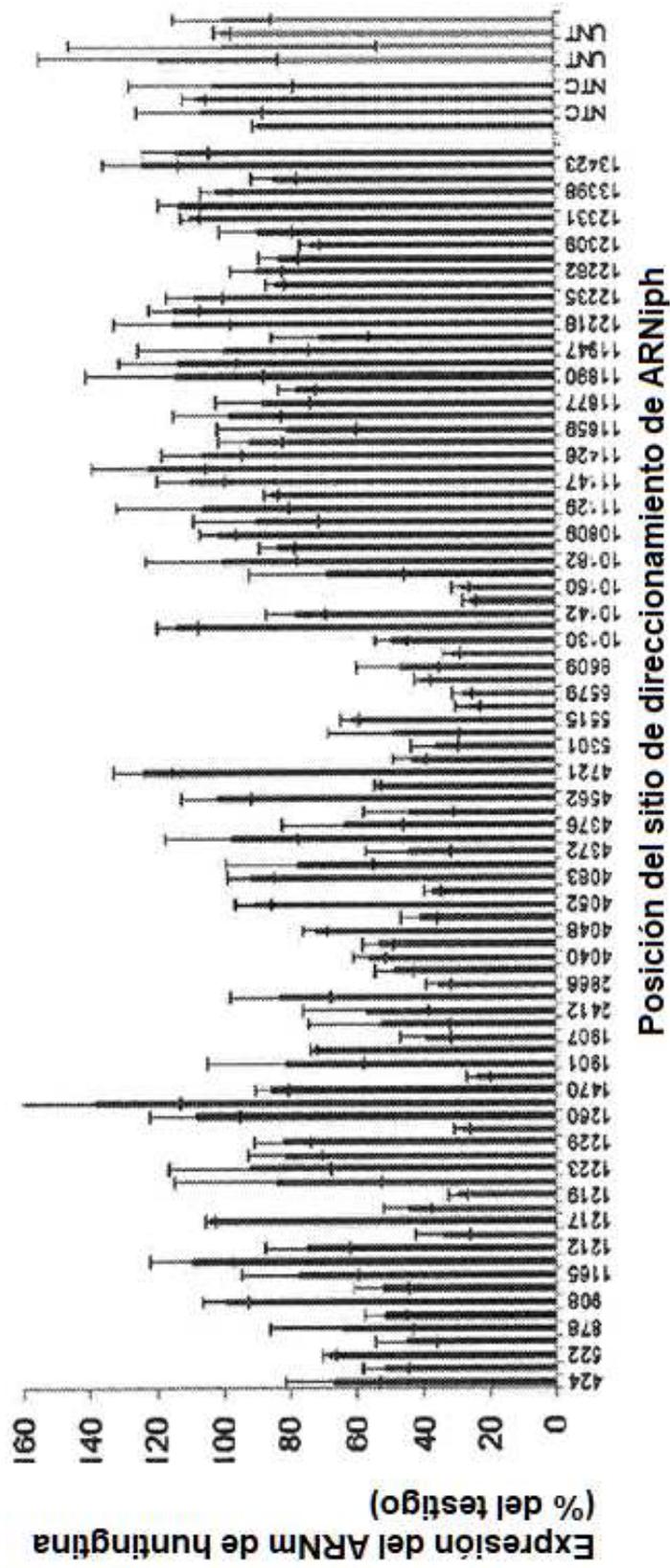


Fig. 2C

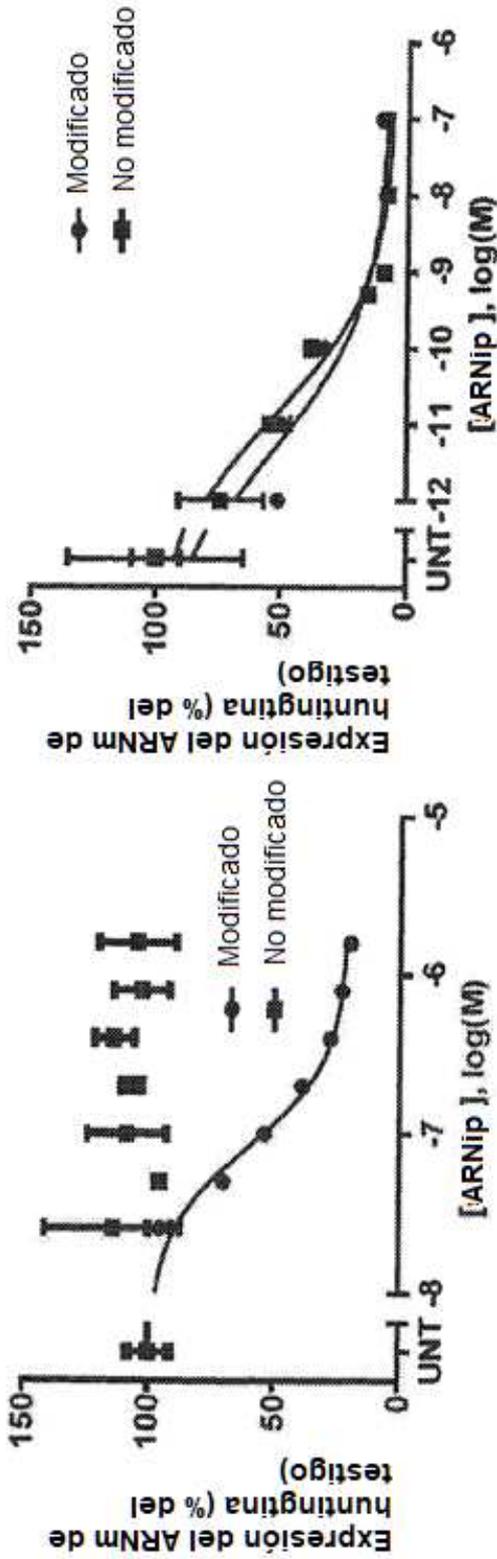


Fig. 3A

Fig. 3B

	Captación pasiva	Captación mediada por lípido
C150 de modificado	82,2 nM	4,4 pM
C150 de no modificado	N/A	13,3 pM

Fig. 3C

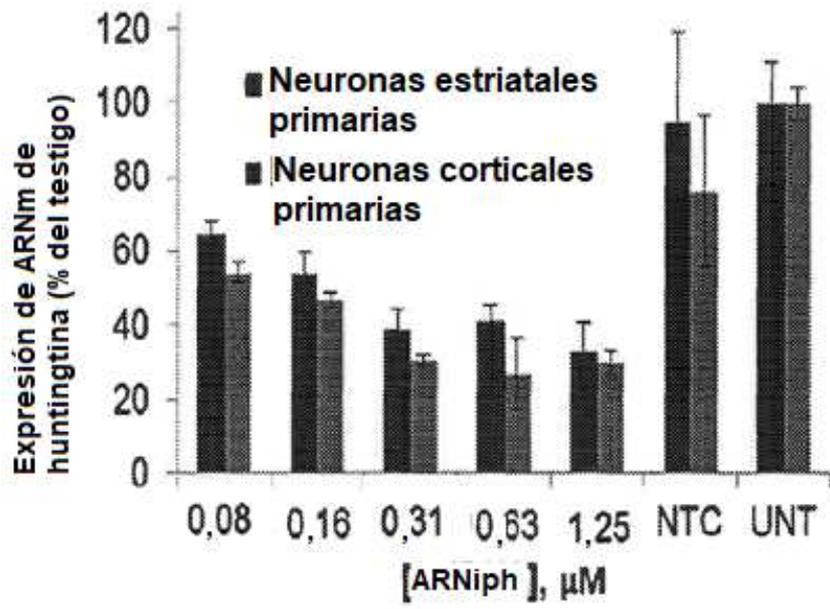


Fig. 4A

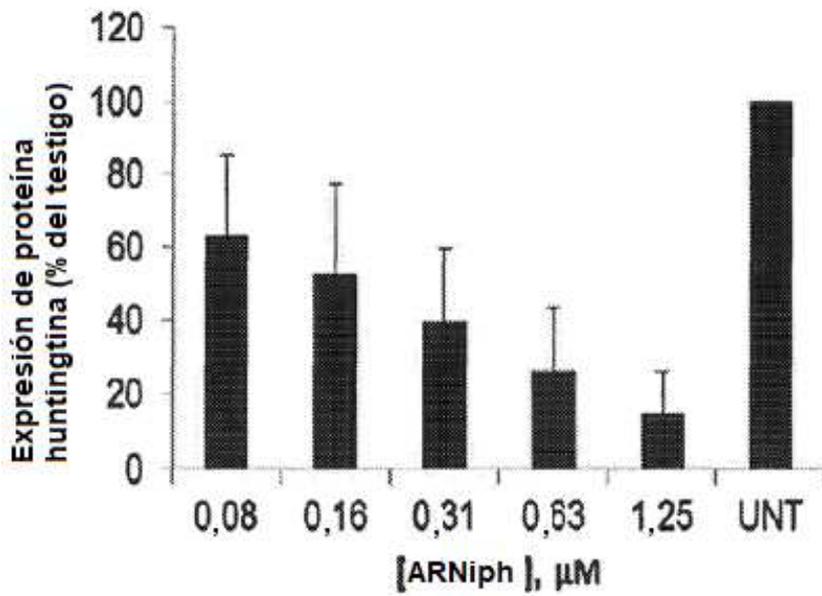


Fig. 4B

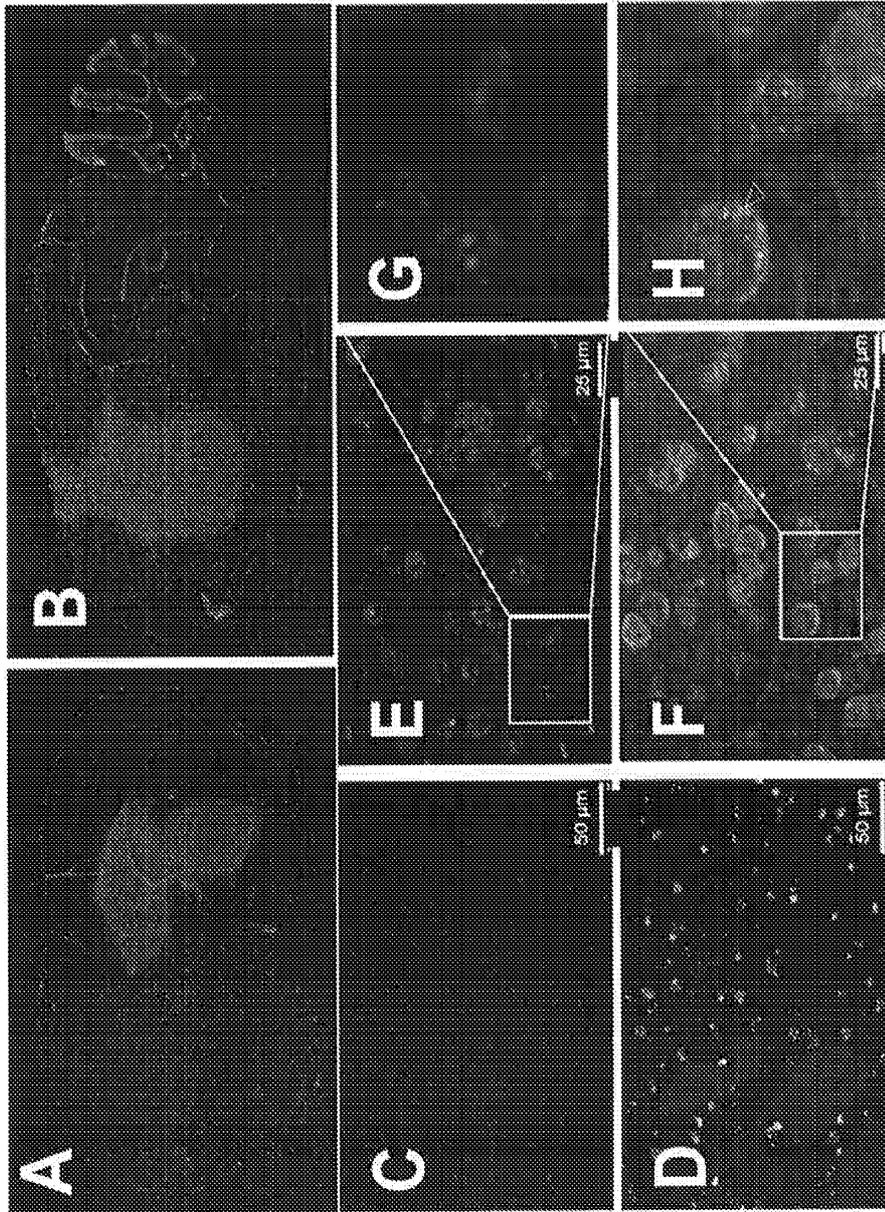


Fig. 5A-5H

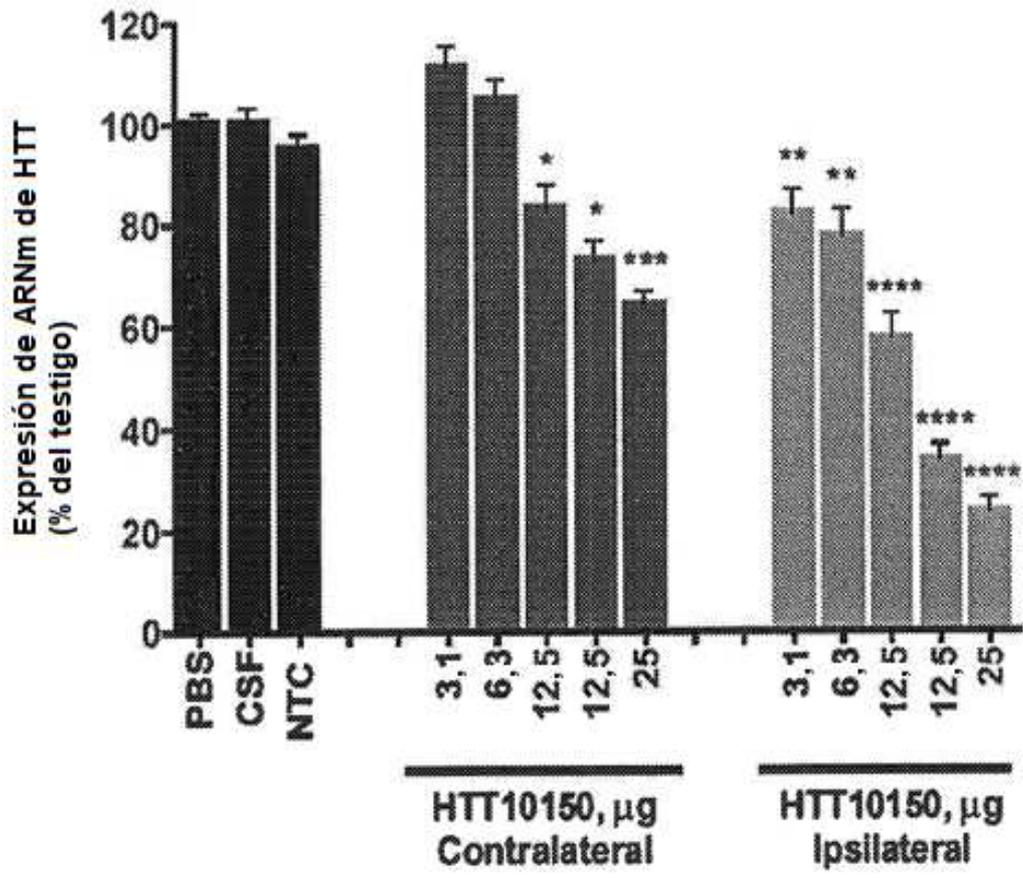


Fig. 6

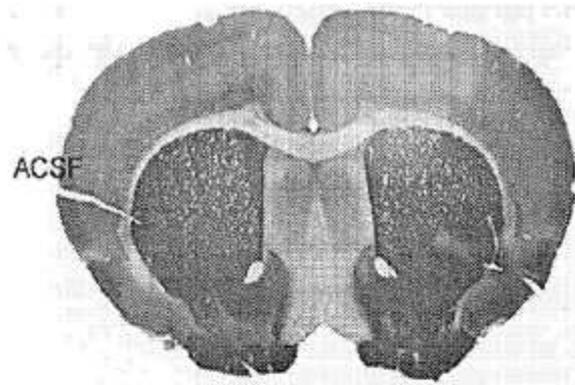


Fig. 7A

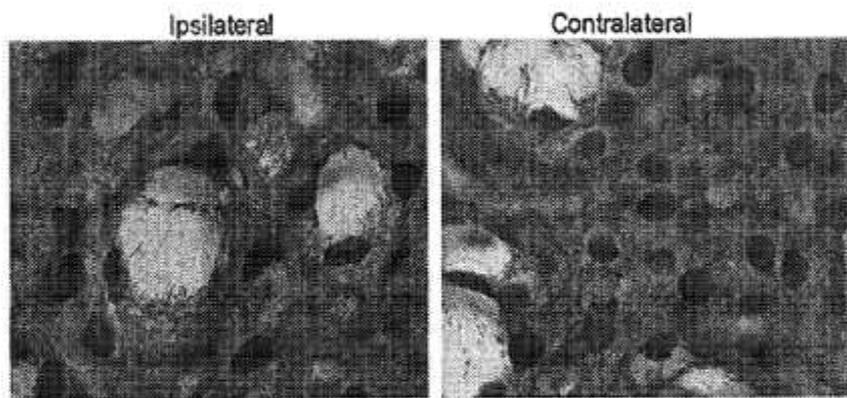


Fig. 7B

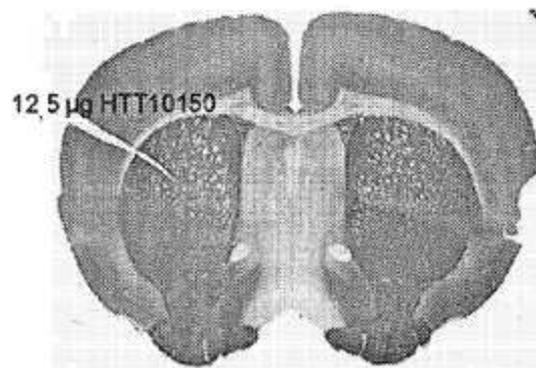


Fig. 7C

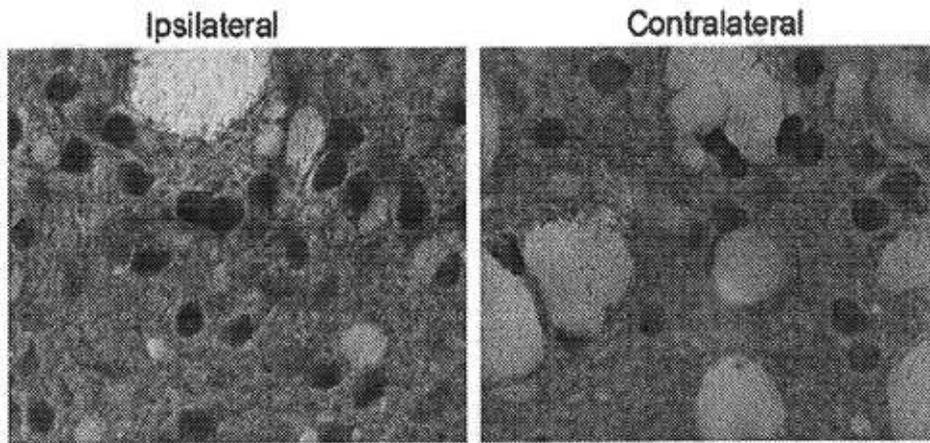


Fig. 7D

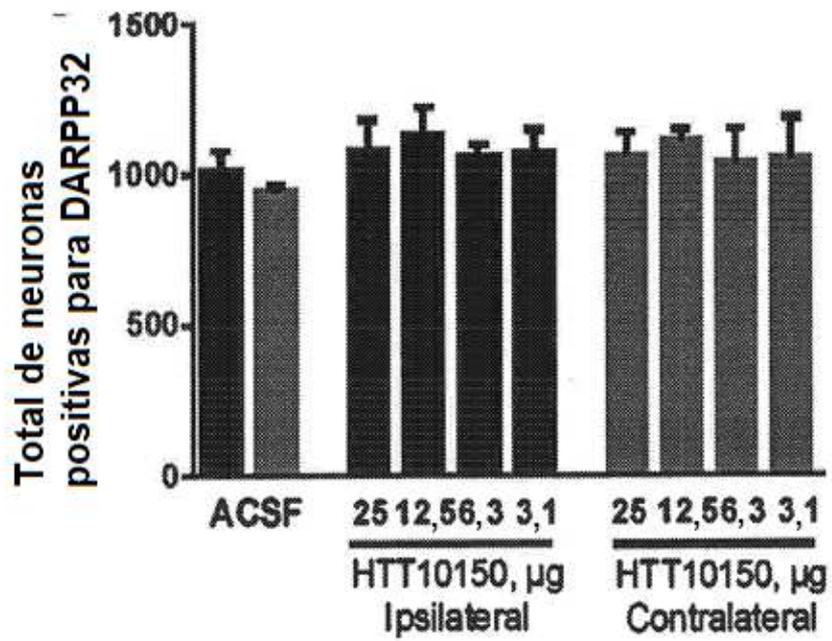


Fig. 7E

ARNiph activos			Modificaciones de cadena	
Gen	Número de acceso	Posición	Secuencia diana	Cadena de sentido
HTT	NM_002111.6	11863	GAGCUCAUUGUAAA	mG.mA.G.mC.mU.mC.A.mU.mU.A.G.mU.A.#mA#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	11890	CACGCAUUAACAUA	mC.mA.mC.G.mC.A.mU.A.mC.A.mU.#mA#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	11927	GACACAUUAUAUU	mG.mA.mC.A.mC.A.mU.mC.mU.A.#mU#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	11947	CACACACCUCUCAAG	mC.mA.mC.A.mC.A.mC.mU.mC.mU.A.#mA#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	12163	UAUCAUGUCCUAAA	mU.mA.mU.mC.A.mU.G.mU.mU.mC.mU.A.#mA#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	12218	GCAAAUGUGAUUAU	mG.mC.A.A.A.mU.G.mU.G.A.mU.A.#mA#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	12223	UGUGAUUAUUUGGU	mU.mG.mU.G.A.mU.mU.A.A.mU.mU.mU.G.#mG#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	12235	GGUUGUCAAGUUUUG	mG.mG.mU.mU.G.mU.mC.A.A.G.mU.mU.mU.#mU#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	12279	UUUCCUGCUGGUAU	mU.mU.mU.mC.mU.G.mC.mU.G.G.mU.A.#mA#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	12282	CCUGCUGGUAUAUC	mC.mC.mU.G.mC.mU.G.G.mU.A.mU.A.#mU#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	12297	GGGAAAGAUUUUAU	mG.mG.G.A.A.G.A.mU.mU.mU.A.#mA#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	12309	AAUGAAACCAGGGUA	mA.mA.mU.G.A.A.mC.mC.A.G.G.#mU#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	12313	AAACCAGGGUAGAAU	mA.mA.A.mC.mC.A.G.G.mU.A.G.A.#mA#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	12331	UUGGCAUUGCACUGA	mU.mU.G.G.mC.A.mU.G.mC.A.mC.mU.#mC#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	13136	CAGUUGUUUCUAAGA	mC.mA.G.mU.mU.G.mU.mU.mC.mU.A.#mG#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	13398	GACGAGAGAUUAUA	mG.mA.mC.G.A.G.A.mU.G.mU.A.#mU#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	13403	GAGAUUAUUUUUA	mG.mA.G.A.mU.G.mU.A.mU.mU.mU.#mU#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	13423	UAACUGCUGCAAACA	mU.mA.A.mC.mU.G.mC.mU.G.mC.A.A.#mC#mAtegChol
HTT	NM_002111.6	13428	GCUGCAAACAUIUGUA	mG.mC.mU.G.mC.A.A.mC.A.mU.mU.G.#mU#mAtegChol
NTC	N/A	N/A	ACAAAUACGAUUA	mA.mC.A.A.mU.A.mC.G.A.mU.#mU#mA#mAtegChol

Continúa en la hoja 18/136

Fig. 8 (cont.)

Gen	Número de acceso	Posición	Modificaciones de cadena	Homología			Barrido primario		CI50 (nM)	
			Cadena de antisentido	H. sapien	M. musculus	M. mulatta	Expresión de ARNm de huntingtina (% del testigo)	Captación pasiva	Captación mediada por lipido	
HTT	NM_002111.6	1207	PmU.A.U.A.A.mA.fC.fU.G.G.mA.fC.A.#mG#fC#U#G#C	si	si	si	109,5	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	1212	PmU.A.G.fU.fU.fC.A.U.A.A.mA.fC.fC.fU.#G#mA#fC#A#A	si	si	si	74,9	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	1217	PmU.A.fC.G.fU.fC.A.G.fU.fU.fC.A.U.#A#mA#fC#C#U#G	si	si	si	104,0	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	1220	PmU.G.fU.A.fC.G.fU.fC.A.G.fU.fU.fC.A.#A#mA#C	si	si	si	83,9	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	1223	PmU.G.A.fU.G.fU.A.fC.G.fU.fC.A.G.fU.fU.fC#A#U#A	si	si	si	92,2	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	1227	PmU.G.fU.A.U.G.A.fU.G.fU.A.fC.G.fU.fU.fC#A#G#U#U	si	si	si	81,4	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	1229	PmU.G.fU.G.fU.A.fU.G.A.fU.G.fU.A.#fC#G#U#fC#A#G	si	si	si	82,2	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	1260	PmU.G.fC.fU.fC.fC.G.fU.fC.A.fC.A.#fC#A#U#U#G#U	si	si	si	108,4	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	1403	PmU.fU.A.A.mG.fU.fU.fC.fC.A.fC.A.fU.#A#fC#C#U#U	si	si	si	138,5	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	1470	PmU.fC.fC.fU.A.A.mG.A.G.fC.A.fC.fU.fU.#G#fC#C#U#U	si	si	si	85,6	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	1901	PmU.A.fC.fU.G.G.fU.G.fU.fC.fC.G.fU.fU.#G#U#C	si	si	si	81,4	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	1903	PmU.A.fU.A.fC.fU.G.G.fU.fU.fC.fC.G.fU.fU.#G#U#C#G	si	si	si	72,7	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	2411	PmU.fC.A.fU.G.A.fU.fC.G.A.fU.G.fU.fU.#fC#A#A	si	si	si	53,0	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	2412	PmU.fC.fC.A.fU.G.A.fU.fC.G.A.fU.fU.#G#U#U#C#A	si	si	si	57,1	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	2865	PmU.fC.A.fU.fU.A.fU.fU.G.A.mG.fC.A.fC#U#C#G#U#U	si	si	si	83,1	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	3801	PmU.fU.fU.A.fC.fU.fU.G.fU.fU.fC.fC.A.#fC#A#G#mC#A#C	si	si	si	48,9	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	4040	PmU.G.A.fC.fU.A.A.mA.G.fC.A.G.mG.A.fU.fU.#fC#A#G	si	si	si	56,2	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	4048	PmU.fU.G.G.fU.fU.fC.fC.G.A.fC.fU.fU.#fC#A#G	si	si	si	72,2	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	4052	PmU.fU.fC.A.fU.fU.G.fU.fU.fC.fC.G.fU.fU.#A#A	si	si	si	90,8	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	4055	PmU.fC.fC.A.fU.fC.A.fU.fU.fC.fC.G.fU.fU.#fC#A#fC#U	si	si	si	37,2	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	4083	PmU.fU.fU.fC.A.fC.A.fU.fU.fU.fU.fU.#fC#A#fC#A#C	si	si	si	91,7	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	4275	PmU.G.fC.fC.fU.fC.A.fC.fC.A.fU.fU.fU.fU.#fC#U#fC#A	si	si	si	71,2	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	4372	PmU.fU.fC.fC.A.fC.G.fU.fU.fC.fU.fU.#G#U#G#A#fC#A	si	si	si	44,5	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	4374	PmU.fU.fC.fU.fC.fC.A.fC.G.fU.fU.fC.fU.fU.#G#U#G#A	si	si	si	97,5	N/A	N/A	
HTT	NM_002111.6	4376	PmU.fU.A.fU.fC.fU.fC.fC.A.fC.G.fU.fU.#fC#U#U#G#U	si	si	si	64,1	N/A	N/A	

Continúa de la hoja 12/136

Continúa en la hoja 16/136

Fig. 8 (cont.)

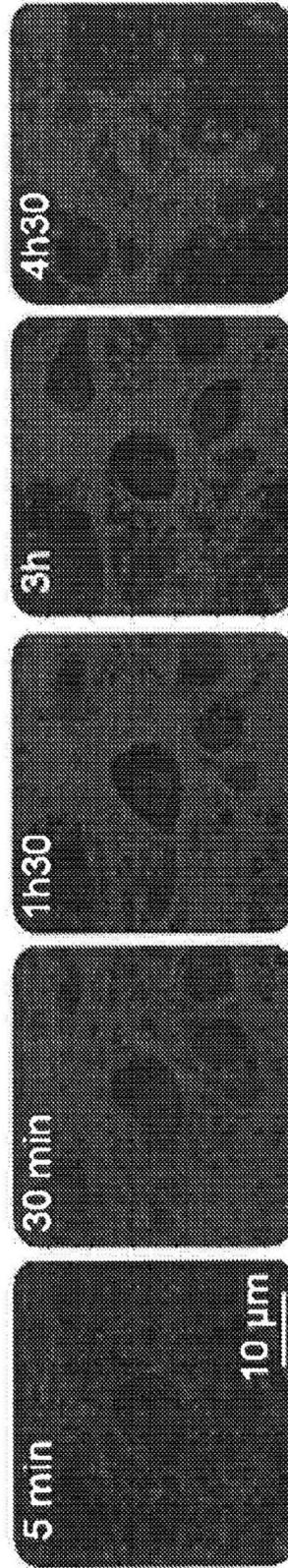


Fig. 9

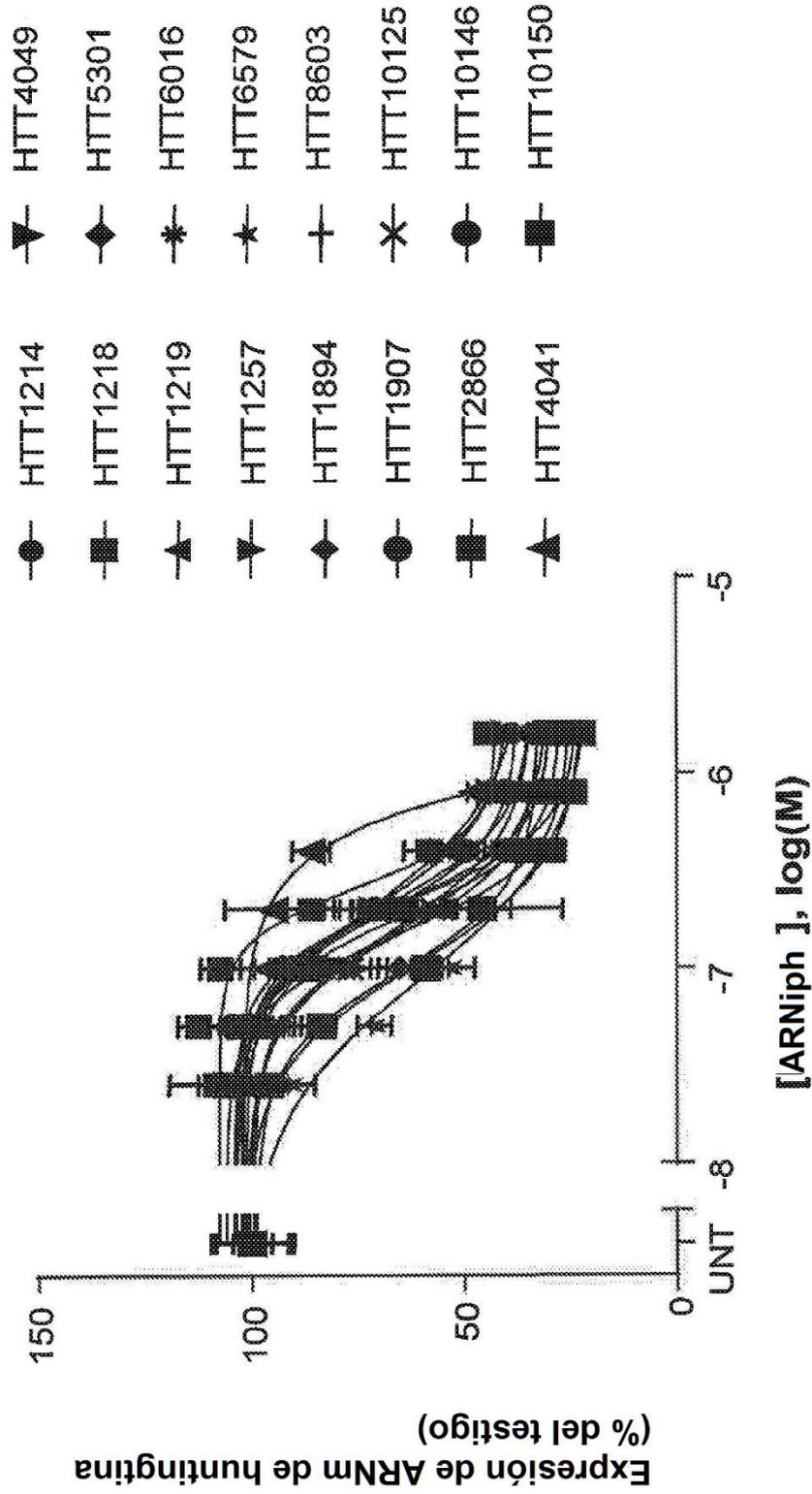


Fig. 10A

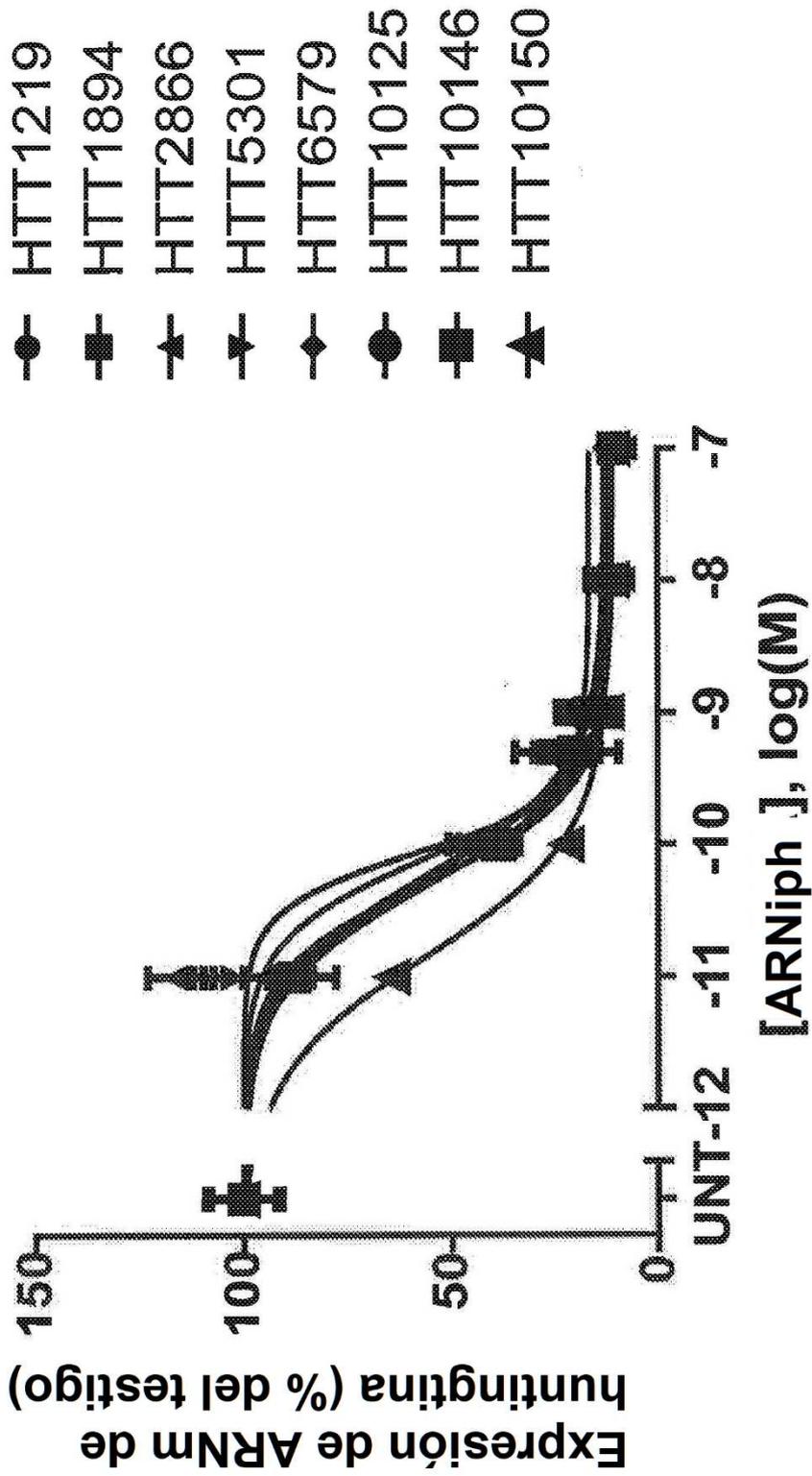


Fig. 10B

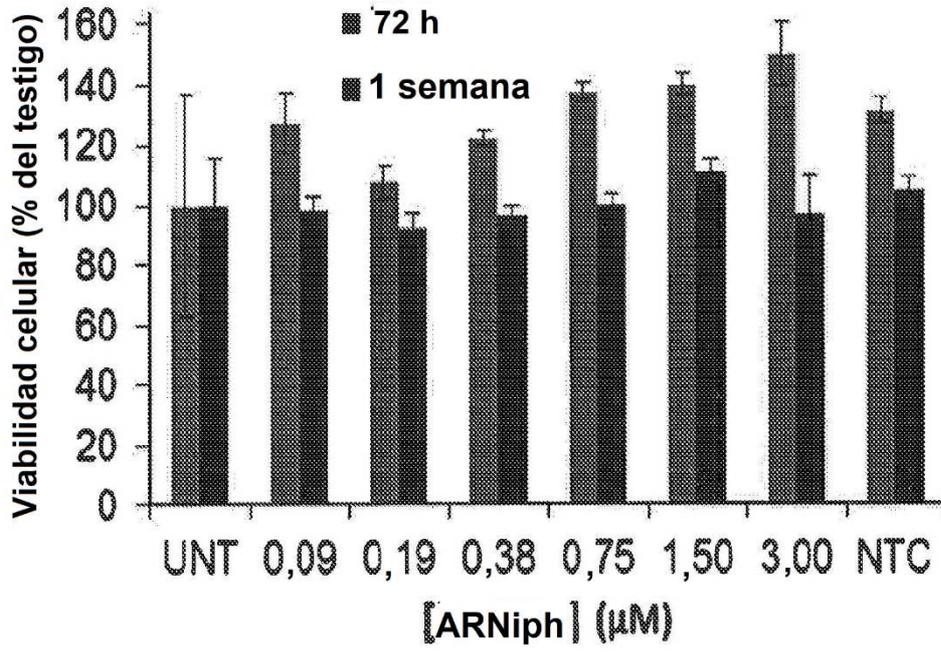


Fig. 11A

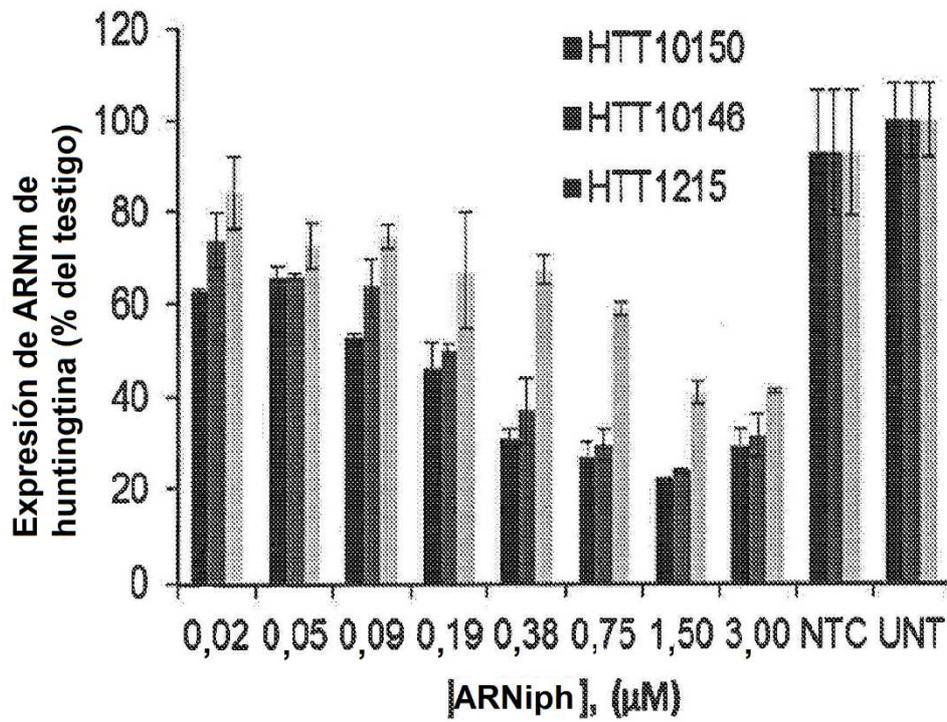


Fig. 11B

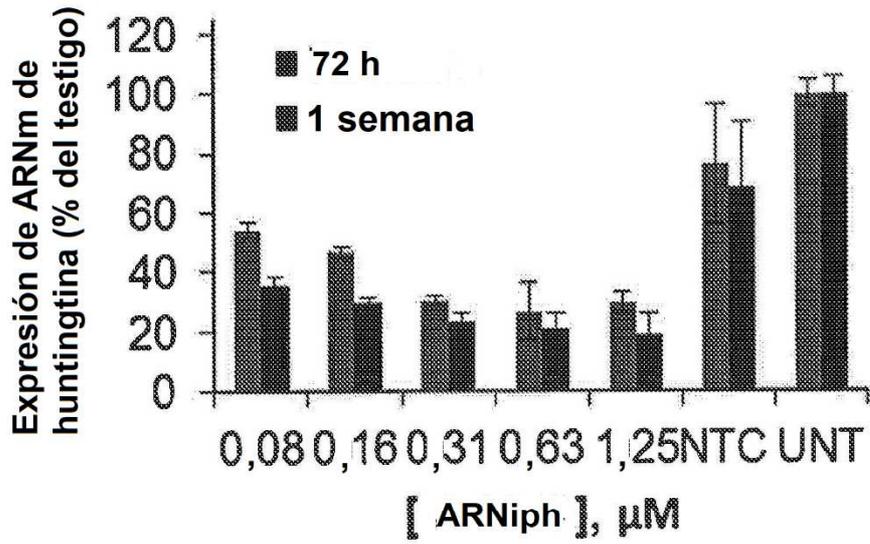


Fig. 12A

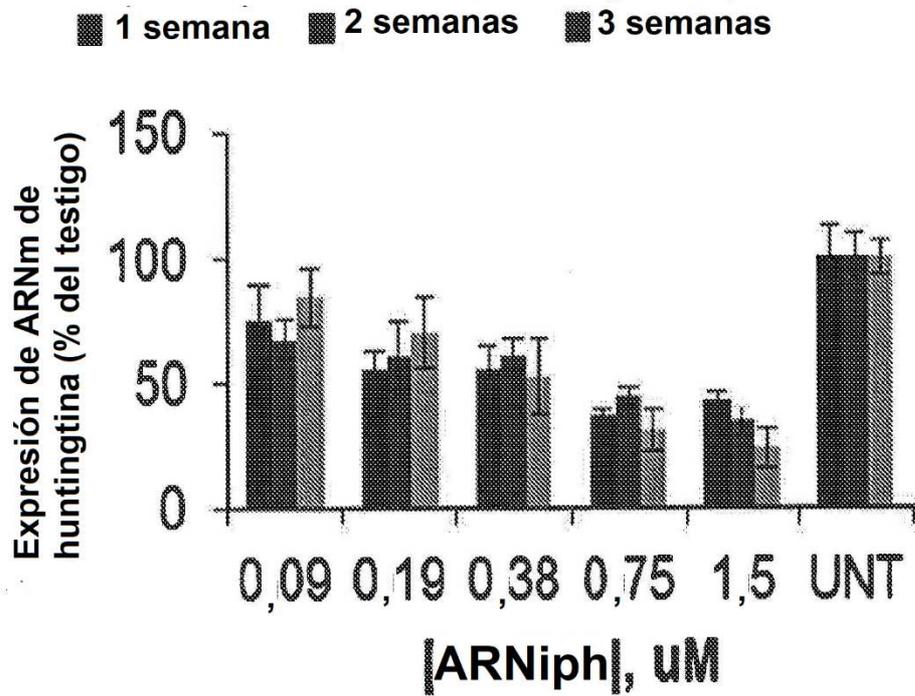


Fig. 12B

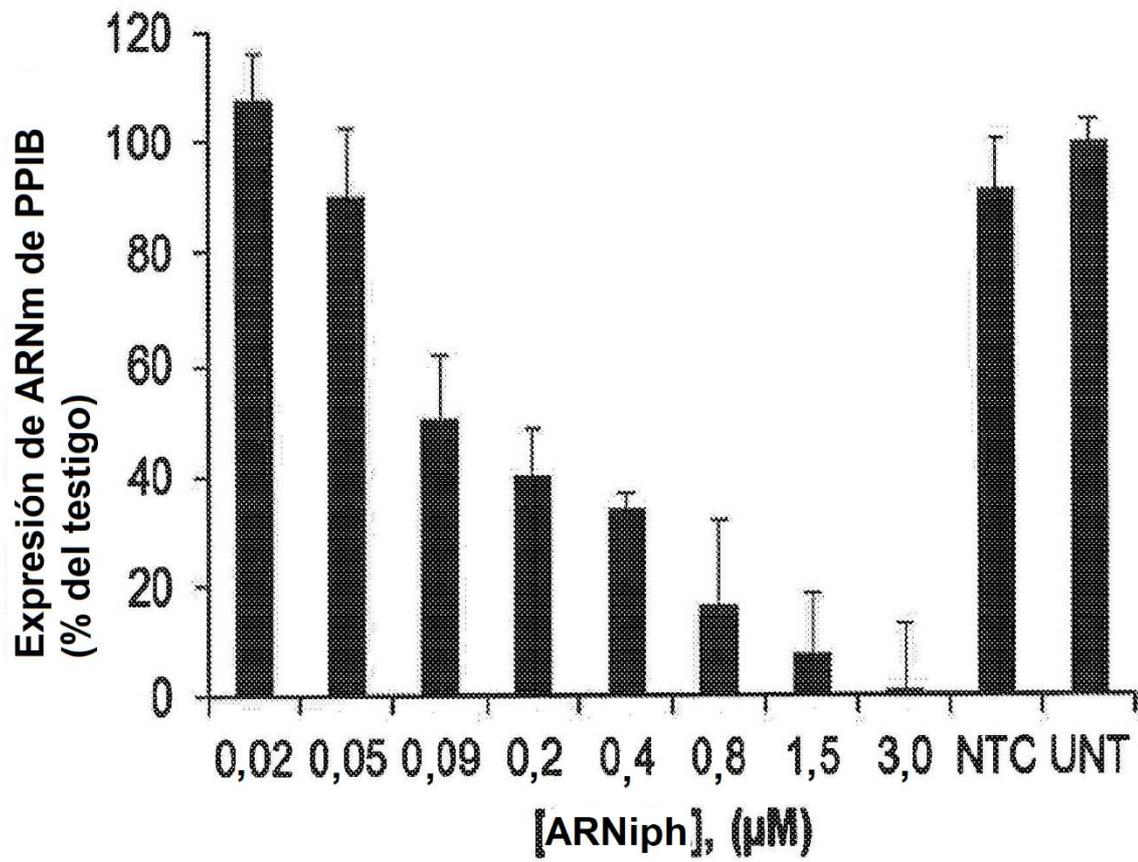


Fig. 13

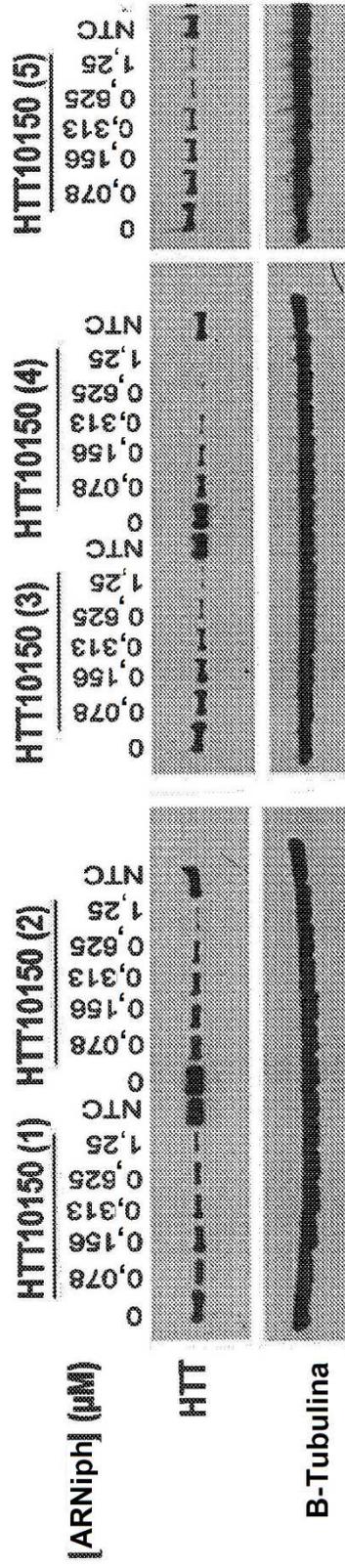


Fig. 14

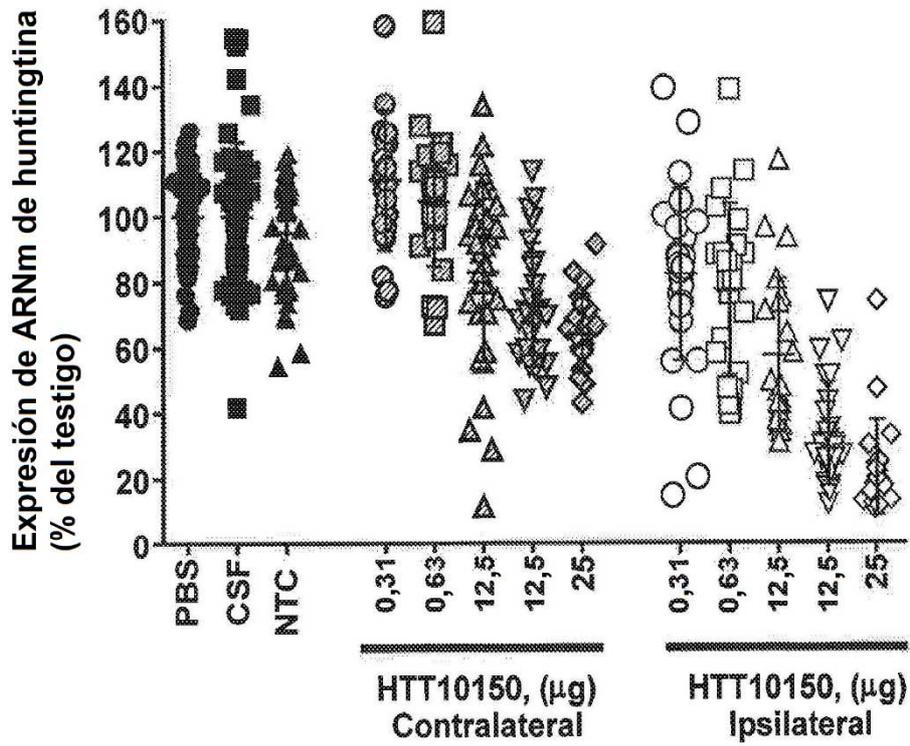


Fig. 15A

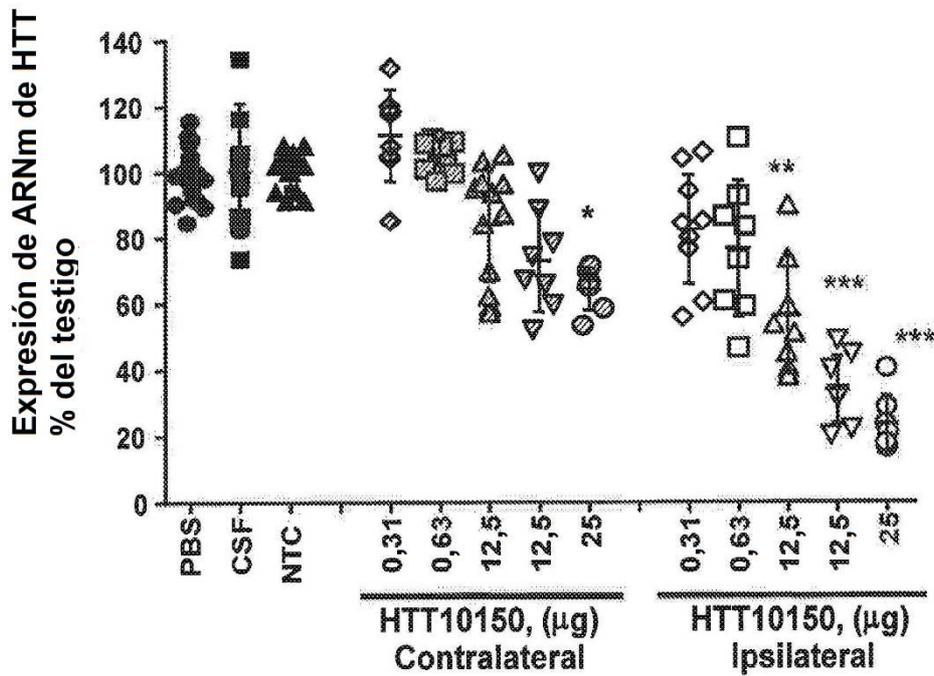


Fig. 15B

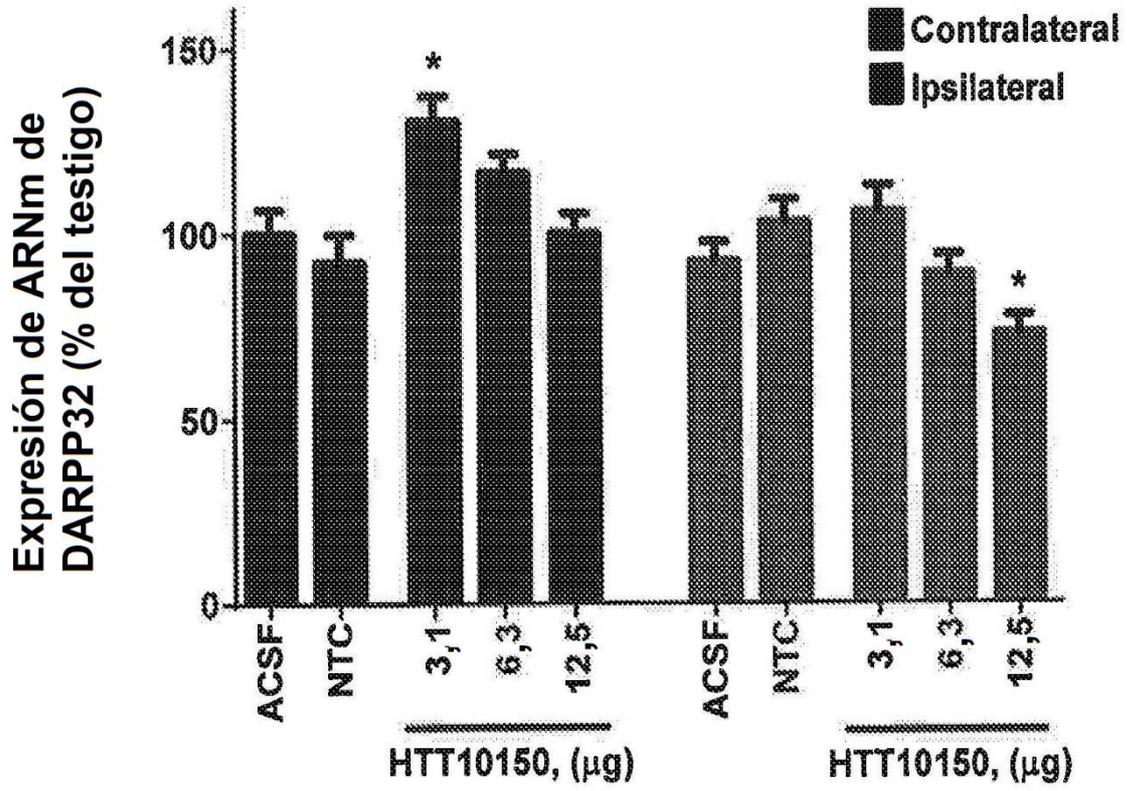


Fig. 16

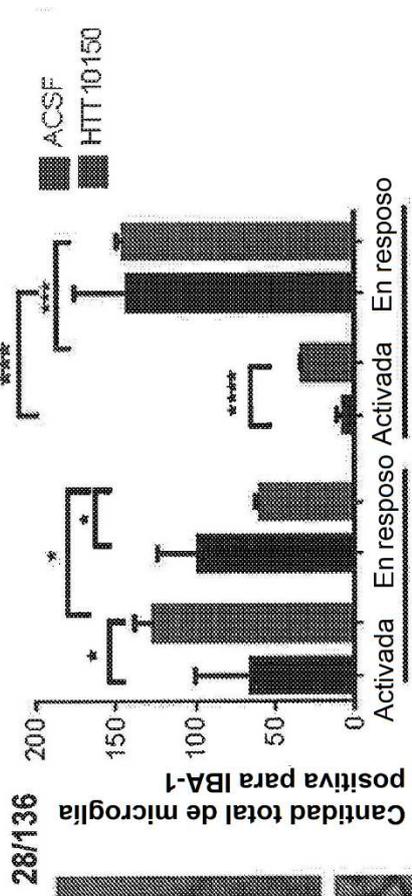


Fig. 17B

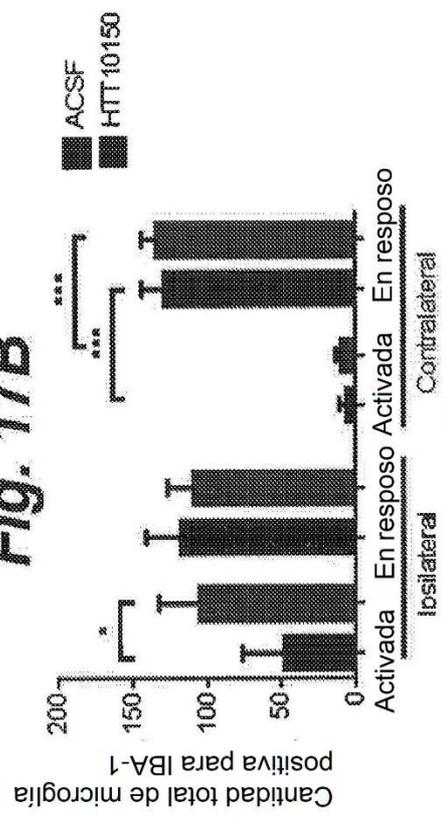


Fig. 17C

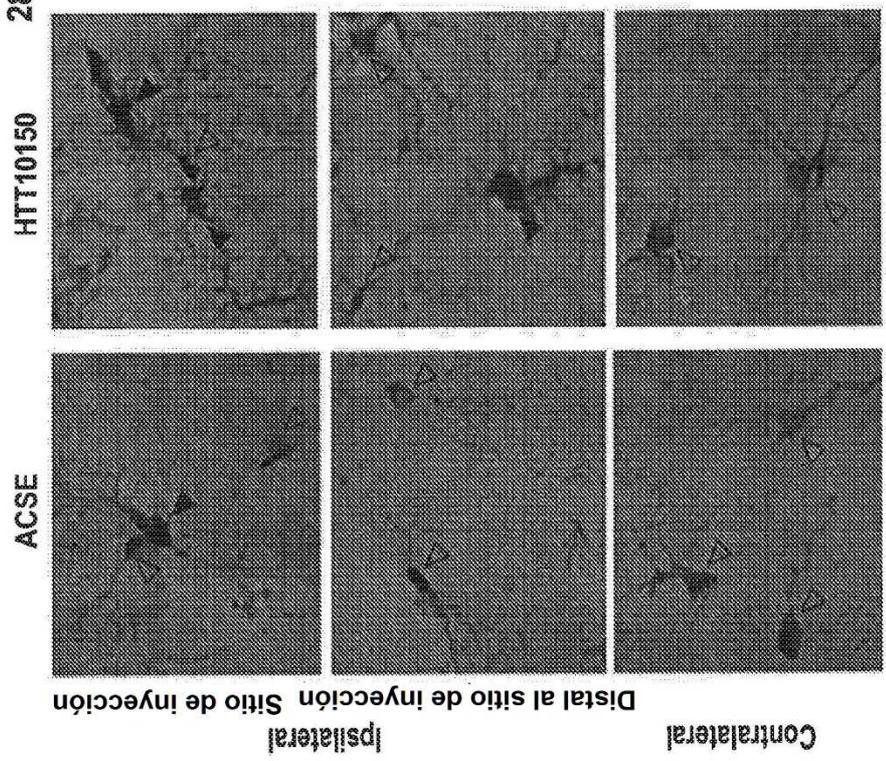


Fig. 17A

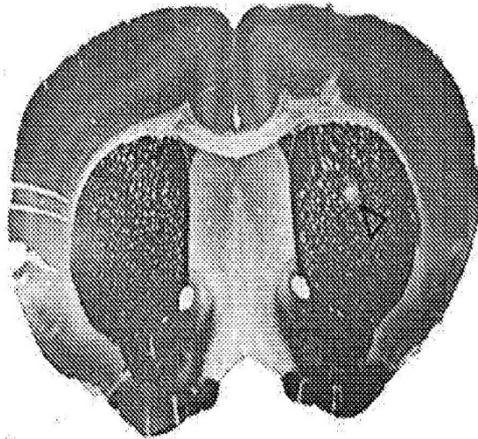


Fig. 18A

10X Sitio de la inyección

20X Sitio de la inyección

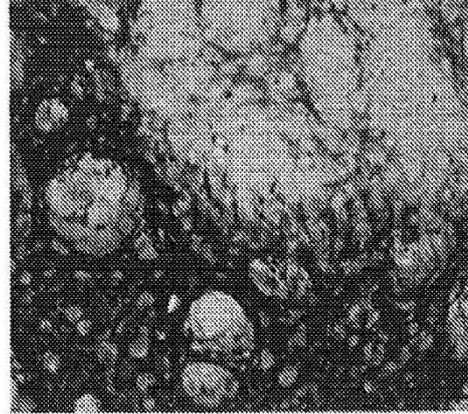
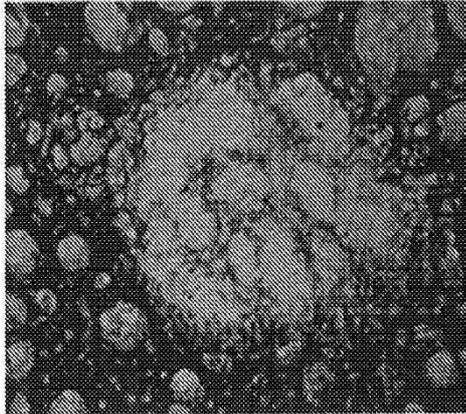


Fig. 18B

60X Lado ipsilateral

60X Lado contralateral

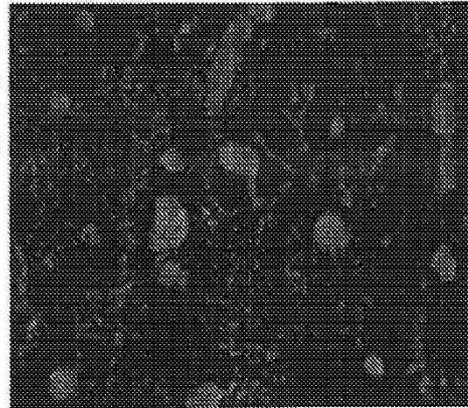
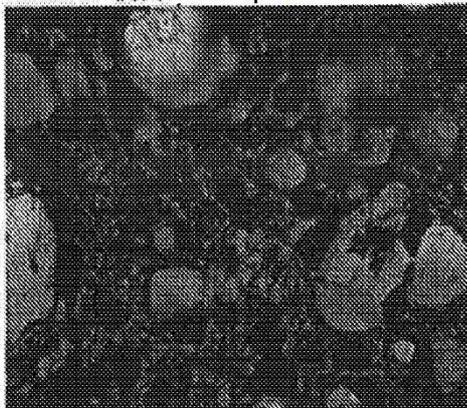


Fig. 18C

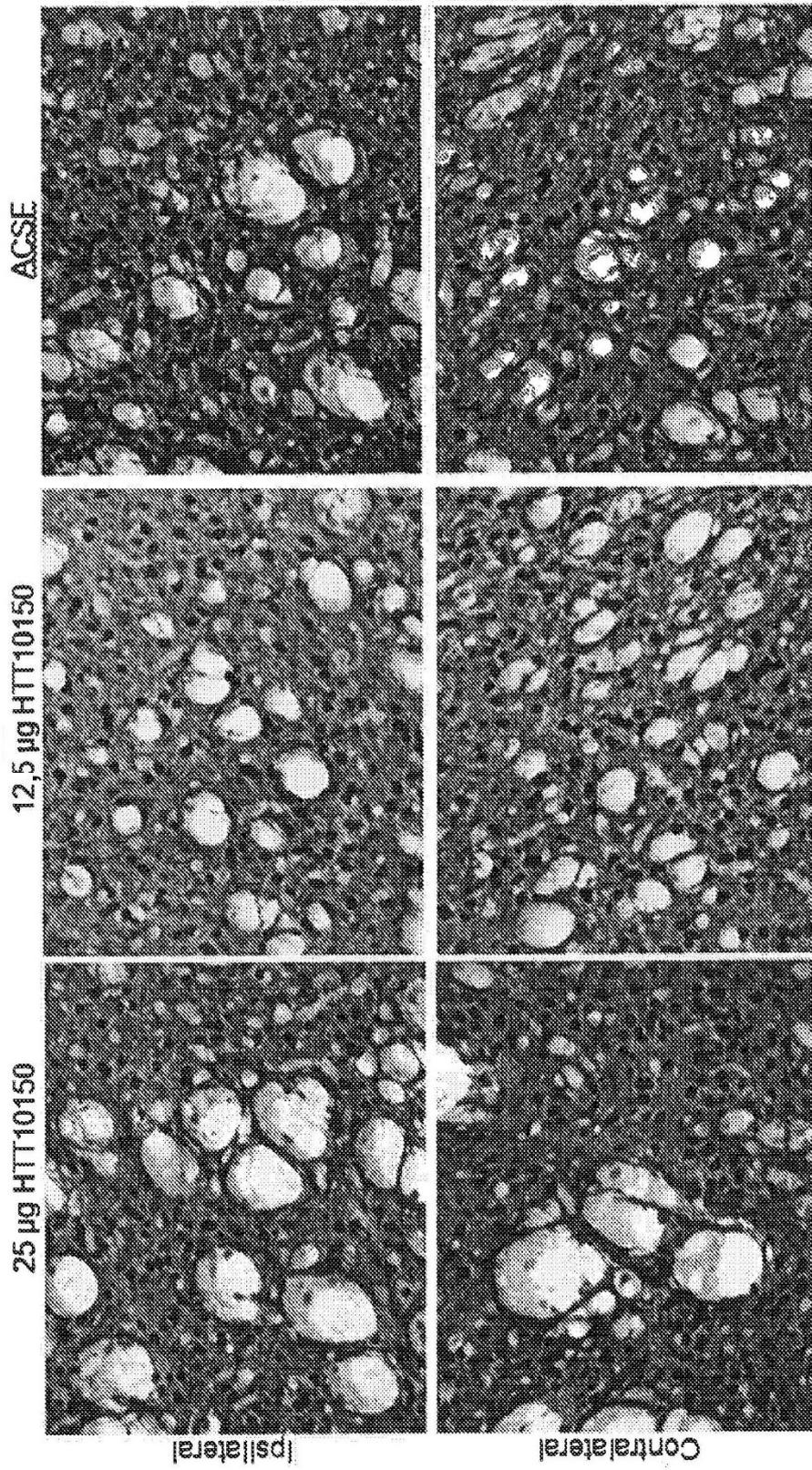


Fig. 19

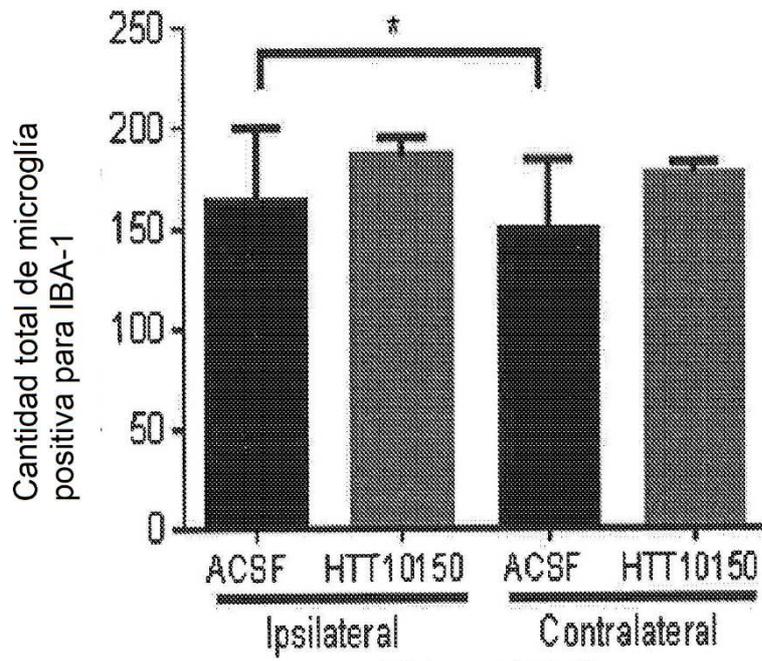


Fig. 20A

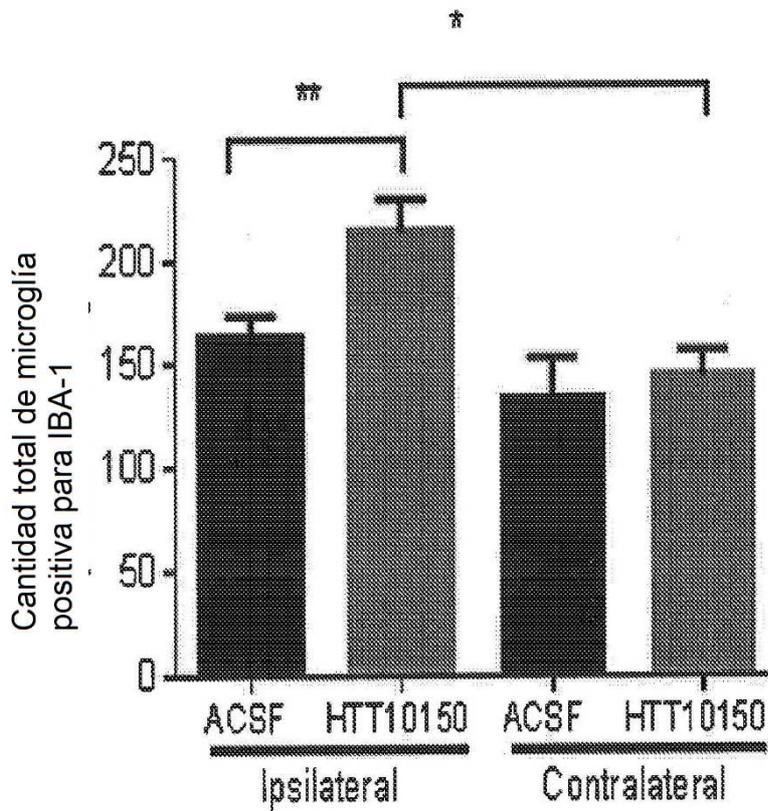


Fig. 20B

CGUGCGGG	Número de acceso	Posición	Región de direccionamiento (20 mer)	Región de direccionamiento (30 mer)
HTT	NM_002111.6	1214	GUCCAGGUUUAUGAACUGAC	AGCUUGUCCAAGGUUUAUGAACUGACGUUUA
HTT	NM_002111.6	1216	AGGUUUAUGAACUGACGUUUA	UGUCCAAGGUUUAUGAACUGACGUUUAUCA
HTT	NM_002111.6	1219	GGUUUAUGAACUGACGUUUA	GUCCAAGGUUUAUGAACUGACGUUUAUCAU
HTT	NM_002111.6	1257	ACCAACAUGUUGUGACCGGA	CCAAGACCAACAUGUUGUGACCGGACGCCU
HTT	NM_002111.6	1894	UGUUAUGACCGUAACCGACA	GAAAUUGUUAUGACCGUAACCGACAACCA
HTT	NM_002111.6	1907	ACCGACAACCAUAUUUGGG	ACGGUAACCGACAACCAUAUUUGGGCCU
HTT	NM_002111.6	2666	ACGAGUGCUCAUAUUGLUG	CAAGAAACGAGUGCUCAUAUUGLUGUAC
HTT	NM_002111.6	4041	UGAAAUCUGCUUUAUGCGA	AUACUGAAAUCCUGCUUUAUGCGAGAAC
HTT	NM_002111.6	4049	UGCUUUAUGCGAAACCAU	AUCCUGCUUUAUGCGAAACCAUUGG
HTT	NM_002111.6	5301	GGGACGUAUCUCAAACGUA	AGUUGGGACGUAUCUCAAACGUAAGAA
HTT	NM_002111.6	6016	GGCAAUUCAGUCUGGUUG	AUCCAGGCAAUUCAGUCUGGUUGAAAC
HTT	NM_002111.6	6579	GCUGCUAGCUGCAUGCUUA	CCUAGCCUGCUAGCUGCAUGCUUAGCCU
HTT	NM_002111.6	8603	GCCACUGCGUGAACAUUCA	GGUUGCCACUGCGUGAACAUUCAAGCC
HTT	NM_002111.6	10125	UUCUUCUCAAGAUUUAUAU	CUUUUUUCUCAAGAUUUAUAUUAU
HTT	NM_002111.6	10146	UAUUAUAUCAUAAGAGA	AAAUUAUAUUAUCAUAAGAGAUUAU
HTT	NM_002111.6	10150	UAUUAUCAUAAGAGAUUA	UUAUUAUAUCAUAAGAGAUUAUUUA
HTT	NM_002111.6	424	ACUUAUCAUCAAAGAAAG	AAAGAAACUUAUCAUCAAAGAAAGCCGU
HTT	NM_002111.6	456	AUUGUGACAAUAUGUGAA	GAAUCAUUGUGACAAUAUGUGAAACA
HTT	NM_002111.6	522	UUCUGGGCAUCGCUAUGGA	
HTT	NM_002111.6	527	GGCUCGCUAUGGAAAUUUU	UUCUGGGCAUCGCUAUGGAAAUUUUCUG
HTT	NM_002111.6	878	GCAAAUGACAUAUAAUUA	AUUUUGCAAAUGACAUAUAAUUAAGUUU
HTT	NM_002111.6	879	CAAAUGACAUAUAAUUAAG	UUUUGCAAAUGACAUAUAAUUAAGUUUU
HTT	NM_002111.6	908	AAAGCCUUAUAGCGAACCU	UGUUAUAAAGCCUUAUAGCGAACCUUUA
HTT	NM_002111.6	1024	ACUAAUUGUCUUAUAGCCU	UGGCUAUAUUGUCUUAUAGCCUUAUC
HTT	NM_002111.6	1185	CGGAGUGACAAGAAAGAAA	AGUUCCGAGUGACAAGAAAGAAUUGGA
HTT	NM_002111.6	1207	GCAACUUGUCCAAGGUUUAUG	GCAAGCAGCUGUCCAAGGUUUAUGAACUG
HTT	NM_002111.6	1212	UUGUCCAAGGUUUAUGAACUG	GCAGCUUGUCCAAGGUUUAUGAACUGU
HTT	NM_002111.6	1217	CAGGUUUAUGAACUGACGUU	UUGUCCAAGGUUUAUGAACUGACGUUA
HTT	NM_002111.6	1220	GUUUAUGAACUGACGUUUA	UCCAGGUUUAUGAACUGACGUUUAUCA
HTT	NM_002111.6	1223	UAUGAACUGACGUUUAUCA	AGGUUUAUGAACUGACGUUUAUCAUCA
HTT	NM_002111.6	1227	AAUGACGUUUAUCAUCA	UUAUGAACUGACGUUUAUCAUCAACAGCA
HTT	NM_002111.6	1229	CUGACGUUUAUCAUCA	AUGAACUGACGUUUAUCAUCAACAGCAC
HTT	NM_002111.6	1260	ACAAUGUUGUGACCGGACCC	AGACCAACAUGUUGUGACCGGACCCUUGA
HTT	NM_002111.6	1403	GGGAGUAUUGUGGAAAUUAU	GUAUGGGAGUAUUGUGGAAAUUAUAGCUG
HTT	NM_002111.6	1470	AAAGCAAAGUGCUUUAUGA	ACAAAAGCAAAGUGCUUUAUGGAAAGA
HTT	NM_002111.6	1901	GACGGUACCGACAACCAUA	UGUUAACGGUACCGACAACCAUAUUUG
HTT	NM_002111.6	1903	CGGUAACCGACAACCAUAU	UUAACCGUACCGACAACCAUAUUUGGG
HTT	NM_002111.6	2411	UUGAACUAUCAUGAUUGG	ACAUUUGAACUAUCAUGAUUGGAGACC
HTT	NM_002111.6	2412	UGAACUAUCAUGAUUGGA	CAUUCUUGAACUAUCAUGAUUGGACCC
HTT	NM_002111.6	2865	AACGAGUGCUCAUAUUGU	GCAAGAAACGAGUGCUCAUAUUGUUGAU
HTT	NM_002111.6	3801	GUCCUGUUAACAACAUAUA	CUAGGUCUUGUUAACAACAUAUAUCCUC
HTT	NM_002111.6	4040	CUGAAAUCCUGCUUUAUGCG	GAAUCCUGAAAUCCUGCUUUAUGCGAAGC
HTT	NM_002111.6	4048	CUGCUUUAUGCGAAACCA	AAAUCCUGCUUUAUGCGAAACCAUUGG
HTT	NM_002111.6	4052	UUUAUGCGAACAACAUGAU	CCUGCUUUAUGCGAACAACAUGAUGGCA
HTT	NM_002111.6	4055	AGUGGAAACAACAUGAUGG	GCUUUAUGCGAACAACAUGAUGGCAACUG
HTT	NM_002111.6	4083	GUGUACAACAUAUGUGAAG	UGUUUGUGUACAACAUAUGUGAAGACUCU
HTT	NM_002111.6	4275	UGAGGAAACUUGGUGACGGG	CAGCCUGAGGAAACUUGGUGACGGCGGCA
HTT	NM_002111.6	4372	UGUCAACAAGAACCGUGCAG	ACBAGUGUCAACAAGAACCGUGCAGUAAG
HTT	NM_002111.6	4374	UCAACAAGAACCGUGCAGAU	GAGUGUCAACAAGAACCGUGCAGUAAGAA

Fig. 21

HTT	NM_002111.8	4378	ACAAA GAACCGUGCA GAUAA	GUUKCAAAA GAACCGUGCA GAUAA GAUUG
HTT	NM_002111.8	4425	UUGAACCCUUGUUAUAAA	UUUGUUUGAACCCUUGUUAUAAA GCUUU
HTT	NM_002111.8	4582	UUUAUUGGCUUUGUAUUGA	AGGUGUUUAUUGGCUUUGUAUUGAAA CAU
HTT	NM_002111.8	4692	UCAUUGGAAUUGGUAUAAUUG	ACAGAUCUUGGAAUUGGUAUAAA UCAUUGA
HTT	NM_002111.8	4721	UGUGAUGGCAUCAUGGCCAG	AGUCUUGUAUUGGCAUCAUGGCCAGUGGAA
HTT	NM_002111.8	5200	GAUUUUGCAUCAACUGAAAG	GUUCUGAUUUUGCAUCAACUGAA GAUUAU
HTT	NM_002111.8	5443	GAGUGAGCA GCAACAUAUCU	GAAAUGAGUGAGCA GCAACAUAUCUUUCUUAU
HTT	NM_002111.8	5515	GUUGGAAUUGUUGGAGAA	UUCAGUUGGAAUUGUUGGAGAAUUCACA
HTT	NM_002111.8	8609	UGGUGAACA UUGACAGCCA	CCCAUUGGUGAACA UUGACAGCCA GCGC
HTT	NM_002111.8	10130	CUCAGAUUUA AAAUUUAU	UUUCUUCAGGAUUUA AAAUUUAUUAUUAU
HTT	NM_002111.8	10134	GGAUUAAA AUUUAUUAUA	UUCAGGAUUUA AAAUUUAUUAUUAUUCAGU
HTT	NM_002111.8	10142	AAUUUAUUAUUAUCA GUAAA	UUUUA AAAUUUAUUAUUAUCA GUAAA GAUUAU
HTT	NM_002111.8	10180	AUUUAACGUUACUUCUUCU	GAUUAUUUAACGUUACUUCUUCUUGCC
HTT	NM_002111.8	10182	UCUUUUAUGCCUGUGAAA	GUUAUCUUUUAUGCCUGUGAAAUGUUG
HTT	NM_002111.8	10186	UCUAUGCCUGUAAGUAU	CUCUUCUAUGCCUGUAAGUAUUGUUA
HTT	NM_002111.8	10809	CUUUUAUGCAGGAGAGUGCA	GACCCUUUAUGCAGGAGAGUGCAUUCU
HTT	NM_002111.8	11118	UGUUUGGUAUUGAAUUGUG	GUUGAUGUUUGGUAUUGAAUUGUGUAUUG
HTT	NM_002111.8	11129	GAAUGUGGUAUGGAGGAA	GUUAUGAUGUGGUAUGGAGGAAAUUGUU
HTT	NM_002111.8	11134	UGGUAAGUGGAGGAAUUGUU	GAAUGUGGUAAGUGGAGGAAUUGUUGGAAUUG
HTT	NM_002111.8	11147	AAAUGUGGAAUCUCUGUGCA	GGAGGAAUUGUGGAAUCUCUGUGCAGUGG
HTT	NM_002111.8	11412	AUGUUGAGGAGGCCUUA	GUCCGAUUGUUGAGGAGGCCUUAUGGAA
HTT	NM_002111.8	11426	CCUUAAGGAGCUUAUCUUA	GAGGCCUUAAGGAGCUUAUCUUAUUAUA
HTT	NM_002111.8	11443	GAAUUAUAACAUGUAAGA	CUAUGAUAUAACAUGUAAGAUAUCAUC
HTT	NM_002111.8	11859	AUGUUAUCAUUGUUAAGAA	GUUAUGAUUAUCAUUGUUAAGAAUAUAACA
HTT	NM_002111.8	11866	CALUUGUAAGAUAUAACAUCU	GUUAUCALUUGUAAGAUAUAACAUCUGUUA
HTT	NM_002111.8	11877	AUAUAACAUGUGAAUUGUA	UAAGAUAUAACAUGUGAAUUGUAUAACAUGA
HTT	NM_002111.8	11883	AUAUUGAUCUUAUUAUUA	AGAUGAUAUUGAUCUUAUUAUUAUAUAUA
HTT	NM_002111.8	11890	UCACCAGCAUAUAUAUA	UGAUCUCAUCAUCAUAUAUAUAUAUAUAUA
HTT	NM_002111.8	11927	AUAUAGACAUUAUAUAU	UGUGCAUAUAAGACAUUAUAUAUUAUAUA
HTT	NM_002111.8	11947	UAACAACAACAUCUUAAG	UAUAUUUAACAACAACAUCUUAAGUGGAA
HTT	NM_002111.8	12183	GACUUAUCAUGUUCUUA	AGGAAAGACUUAUCAUGUUCUUAUAUAU
HTT	NM_002111.8	12218	UUGUUGCAAUUGUUAUAU	AAAUUUUGUUGCAAUUGUUAUAUAUUGGU
HTT	NM_002111.8	12223	GCAAUUGUAUAUAUUGGU	UUGUUGCAAUUGUUAUAUAUUGGUUGUCA
HTT	NM_002111.8	12235	AAUUGUUGUUAUAUUGGU	UGAUAUAUUGGUUGUUAUAUAUUGGUUGGU
HTT	NM_002111.8	12279	UUUGUUAUCUGUGGUAU	UUUGUUUGUUUUCUGUGGUAUAUAUUGG
HTT	NM_002111.8	12282	GUUUUGUGUGGUAUAUUG	CUUUUGUUUUGUGUGGUAUAUAUUGGGA
HTT	NM_002111.8	12297	AUAUCGGAAAGAUUAUAU	UGGUAUAUCGGAAAGAUUAUAUUGGAAAG
HTT	NM_002111.8	12309	AUUUAUUGAAACCAUGGUA	GAAA GAUUUAUAUGAAACCAUGGUAUAUAU
HTT	NM_002111.8	12313	UAUUGAAACCAUGGUAUAU	GAUUUAUAUGAAACCAUGGUAUAUAUUGUU
HTT	NM_002111.8	12331	AUUUGUUGGCAUUGCAUGA	GUUAUAUUUGUUGGCAUUGCAUGAUAUGGU
HTT	NM_002111.8	13138	CCCUCAUGUUGUUAUAUA	GCUCUCCCUCAUGUUGUUAUAUAUGGCAUA
HTT	NM_002111.8	13388	GGAUGAGAGAGAUUGUAUA	GGGAAUGGAGAGAGAUUGUAUAUUAUAUA
HTT	NM_002111.8	13403	GACGAGAGAUUAUAUAUA	GGACUGAGAGAGAUUGUAUAUUAUAUAUA
HTT	NM_002111.8	13423	UUUUUAUCUGUGCAACA	UUUAUAUUUUUAUCUGUGCAACAUAUUAUA
HTT	NM_002111.8	13428	UAUCUGUGCAACAUAUGUA	UUUUUAUAUCUGUGCAACAUAUUGUAUAUA
HTT	NM_002111.8	152	ACCUUGGAAAACUGUUGAA	UGGCGAACCUUGGAAAACUGUUGAAUGCCU
HTT	NM_002111.8	170	AAAGCCUUGGAGUUGUUA	UGAUGAAAGCCUUGGAGUUGUUAUAUGCCU
HTT	NM_002111.8	402	CGUGCAUGGCAACAAGAA	CGAUGCCUGGCAUGGCAACAAGAAAGAACU
HTT	NM_002111.8	420	AAGAACUUAUCAUCAACAA	AAAGAAAGAACUUAUCAUCAACAAAGAAAG
HTT	NM_002111.8	430	AGGUAACAAGAAAGCGUG	CUUUGAGGUAACAAGAAAGCGUGUUAUAU
HTT	NM_002111.8	448	CGUGGUAUCAUUGUGUGAC	AAAGACCGUGGUAUCAUUGUGUGACAUAUA
HTT	NM_002111.8	454	UCAUUGUGUGACAUAUUGUG	GUGAUAUCAUUGUGUGACAUAUUGUGAAAG
HTT	NM_002111.8	462	UGACAUAUGUGAAACAUA	UUGUGUGACAUAUUGUGAAACAUAUUGGCG
HTT	NM_002111.8	467	AUAUGUGAAACAUAUGUGG	UGACAUAUUGUGAAACAUAUUGUGGCAAGU
HTT	NM_002111.8	211	GCAAGCAACAACAACAACA	CAGCAGCAACAACAACAACAACAACAACA

Fig. 21 (Cont)

De sentido no marcada	De antisentido no marcada	Cadena de sentido (P0)
GUCCAGGUUUUGAACUGAC	GUCAGUUCAUAAACCGGAC	PmU.fU.fC.A.G.fU.fU.fC.A.fU.A.A.mA.fC#C#U#G#G#m#A#C
AGGUUUUGAACUGACGUUA	UAACGUCAGUUCAUAAACCU	PmU.A.A.fC.G.fU.fC.A.G.fU.fU.fC.A.fU#A#m#A#C#C#U
GGUUUUGAACUGACCGUUC	GUAACGUCAGUUCAUAAACC	PmU.fU.A.A.fC.G.fU.fC.A.G.fU.fU.fC.A.fU#A#m#A#C#C
ACCACAAUGUUGACCGGA	UCCGGUCACAAACUUGUGU	PmU.fC.fC.G.G.fU.fC.A.fC.A.A.fC.A.fU#U#G#U#G#G#U
UGUUGUUGACCGUACCGACA	UGUCGGUACCGUCUAAACACA	PmU.G.fU.fC.G.G.fU.A.fC.fC.G.fU.fC.fU#A#A#C#A#C#A
ACCGACAACCAUUAUUGGG	CCCAAUACUGGUUUGUCGGU	PmU.fC.fC.A.A.mA.fU.A.fC.fU.G.G.fU.fU#G#U#C#G#G#U
ACGAGUGCUCAAUUAUUG	CAACAUUAUUGAGCACUCGU	PmU.A.A.fC.A.fU.fU.A.fU.fU.G.A.mG.fC#A#C#U#C#G#U
UGAAAUCCUGCUUUAUGCGA	UCGACUAAAGCAGAUUUA	PmU.fC.G.A.fC.fU.A.A.mA.G.fC.A.G.mG#A#U#U#U#C#A
UGCUUUGACGAGAACCAAU	AUUGGUUCUCGACUAAAGCA	PmU.fU.fU.G.G.fU.fU.fC.fU.fC.G.A.fC.fU#A#A#m#A#C#A
GGGACAGUACUUAACAGCUA	UAGCGUUGAAGUACUGUCCC	PmU.A.G.fC.G.fU.fU.G.A.mA.G.fU.A.fC.fU#G#U#C#C#C
GGCAAUUCAGUCUCGUUGUG	CACAACGAGACUGAAUUGCC	PmU.A.fC.A.A.fC.G.A.mG.A.fC.fU.G.A.mA#U#U#G#C#C
GCCUGCUAGCUCAUGCUUA	UAAGCAUUGGAGCUAGCAGGC	PmU.A.A.mG.fC.A.fU.G.G.mA.G.fC.fU.A.fC#C#A#G#m#C#C
GCCCACUGCGUGAACAUUCA	UGAAUUGUACCGCAGUGGGC	PmU.G.A.mA.fU.G.fU.fU.fC.A.fC.fC.A.fG#U#G#G#m#C#C
UUUCUCUCAGGAUUAAAUA	AUUUUAAAUCUGAGAAGAA	PmU.fU.fU.fU.A.A.mA.fU.fC.fU.fU.G.A.m#C#A#A#m#G#A#A
UAAUUAUUCAGUAAAGAGA	UCUCUUUACUGAUUAAUUA	PmU.fC.fU.fC.fU.fU.fU.A.fC.fU.G.A.fU.A.fU#A#A#U#U#U#A
UAUAUCAGUAAAGAGAUUA	UUAUCUCUUUACUGAUUA	PmU.fU.A.A.fU.fC.fU.fU.fU.A.fC.fU#G#A#U#A#U#U#A
ACUUUCAGCUAACAGAAAG	CUUUUCUUGGUAGCUAAAGU	PmU.fU.fU.fU.fC.fU.fU.G.G.fU.A.G.fC.fU#G#A#A#A#G#U
AUUGUCUGACAAUUGUGAA	UUCACAUUUGUCAGACAAU	PmU.fU.fC.A.fC.A.fU.A.fU.fU.G.fU.fC.A.fG#m#A#C#A#A#U
UUCUGGGCAUCGUUUGGAA	UUCCAUAGCGAUGCCAGAA	PmU.fU.fC.fC.A.fU.A.G.fC.G.A.fU.G.fC#C#C#A#G#m#A#A
GGCAUCGCUAUGGAACUUU	AAAAGUUCUUAUGCGAUGCC	PmU.A.A.mA.G.fU.fU.fC.fC.A.fU.A.G.fC#G#A#U#U#G#C#C
GCAAAUGACAAUGAAUUA	UUAAUUUCAUUGUUAUUGC	PmU.fU.A.A.fU.fU.fU.fC.A.fU.fU.G.fU.fC#A#U#U#U#G#C
CAAAUGACAAUGAAUUAAG	CUUAAUUUCAUUGUUAUUG	PmU.fU.fU.A.A.fU.fU.fU.fC.A.fU.fU.G.fU.fC#A#U#U#U#G
AAGGCCUUCUAGCGAACCU	AGGUUCGCUAUGAAGGCCUU	PmU.G.G.fU.fU.fC.G.fC.fU.fU.G.A.mA#G#C#C#C#U#U
ACUAAUUGUCUCUAGGCU	AGCCUUAAGAGCACAUUUAUG	PmU.G.fC.fC.fU.A.A.mG.A.G.fC.A.fC.A.fU#U#U#A#G#U
CGGAGUGACAAGGAAAGAA	UUUCUUUCGUUGUCACUCCG	PmU.fU.fU.fC.fU.fU.fU.fC.fC.fU.fU.G.fU.fC#A#C#U#C#C#G
GCGAGUUGUCCAGGUUAUG	CAUAAACCGGACAAAGCUGC	PmU.A.fU.A.A.mA.fC.fC.fU.G.G.mA.fC.A.fA#m#C#C#U#G#C
UUGUCCAGGUUUAUGAACUG	CAGUUCAUAAACCGGACAA	PmU.A.G.fU.fU.fC.A.fU.A.A.mA.fC.fC.fU#G#G#m#A#C#A#A
CAGGUUUUGAACUGACGUU	AACGUCAGUUAUAAACCGUG	PmU.A.fC.G.fU.fC.A.G.fU.fU.fC.A.fU.A.fA#m#A#C#C#U#G
GUUUUGAACUGACGUUACA	UGUAACGUCAGUUAUAAAC	PmU.G.fU.A.A.fC.G.fU.fC.A.G.fU.fU.fC.A.fU#U#A#A#m#A#C
UAUGAACUGACGUUAUCA	UGAUGUAACGUCAGUUAUCA	PmU.G.A.fU.G.fU.A.A.fC.G.fU.fC.A.G.fU#U#U#C#A#U#A
AACUGACGUUAUCAUCA	UGUAUGAUGUAACGUCAGUU	PmU.G.fU.A.fU.G.A.fU.G.fU.A.A.fC.G.fU#U#C#A#G#U#U
CUGACGUUAUCAUCA	UGUGUAUGAUGUAACGUCAG	PmU.G.fU.G.fU.A.fU.G.A.fU.G.fU.A.A.fC#G#U#U#C#A#G
ACAALUGUUGACCGGAGCC	GGUCCGGUCACAAAUUGU	PmU.G.fC.fU.fC.fC.G.G.fU.fC.A.fC.A.fA#C#A#U#U#G#U
GGGAGUUGUGGAACUUUAU	AUAAGUUCACAAUACUCCC	PmU.fU.A.A.mG.fU.fU.fC.fC.A.fC.A.A.fU#A#C#U#C#C#C
AAGGCAAUGUCUUAUGGA	UCCUAAGAGCACUUAUGCCUU	PmU.fC.fU.fU.A.A.mG.A.G.fC.A.fC.fU.fU#G#C#C#U#U#U
GACGGUACCGACAACCAGUA	UACUGGUUGCGGUACCGUC	PmU.A.fC.fU.G.G.fU.fU.fU.fC.G.G.fU#A#C#C#G#U#C
CGGUACCGACAACCAGUAUU	AUACUGGUUGUCGGUACCG	PmU.A.fU.A.fC.fU.G.G.fU.fU.fU.fC.G.G.fU#A#C#C#G#U#C
UUGAACUACAUCGAUCAUGG	CCAUGAUCGAUGUAGUCAA	PmU.fC.A.fU.G.A.fU.fC.G.A.fU.G.fU.A.fG#U#U#U#C#A#A
UGAACUACAUCGAUCAUGGA	UCCAUGAUCGAUGUAGUCAA	PmU.fC.fC.A.fU.G.A.fU.fC.G.A.fU.G.fU.A.fG#U#U#U#C#A
AACGAGUGCUAAUUAUGUU	AACAUAUUGAGCACUCGUU	PmU.A.fC.A.fU.fU.A.fU.fU.G.A.mG.fC.A.fC#U#U#C#G#U#U
GUCCUGUUAACAAGUAAA	UUUACUUGUUGUAACAGGAC	PmU.fU.fU.A.fC.fU.fU.G.fU.fU.G.fU.A.fC#A#G#m#A#C
CUGAAAUCCUGCUUUAUGCG	CGACUAAAGCAGGAUUUCAG	PmU.G.A.fC.fU.A.A.mA.G.fC.A.G.mG.A.fU#U#U#U#C#A#G
CUGCUUUAUGUCGAGAACC	UUGSUUCUGACUAAAGCAG	PmU.fU.G.G.fU.fU.fC.fU.fC.G.A.fC.fU.A.fA#m#A#G#C#A#G
UUUAGUCGAGAACCAAUGAU	AUCAUUGGUUCUCGACUAAA	PmU.fU.fC.A.fU.fU.G.fU.fU.fC.fU.fC.G.A.fC#C#U#A#A#A
AGUCGAGAACCAAUGAUGG	GCCAUCAUUGGUUCUCGACU	PmU.fC.fC.A.fU.fC.A.fU.fU.G.fU.fU.fC.fU#U#C#G#A#C#U
GUGUACAACAALUGUUGAAG	CUUCAACAALUGUUGAACAC	PmU.fU.fU.fC.A.fC.A.A.fU.fU.G.fU.fU#G#A#m#A#C#A#C
UGAGGAACAUGGUCAGGCG	CGCCUGCACAUGUUCUUA	PmU.G.fC.fC.fU.G.fC.A.fC.fC.A.fU.G.fU#U#U#C#C#U#C#A
UGUCACAAGAACCUGGUCAG	CUGCAGGUUCUUGUGACA	PmU.fU.G.fC.A.fC.G.G.fU.fU.fU.fU.fU#G#U#C#A#C#A
UCACAAGAACCUGGUCAGAU	AUCUGCAGGUUCUUGUGA	PmU.fU.fC.fU.G.fC.A.fC.G.G.fU.fU.fU.fU.fU#U#G#U#G#A

Continúa en la hoja 35/136

Continúa en la hoja 37/136

Fig. 21 (Cont)

Cadena de antisentido (P1)	
P-mUfUmCfAmGfUmUfCmAfUmAfAmAfC#mC#U#mG#G#mA#C	
P-mUfAmAfCmGfUmCfAmGfUmUfCmAfU#mA#A#mA#C#mC#fU	
P-mUfUmAfAmCfGmUfCmAfGmUfUmCfAmU#mA#A#mA#C#mC#fC	
P-mUfCmCfGmGfUmCfAmCfAmAfCmAfU#mU#G#mU#G#mG#U	
P-mUfGmUfCmGfGmUfAmCfCmGfUmCfU#mA#A#mC#fA#mC#fA	
P-mUfCmCfAmAfAmUfAmCfUmGfGmUfU#mG#fU#mC#fG#mG#U	
P-mUfAmAfCmAfUmUfAmUfUmGfAmGfC#mA#fC#mU#fC#mG#fU	
P-mUfCmGfAmCfUmAfAmAfGmCfAmGfG#mA#fU#mU#U#mC#fA	
P-mUfUmUfGmGfUmUfCmUfCmGfAmCfU#mA#A#mA#fG#mC#fA	
P-mUfAmGfCmGfUmUfGmAfAmGfUmAfC#mU#G#mU#fC#mC#fC	
P-mUfAmCfAmAfCmGfAmGfAmCfUmGfA#mA#fU#mU#fG#mC#fC	
P-mUfAmAfGmCfAmUfGmGfAmGfCmUfA#mG#C#mA#fG#mG#fC	
P-mUfGmAfAmUfGmUfUmCfAmCfGmCfA#mG#fU#mG#fG#mG#fC	
P-mUfUmUfUmUfAmAfAmUfCmCfUmGfA#mC#fA#mA#fG#mA#fA	
P-mUfCmUfCmUfUmUfAmCfUmGfAmUfA#mU#fA#mA#fU#mU#fA	
P-mUfUmAfAmUfCmUfCmUfUmUfAmCfU#mG#fA#mU#fA#mU#fA	
P-mUfUmUfUmUfCmUfGmGfUmAfGmCfU#mG#fA#mA#mA#mG#U	
P-mUfUmCfAmCfAmUfAmUfUmGfUmCfA#mG#fA#mC#fA#mA#fU	
P-mUfUmCfCmAfUmAfGmCfGmAfUmGfC#mC#fC#mA#fG#mA#fA	
P-mUfAmAfAmGfUmUfCmCfAmUfAmGfC#mG#fA#mU#fG#mC#fC	
P-mUfUmAfAmUfUmUfCmAfUmUfGmUfC#mA#fU#mU#U#mG#fC	
P-mUfUmUfAmAfUmUfCfAmUfUmGfU#mC#fA#mU#U#mU#fG	
P-mUfGmGfUmUfCmGfCmUfAmUfGmAfA#mG#fG#mC#fC#mU#fU	
P-mUfGmCfCmUfAmAfGmAfGmCfAmCfA#mU#fU#mU#fA#mG#fU	
P-mUfUmUfCmUfUmUfCmCfUmUfGmUfC#mA#fC#mU#fC#mC#fG	
P-mUfAmUfAmAfAmCfCmUfGmGfAmCfA#mA#fG#mC#fU#mG#fC	
P-mUfAmGfUmUfCmAfUmAfAmAfCmCfU#mG#fG#mA#fC#mA#fA	
P-mUfAmCfGmUfCmAfGmUfUmCfAmUfA#mA#fA#mC#fC#mU#fG	
P-mUfGmUfAmAfCmGfUmCfAmGfUmUfC#mA#fU#mA#fA#mA#fC	
P-mUfGmAfUmGfUmAfAmCfGmUfCmAfG#mU#fU#mC#fA#mU#fA	
P-mUfGmUfAmUfGmAfUmGfUmAfAmCfG#mU#fC#mA#fG#mU#fU	
P-mUfGmUfGmUfAmUfGmAfUmGfUmAfA#mC#fG#mU#fC#mA#fG	
P-mUfGmCfUmCfCmGfGmUfCmAfCmA#mA#mU#fU#mG#fU	
P-mUfUmAfAmGfUmUfCmCfAmCfAmAfU#mA#fC#mU#fC#mC#fC	
P-mUfCmCfUmAfAmGfAmGfCmAfCmUfU#mU#G#mC#fC#mU#fU	
P-mUfAmCfUmGfGmUfUmGfUmCfGmGfU#mA#fC#mC#fG#mU#fC	
P-mUfAmUfAmCfUmGfGmUfUmGfUmCfG#mG#fU#mA#fC#mC#fG	
P-mUfCmAfUmGfAmUfCmGfAmUfGmUfA#mG#fU#mU#fC#mA#fA	
P-mUfCmCfAmUfGmAfUmCfGmAfUmGfU#mA#fG#mU#fU#mC#fA	
P-mUfAmCfAmUfUmUfUmUfGmAfGmCfA#mC#fU#mC#fG#mU#fU	
P-mUfUmUfAmCfUmUfGmUfUmGfUmAfA#mC#fA#mA#fG#mA#fC	
P-mUfGmAfCmUfAmAfAmGfCmAfGmGfA#mU#fU#mU#fC#mA#fG	
P-mUfUmGfGmUfUmCfUmCfGmAfCmUfA#mA#fA#mG#fC#mA#fG	
P-mUfUmCfAmUfUmGfGmUfUmCfUmCfG#mA#fC#mU#fA#mA#fA	
P-mUfCmCfAmUfCmAfUmUfGmGfUmUfC#mU#fC#mA#mC#fU	
P-mUfUmUfCmAfAmCfAmUfUmUfGmUfU#mG#fA#mA#fC#mA#fC	
P-mUfGmCfCmUfGmCfAmCfAmUfUmGfU#mU#fC#mC#fU#mC#fA	
P-mUfUmGfCmAfCmGfGmUfUmCfUmUfU#mG#fU#mG#fA#mC#fA	
P-mUfUmCfUmGfCmAfCmGfGmUfUmCfU#mU#fU#mG#fU#mC#fA	

Continúa de la hoja 35/136

Continúa en la hoja 39/136

Fig. 21 (Cont)

Continúa de la hoja 34/136

De sentido no marcada	De antisentido no marcada	Cadena de sentido (P0)
ACAAAGAACCGUGCAGAUAA	UUUAUCUGCACGGUUCUUUGU	mG.mA.A.mC.mC.G.mU.G.mC.A.G.A.mU.#mA#mA.tegChol
UUGAACCCUUCUUGUUUAAAA	UUUUUAUAACAAGAGGUUJCAA	mC.mC.mU.mC.mU.mU.G.mU.mU.A.mU.A.#mA#mA.tegChol
UUUUUUGGCUUUUGUAUUUGAA	UUCAAUJACAAGCCAAUAAAA	mU.mG.G.mC.mU.mU.mU.G.mU.A.mU.U.#mA#mA.tegChol
UCAUUGGAAUUCUAAAUAUC	GAUUUUJAGGAUUJCCAAUGA	mG.mG.A.A.mU.mU.mC.mC.mU.A.A.A.#mU#mA.tegChol
UGUGAUGGCACUACUGGCCAG	CUJGCCCAUGAUGCCAUACACA	mU.mG.G.mC.A.mU.mC.A.mU.G.G.mC.mC#mA#mA.tegChol
GAUUUCCCAGUCAACUGAAG	CUUCAGULIGACUGGAAAUUC	mC.mC.mC.A.G.mU.mC.A.A.mC.mU.G.A#mA#mA.tegChol
GUGUGAGCAGCAACAUACUU	AAGUAUUGUUGCUGUICACUC	mA.mG.mC.A.G.mC.A.A.mC.A.mU.A.mC#mU#mA.tegChol
GACUGGAAUGUUCGGGAGAA	UUCUCGGGAACAUUCCAGAC	mG.mA.A.mU.G.mU.mU.mC.mC.G.G.A.G.#mA#mA.tegChol
UGCGUGAACAUUCACAGCCA	UGGCUUGUGAAUUGUACAGCA	mG.mA.A.mC.A.mU.mU.mC.A.mC.A.G.mC#mC#mA.tegChol
CUJGAGAUUUAAAAUUUAU	AUUAAAUUUUAAAUCUJGAG	mG.mA.mU.mU.mU.A.A.A.mU.mU.mU.A#mA#mA.tegChol
GGAUUUAAAUUUAUUUAUA	UAUUUUAAAUUUUAAAUC	mU.mA.A.A.A.mU.mU.mU.A.A.mU.mU.A#mU#mA.tegChol
AAUUUAUUUAUUUCAGUAAA	UUUACUGAUUAUUJAAUUU	mA.mA.mU.mU.A.mU.A.mU.mC.A.G.mU.A#mA#mA.tegChol
AUUUUAACGUAAUCUUCUUUCU	AGAAAGAGUUAACUJUAUUU	mA.mA.mC.G.mU.A.A.mC.mU.mC.mU.mU.#mC#mA.tegChol
UCUUUCUUAUGCCCGUGUAAA	UUUACACCGGCAUAGAAAAG	mC.mU.A.mU.G.mC.mC.mC.G.mU.G.mU.A.#mA#mA.tegChol
UCUUAUGCCCGUGUAAAGUUA	AUACUUAUACCGGCAUAGA	mG.mC.mC.mC.G.mU.G.mU.A.A.G.mU.#mA#mA.tegChol
CUUUUAAGUCAGGAGUGGCA	UGGACUCUCCUGACUAAAAG	mA.mG.mU.mC.A.G.G.A.G.A.G.mU.G#mC#mA.tegChol
UGUUUUGGGUUAUGAAUGUG	CACAUJCAAUACCCAAAACA	mU.mG.G.G.mU.A.mU.mU.G.A.A.mU.G#mU#mA.tegChol
GAUUGUGUAAGUGGAGGAA	UUCUCCACUJACCACAUUC	mU.mG.G.mU.A.A.G.mU.G.G.A.G.G.#mA#mA.tegChol
UGGUUAGUGGAGGAAUUGUU	AACAUUUCUCCACUUAACA	mA.mG.mU.G.G.A.G.G.A.A.mU.G#mU#mA.tegChol
AAAUGUGGAAUCUCUGUGCA	UGCACAGAGUJCCAAACAUUU	mU.mU.G.G.A.A.mC.mU.mC.mU.G.mU.G.#mC#mA.tegChol
AUGUUUGAGGAGGCCCUAAA	UUUAGGGCCUCCUCAAACA	mU.mG.A.G.G.mA.G.G.mC.mC.mC.mU.mU.#mA#mA.tegChol
CCUUAAGGGAAGCUACUGAA	UUUCAGUAGCUUCCCUUAAGG	mA.mG.G.G.A.G.mC.mU.A.mC.mU.G.#mA#mA.tegChol
GAUUUAUAAACAGUAGGAAA	UUUCUJACGUGUUAUUUAUUC	mA.mU.A.A.mC.A.mC.G.mU.A.A.G.A.#mA#mA.tegChol
AUUGUUACAUUUGUAAAGAAA	UUUUUUACAALUGUAAACAU	mU.mA.mC.A.mU.mU.mU.G.mU.A.A.G.A.#mA#mA.tegChol
CAUUUGUAGAAAUAACACU	AGUGUUAUUUCUUAACAAUG	mG.mU.A.A.G.mA.A.A.mU.A.A.mC.A.#mC#mA.tegChol
AAUAACACUGUGAAUUGUAAA	UUUACAUUACAGUGUUAUU	mC.mA.mC.mU.G.mU.G.A.A.mU.G.mU.A.#mA#mA.tegChol
AAUUAUGAGUCAUUAGUAAA	UUUACAUUACAGUCUUAUU	mG.mA.G.mC.mU.mC.A.mU.mU.A.G.mU.A.#mA#mA.tegChol
UCACCCACCGCAUUAACAUAA	UUUUGUUAUUUGCGUGGGUGA	mC.mA.mC.G.mC.A.mU.A.mU.A.mC.A.mU.#mA#mA.tegChol
AUAUAGACACAUCUUAUUAU	AAUUUAUAGAUUGUGUUAUU	mG.mA.mC.A.mC.A.mU.mC.mU.A.mU.A.#mU#mA.tegChol
UUACACACACACCUUCUCAAG	CUUJGAGAGCUUGUGUGUUA	mC.mA.mC.A.mC.A.mC.mC.mU.mC.mU.mC.A.#mA#mA.tegChol
GACUUUAUCAUUUCUAAA	UUUJAGGAACAUGAUUAAGUC	mU.mA.mU.mC.A.mU.G.mU.mU.mC.mU.A.#mA#mA.tegChol
UUUGUGCAAUUGUGAAUUAU	AUUUAUCACAUUUGCAACA	mG.mC.A.A.A.mU.G.mU.G.A.mU.mU.#mA#mA.tegChol
GCAAAUGUGAUUAUUUGGU	ACCAAUUUAUACAUUUUGC	mU.mG.mU.G.A.mU.mU.A.A.mU.mU.mU.G.#mC#mA.tegChol
AAUUUGGUUGUCAAGUUUUJG	CAAAACUJGACAAACAAUU	mG.mG.mU.mU.G.mU.mC.A.A.G.mU.mU.mU.#mU#mA.tegChol
UUUGUUUUCUUGCUGGUAU	AUUACCAAGCAGGAAAACA	mU.mU.mU.mC.mC.mU.G.mC.mU.G.mU.A.#mA#mA.tegChol
GUUUUCUGUGUGUUAUUUC	GAUUUAUACAGCAGGAAAC	mC.mC.mU.G.mC.mU.G.G.mU.A.A.mU.A.#mU#mA.tegChol
AUAUCGGGAAAGAUUUUAU	AUUAAAUCUJUUCCGAUU	mG.mG.G.A.A.G.A.mU.mU.mU.mU.A.#mA#mA.tegChol
AUUUUUAUGAAACCAGGUA	UACCCUGGUUUCAUUAAA	mA.mA.mU.G.A.A.A.mC.mC.A.G.G.G.#mU#mA.tegChol
UAUUGAAACCAGGGUACAAU	AUUUCUACCCUGGUUJCAUUA	mA.mA.A.mC.mC.A.G.G.G.mU.A.G.A.#mA#mA.tegChol
AUUGUUUGGCAUUGCACUGA	UCAGUGCAUUGCCAAACA	mU.mU.G.G.mC.A.A.mU.G.mC.A.mC.mU.#mC#mA.tegChol
CCCCUCAGUUGUUUCUAGA	UCUUAAGAAACACUGAGGGG	mC.mA.G.mU.mU.G.mU.mU.mU.mC.mU.A.#mG#mA.tegChol
GGACUJGACGAGAGUUAUA	UAUACAUUCUCUGCAGUCC	mG.mA.mC.G.A.G.A.G.A.mU.G.mU.A.#mU#mA.tegChol
GACGAGAGUUAUUAUUJAA	UUAAAUAUACAUUCUCUCUC	mG.mA.G.A.mU.G.mU.A.mU.A.mU.mU.#mA#mA.tegChol
UUUUUUUAACUJGUGCAAGA	UGUUUJGACGAGUUAAAAA	mU.mA.A.mC.mU.G.mC.mU.G.mC.A.A.#mC#mA.tegChol
UAACUGGCAAAACAUJUGUA	UACAAGUUJGACAGAGUUA	mG.mC.mU.G.mC.A.A.A.mC.A.mU.mU.G.#mU#mA.tegChol
ACCCUGGAAAGGUAUGAA	UUJCAUCAGCUUUUCCAGGGU	mG.mG.A.A.A.G.mC.mU.G.A.mU.G.#mA#mA.tegChol
AAAGCCUUCBAGUCCUCUAA	UUJGAGGACUCGAAAGCCUU	mC.mU.mU.mC.G.A.G.mU.mC.mC.mU.mC.#mA#mA.tegChol
CGCUCACCBACCAAGAAA	UUUCUUUGGUUGGUGCAGCG	mC.mA.mC.mC.G.A.mC.mC.A.A.G.A.#mA#mA.tegChol
AAGAACUUUCAGCUACCAAG	CUUGGUAGCUGAAAGUUCUU	mC.mU.mU.mU.mC.A.G.mC.mU.A.mC.mC.A.#mA#mA.tegChol
AGCUACCAAGAAAGACCGUG	CACGGUCUUUCUUGGUAGCU	mC.mC.A.A.G.A.A.G.A.mC.mC.G.#mU#mA.tegChol
CGUGUGAAUCAUUGUCUGAC	GUCAGACAUAUUCACACG	mG.mA.A.mU.mC.A.mU.mU.G.mU.mC.mU.G.#mA#mA.tegChol
UCAUUGUCUGACAUAUUGUG	CACAUUUGUCAGACAUAUGA	mG.mU.mC.mU.G.A.mC.A.A.mU.A.mU.G.#mU#mA.tegChol
UGACAUAUUGUAAAAUAU	UAUGUUUACAUUAUUGUCA	mA.mU.A.mU.G.mU.G.A.A.A.mC.A.#mU#mA.tegChol
AUAUGUAAAAACUJAGUGG	GCCACUUGUUUUCACAUUA	mU.mG.A.A.A.A.mC.A.mU.A.G.mU.G.#mG#mA.tegChol
GCAGCAGCAGCAGCAGCAGC	GCUGCUGCUGCUGCUGCUGC	mA.mG.mC.A.G.mC.A.G.mC.A.G.mC.A.#mG#mA.tegChol

Continúa en la hoja 38/136

Fig. 21 (Cont)

Continúa de la hoja 36/136

Cadena de antisentido (P1)	
P-mUfUmAfUmCfUmGfCmAfCmGfGmUfU#mC#U#mU#U#mG#fU	
P-mUfUmUfUmAfUmAfAmCfAmAfGmAfG#mG#U#mU#C#mA#fA	
P-mUfUmCfAmAfUmAfCmAfAmAfGmCfC#mA#A#mU#fA#mA#fA	
P-mUfAmUfUmUfUmAfGmAfAmUfC#mC#A#mA#U#mG#fA	
P-mUfUmGfGmCfCmAfUmGfAmUfGmCfC#mA#U#mC#A#mC#fA	
P-mUfUmUfCmAfGmUfUmGfAmCfUmGfG#mA#mA#A#mU#fC	
P-mUfAmGfUmAfUmGfUmUfGmCfUmGfC#mU#C#mA#C#mU#fC	
P-mUfUmCfUmCfCmGfGmAfAmCfAmUfU#mC#C#mA#G#mA#fC	
P-mUfGmGfCmUfGmUfGmAfAmUfGmUfU#mC#A#mC#fG#mC#fA	
P-mUfUmUfAmAfAmUfUmUfUmAfAmAfU#mC#C#mU#fG#mA#fG	
P-mUfAmUfAmAfUmUfAmAfAmUfUmUfU#mA#A#mA#U#mC#fC	
P-mUfUmUfAmCfUmGfAmUfAmUfAmAfU#mU#A#mA#A#mU#fU	
P-mUfGmAfAmAfGmAfGmUfUmAfCmGfU#mU#A#mA#A#mA#fU	
P-mUfUmUfAmCfAmCfGmGfGmCfAmUfA#mG#fA#mA#A#mG#fA	
P-mUfUmAfCmUfUmUfAmCfAmCfGmGfG#mA#mU#A#mG#fA	
P-mUfGmCfAmCfUmCfUmCfCmUfGmAfC#mU#A#mA#A#mA#fG	
P-mUfAmCfAmUfUmCfAmAfUmAfCmCfC#mA#A#mA#A#mC#fA	
P-mUfUmCfCmUfCmCfAmCfUmUfAmCfC#mA#C#mA#U#mU#fC	
P-mUfAmCfAmUfUmUfCmCfUmCfCmAfC#mU#U#mA#C#mC#fA	
P-mUfGmCfAmCfAmGfAmGfUmUfCmCfA#mA#C#mA#U#mU#fU	
P-mUfUmAfAmGfGmGfCmCfUmCfCmUfC#mA#A#mA#C#mA#fU	
P-mUfUmCfAmGfUmAfGmCfUmUfCmCfC#mU#U#mA#A#mG#fG	
P-mUfUmUfCmUfUmAfCmGfUmGfUmUfA#mU#A#mA#U#mU#fC	
P-mUfUmUfCmUfUmAfCmAfAmAfU#mU#A#mA#A#C#mA#fU	
P-mUfGmUfGmUfUmAfUmUfUmCfUmUfA#mC#A#mA#A#mU#fG	
P-mUfUmUfAmCfAmUfUmCfAmCfAmGfU#mG#U#mU#A#mU#fU	
P-mUfUmUfAmCfUmAfAmUfGmAfGmCfUmC#mA#mU#A#mU#fU	
P-mUfUmAfUmCfUmAfUmAfUmGfCmGfU#mG#fG#mG#U#mC#fA	
P-mUfAmUfUmAfUmAfGmAfUmGfUmGfU#mC#U#mA#U#mA#fU	
P-mUfUmUfGmAfGmAfGmGfUmGfUmGfU#mG#U#mG#U#mA#fA	
P-mUfUmUfAmGfGmAfAmCfAmUfGmAfU#mA#A#A#mU#fC	
P-mUfUmUfAmAfUmCfAmCfAmUfUmUfG#mA#A#C#mA#fA	
P-mUfGmCfAmAfAmUfUmAfAmUfCmAfC#mA#U#mU#U#mG#fC	
P-mUfAmAfAmAfCmUfUmGfAmCfAmAfC#mC#A#mA#A#mU#fU	
P-mUfUmUfAmCfCmAfGmCfAmGfGmAfA#mA#A#mC#A#mA#fA	
P-mUfAmUfAmUfUmAfCmCfAmGfCmAfG#mA#A#A#mA#fC	
P-mUfUmUfAmAfAmAfUmCfUmUfUmCfC#mC#G#mA#U#mA#fU	
P-mUfAmCfCmCfUmGfGmUfUmUfCmAfU#mU#A#mA#mA#fU	
P-mUfUmUfCmUfAmCfCmCfUmGfGmUfU#mU#fC#mA#U#mU#fA	
P-mUfCmAfGmUfGmCfAmUfUmGfCmCfA#mA#A#mC#A#mA#fU	
P-mUfCmUfUmAfGmAfAmAfCmAfAmCfU#mG#A#mG#fG#mG#fG	
P-mUfAmUfAmCfAmUfCmUfCmUfCmGfU#mC#A#mG#U#mC#fC	
P-mUfUmAfAmAfUmAfUmAfCmAfUmCfU#mC#U#mC#fG#mU#fC	
P-mUfGmUfUmUfGmCfAmGfCmAfGmUfU#mA#A#A#mA#fA	
P-mUfAmCfAmAfUmGfUmUfUmGfCmAfG#mA#mG#U#mU#fA	
P-mUfUmCfAmUfCmAfGmCfUmUfUmUfC#mA#mG#fG#mG#U	
P-mUfUmGfAmGfGmGfAmCfUmCfGmAfA#mG#fG#mC#mU#fU	
P-mUfUmUfCmUfUmUfGmGfUmCfGmGfU#mG#C#mA#fG#mC#fG	
P-mUfUmUfGmGfUmAfGmCfUmGfAmAfA#mG#U#mU#fC#mU#fU	
P-mUfAmCfGmGfUmCfUmUfUmCfUmUfG#mG#U#mA#fG#mC#U	
P-mUfUmCfAmGfAmCfAmAfUmGfAmUfUmC#mA#mC#A#mC#fG	
P-mUfAmCfAmUfAmUfUmGfUmCfAmGfA#mA#A#U#mG#fA	
P-mUfAmUfGmUfUmUfUmCfAmCfAmUfA#mU#mG#fU#mC#fA	
P-mUfCmCfAmCfUmAfUmGfUmUfUmUfC#mA#C#mA#U#mA#fU	
P-mUfCmUfGmCfUmGfCmUfGmCfUmGfC#mU#U#GmC#U#mG#fC	

Continúa de la hoja 38/136

Fig. 21 (Cont)

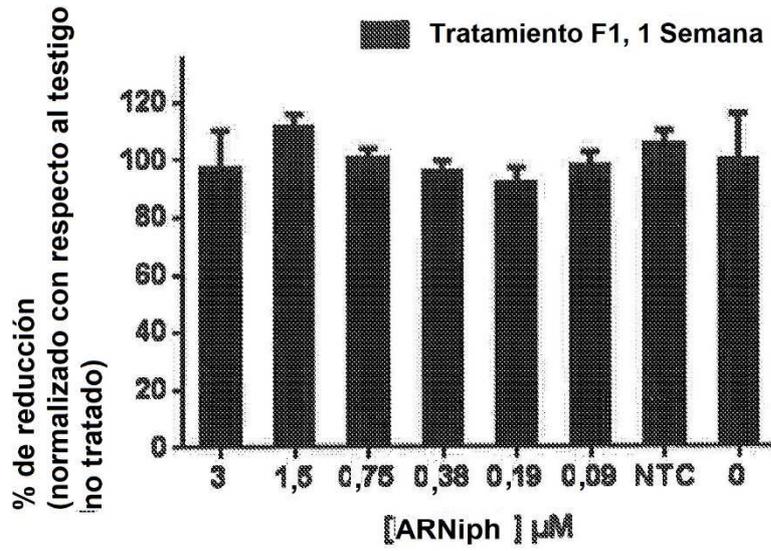


Fig. 22

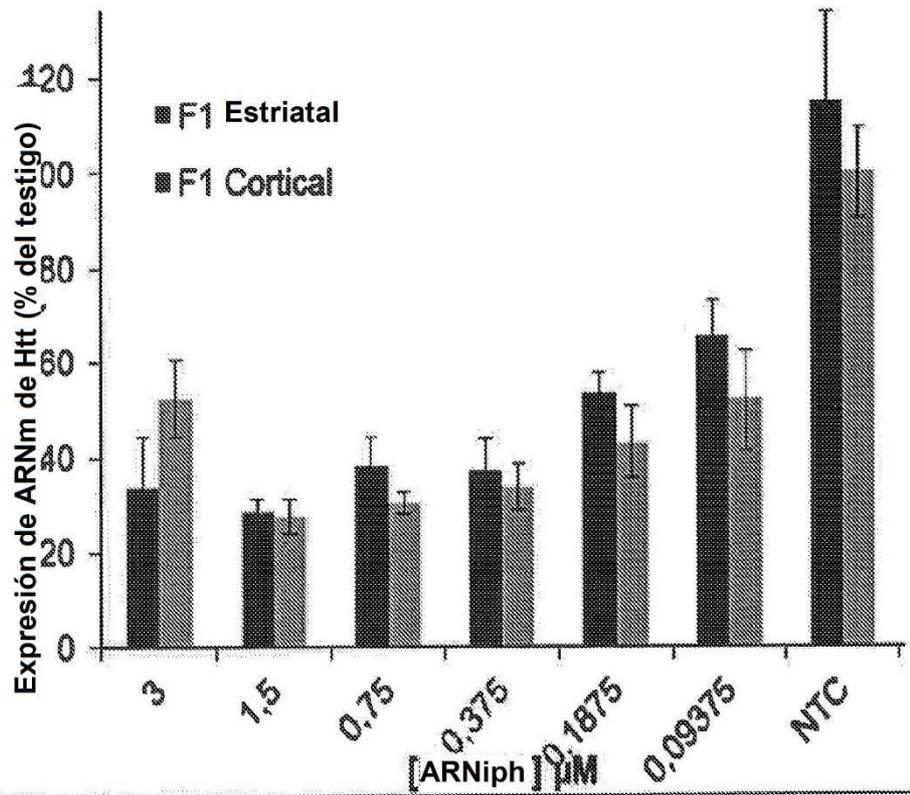


Fig. 23

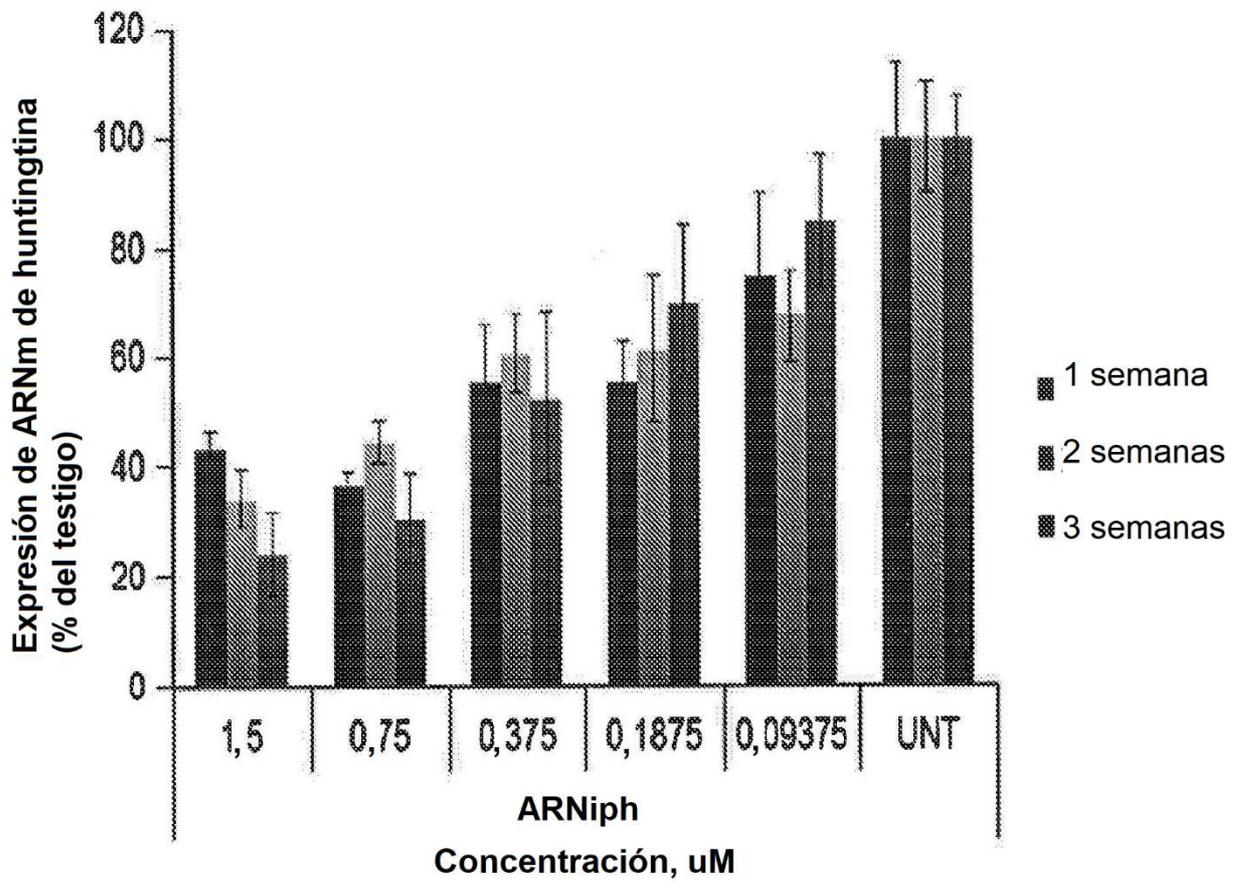


Fig. 24

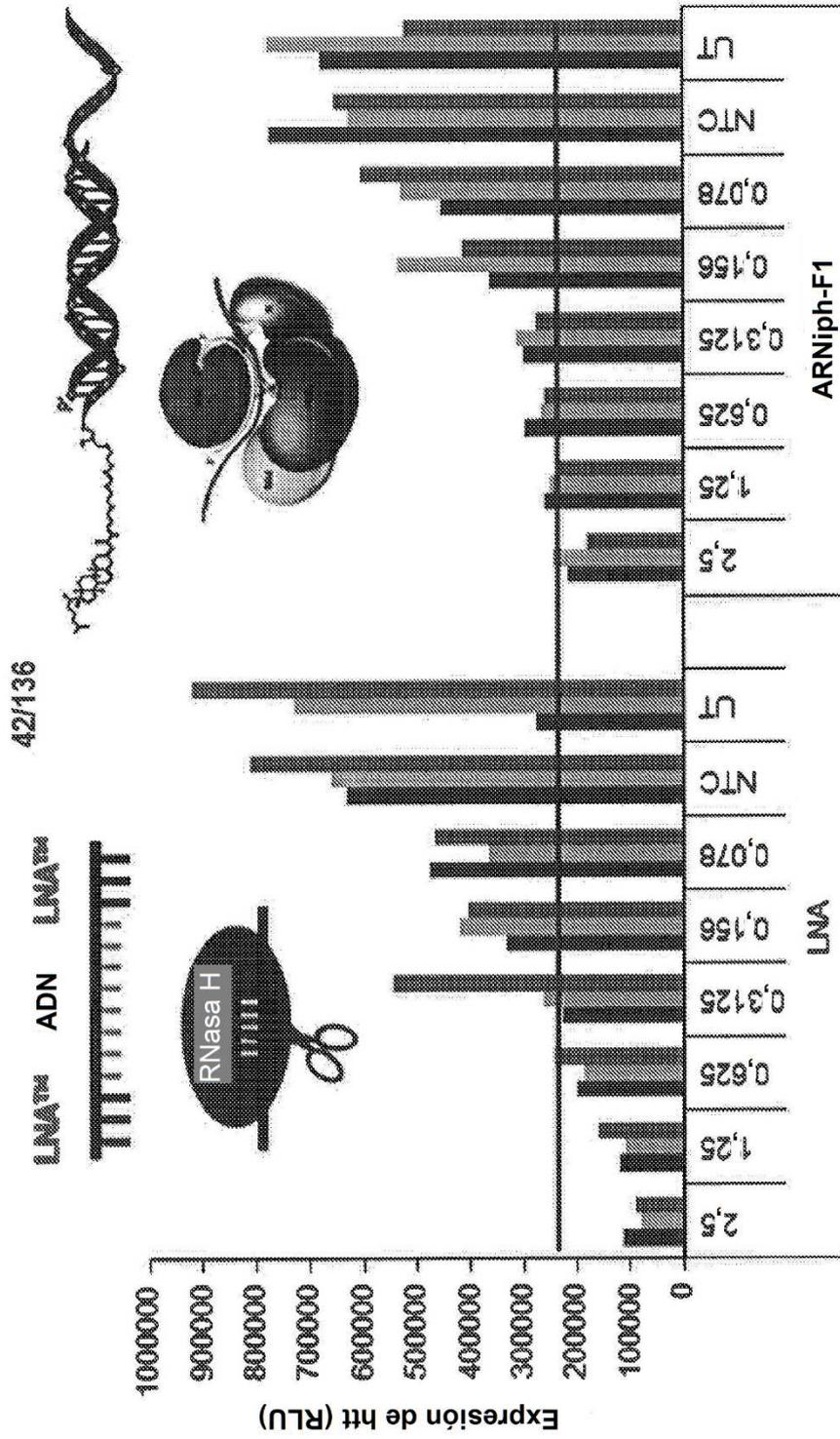


Fig. 25

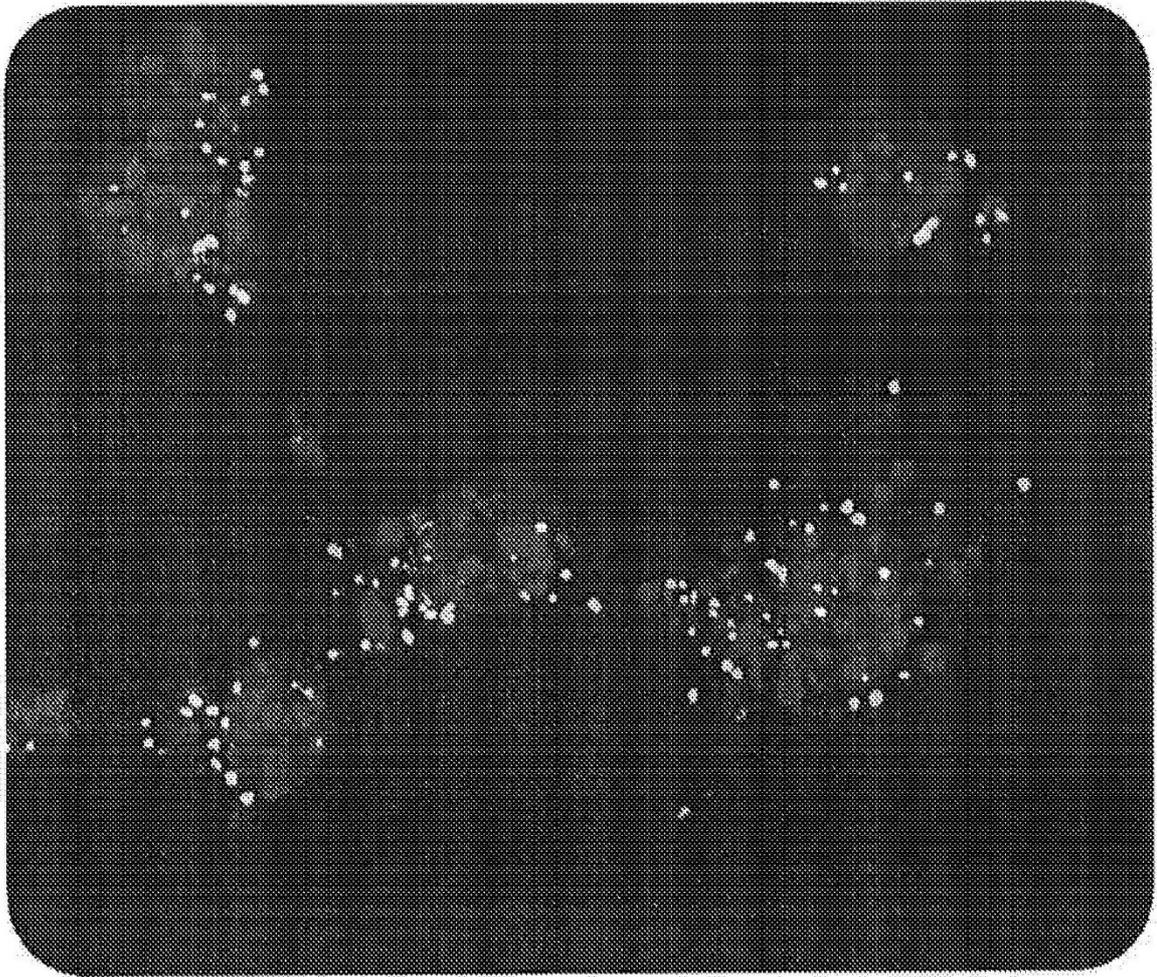


Fig. 26

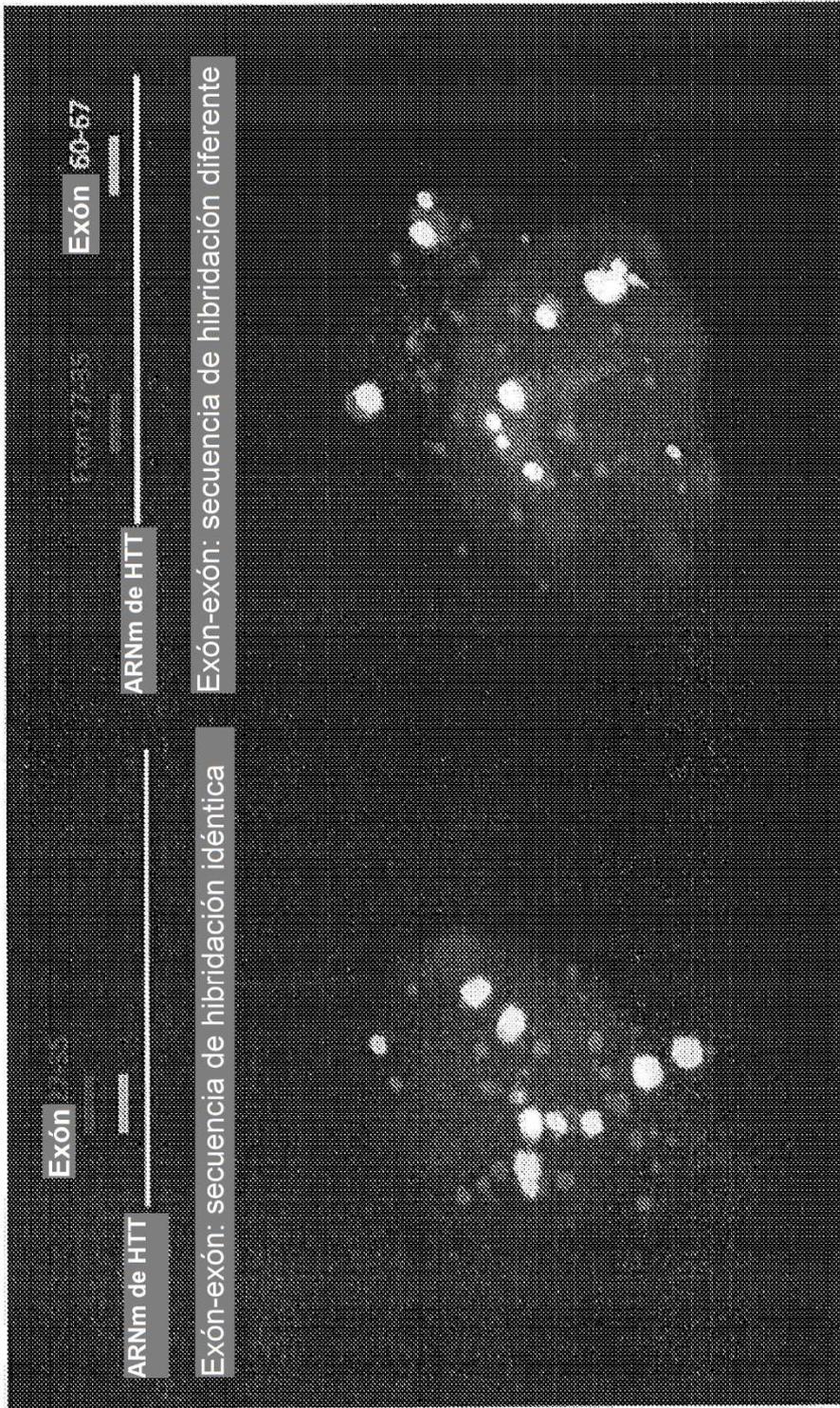


Fig. 27

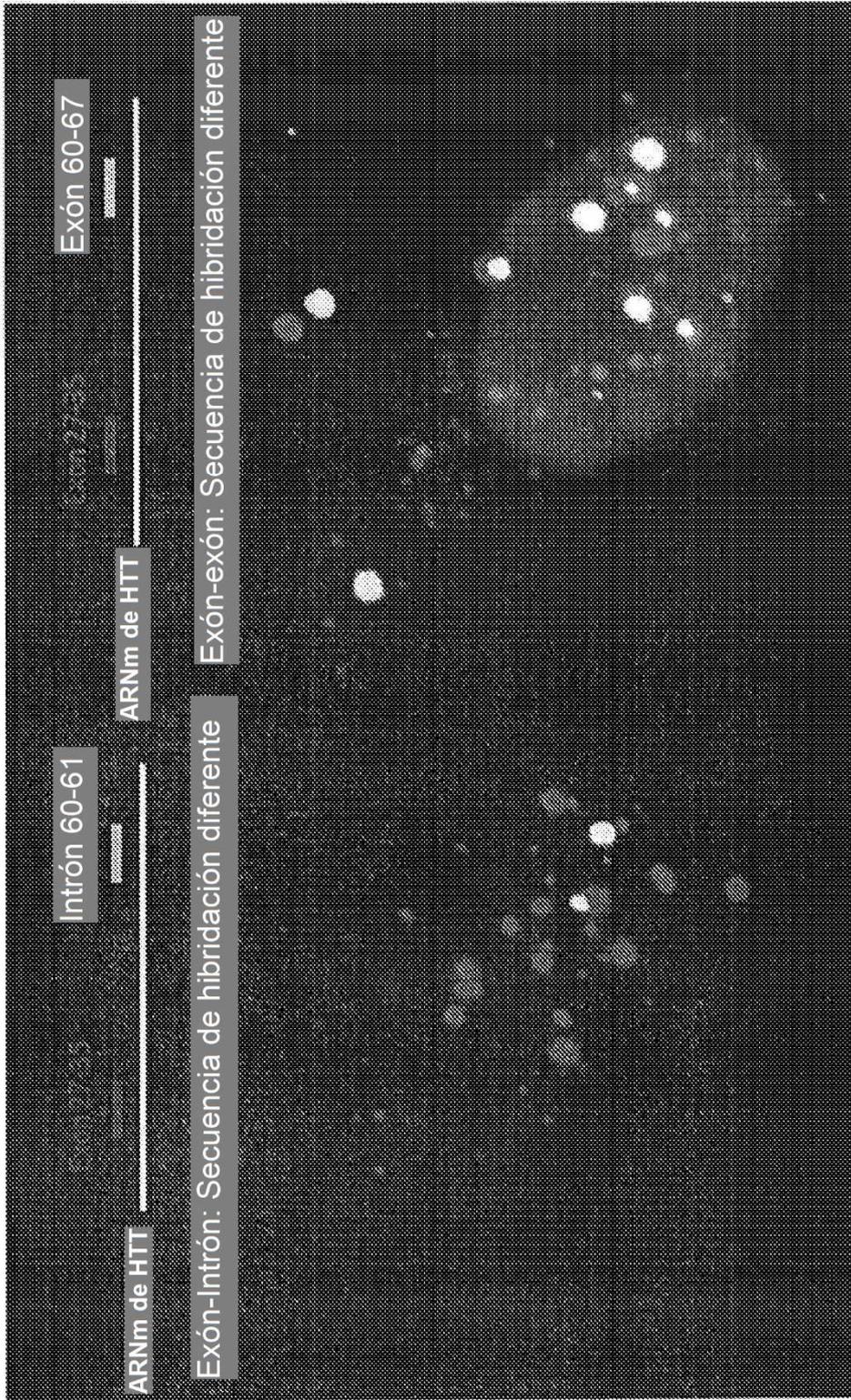


Fig. 28

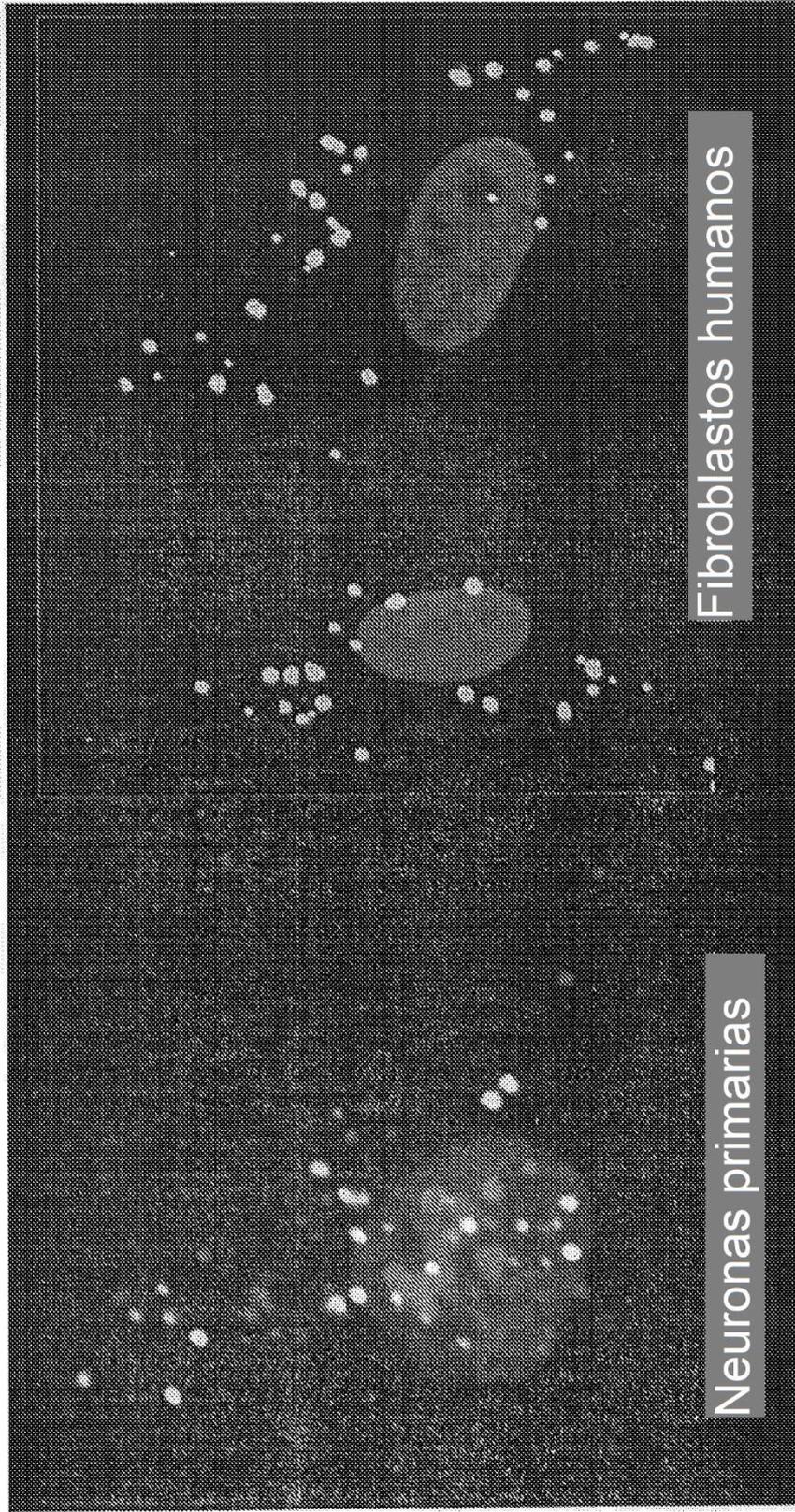


Fig. 29

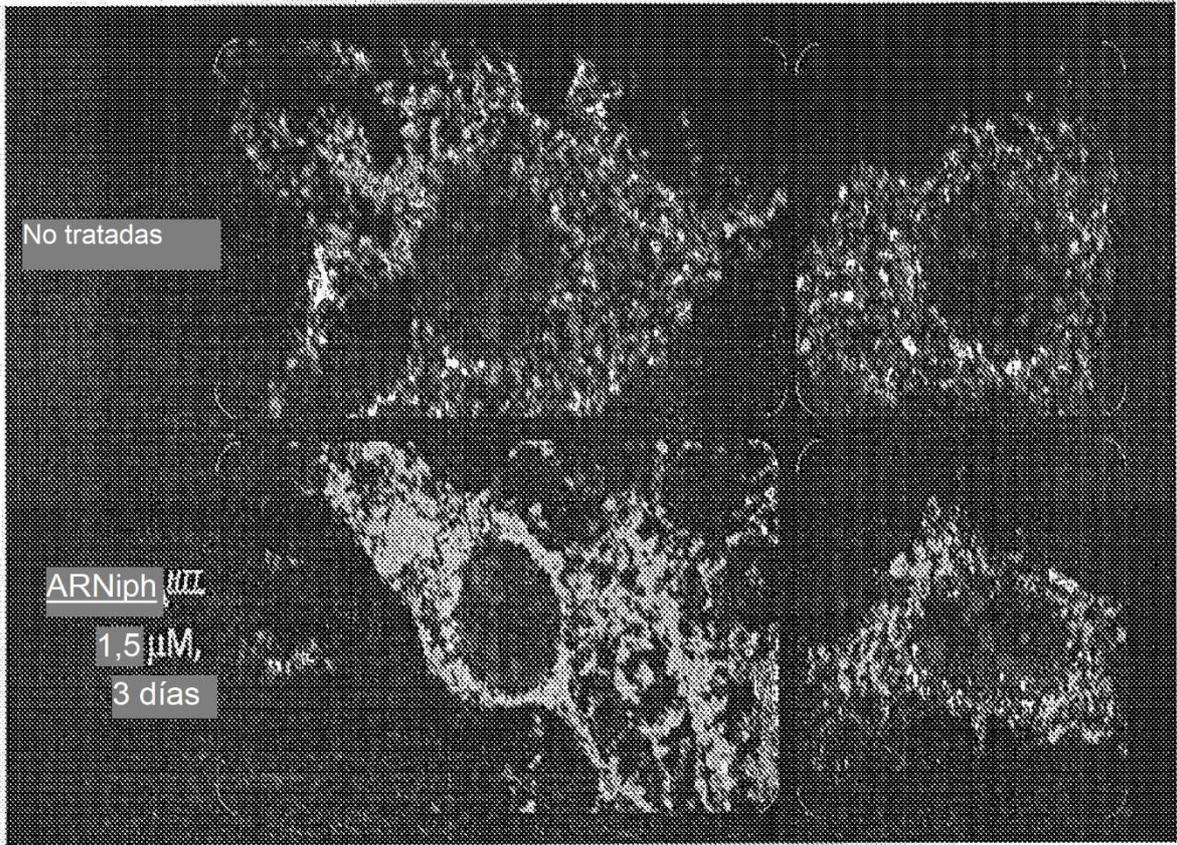


Fig. 30

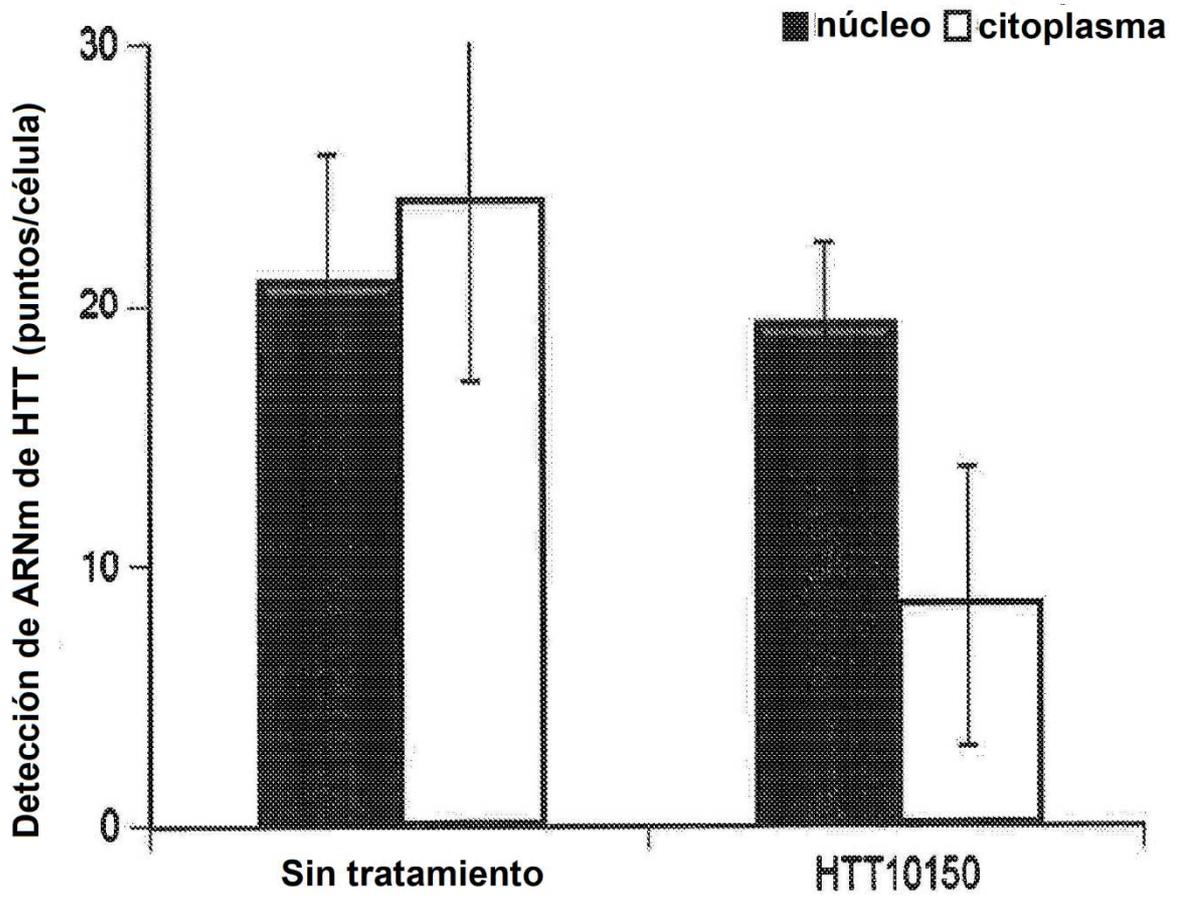


Fig. 31

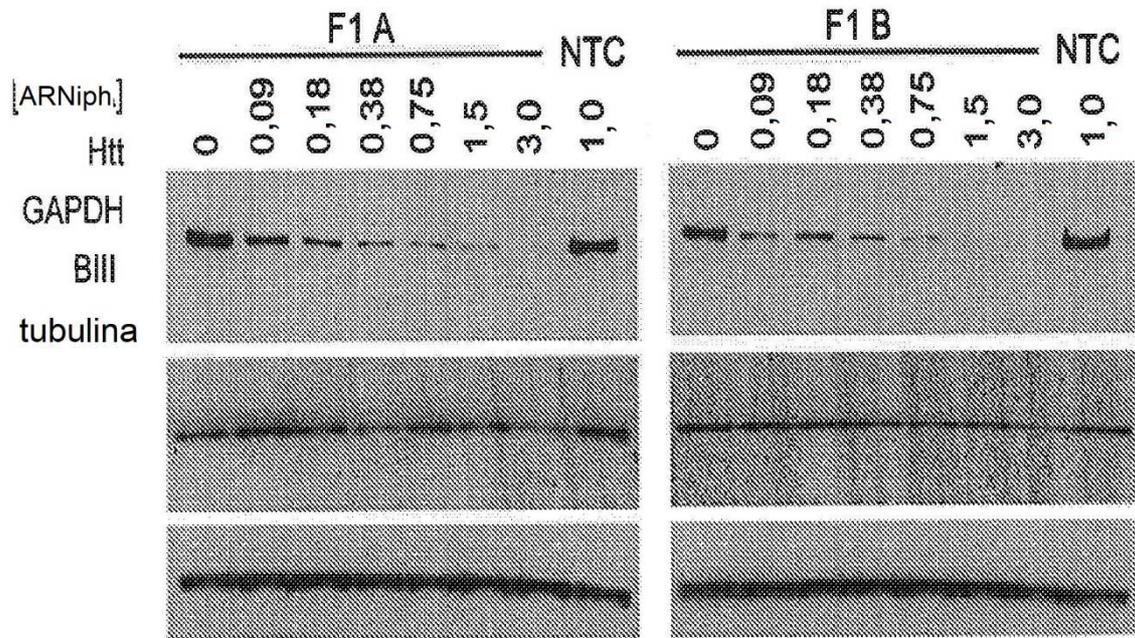


Fig. 32

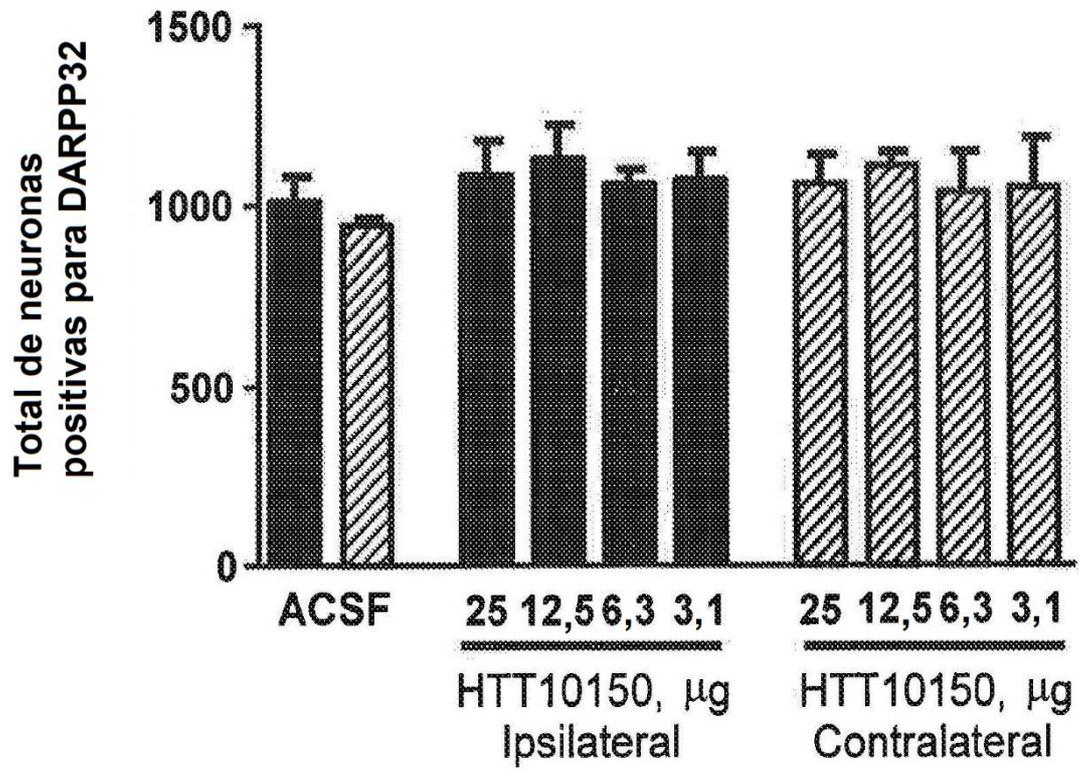


Fig. 33

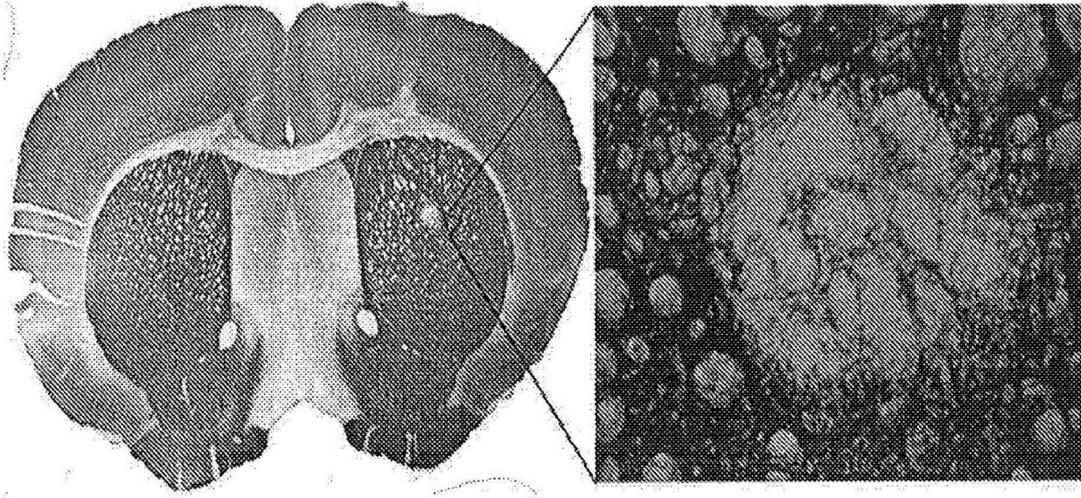


Fig. 34

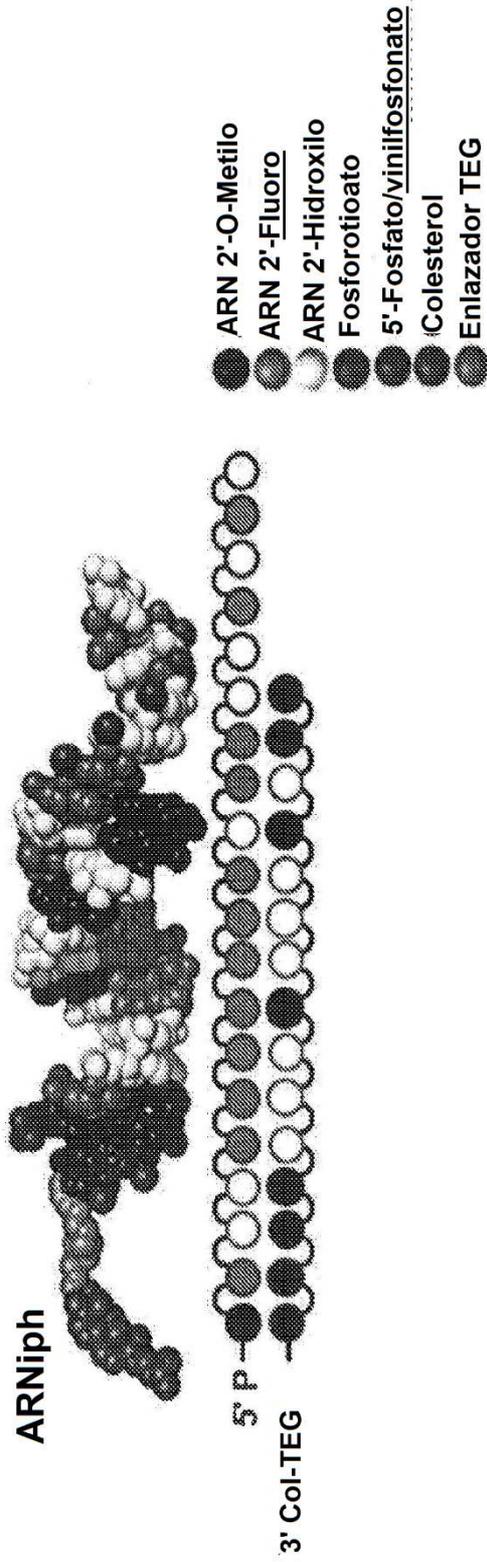


Fig. 35A

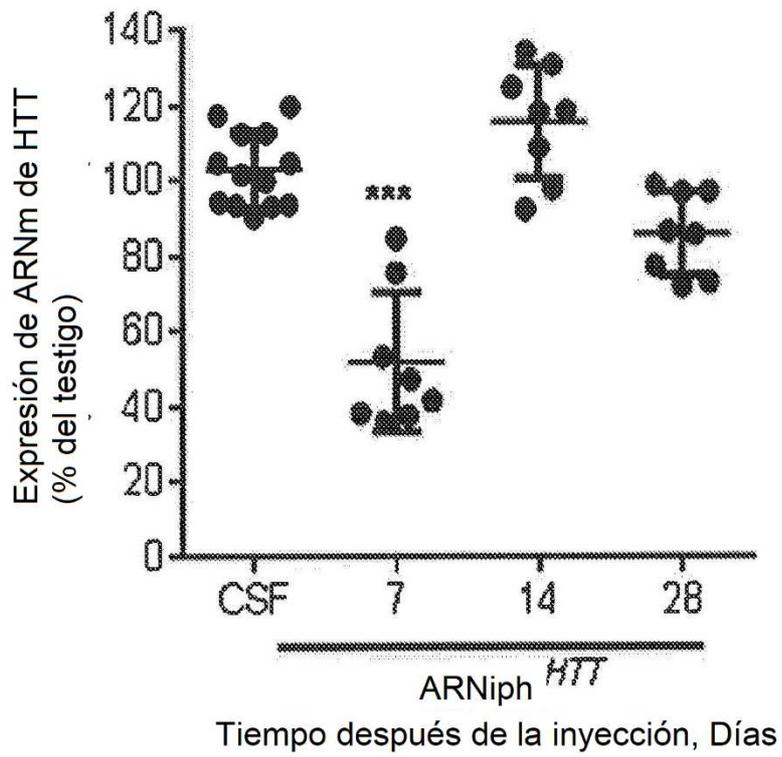


Fig. 35B

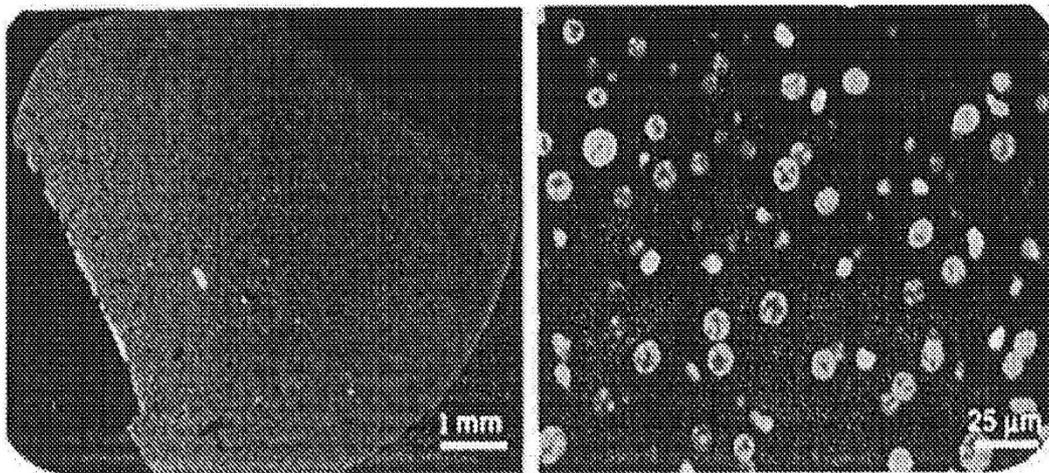


Fig. 35C

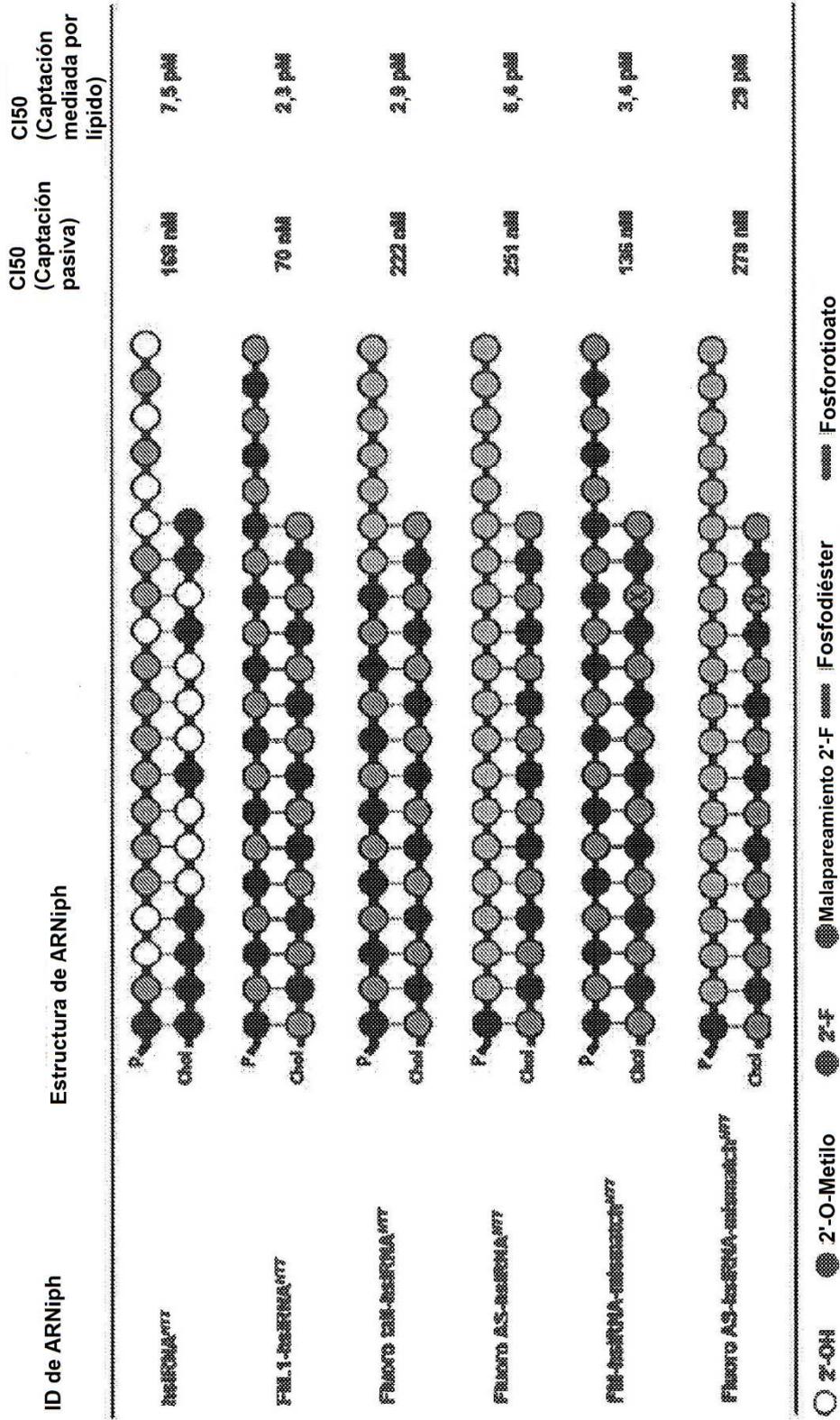


Fig. 36A

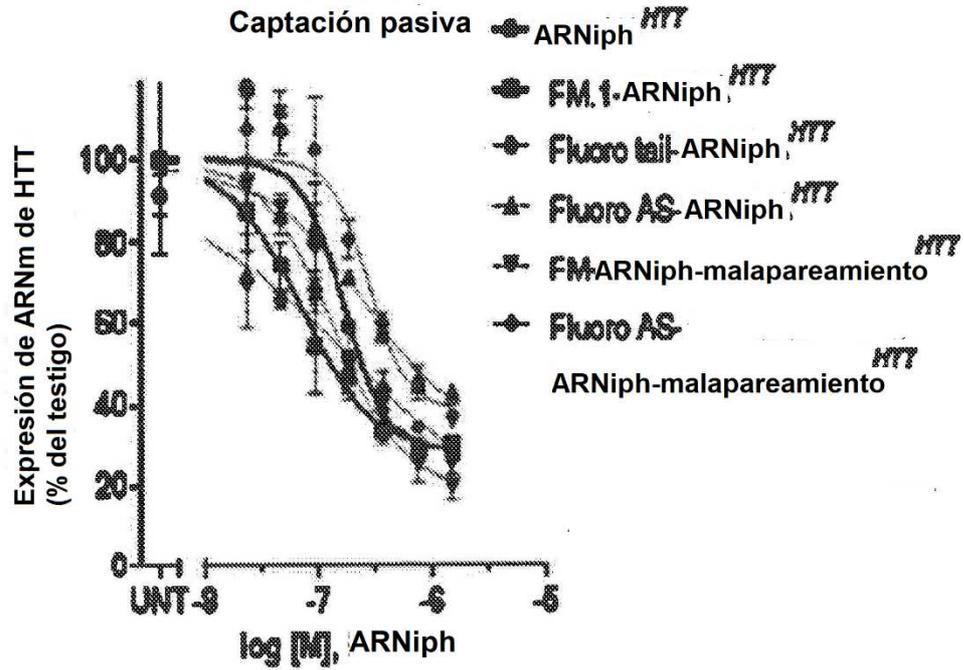


Fig. 36B

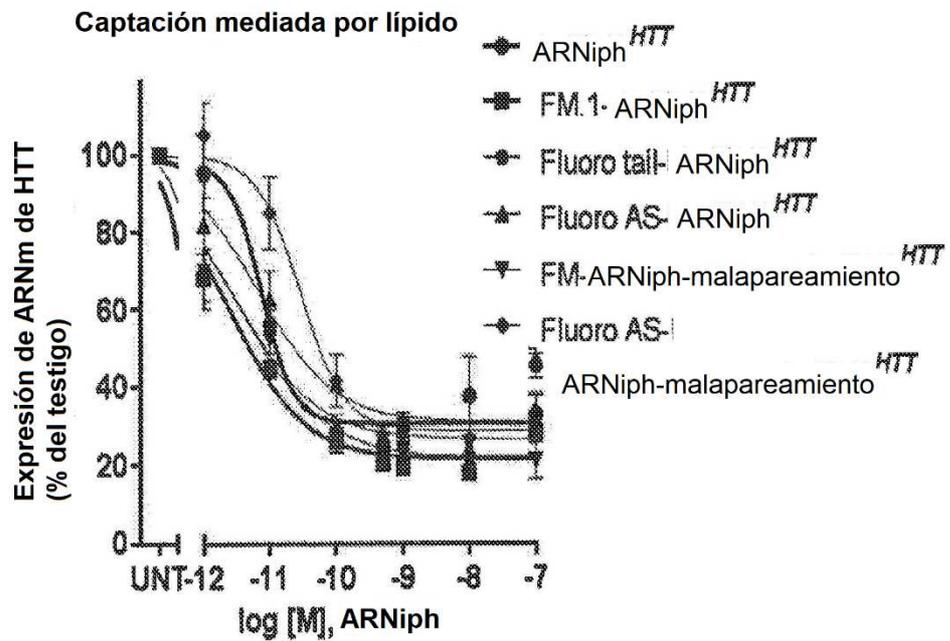


Fig. 36C

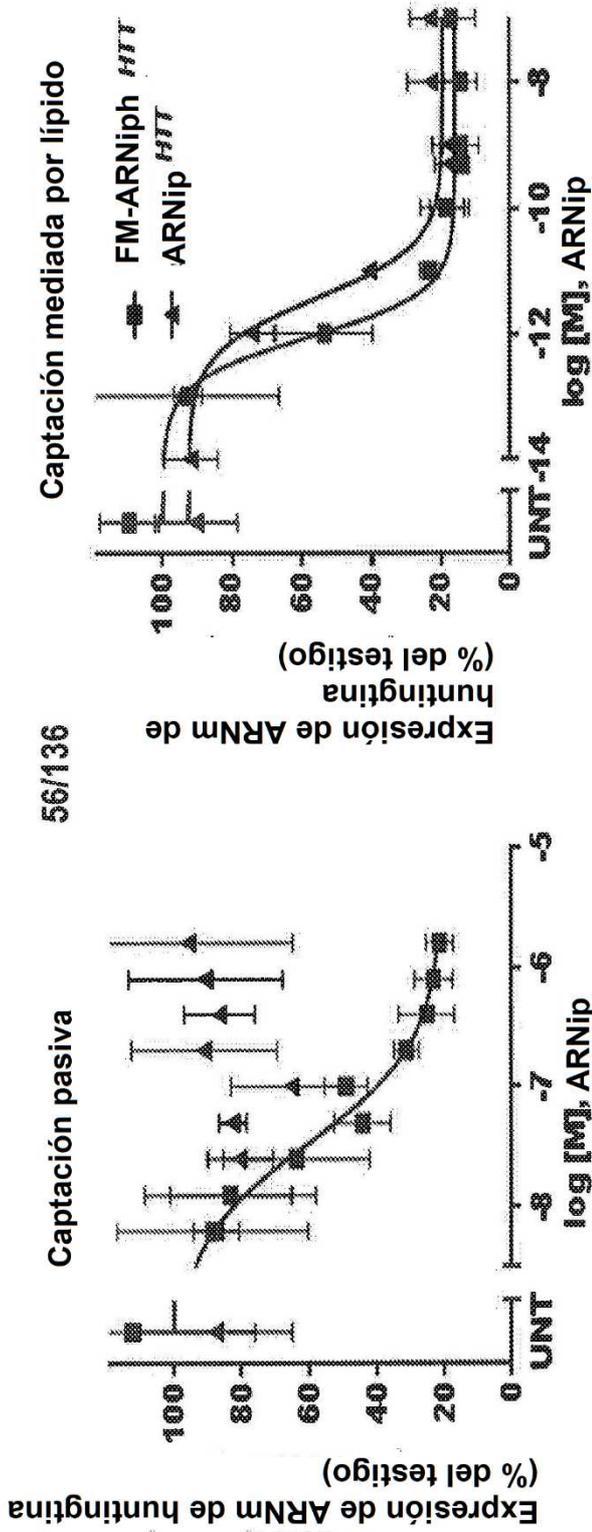


Fig. 37B

Fig. 37A

56/136

ARNip ^{HTT} / FM-ARNip ^{HTT}

C150 (Captación pasiva) / N/A / 33,5 nM

C150 (Captación mediada por lípido) / 3,5 pM / 0,9 pM

Fig. 37C

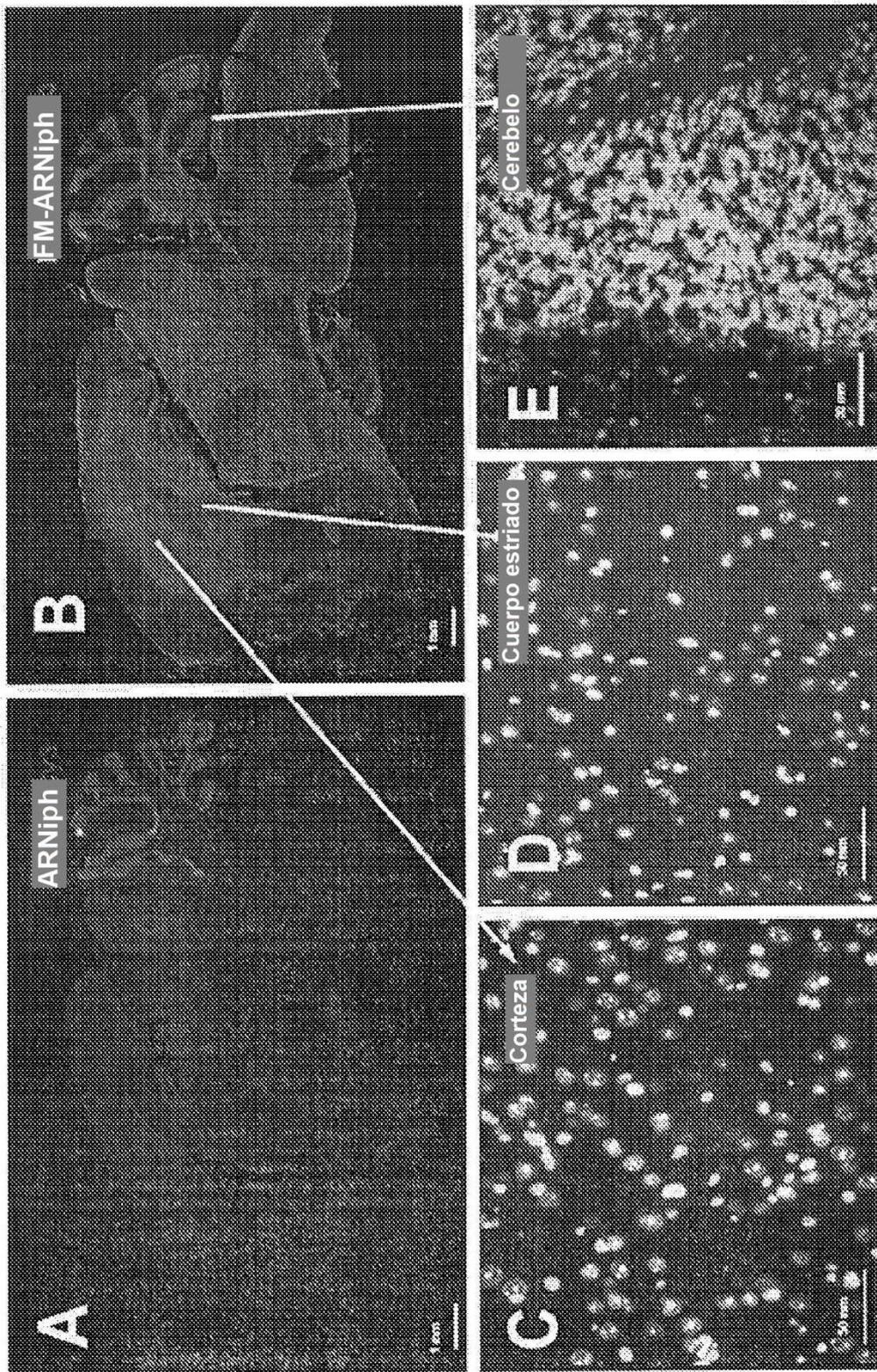


Fig. 38A-E

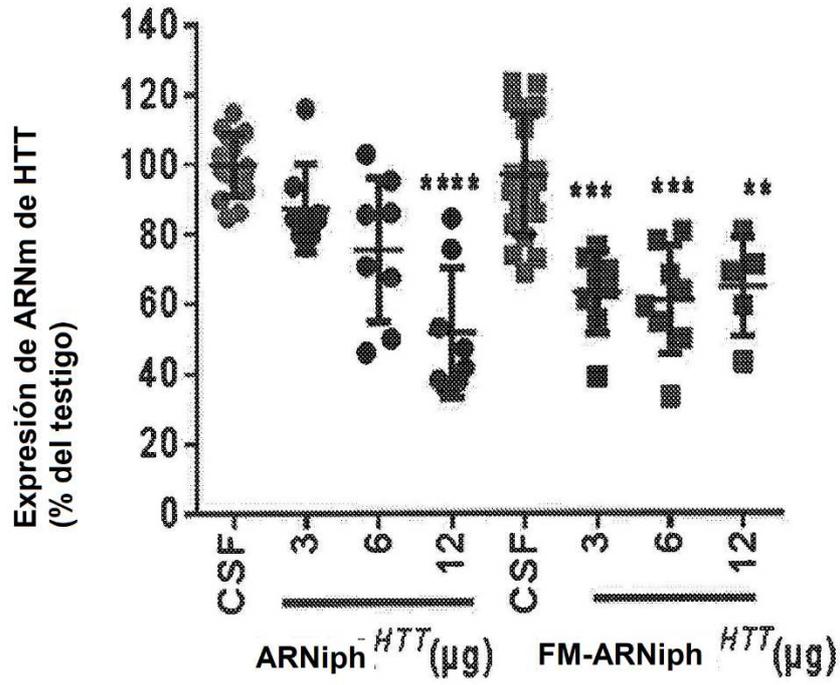


Fig. 39A

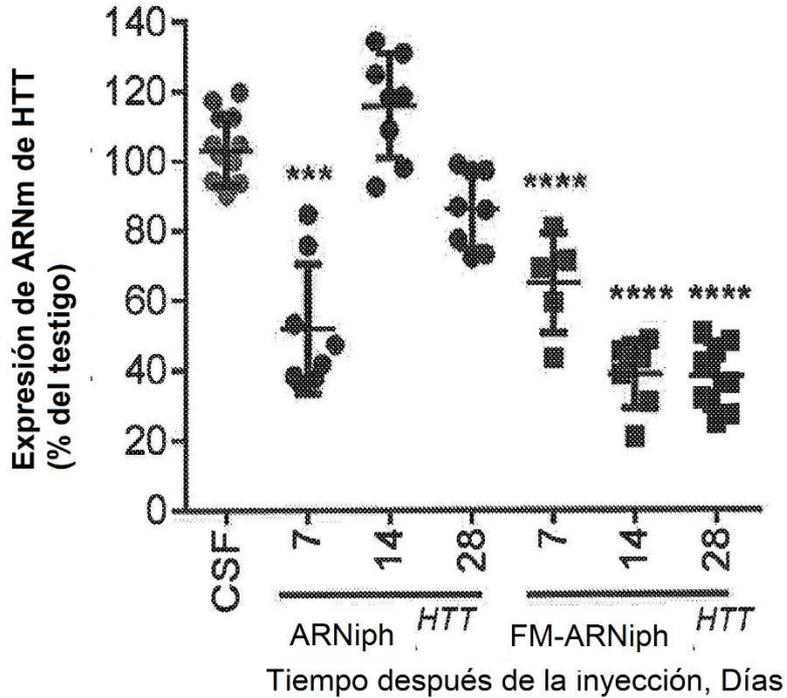


Fig. 39B

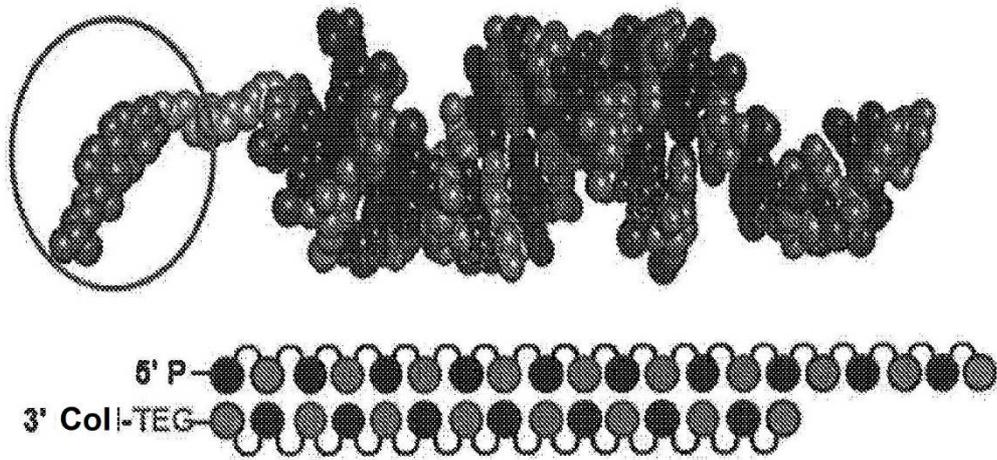


Fig. 40A

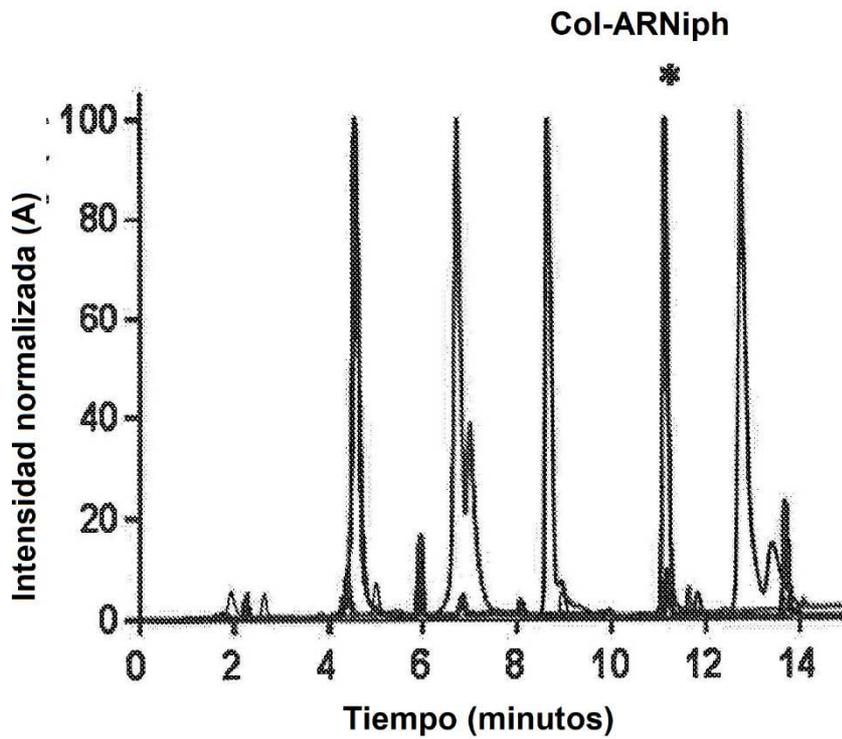


Fig. 40B

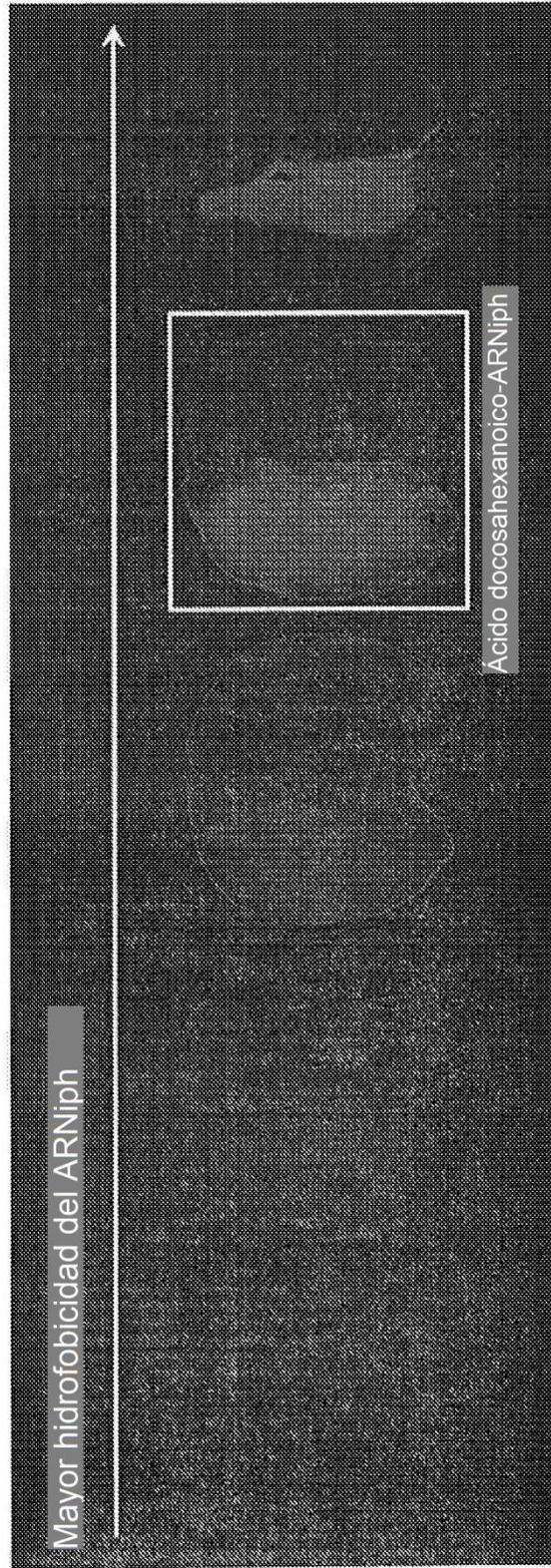


Fig. 41

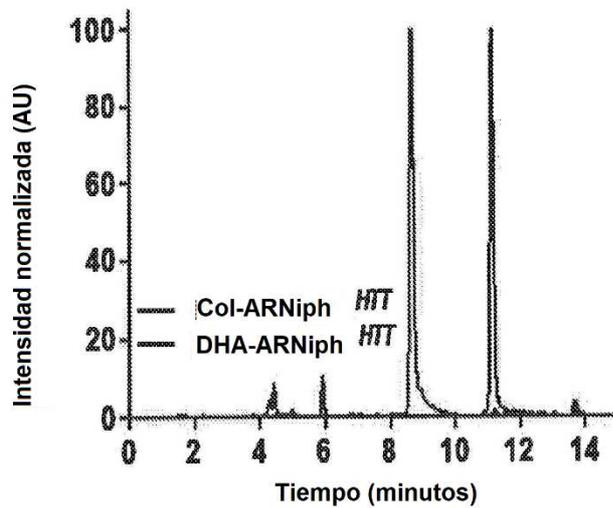
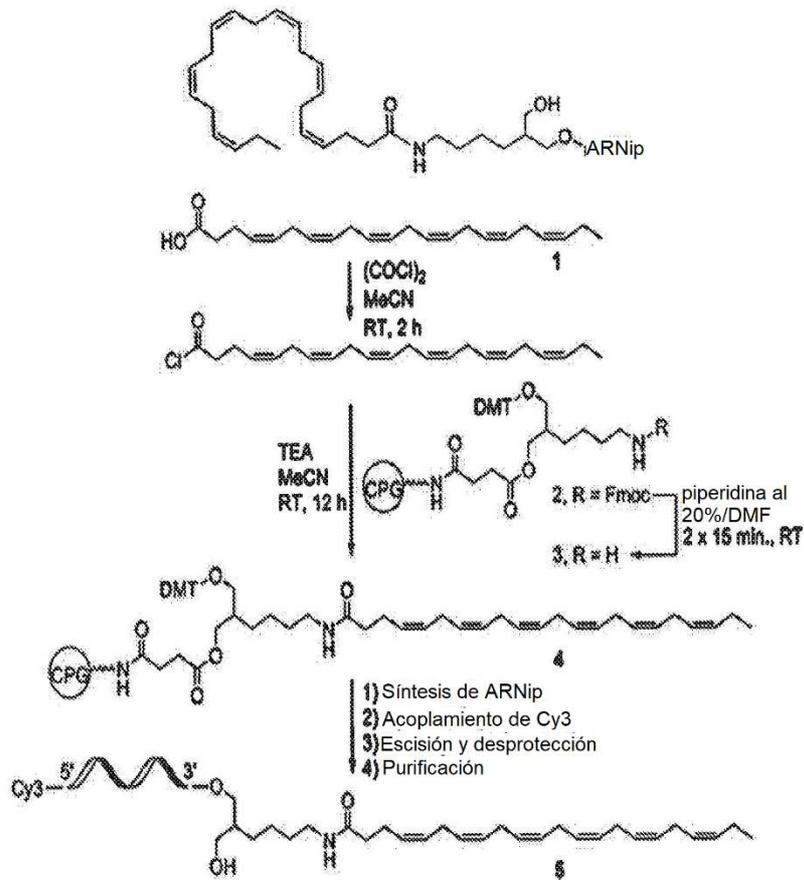


Fig. 42

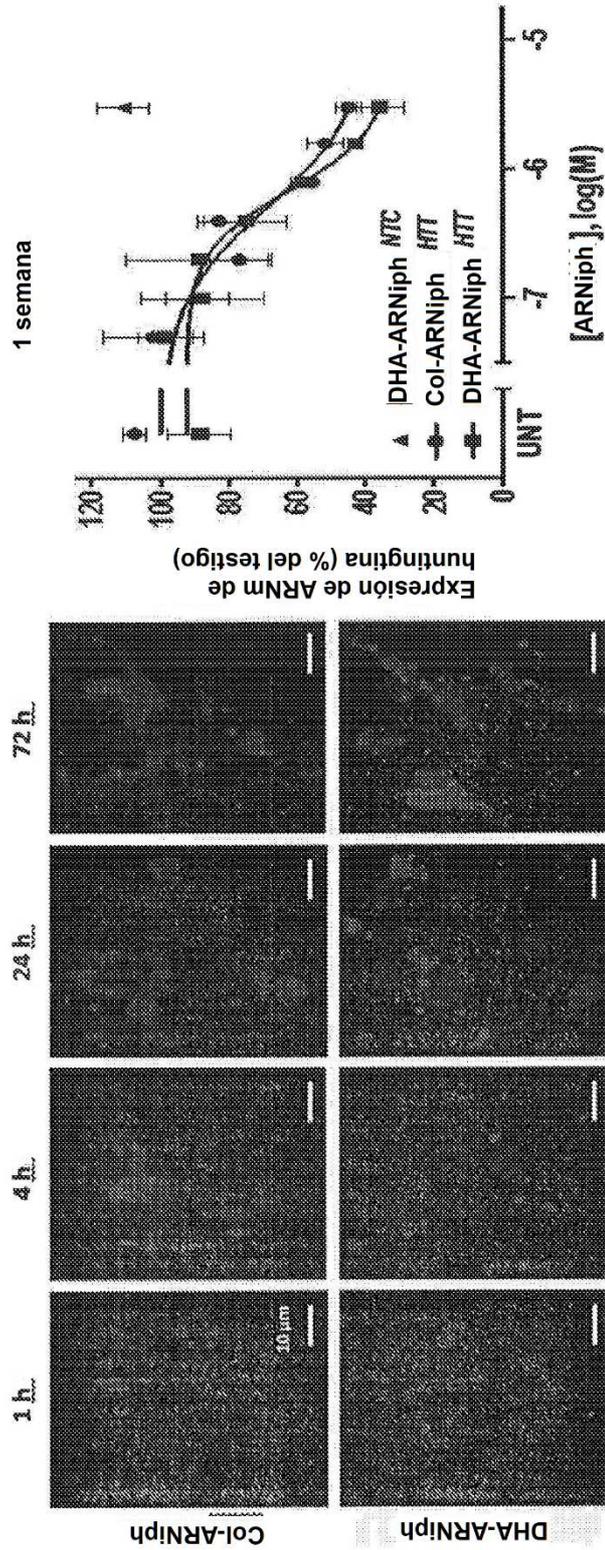


Fig. 43

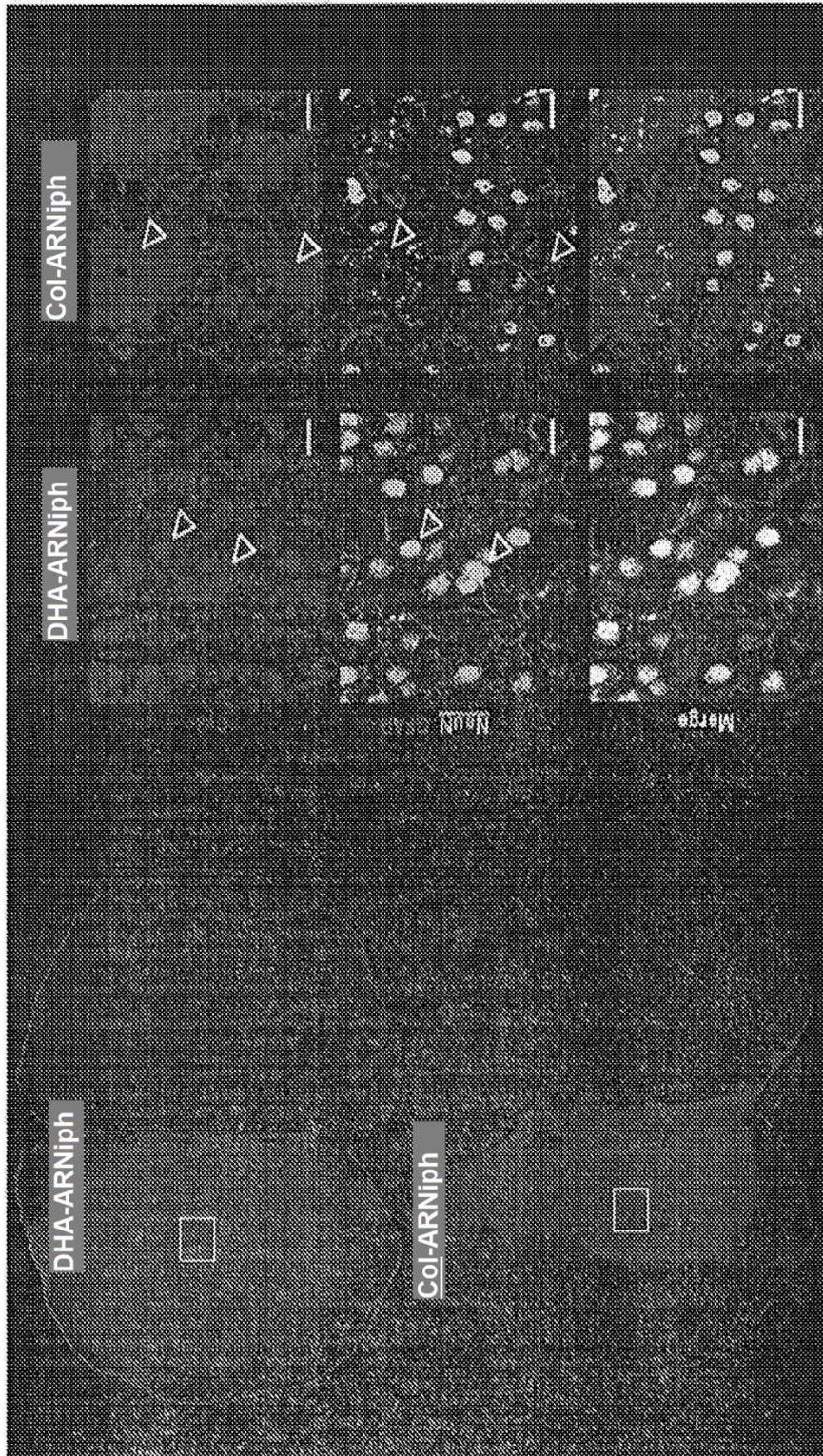


Fig. 44

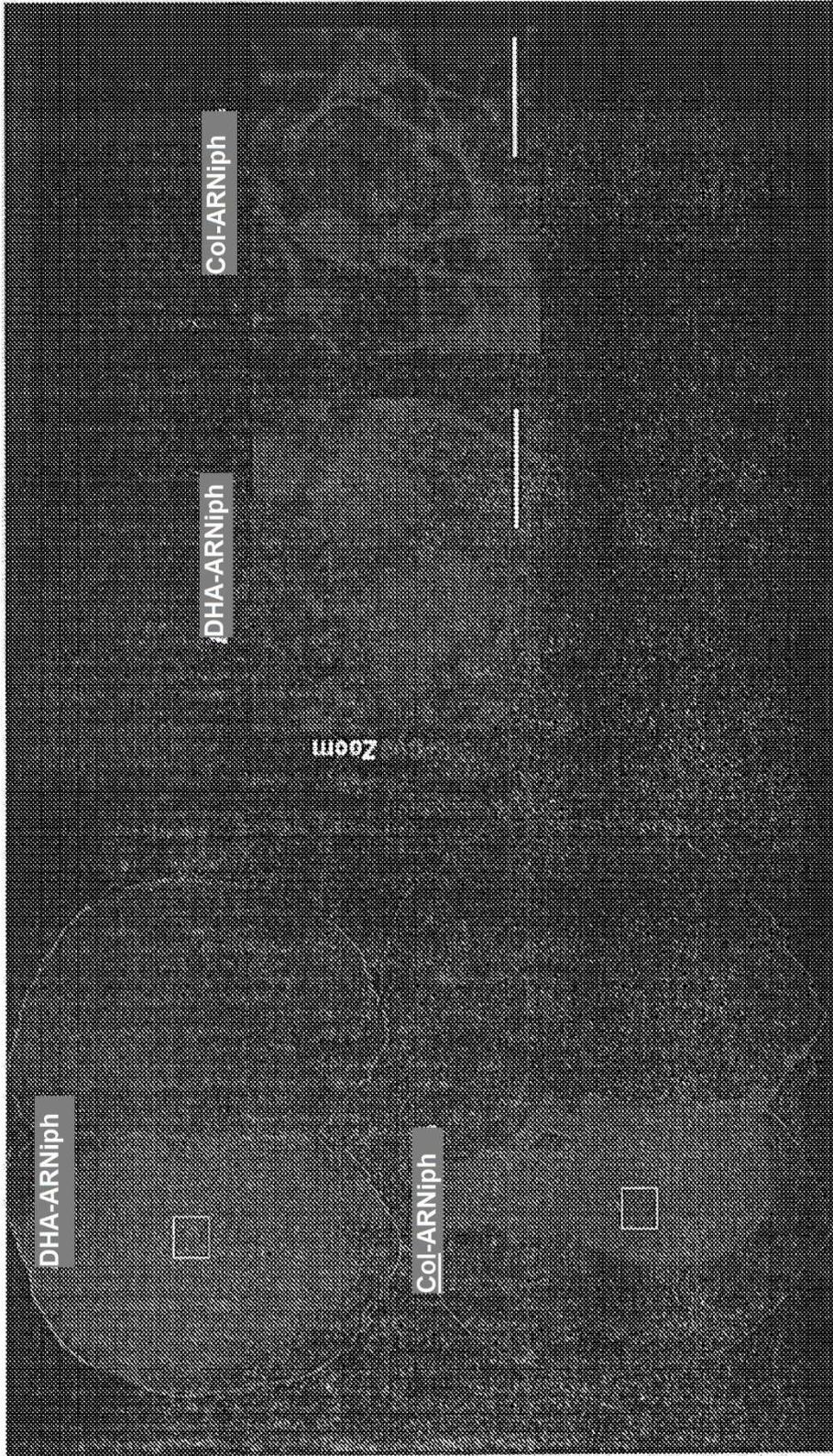


Fig. 45

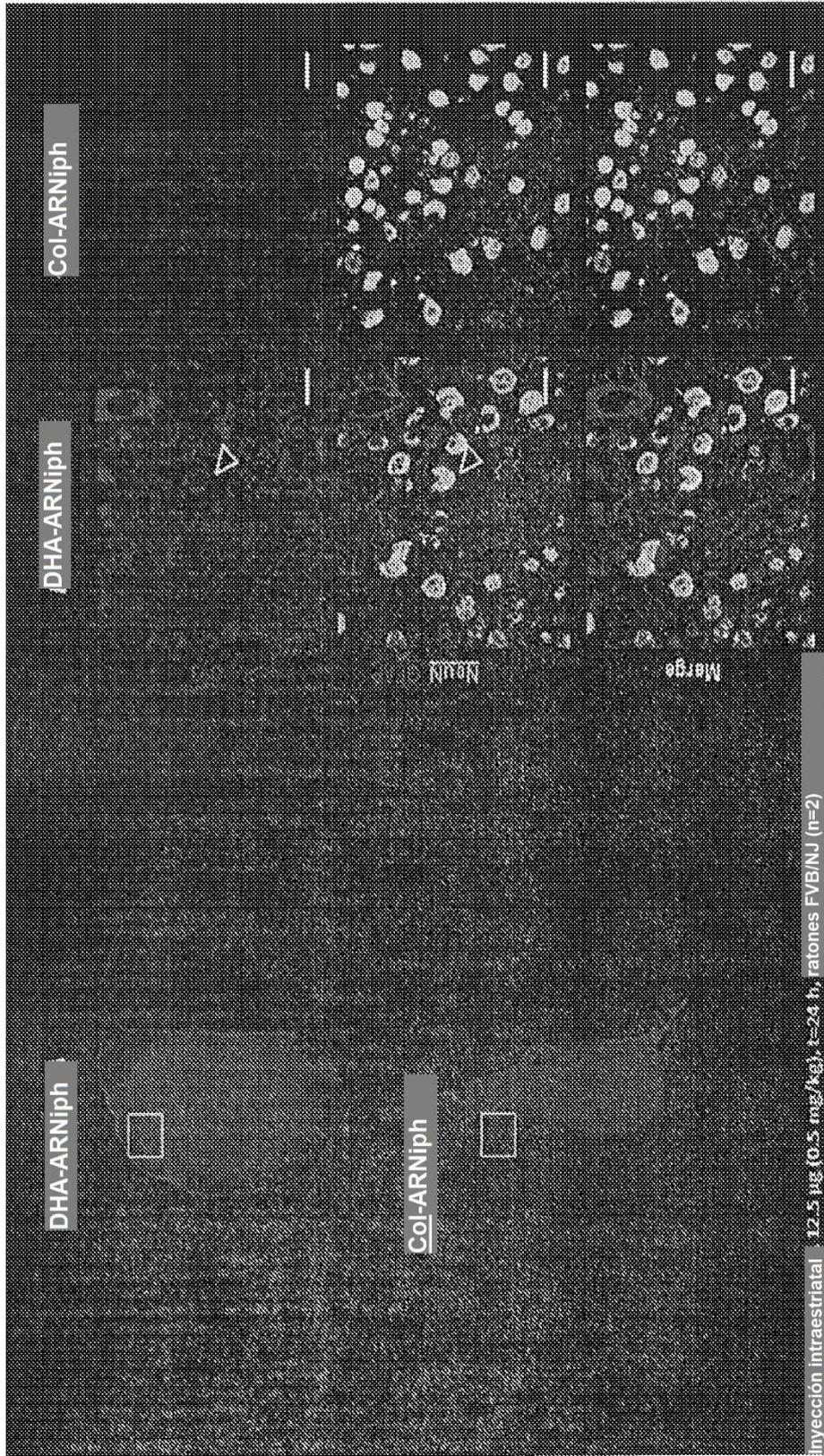


Fig. 46

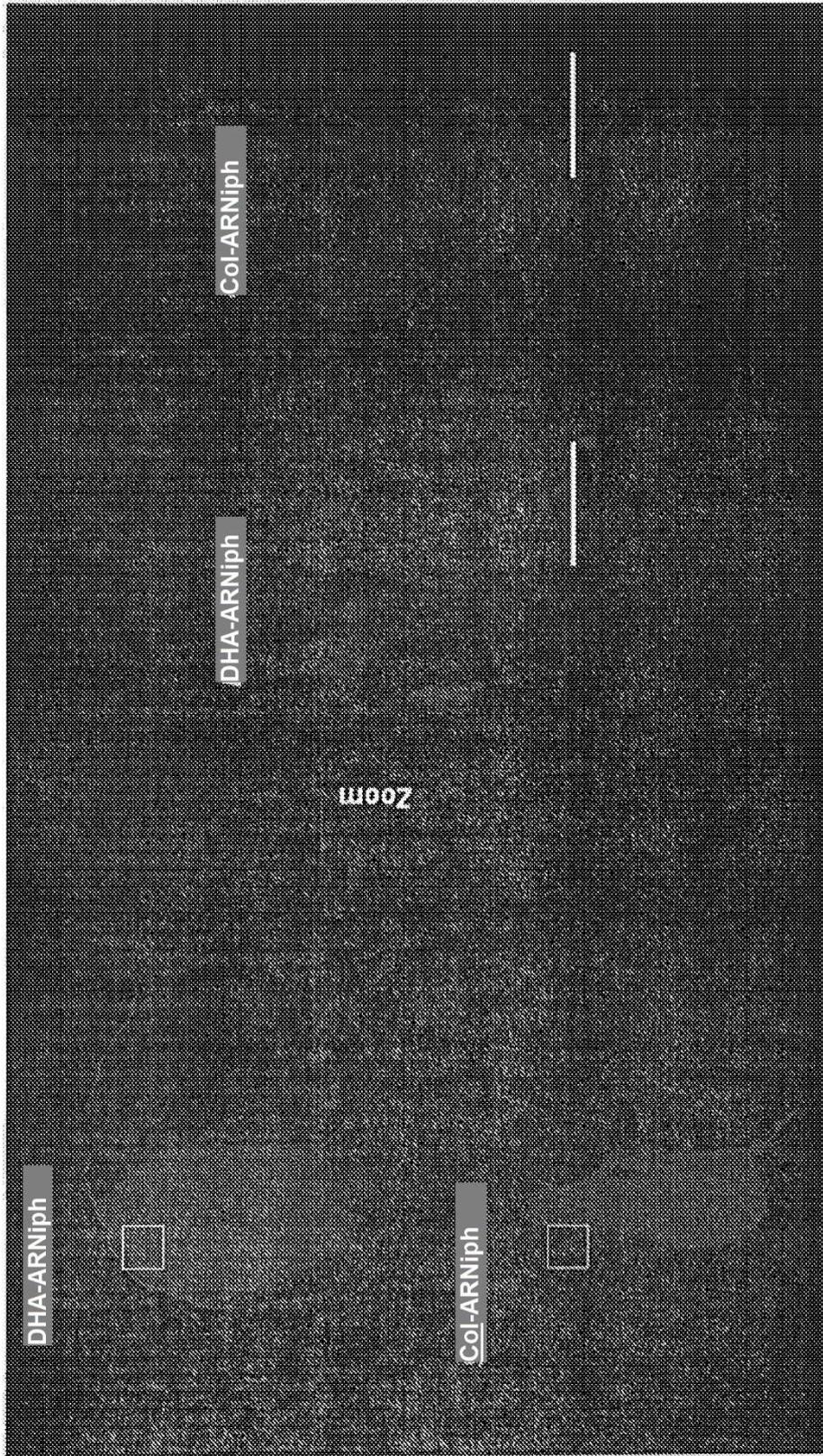


Fig. 47

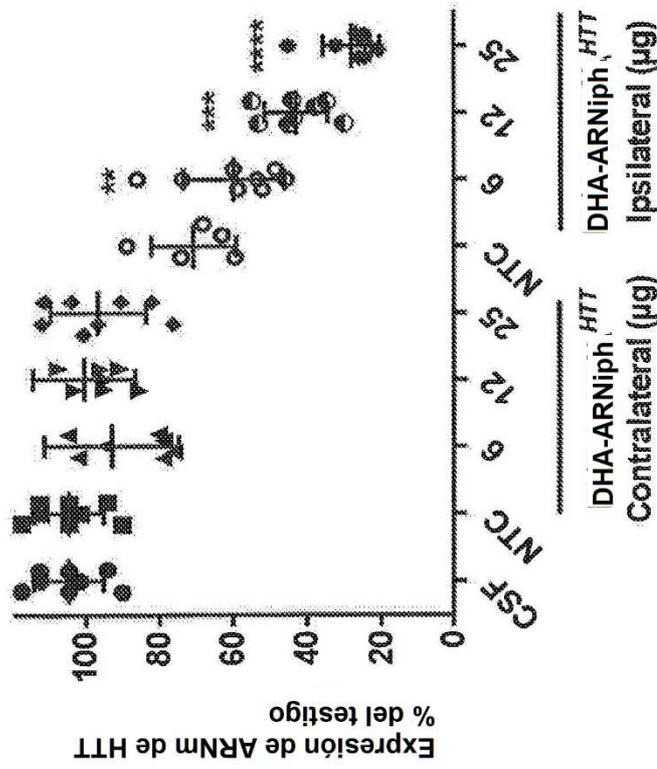
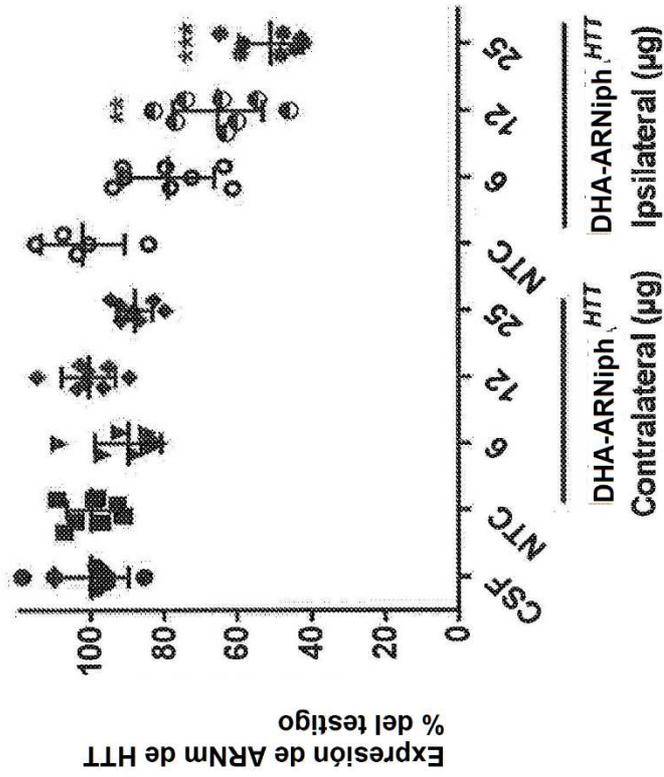


Fig. 48

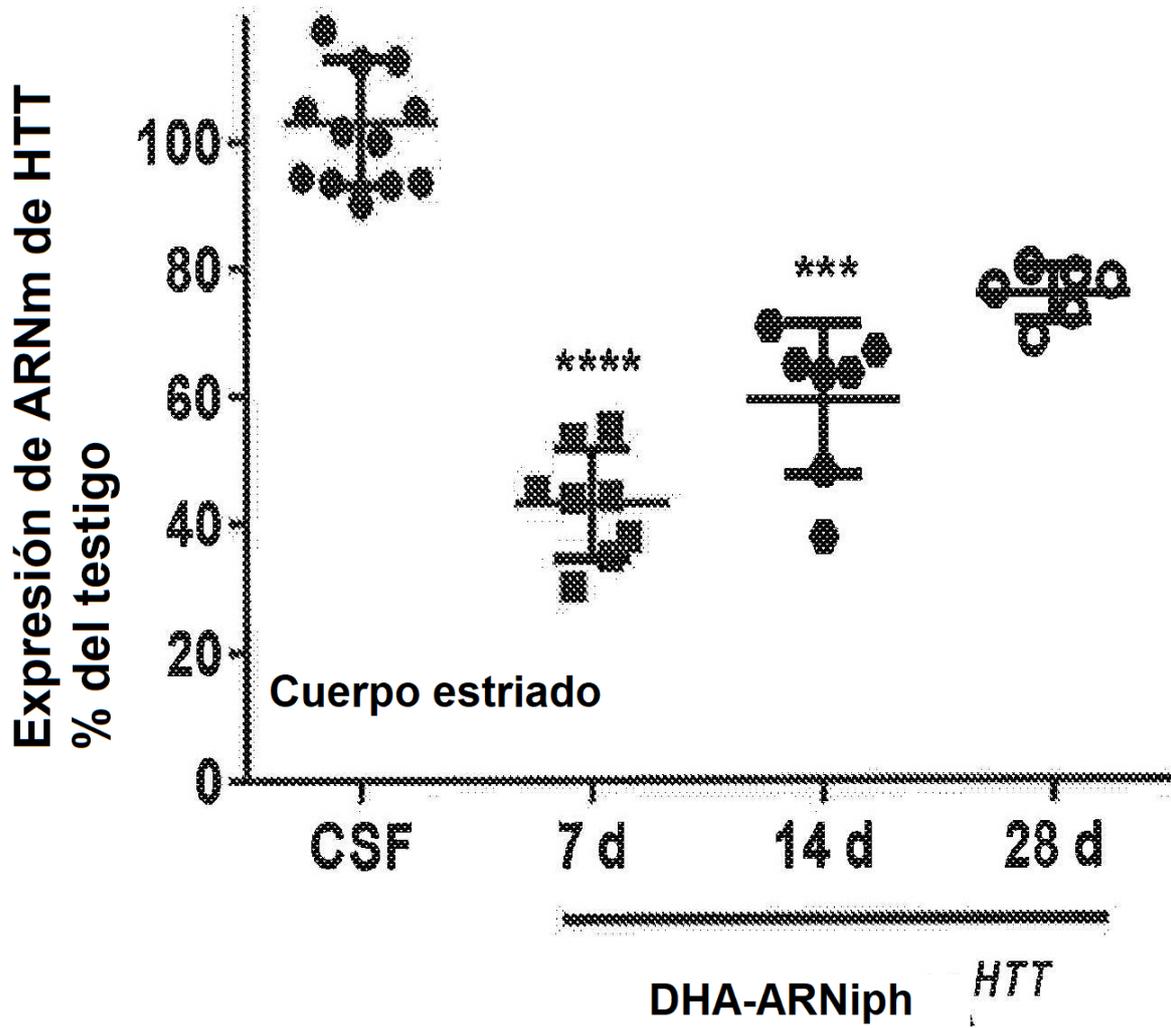


Fig. 49

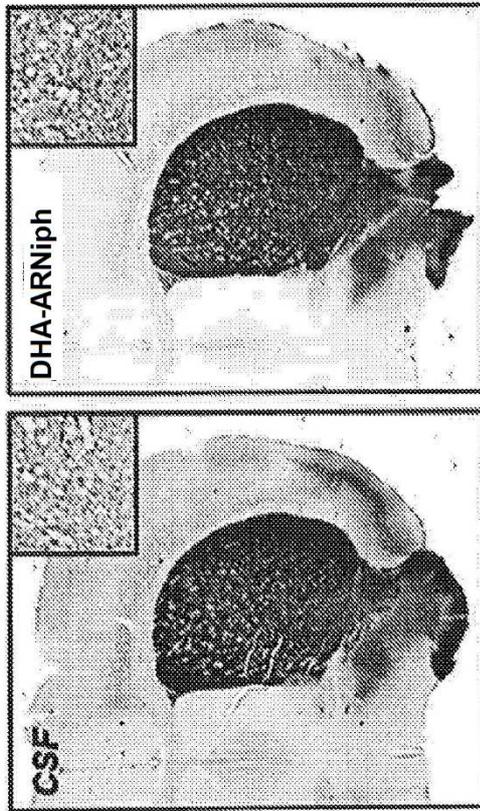
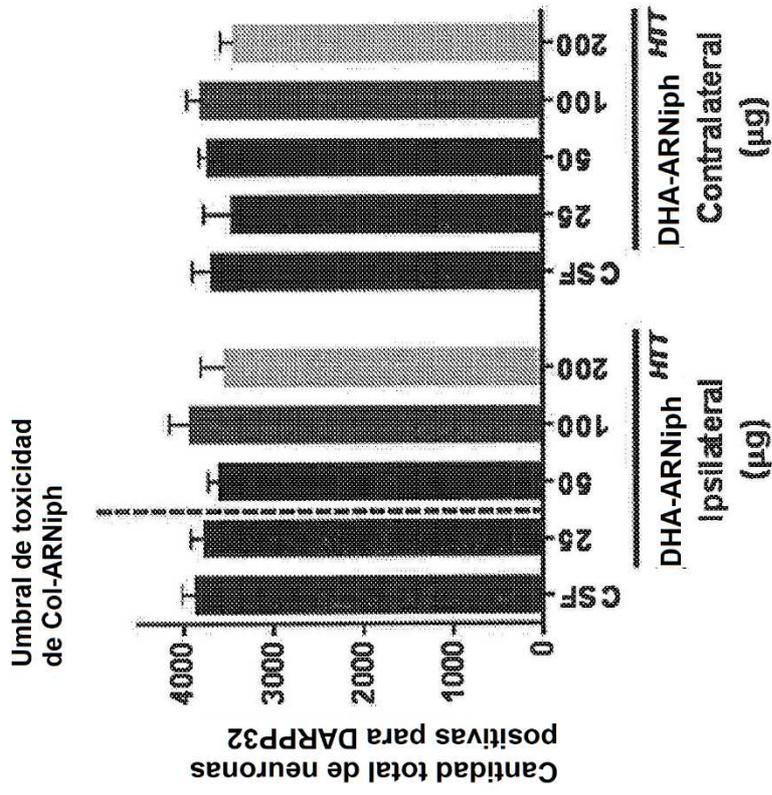


Fig. 50

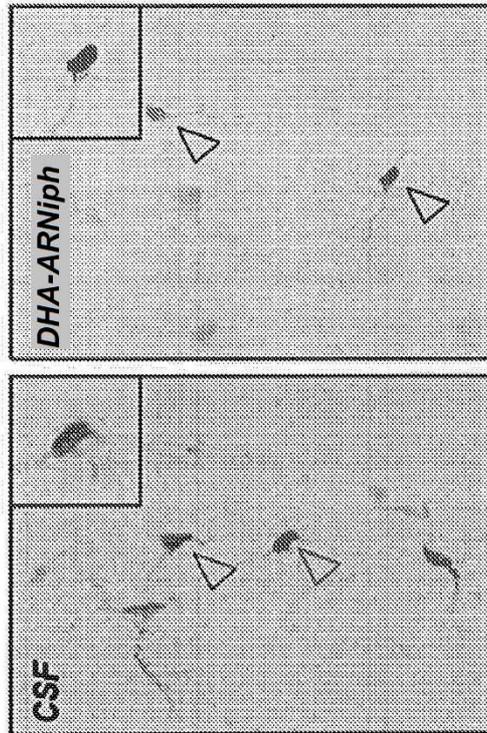
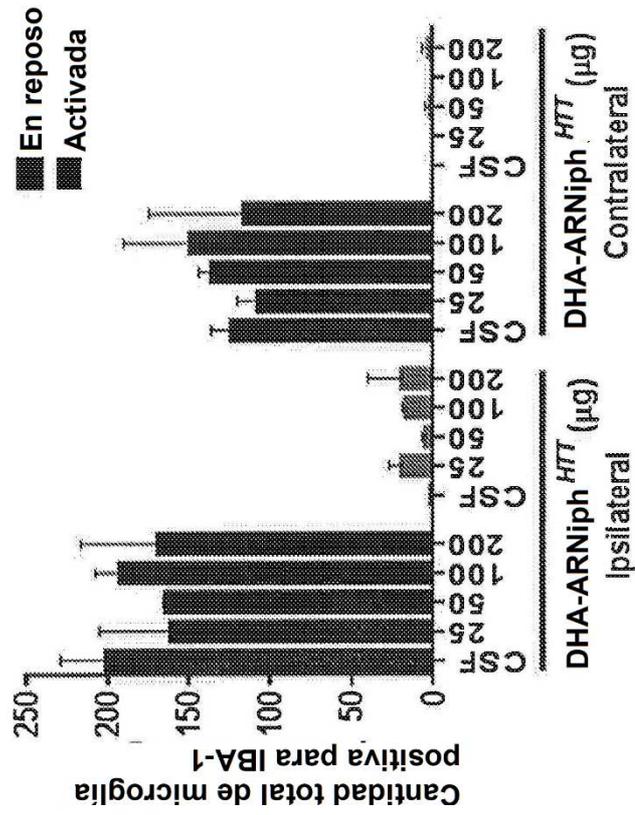


Fig. 51

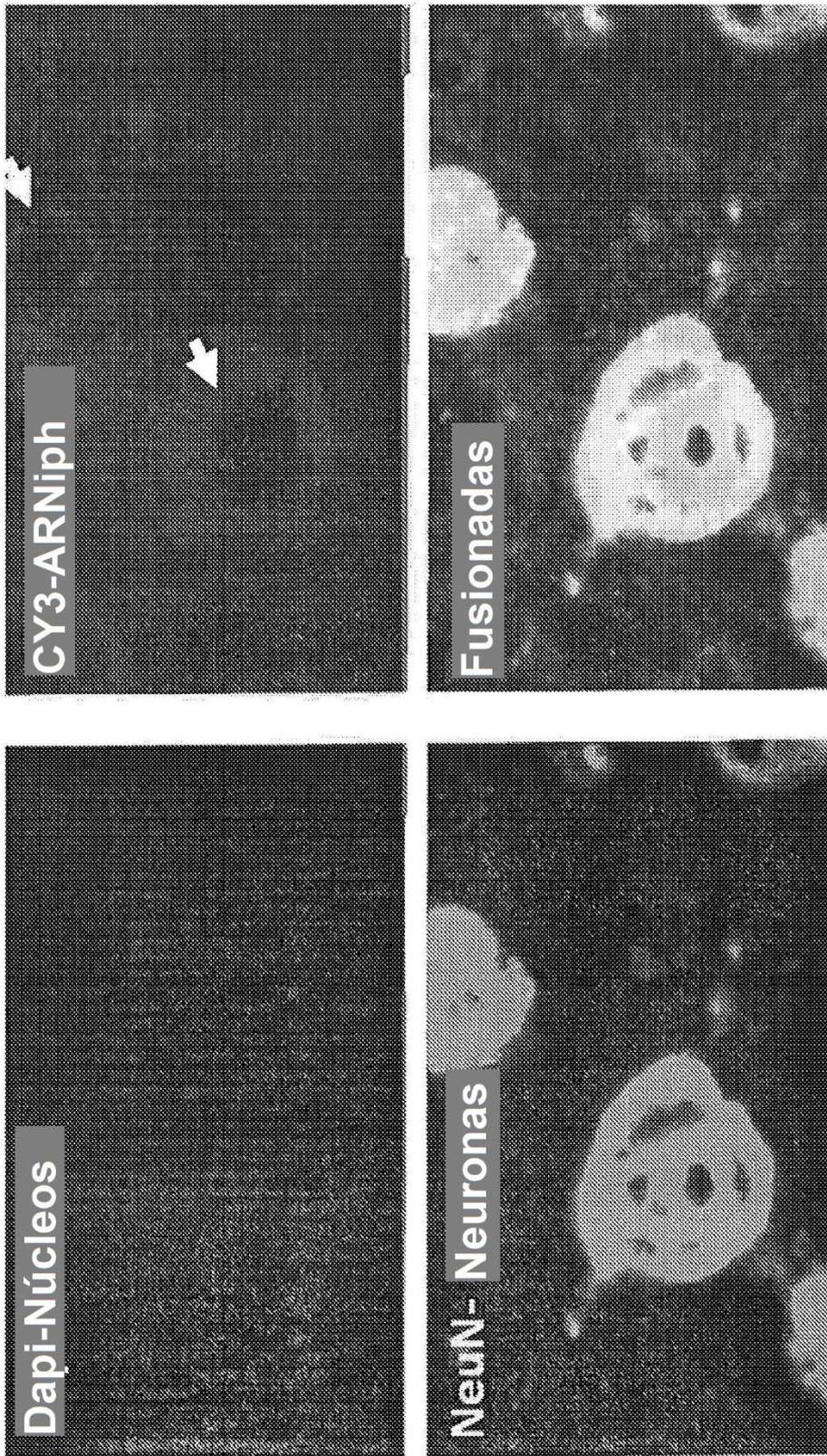


Fig. 52

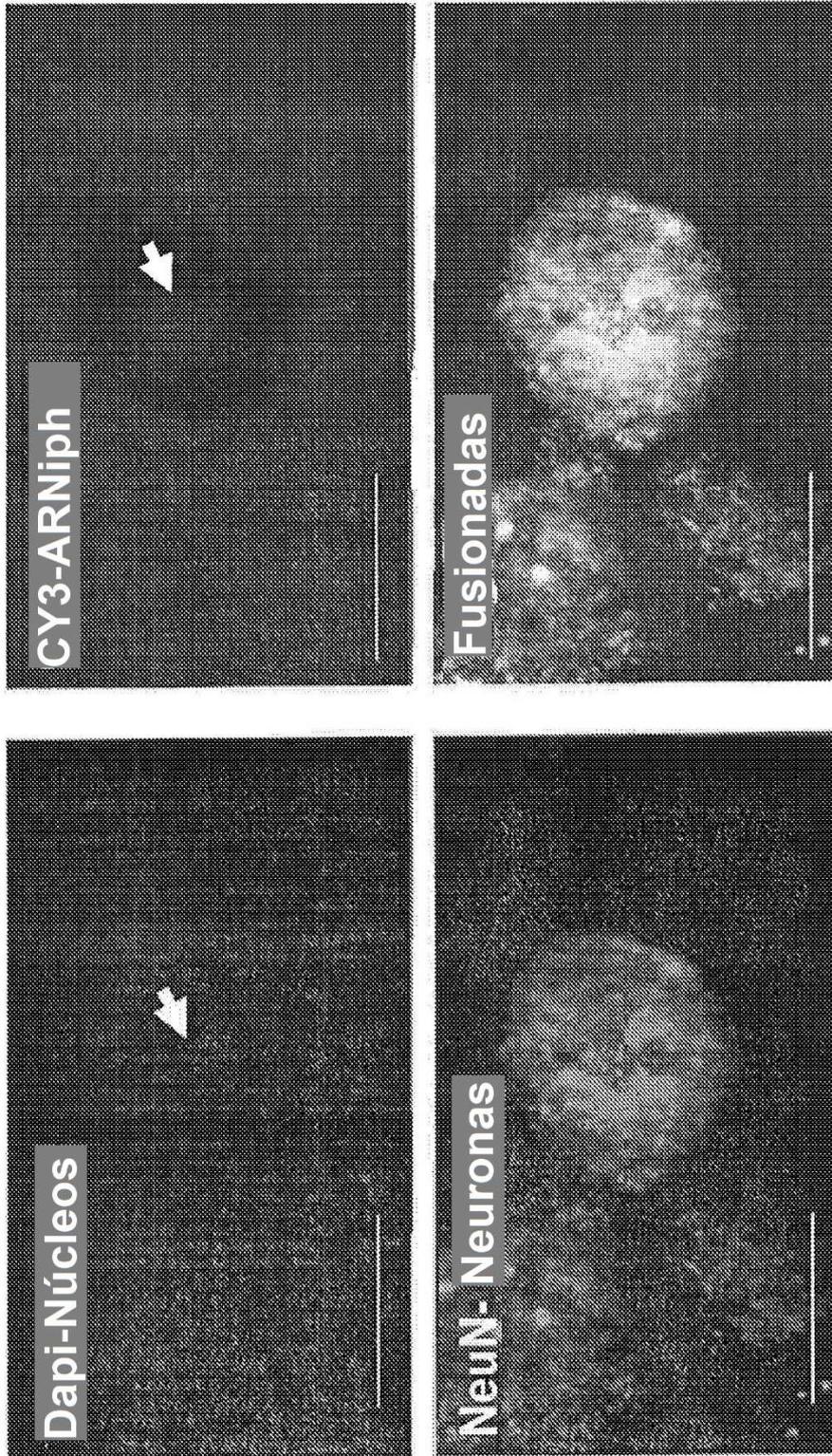
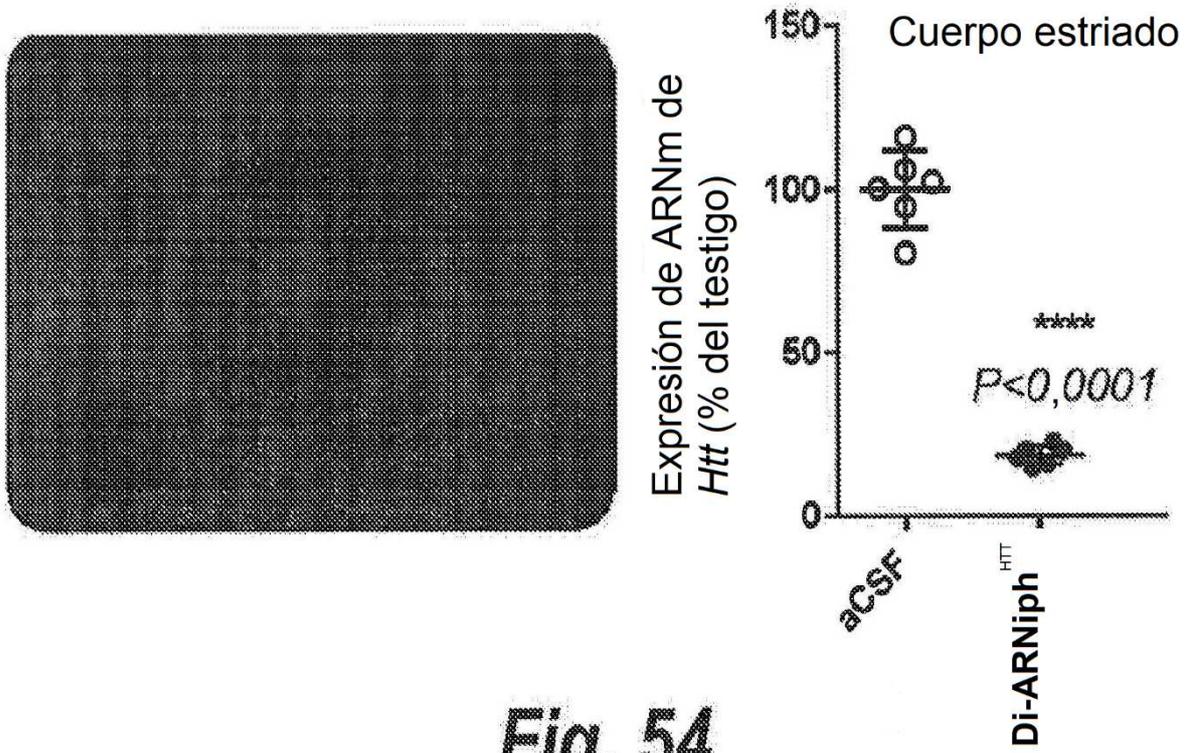


Fig. 53



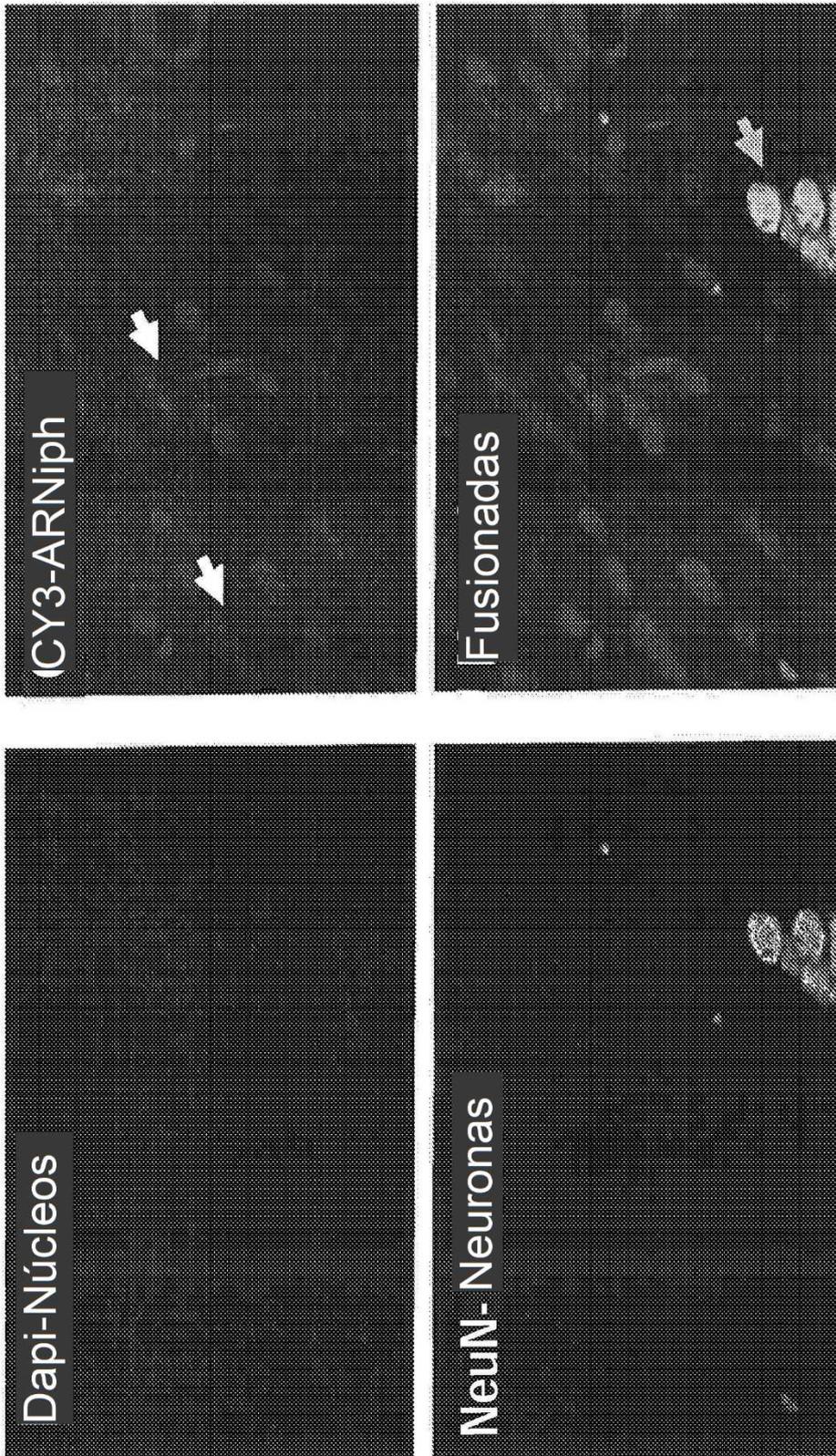


Fig. 55

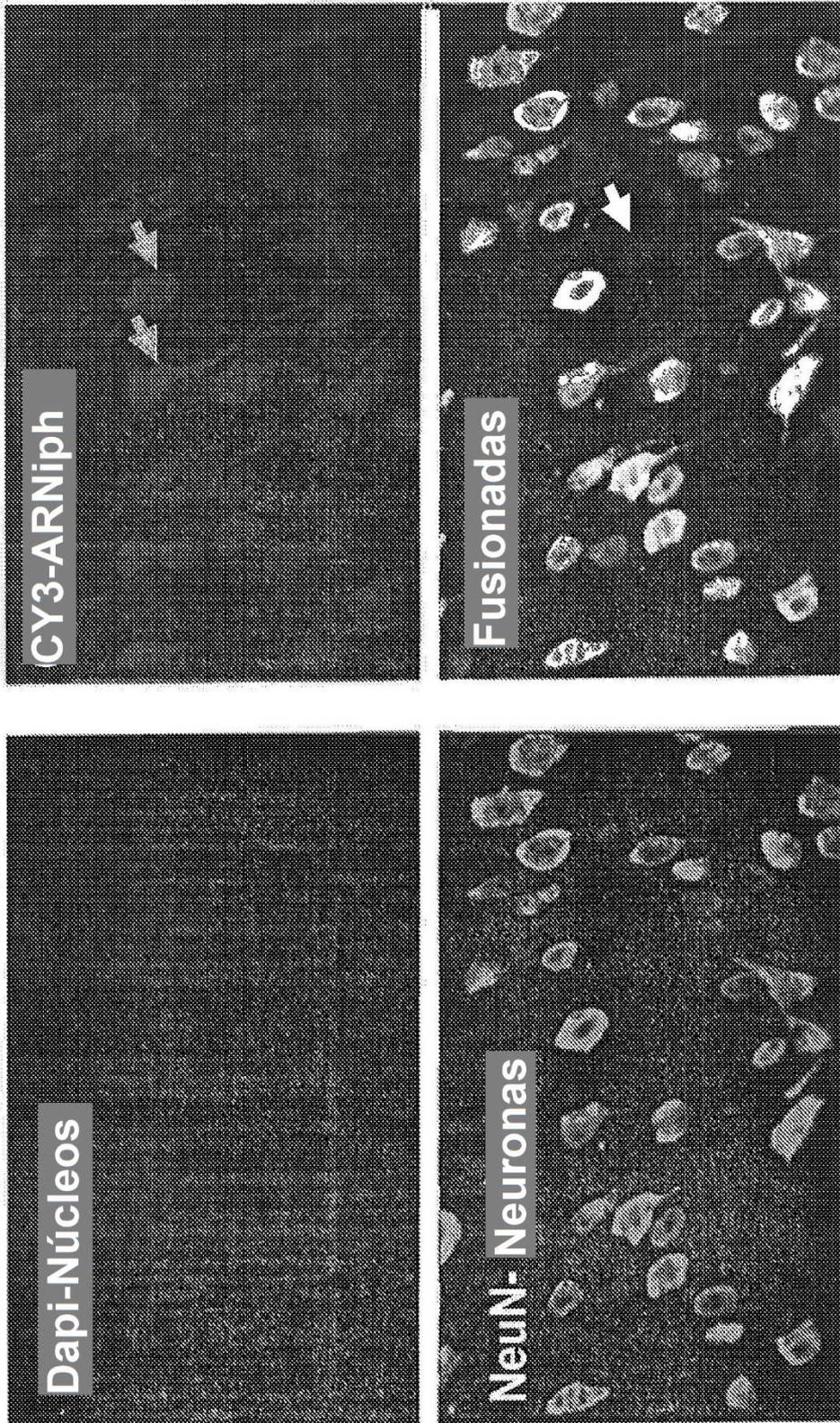


Fig. 56

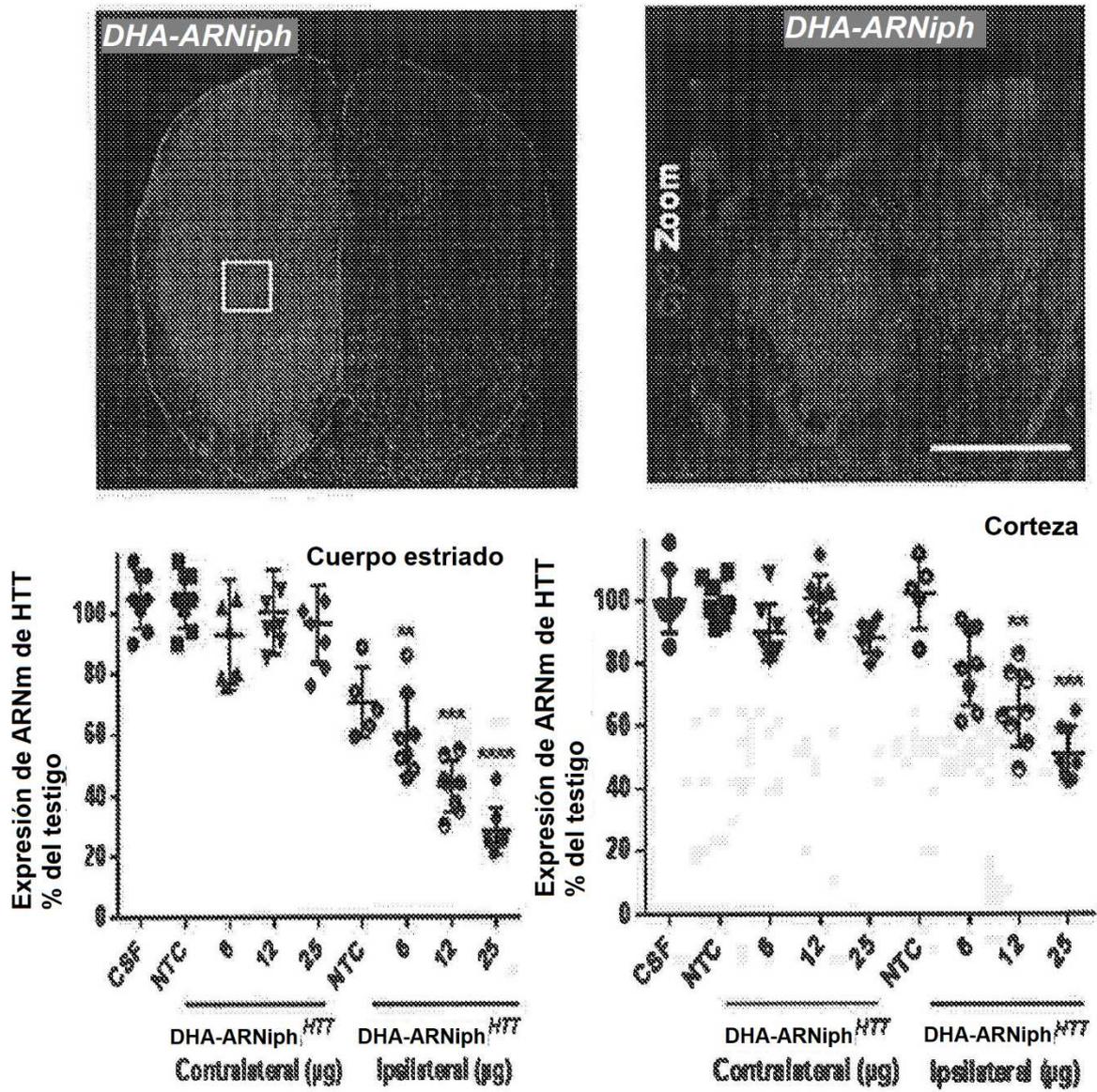


Fig. 57

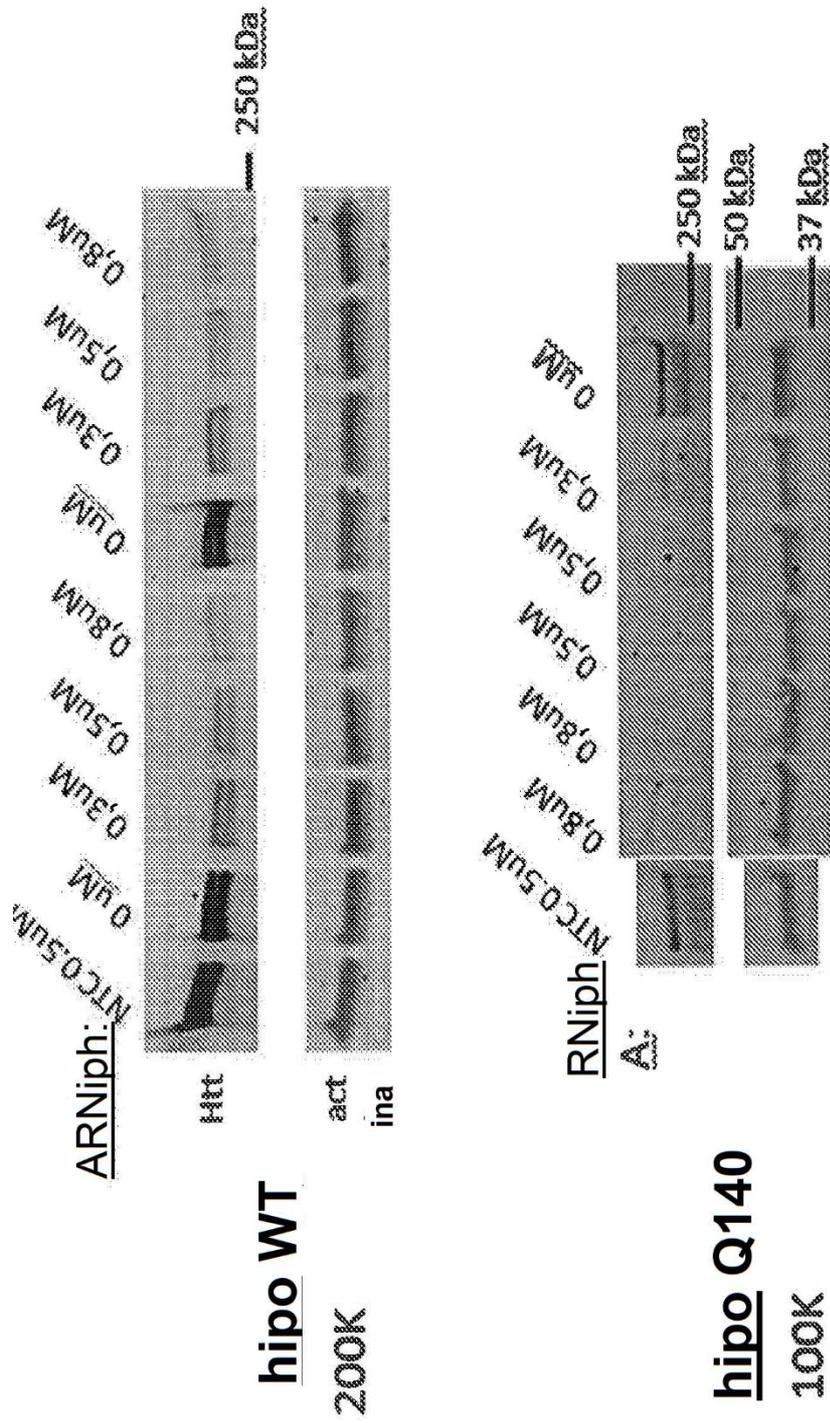


Fig. 58

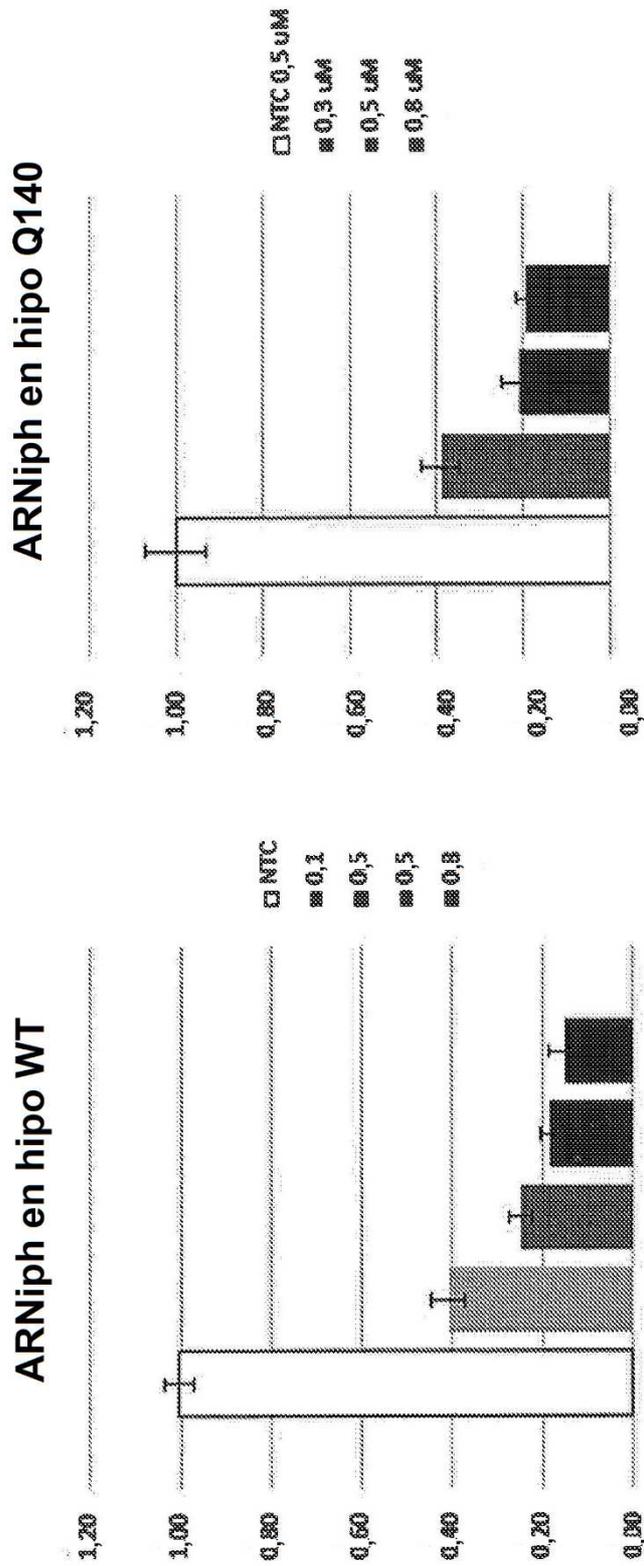


Fig. 59

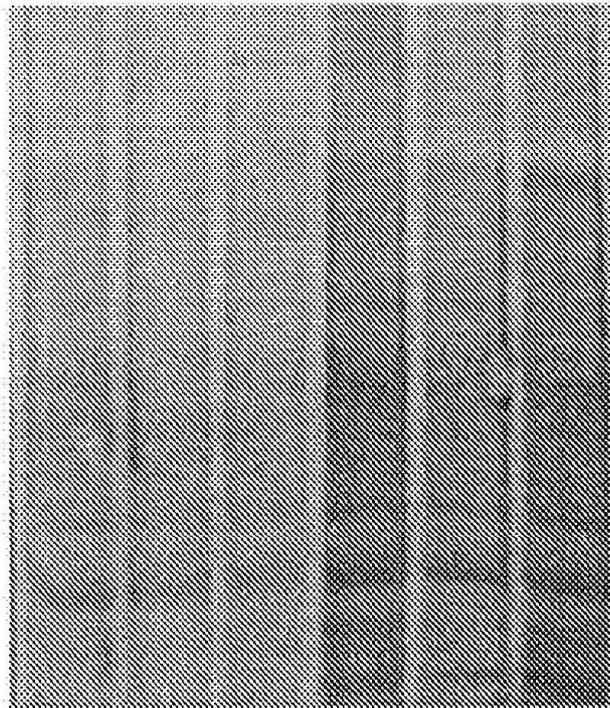
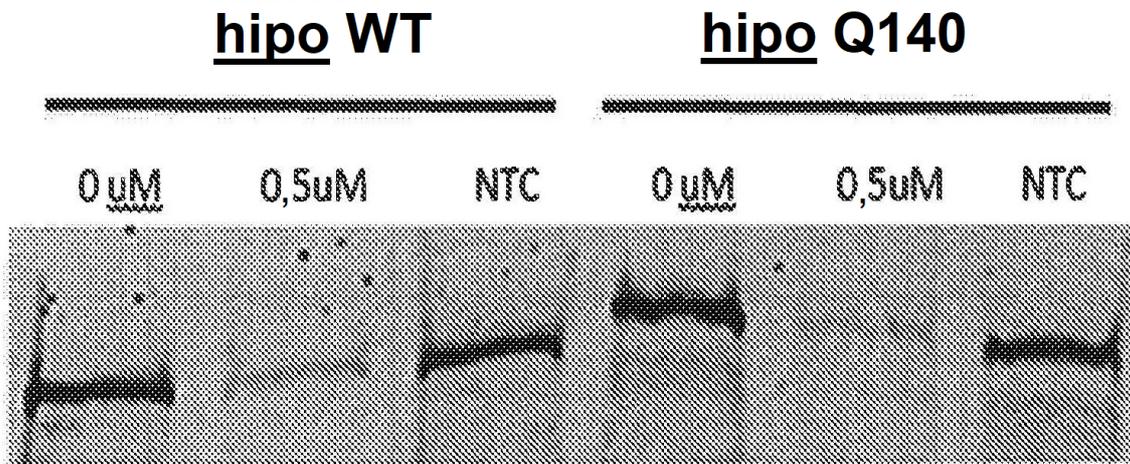


Fig. 60

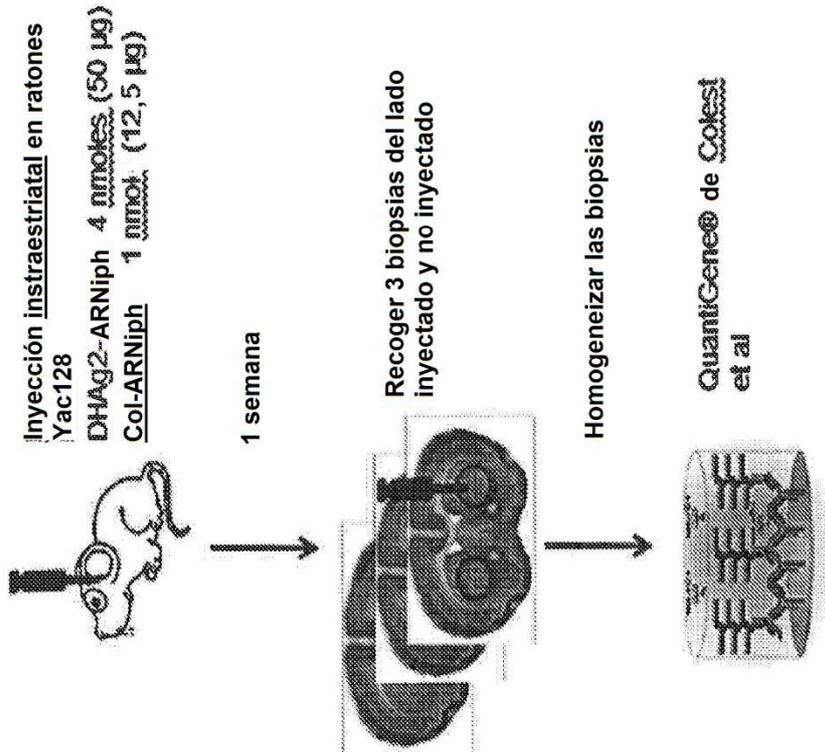
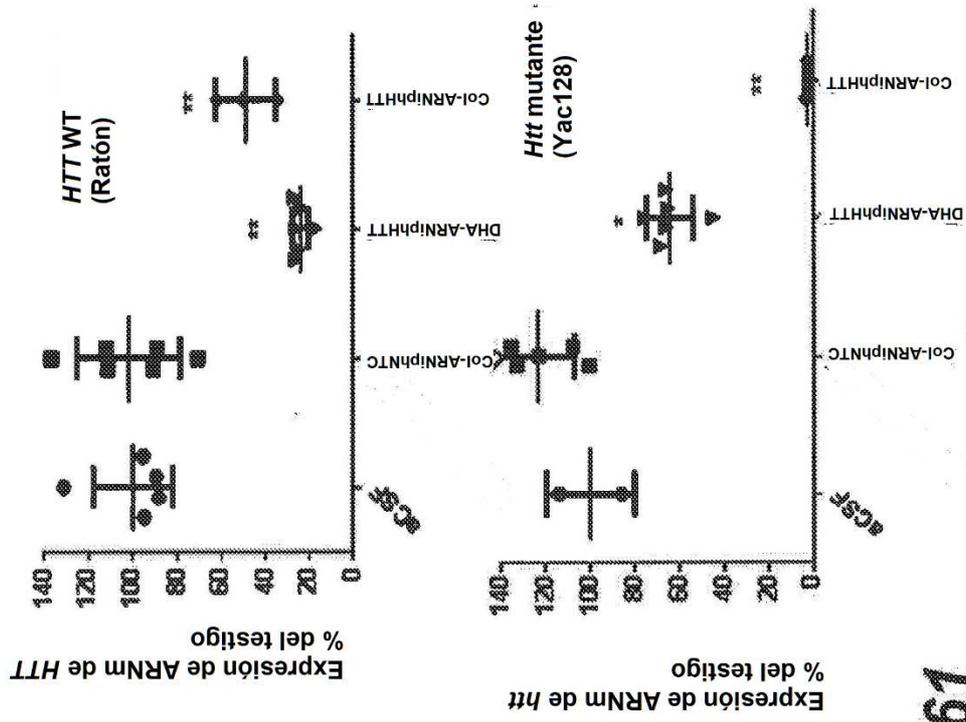


Fig. 61

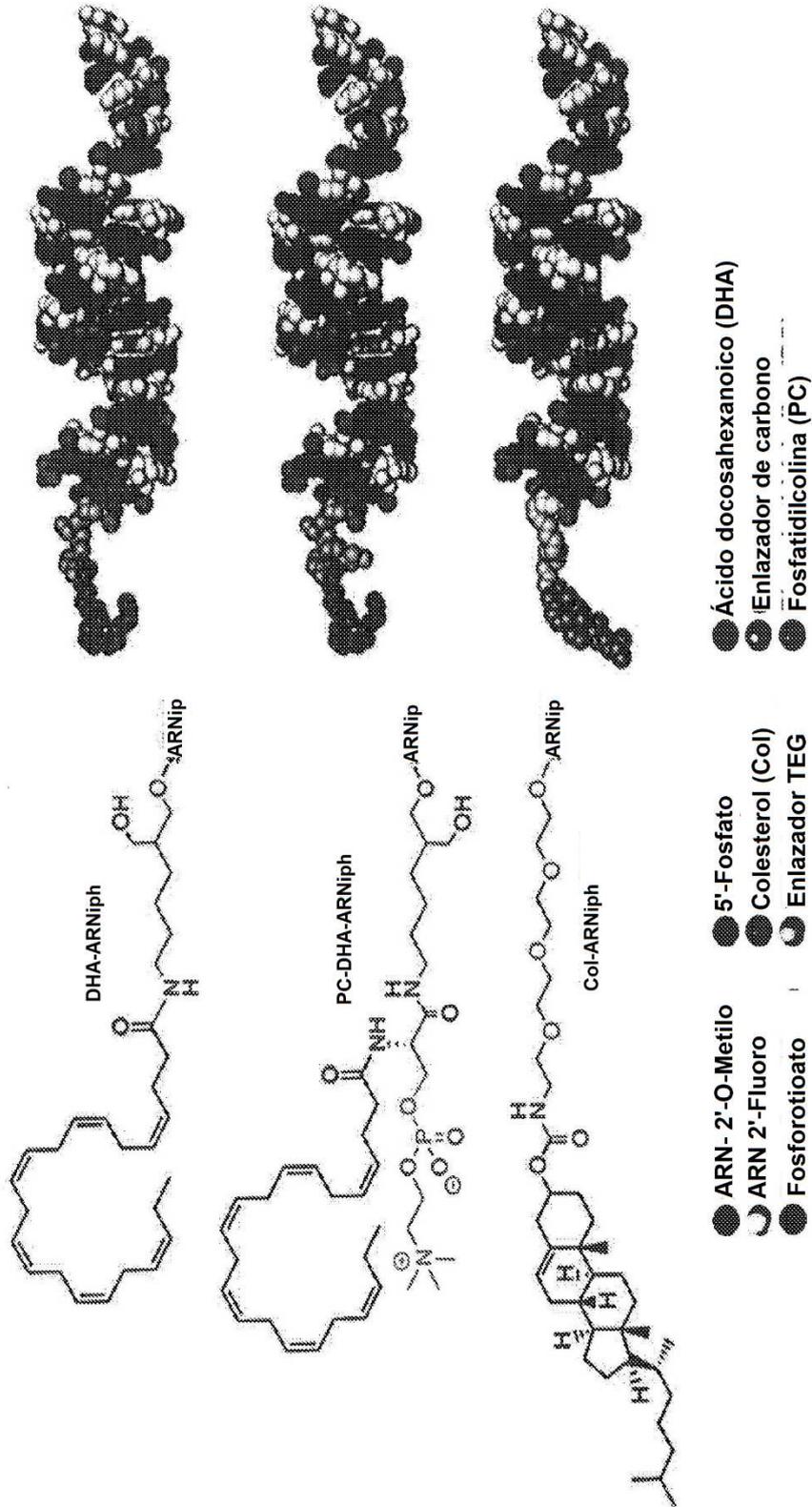


Fig. 62

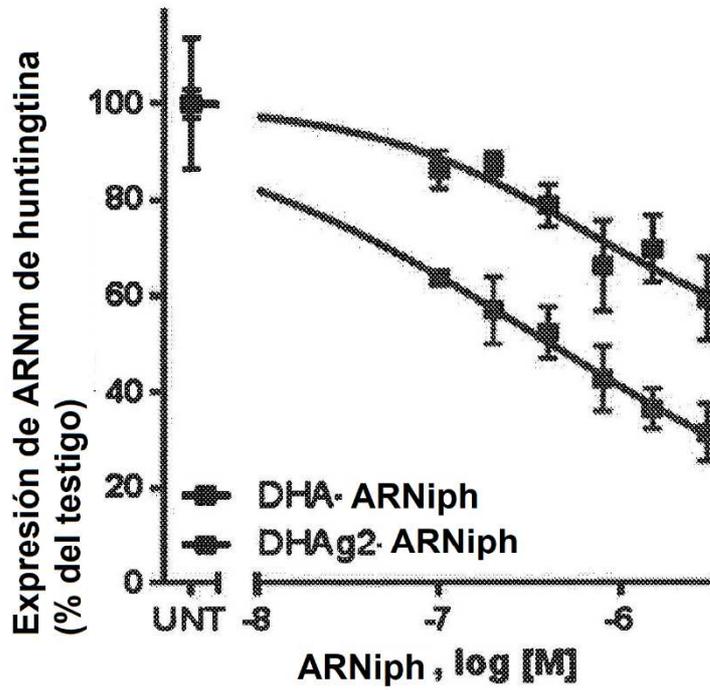


Fig. 63A

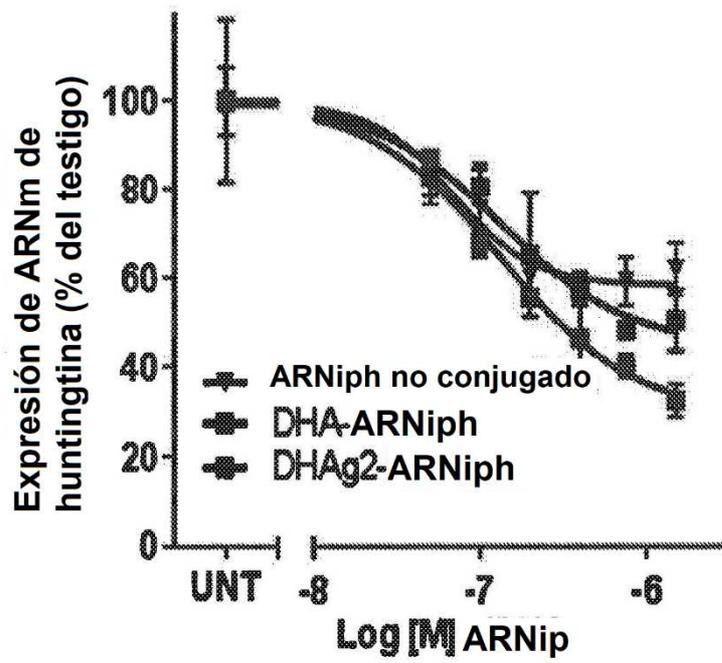


Fig. 63B

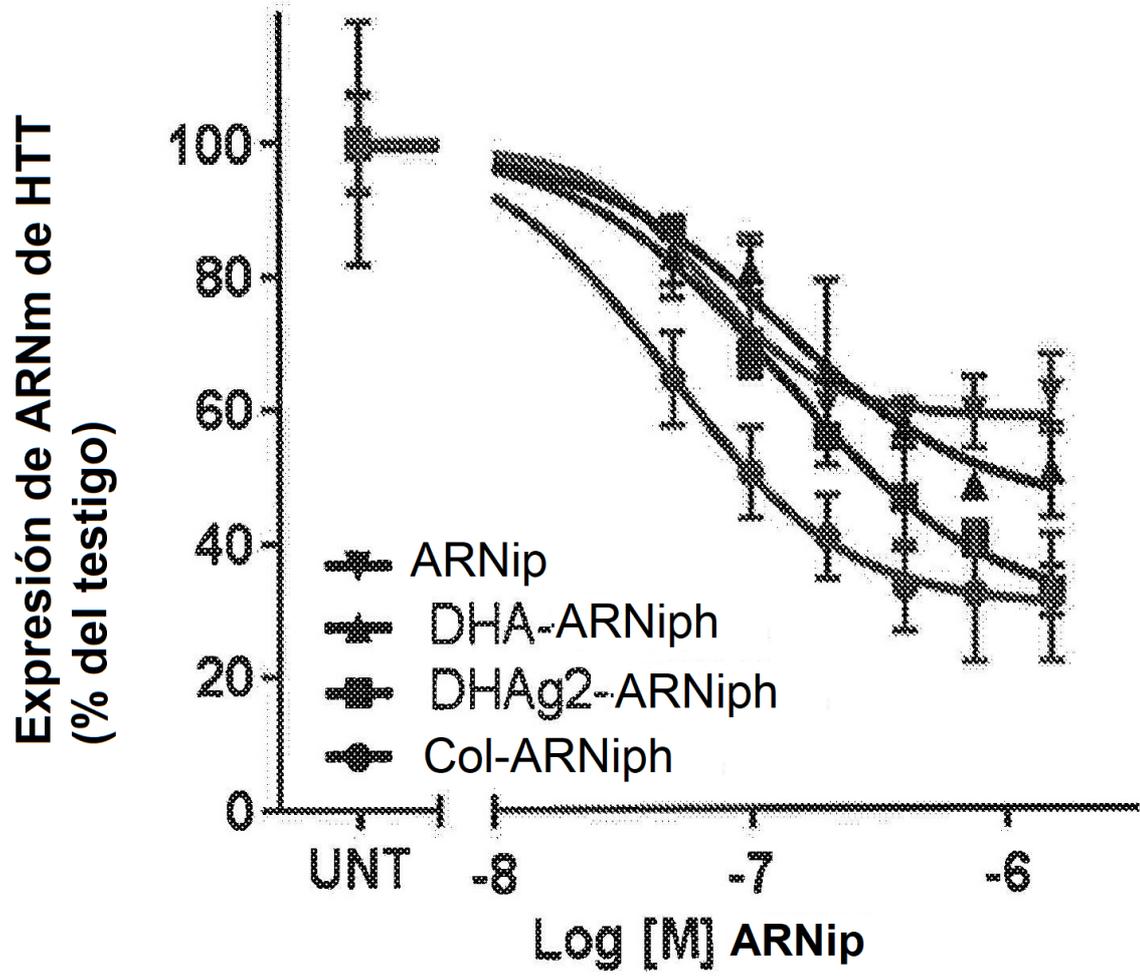


Fig. 64

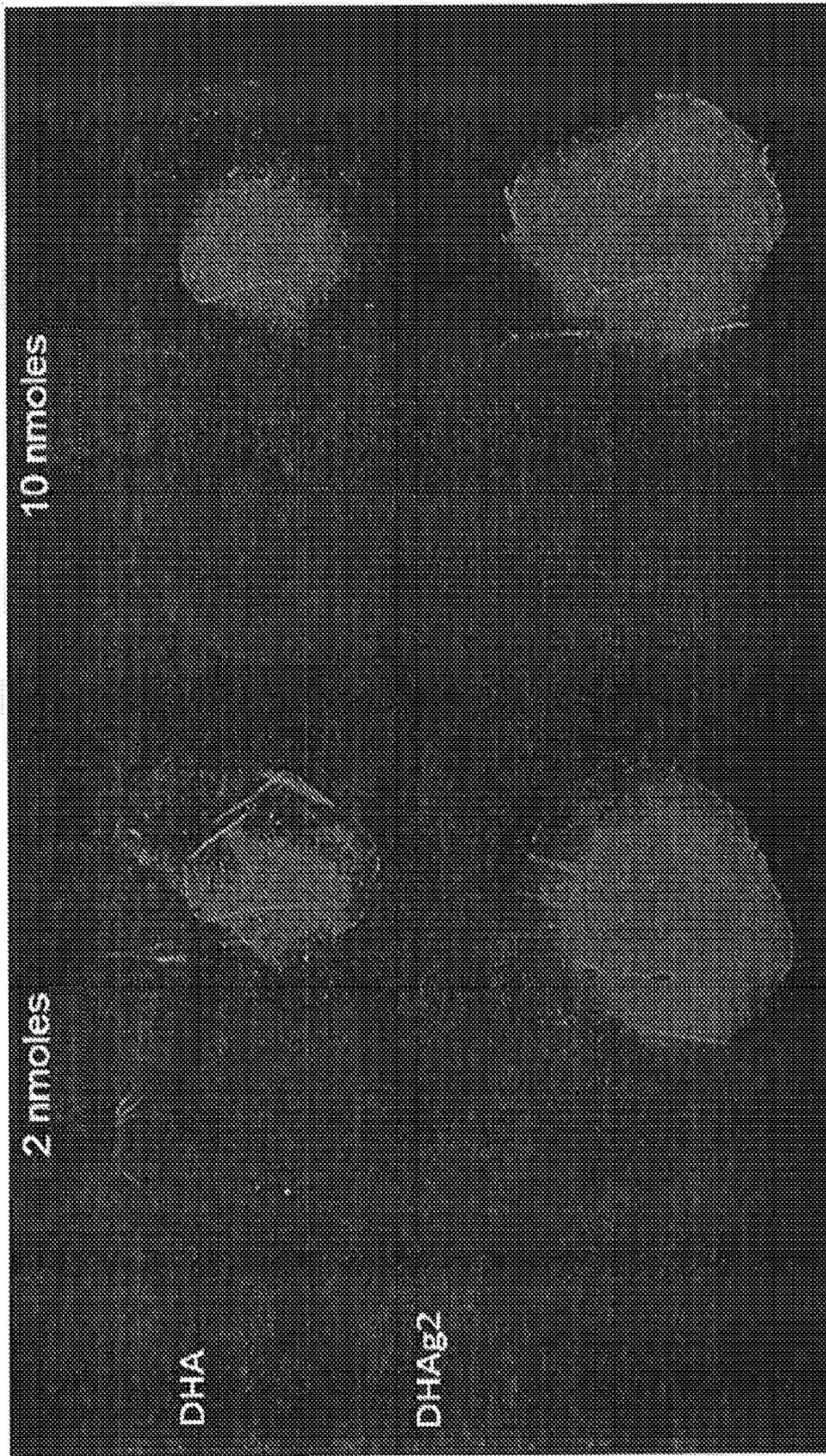


Fig. 65

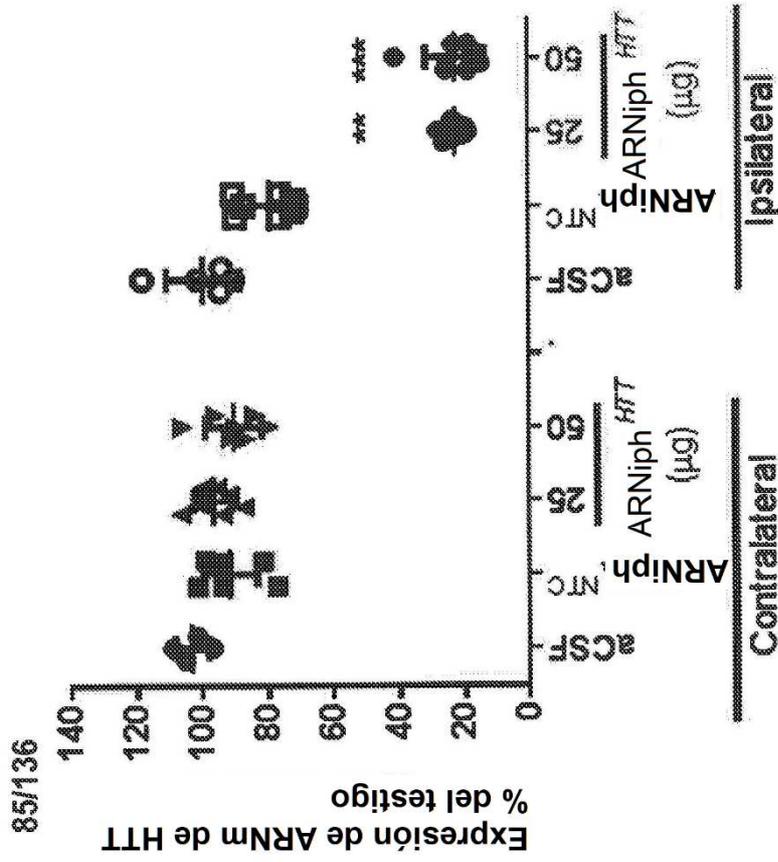
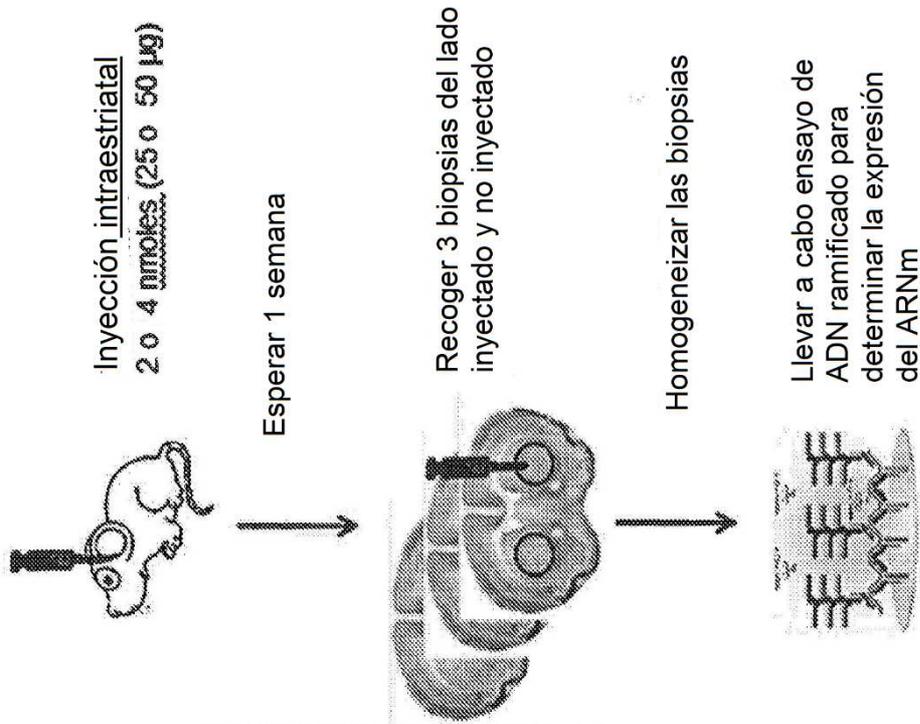


Fig. 66



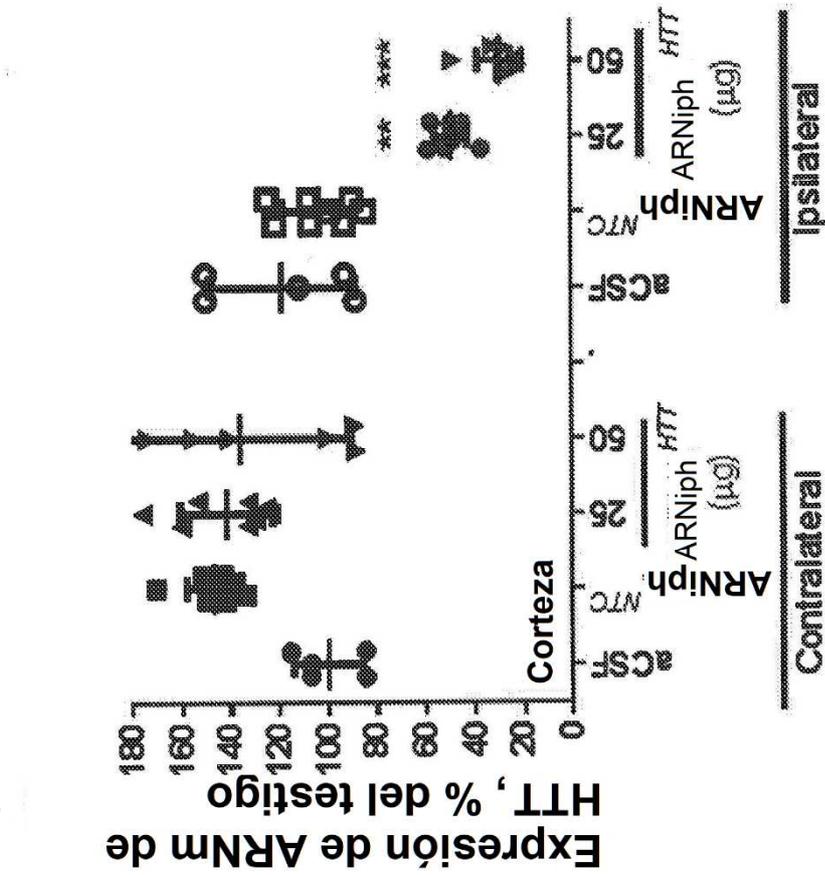
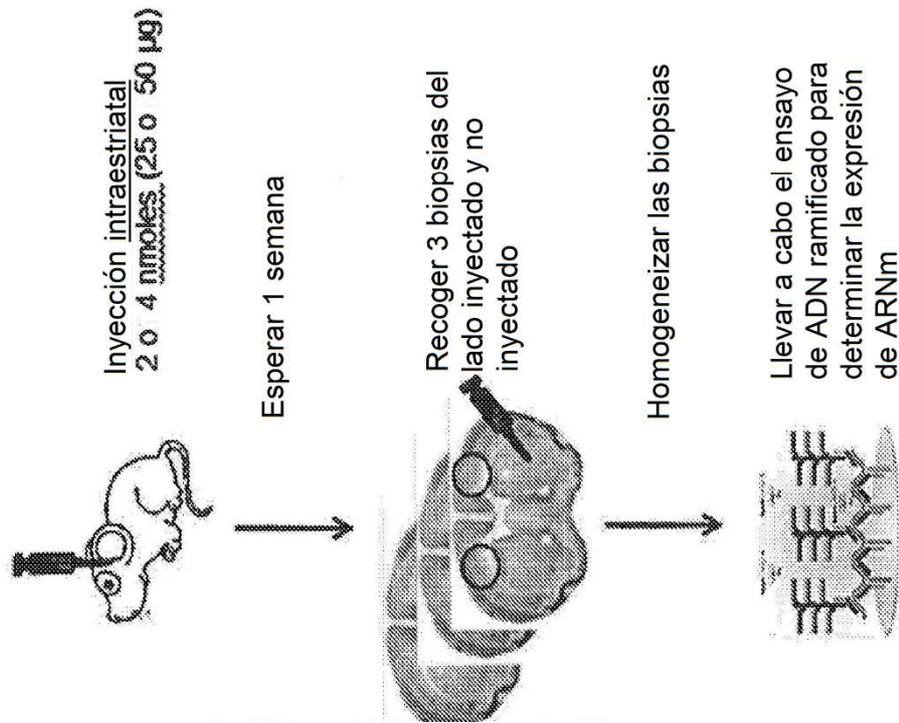


Fig. 67



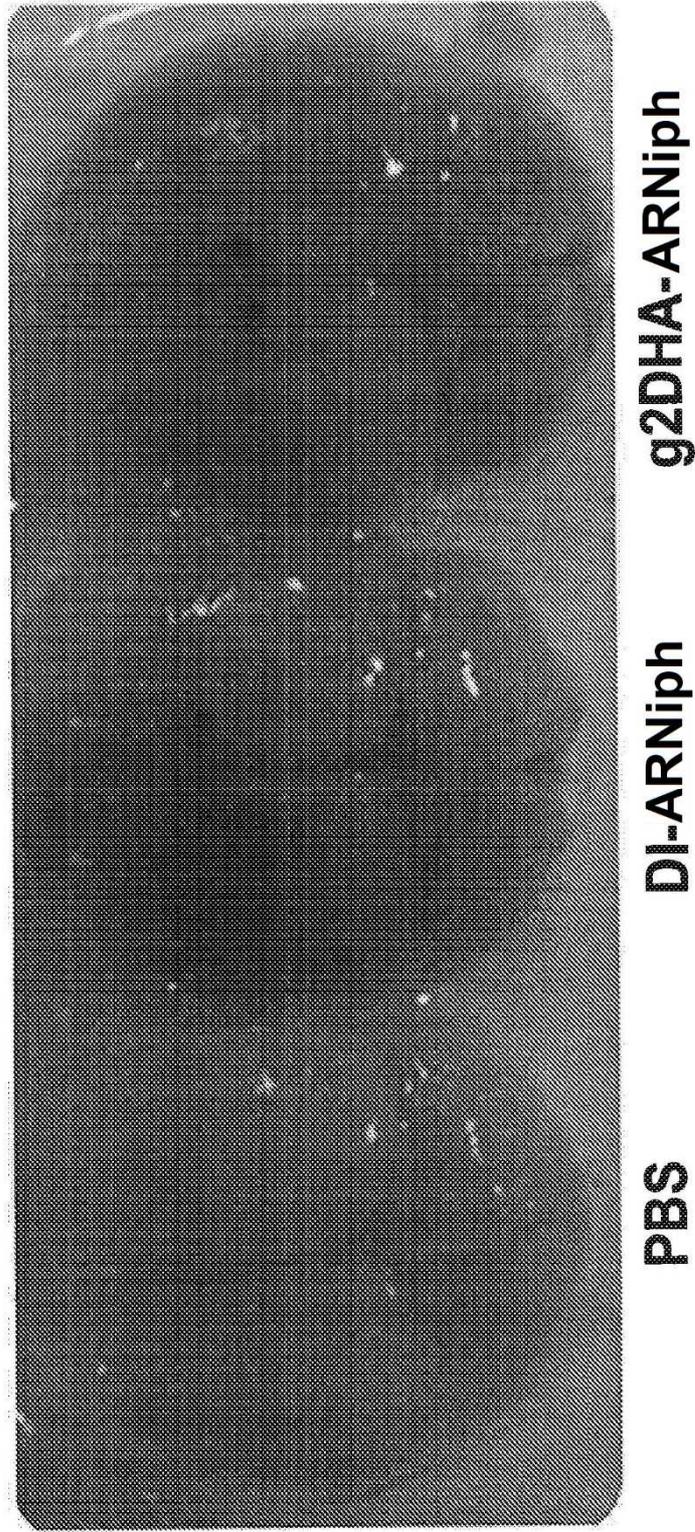
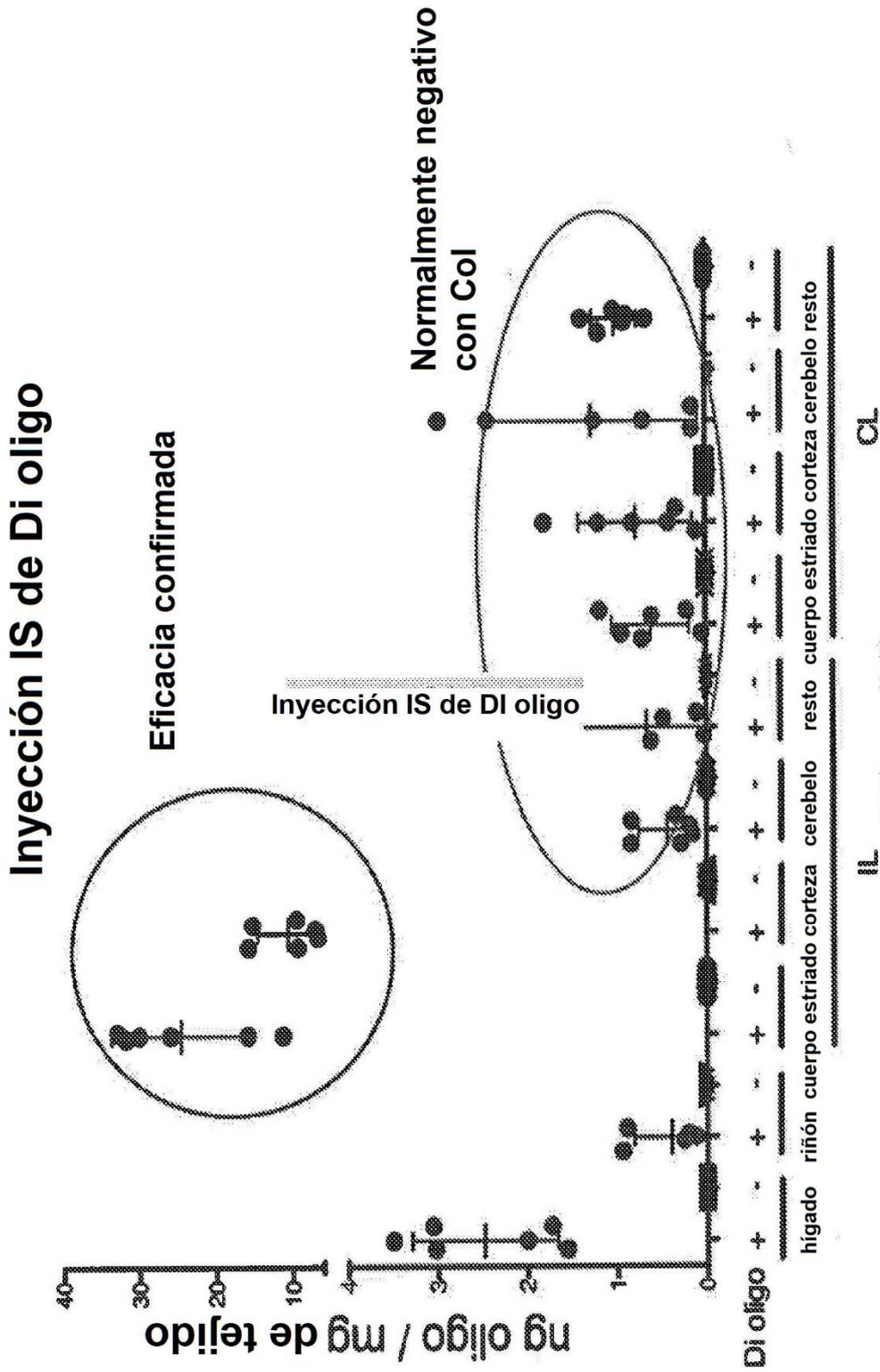


Fig. 68



II. **Fig. 69**

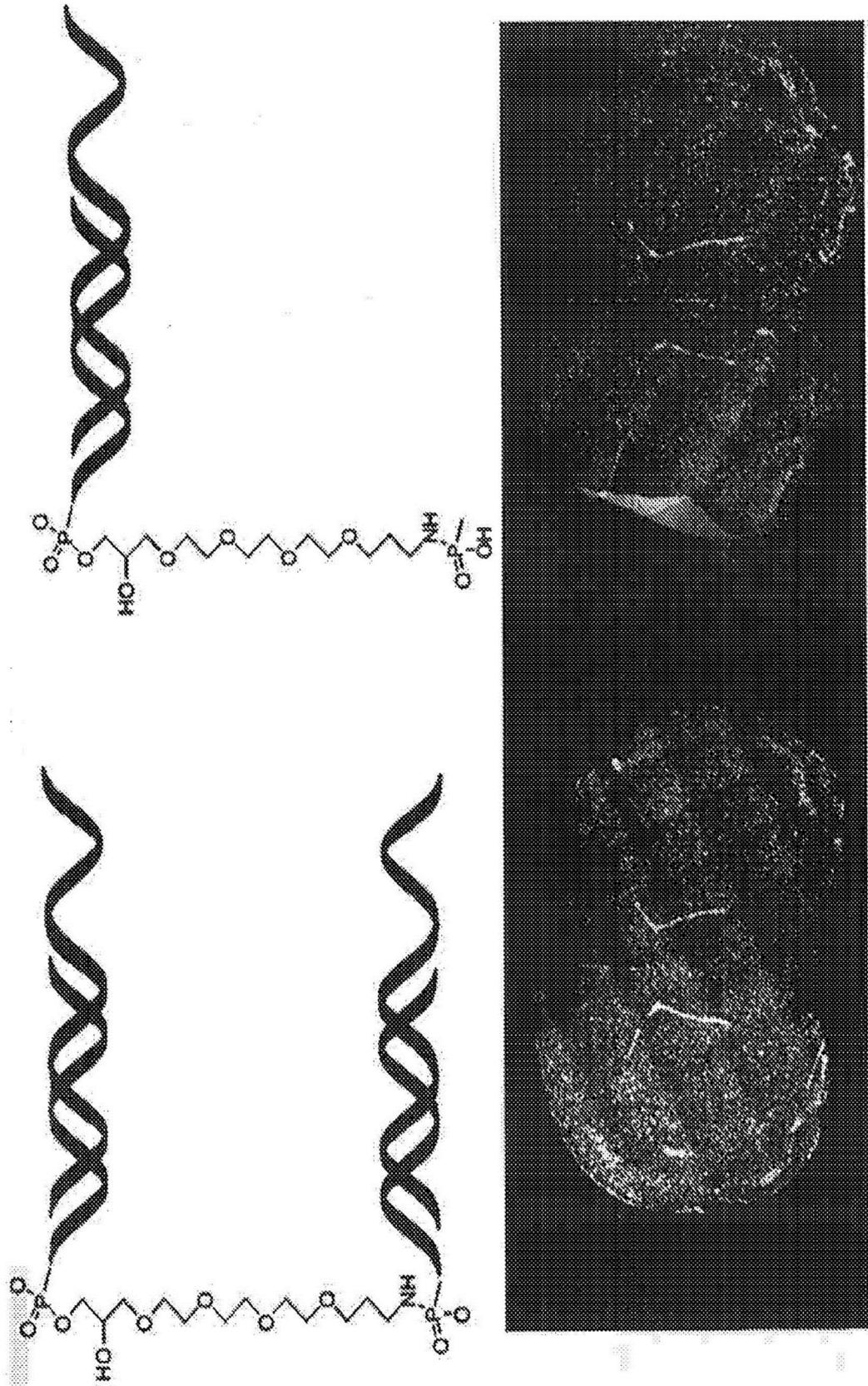


Fig. 70

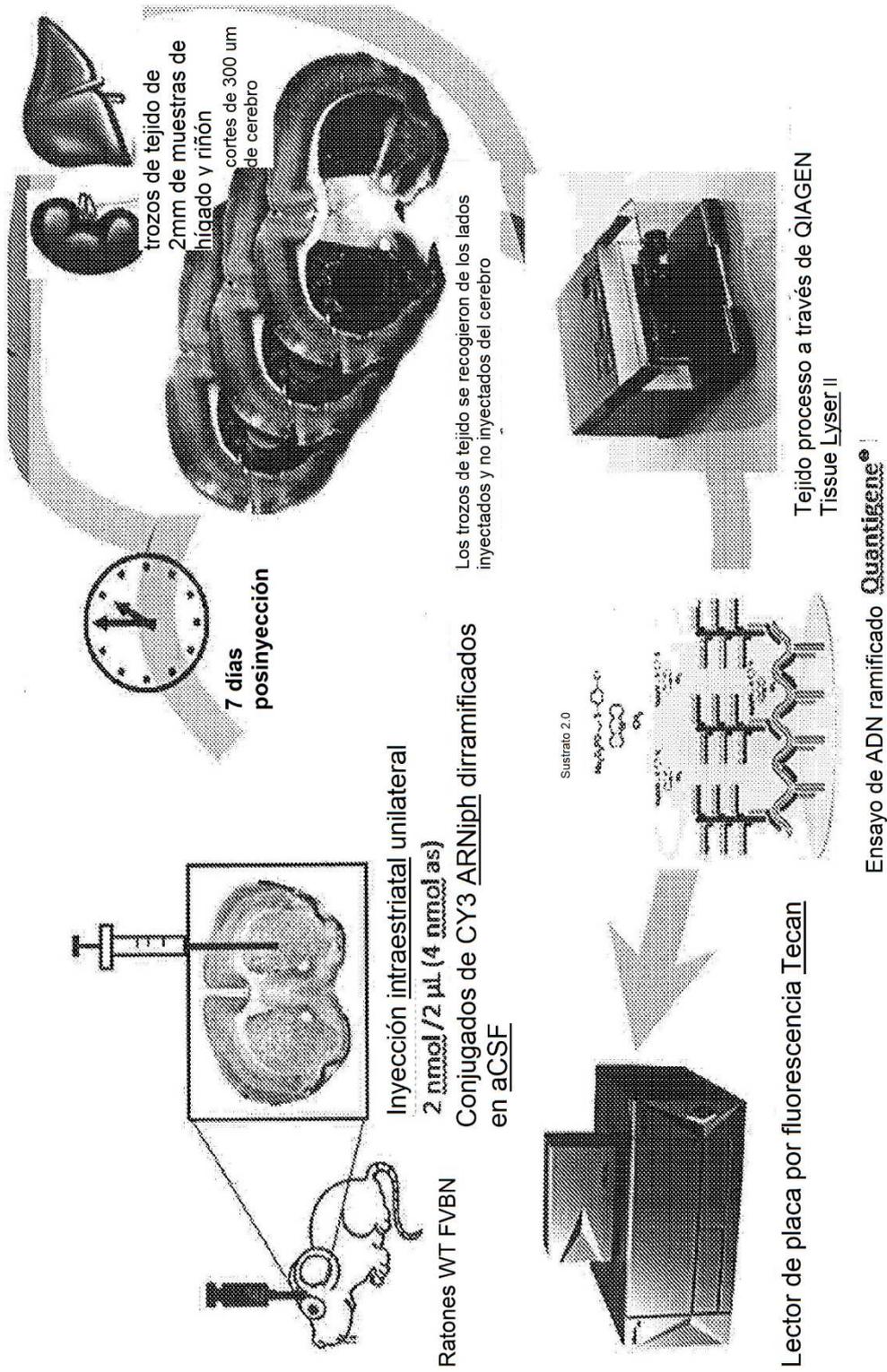


Fig. 71

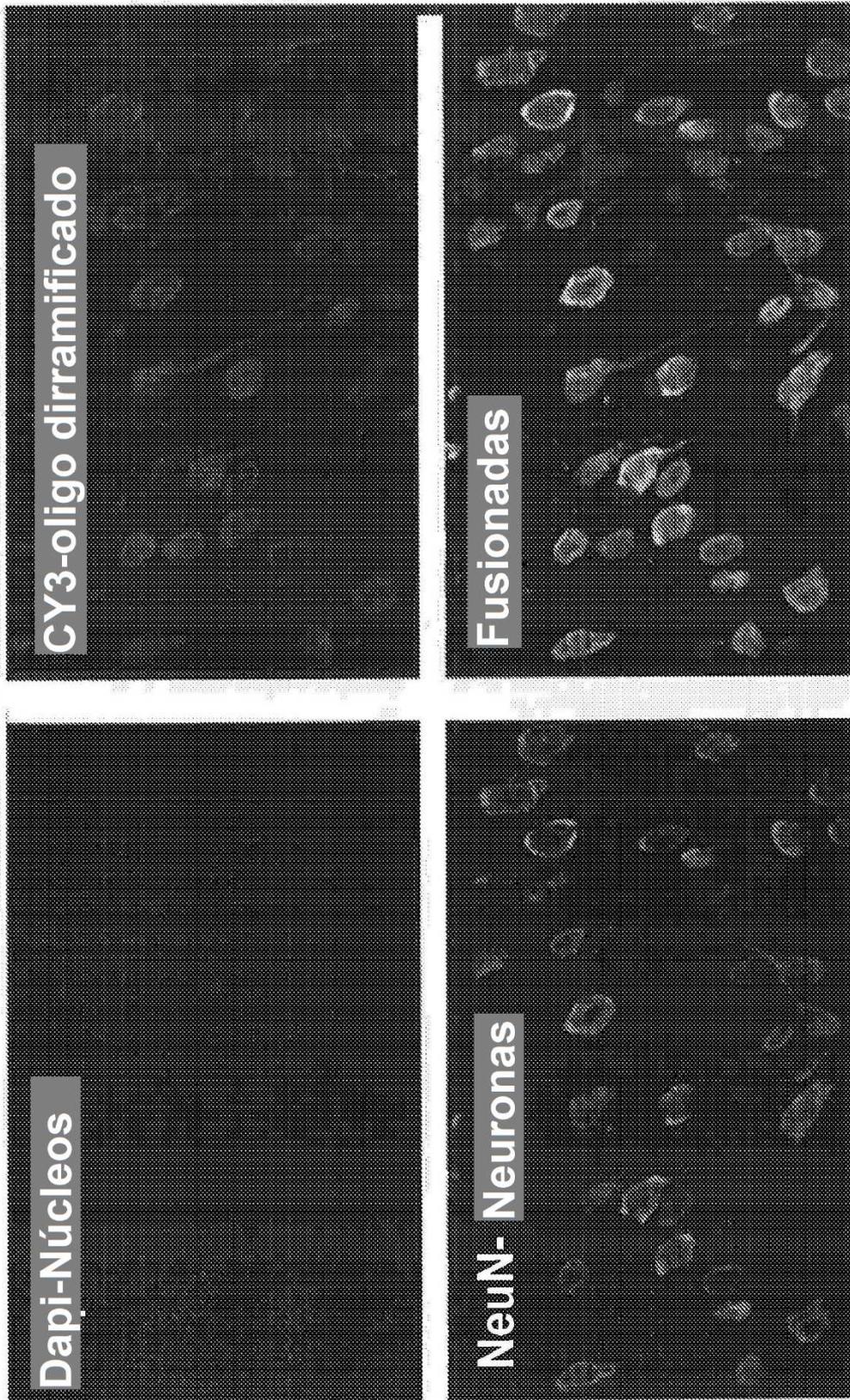


Fig. 72

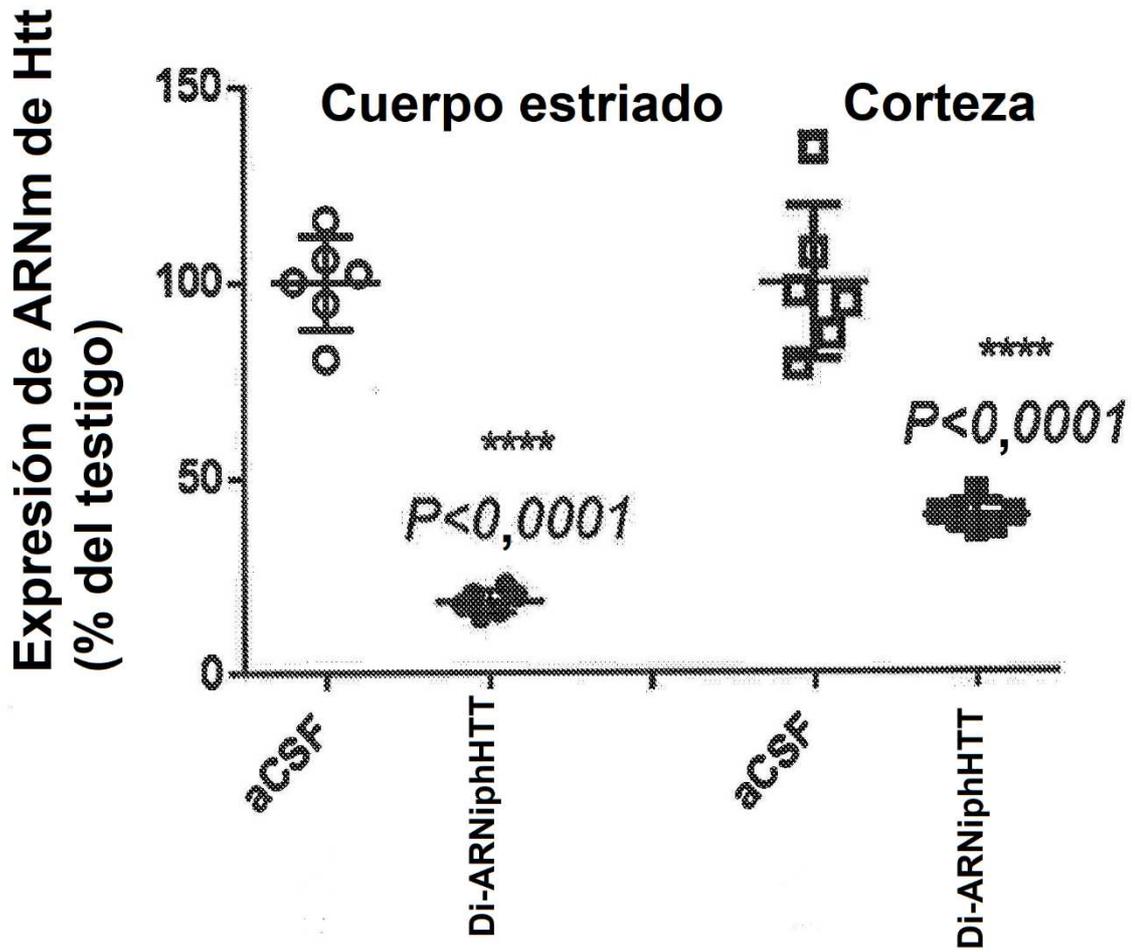


Fig. 73

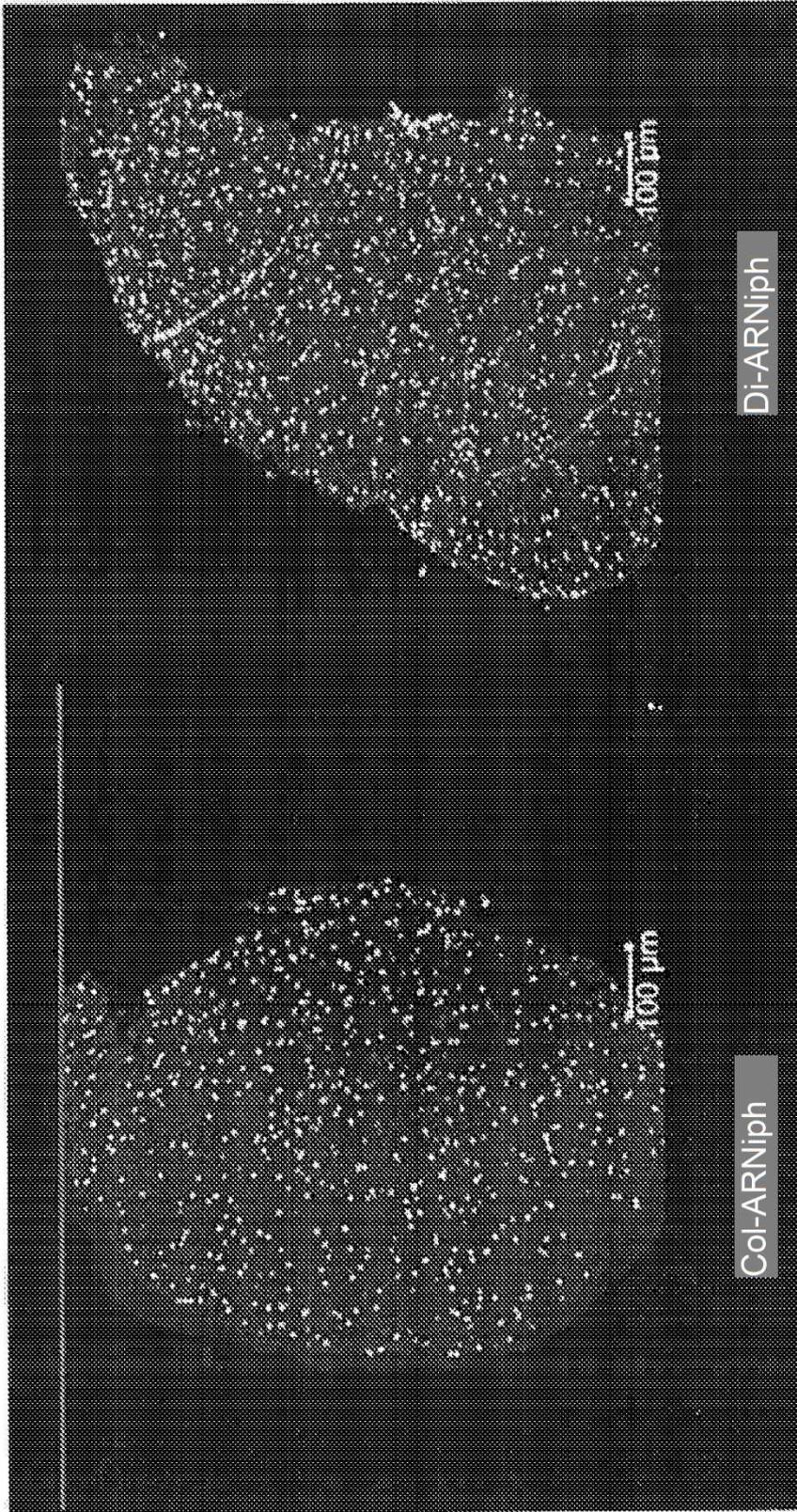


Fig. 74

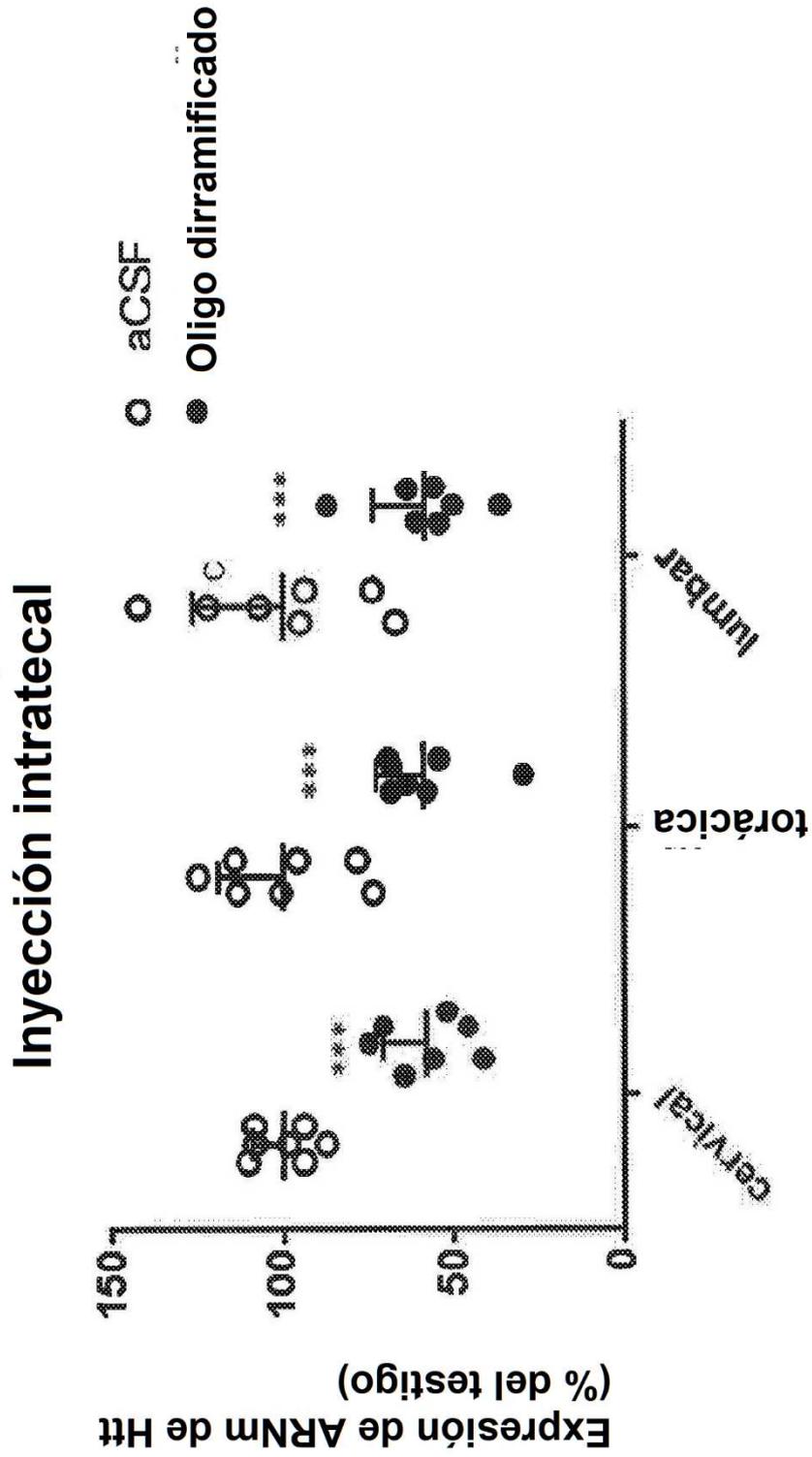


Fig. 75

**Captación pasiva
(células HeLa)**

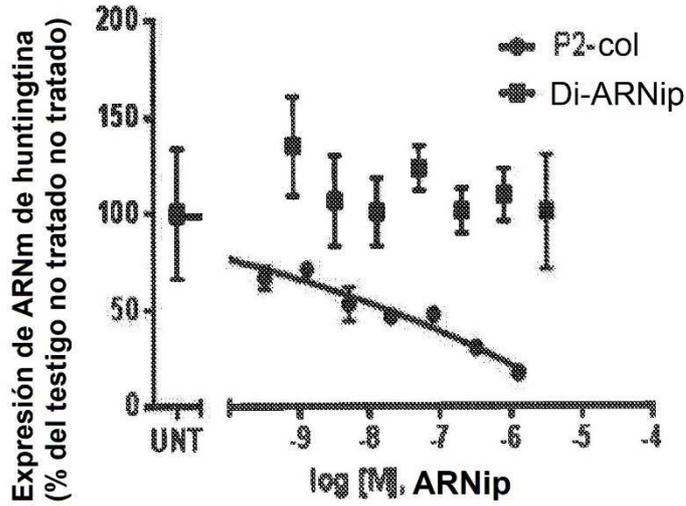


Fig. 76A

**Captación pasiva
(neuronas corticales primarias)**

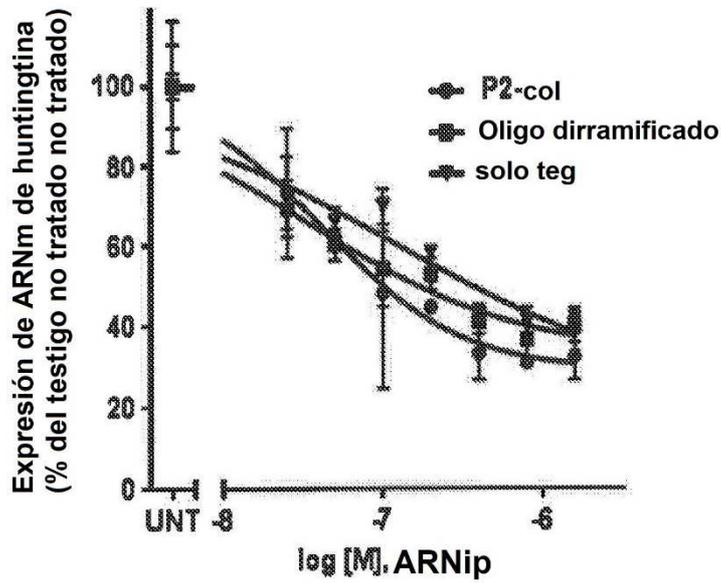
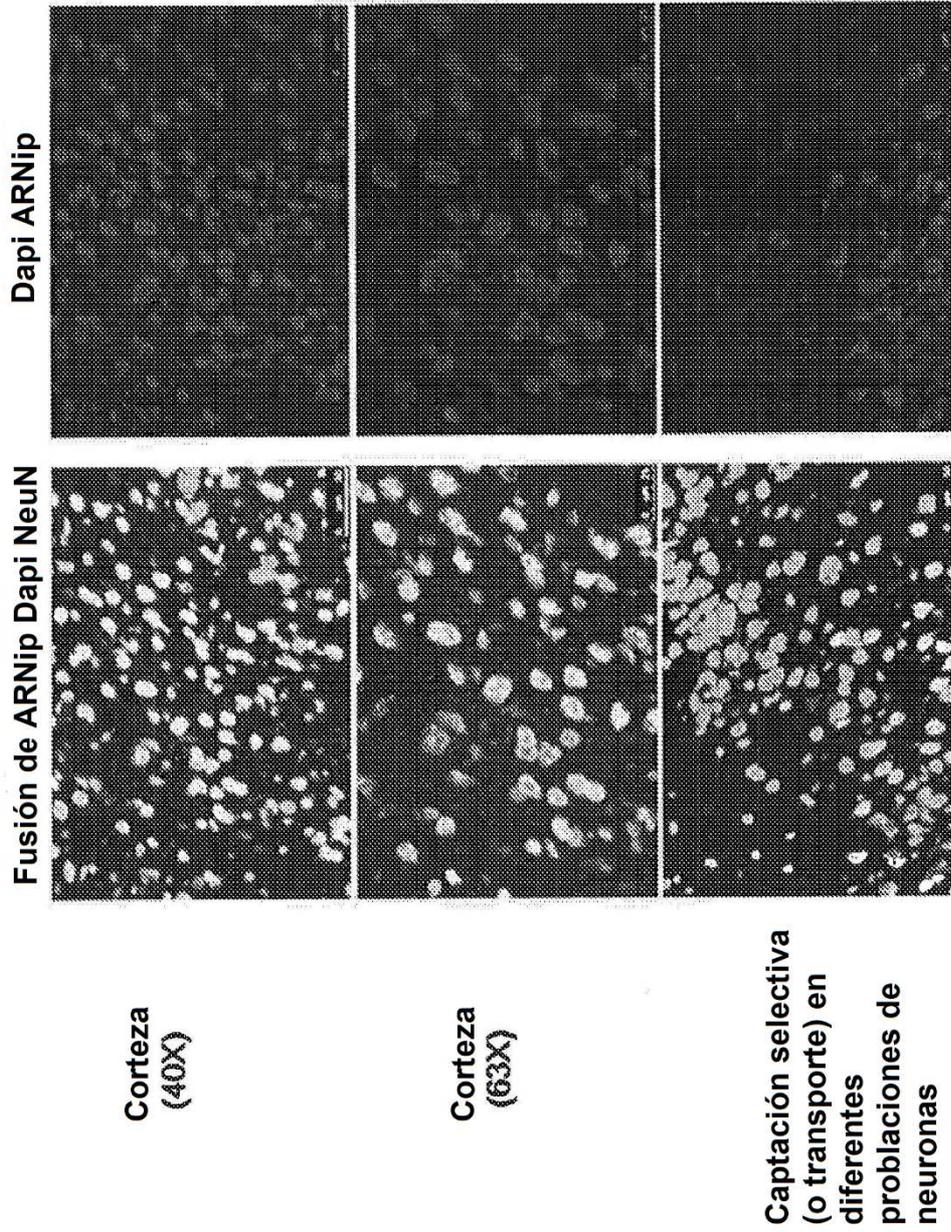


Fig. 76B



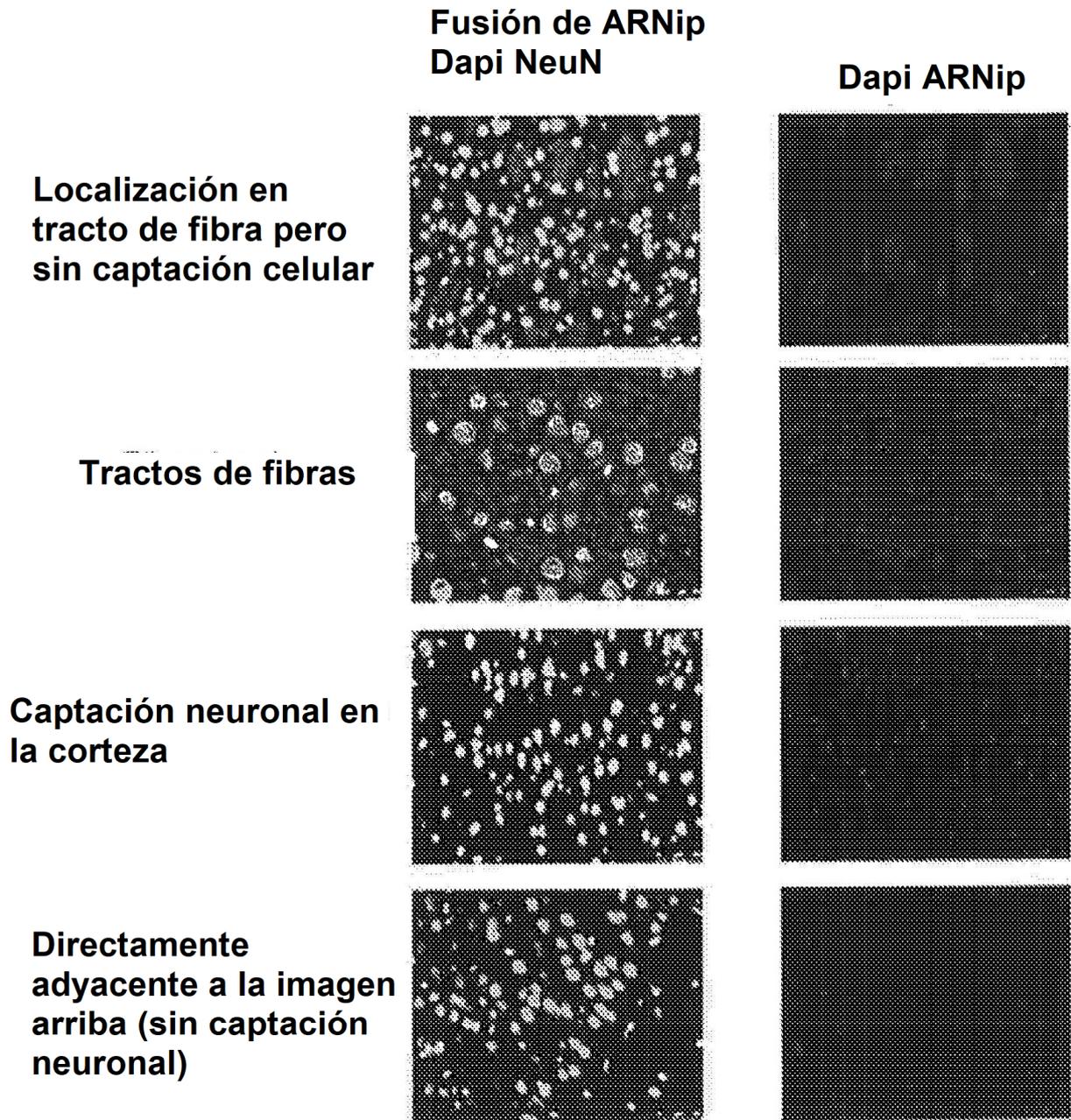


Fig. 78

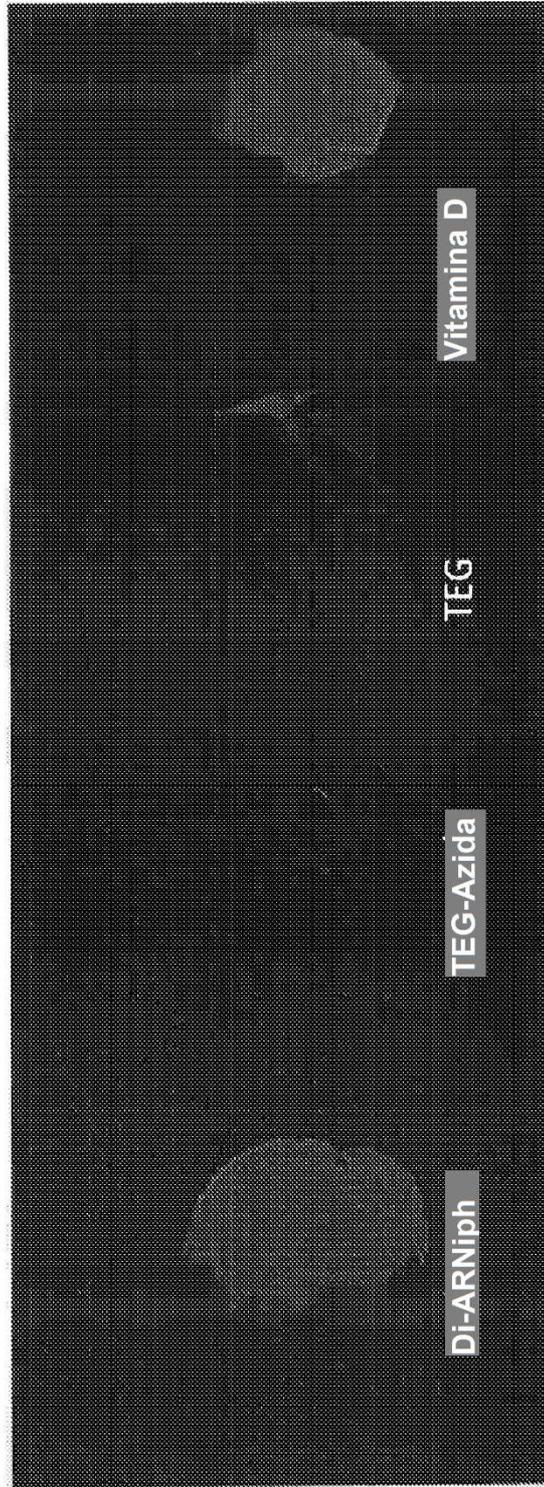


Fig. 79

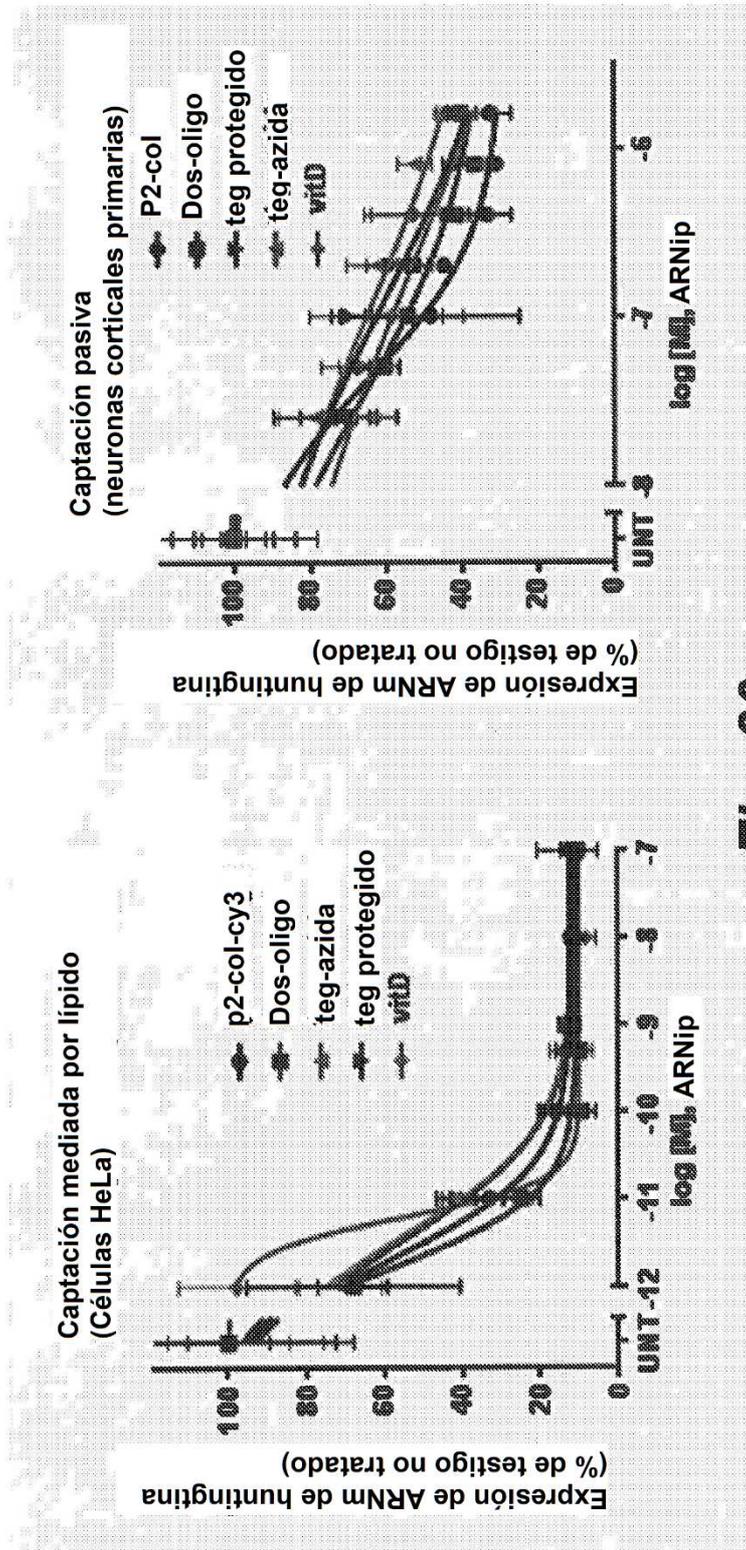


Fig. 80

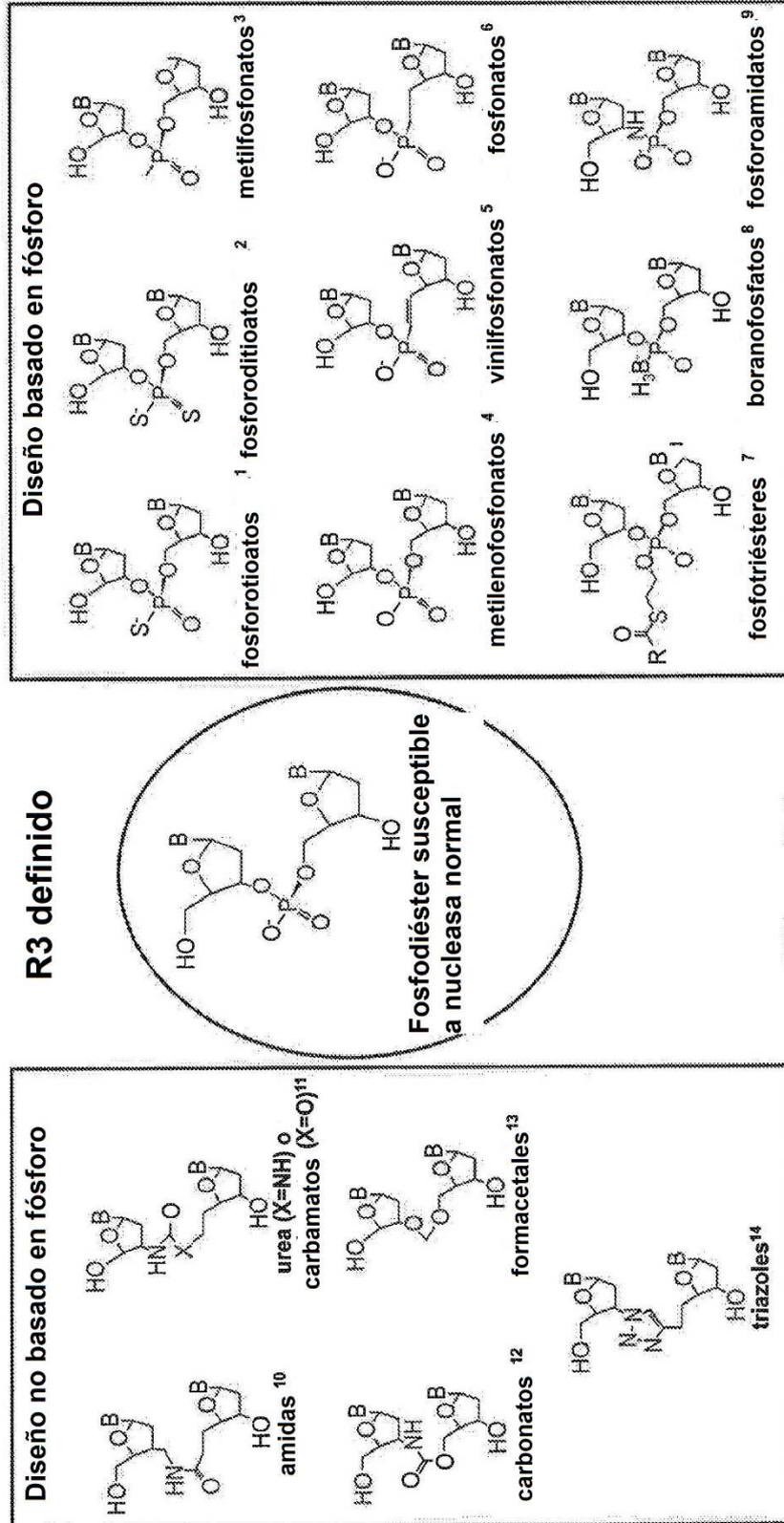


Fig. 82

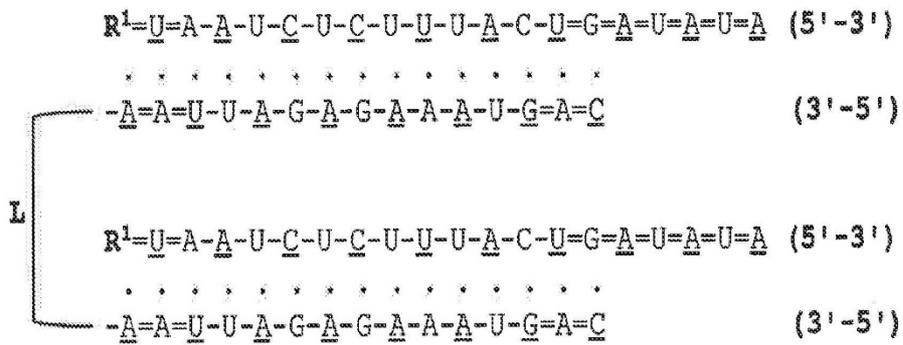
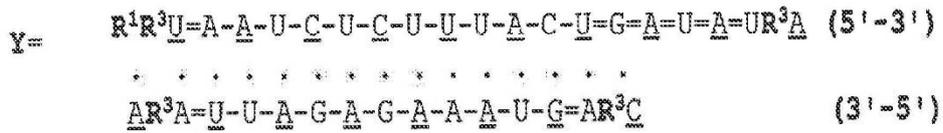
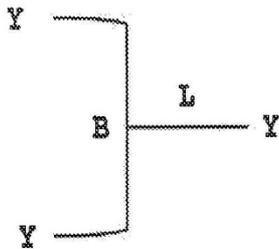


Fig. 83



Leyenda

- \underline{X} - 2'-desoxi-2'-fluoro
- \underline{X} - 2'-O-metilo

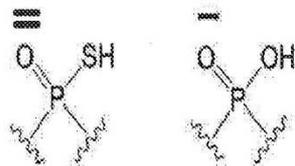
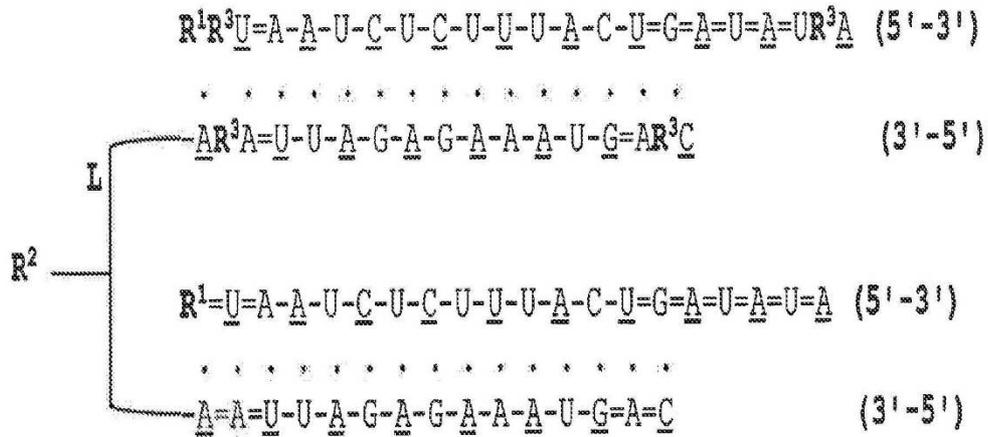


Fig. 84



Leyenda

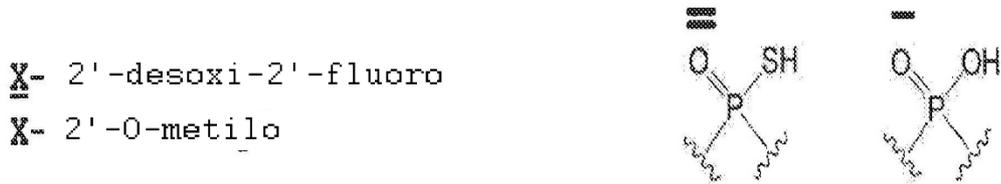


Fig. 87

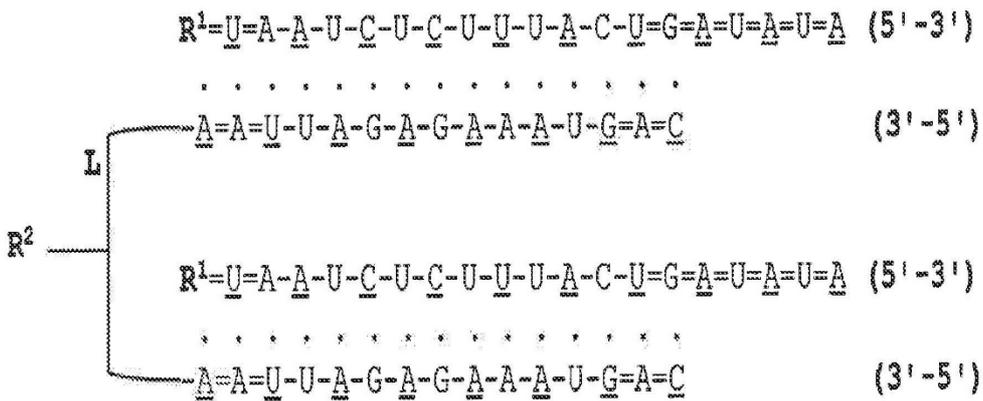


Fig. 88

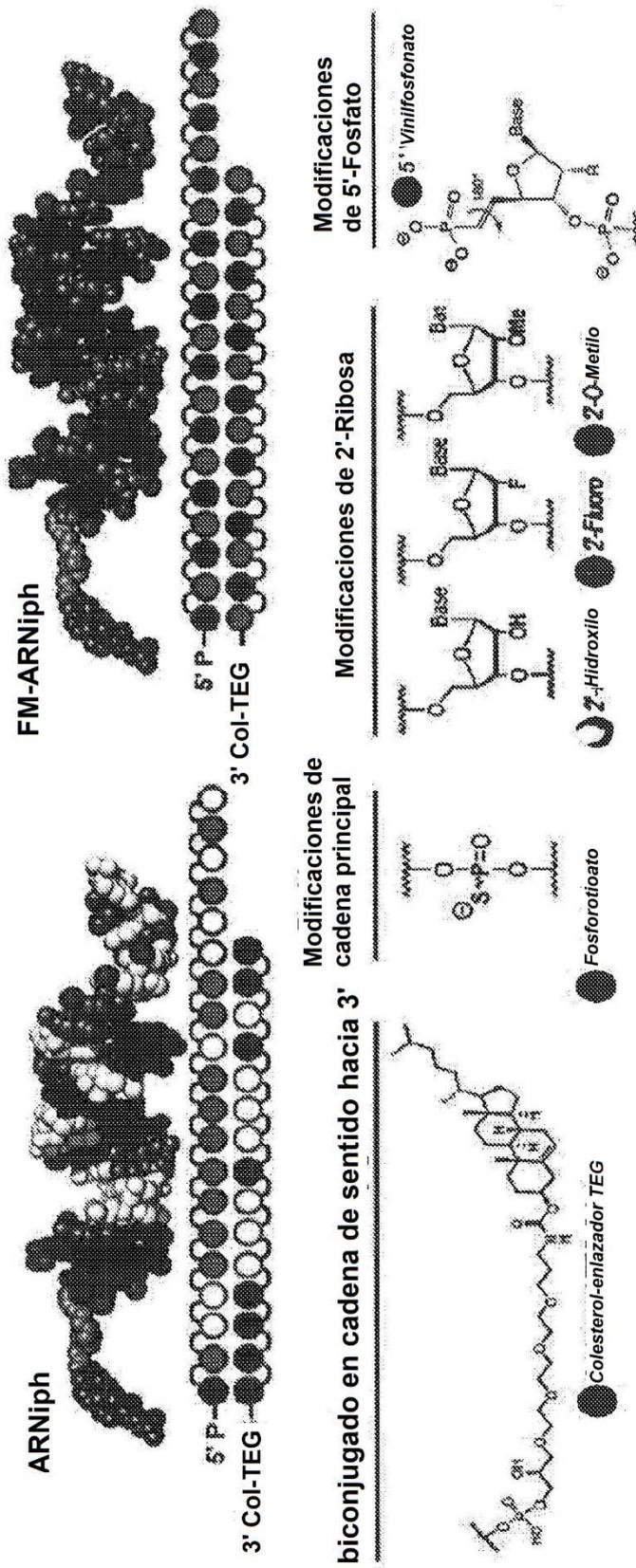


Fig. 91A

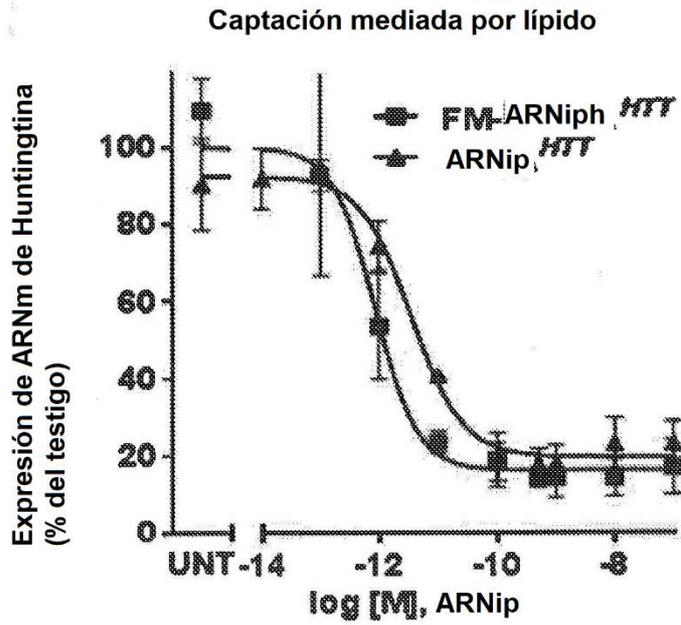


Fig. 91B

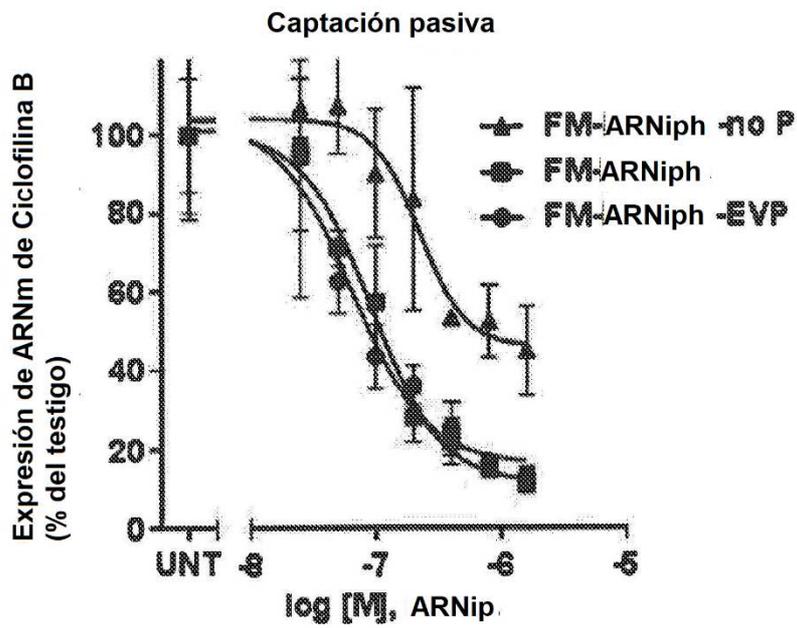


Fig. 91C

Acumulación en tejido distante (1 semana)

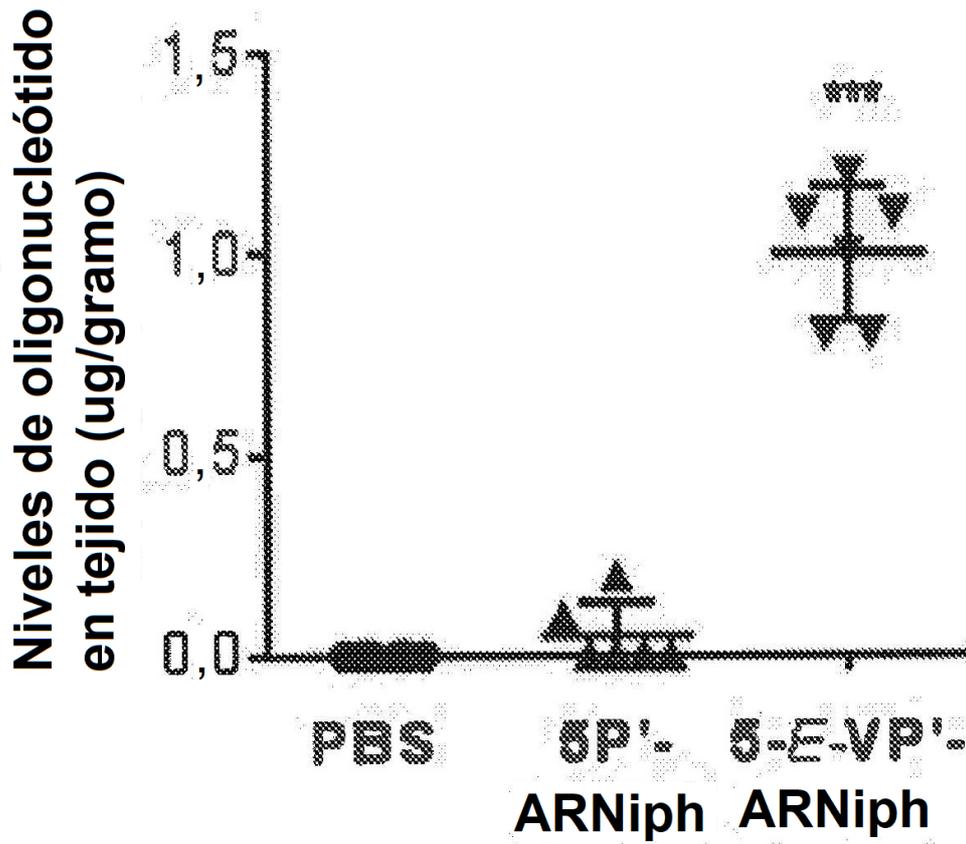
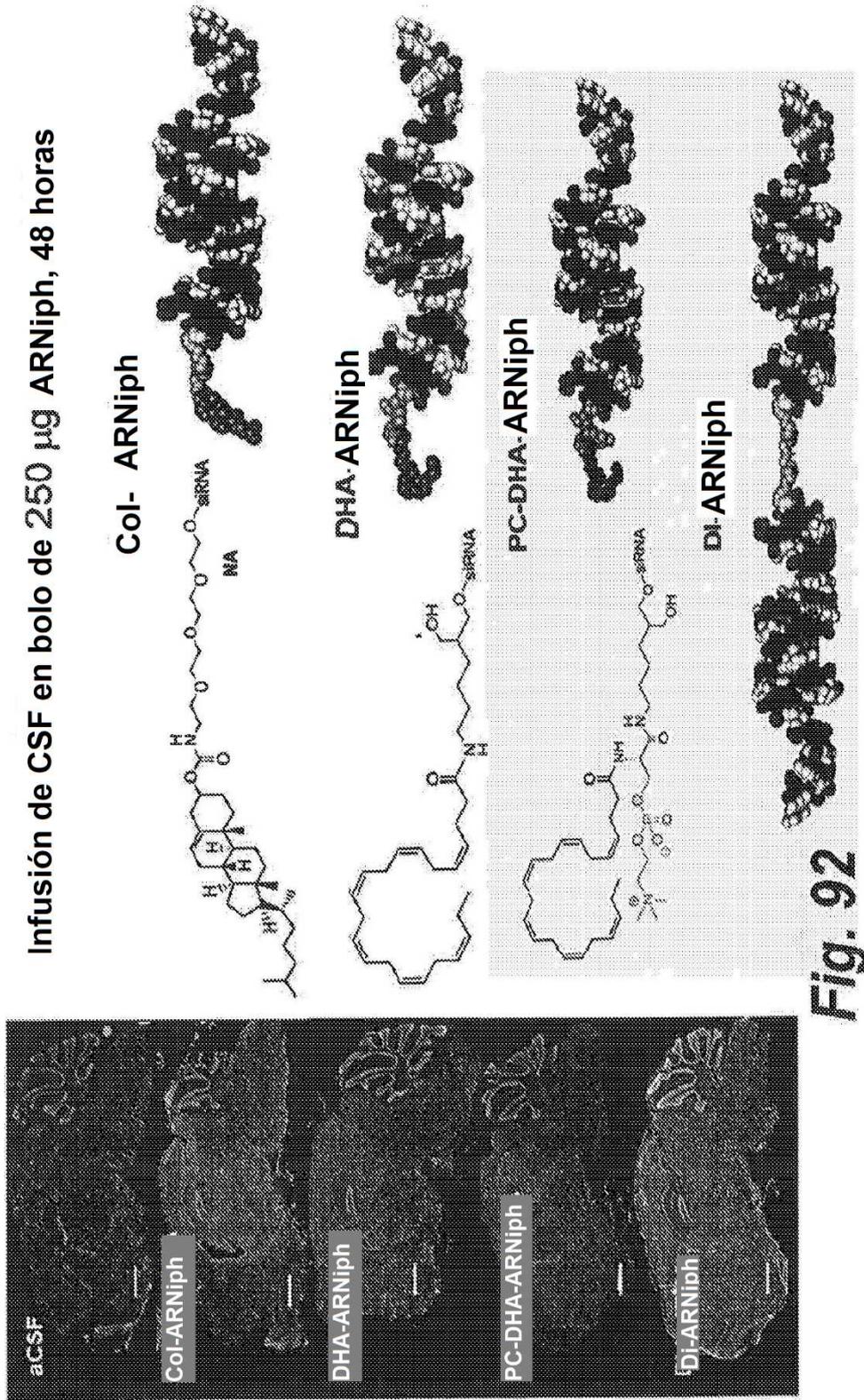


Fig. 91D



Soporte Di

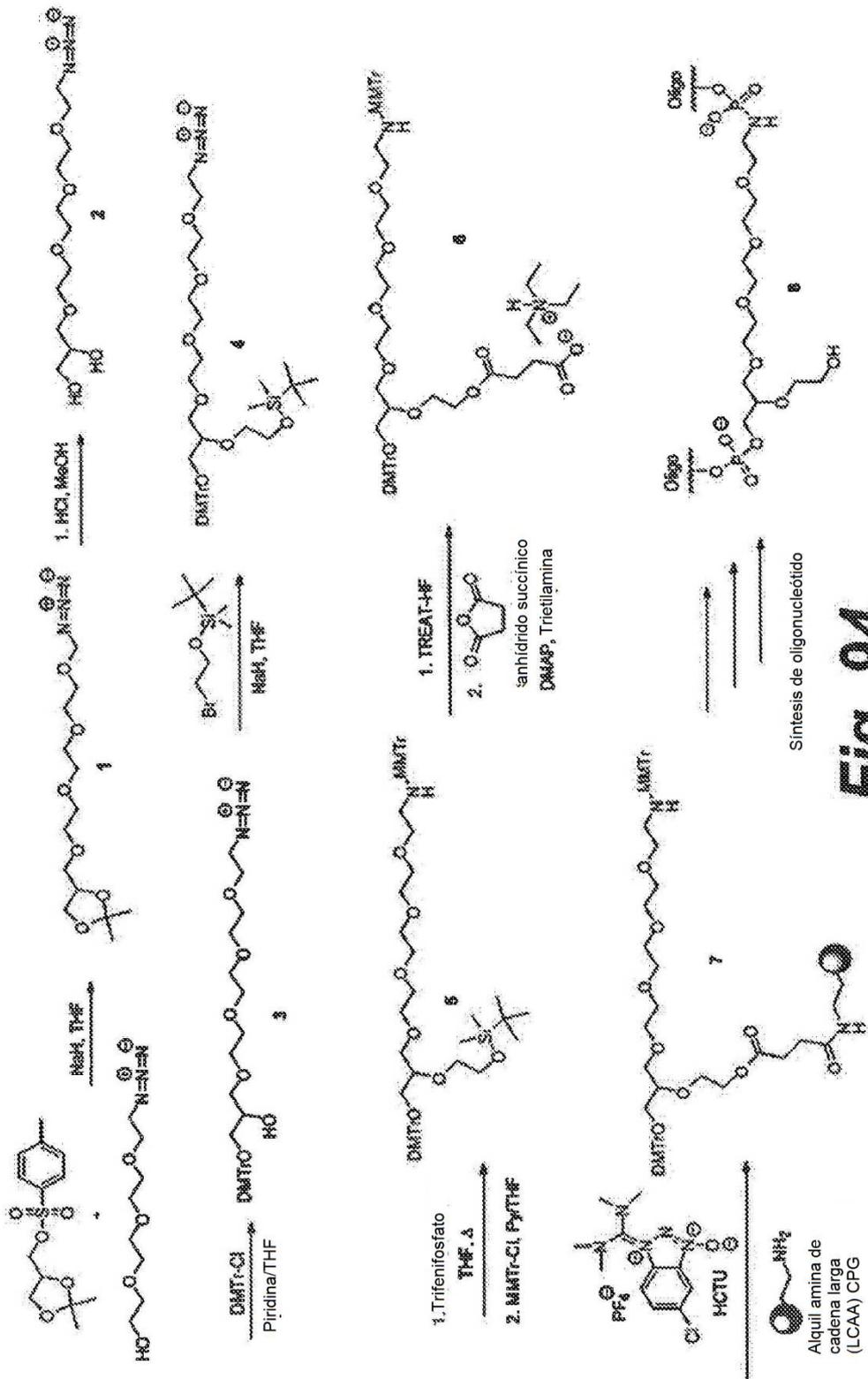


Fig. 94

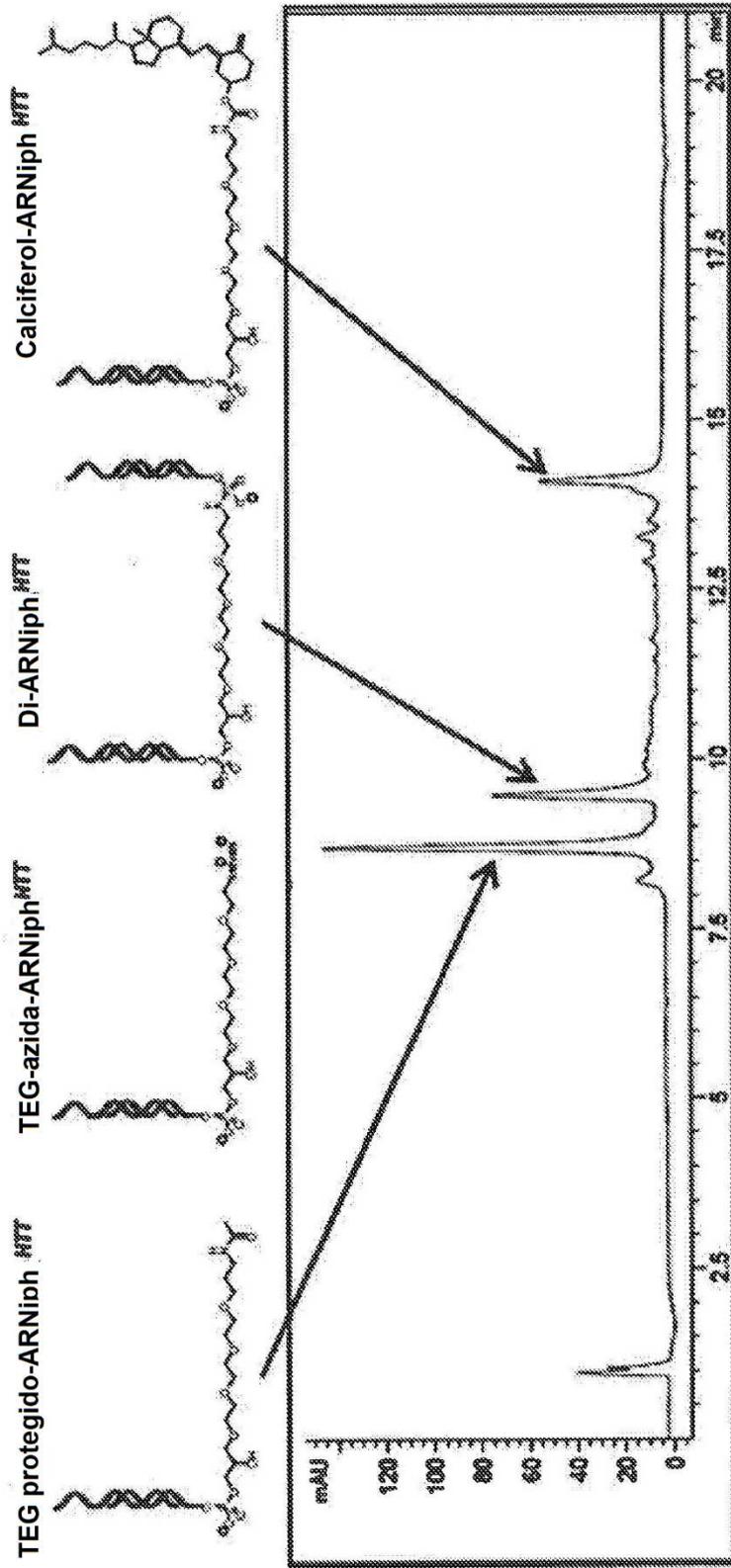


Fig. 95A

Captación mediada por lípido
Células HeLa

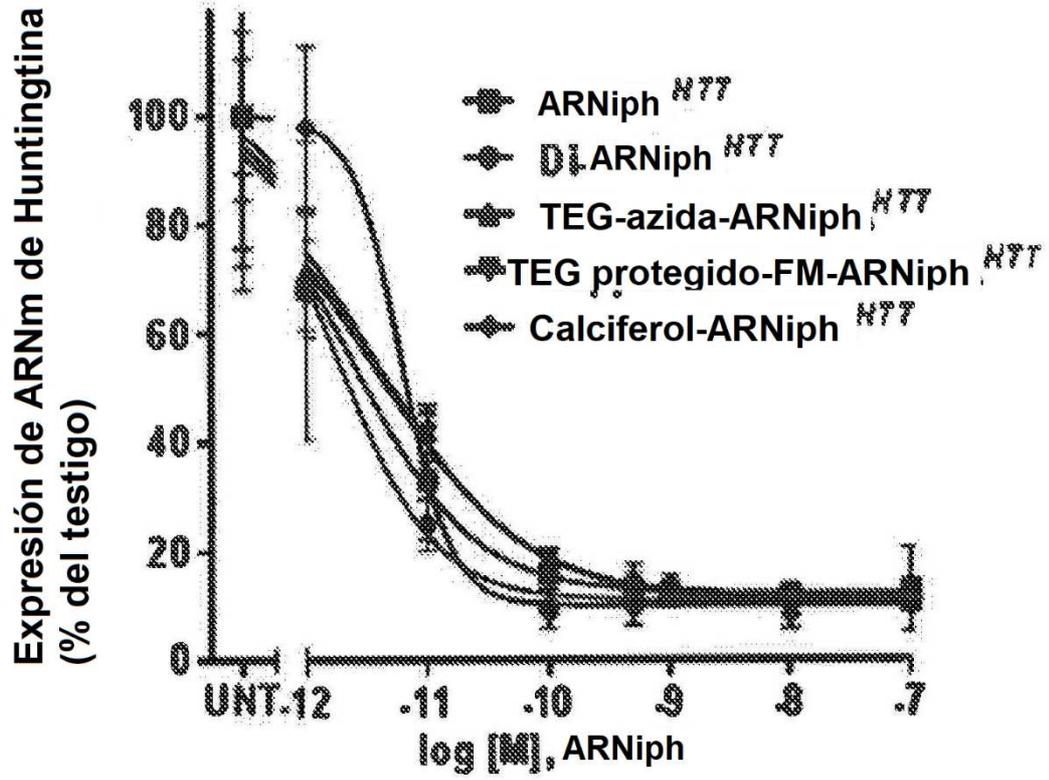


Fig. 95B

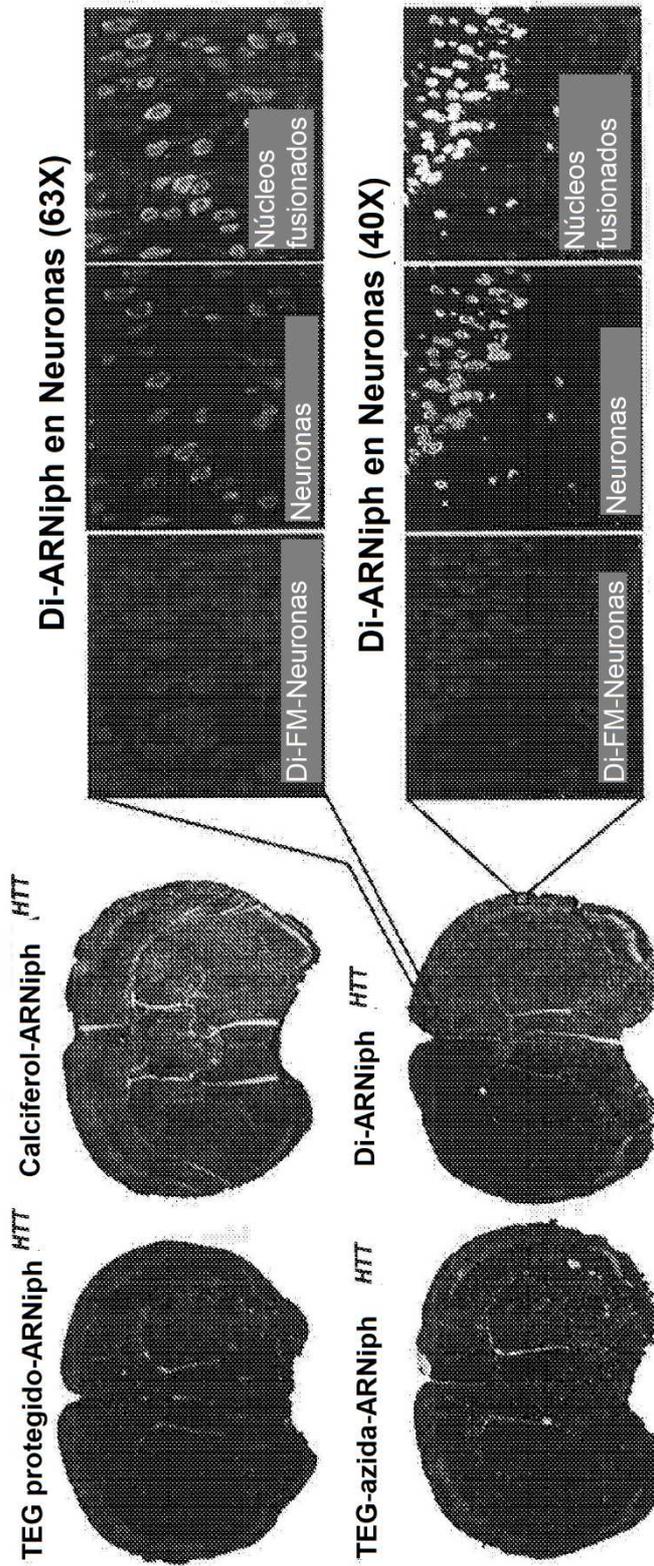


Fig. 95C

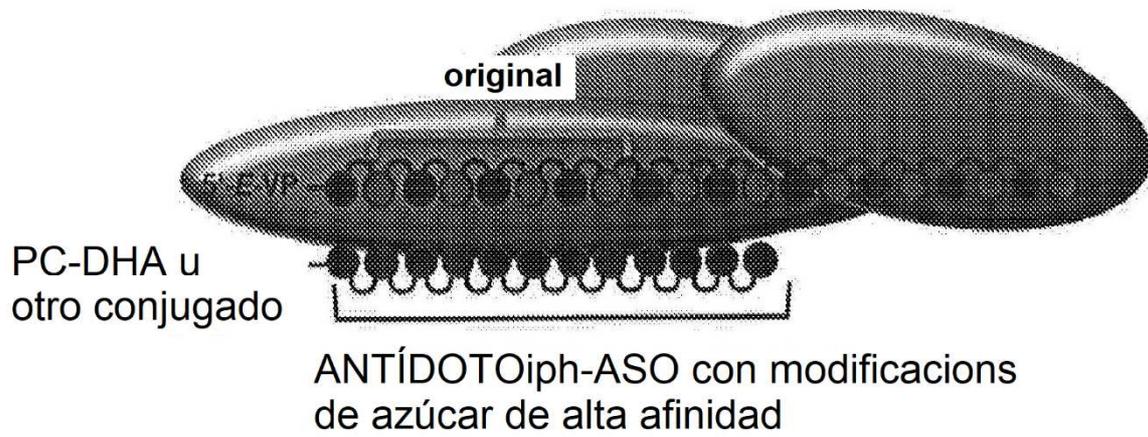


Fig. 96

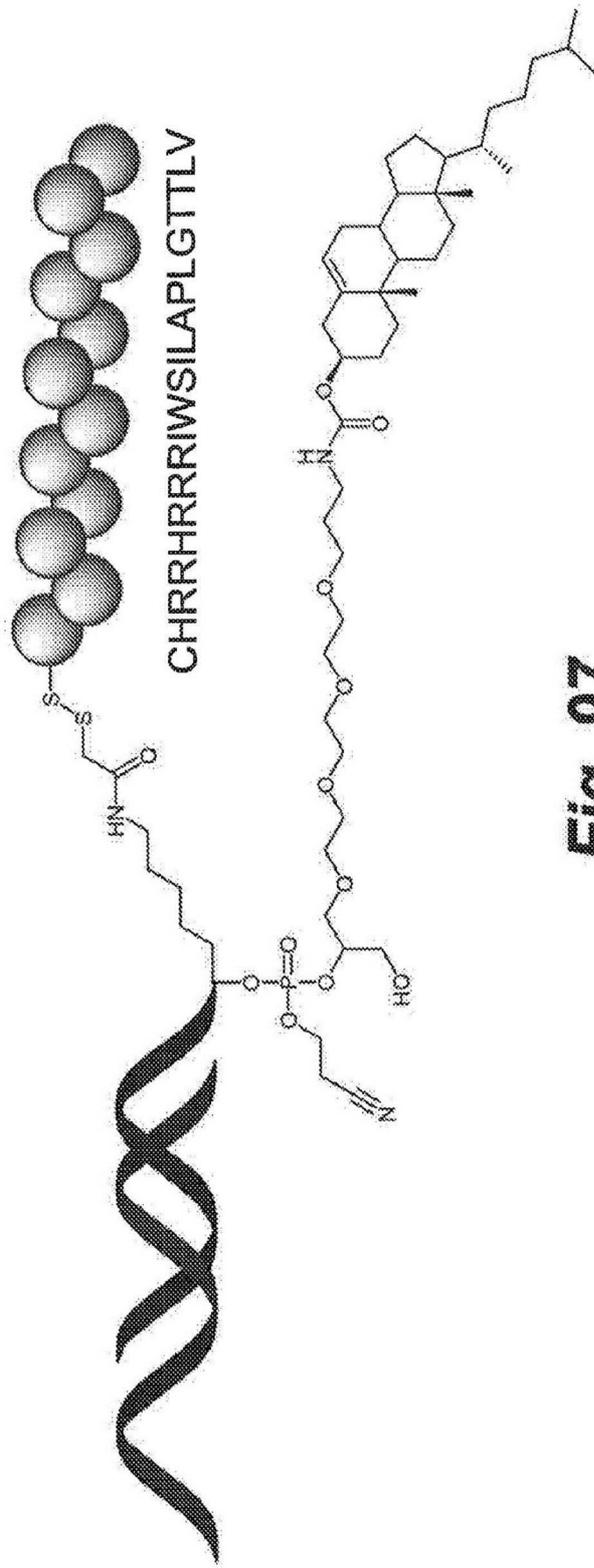


Fig. 97

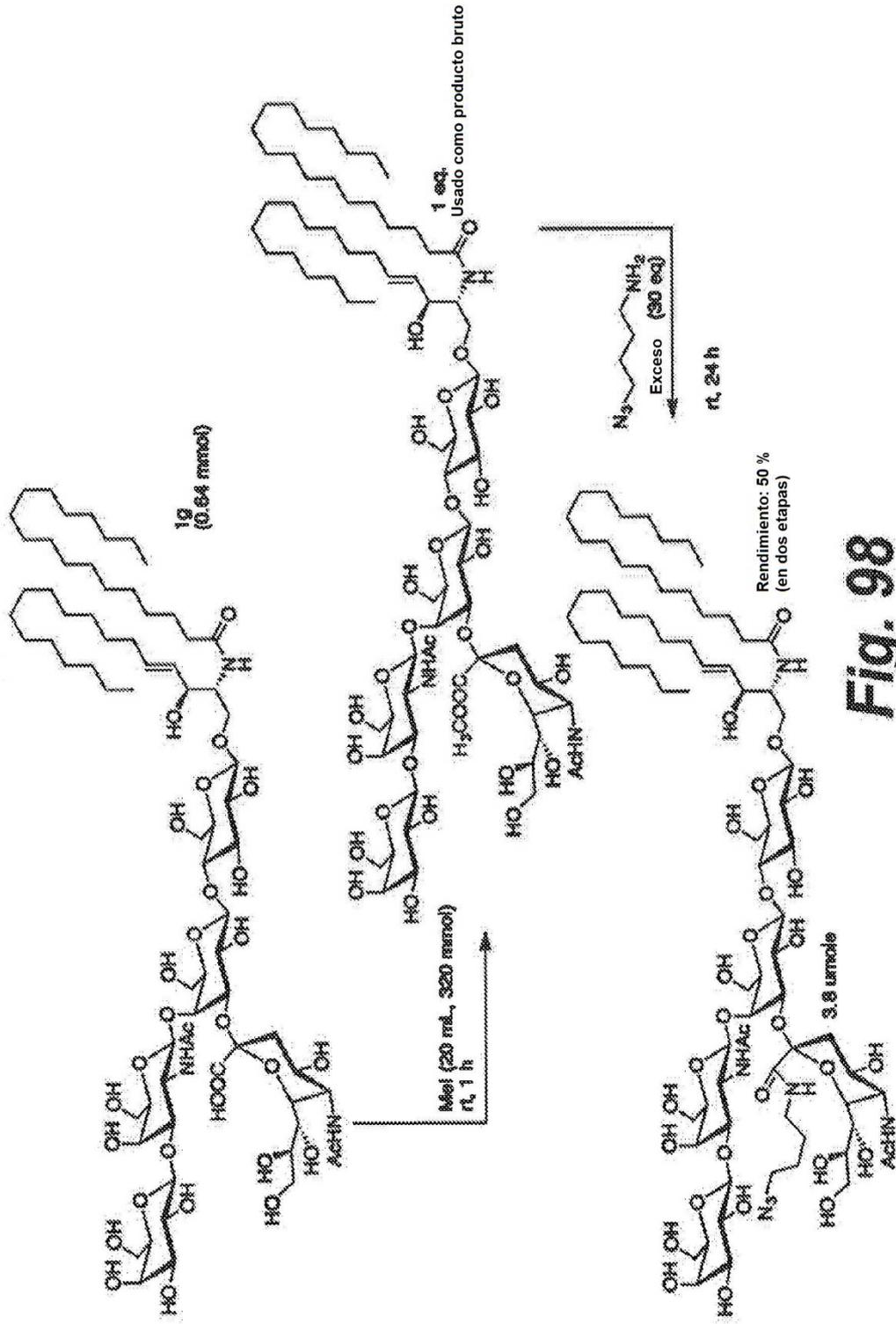
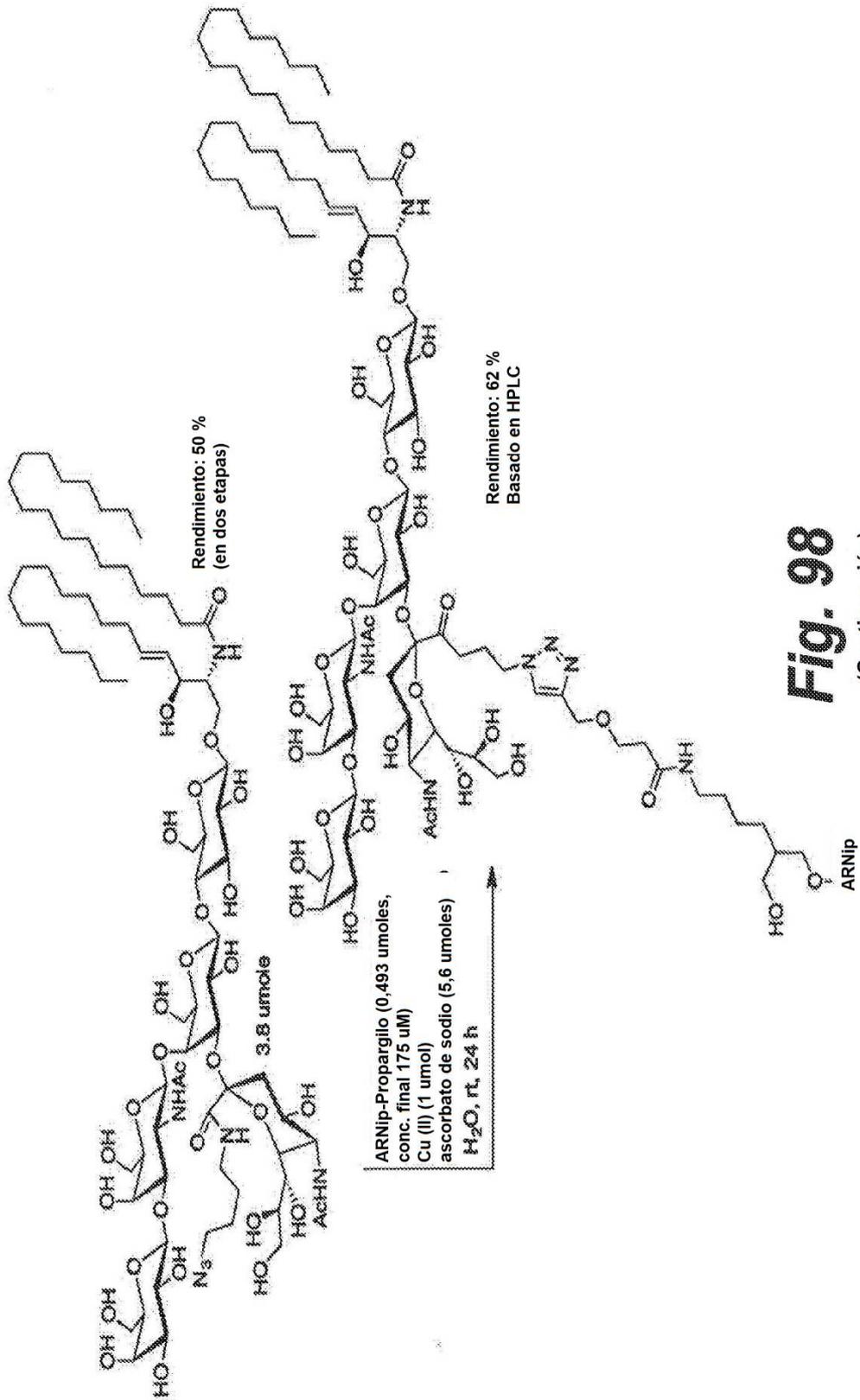


Fig. 98



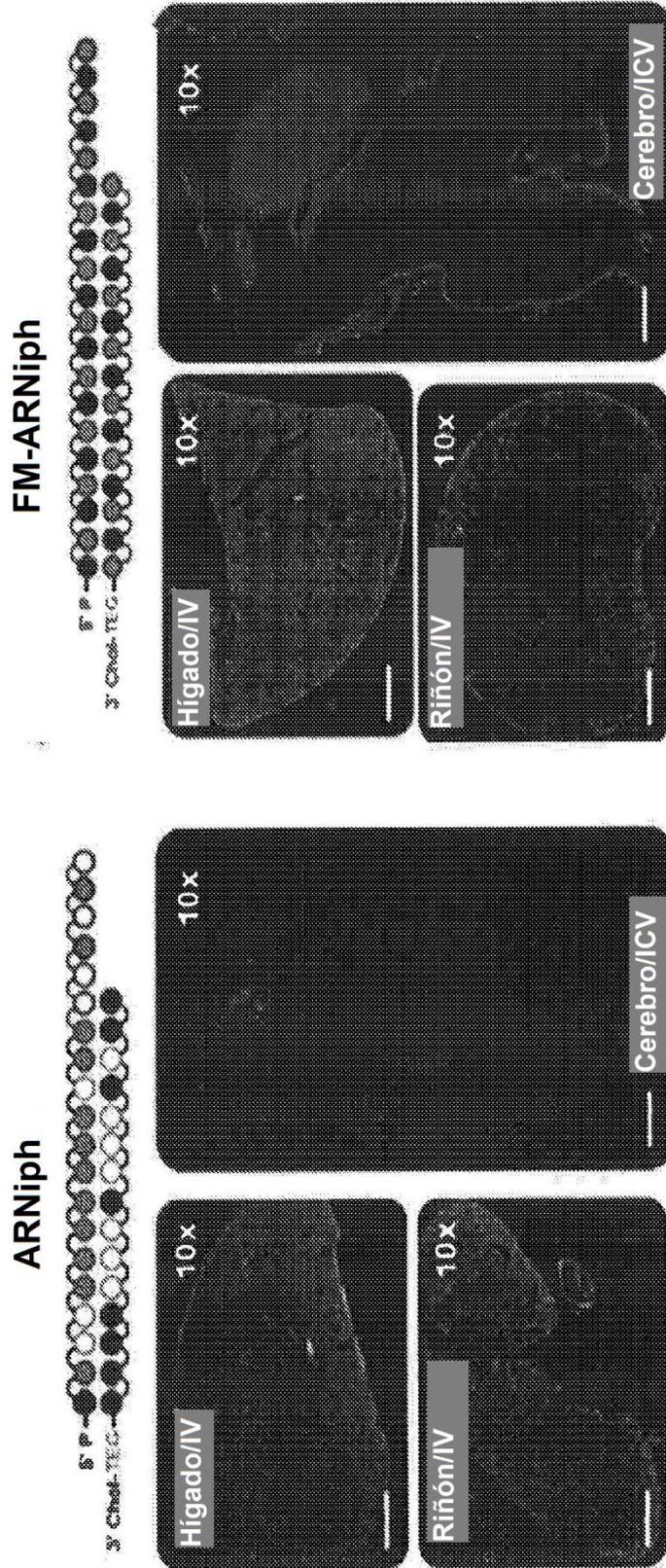


Fig. 102B

Fig. 102A

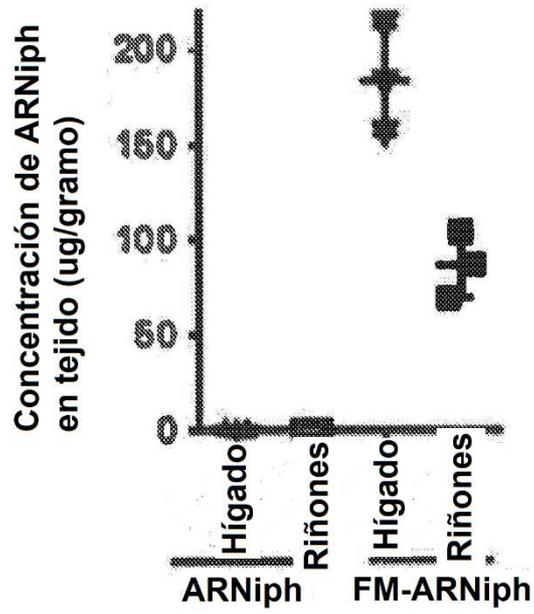


Fig. 102C

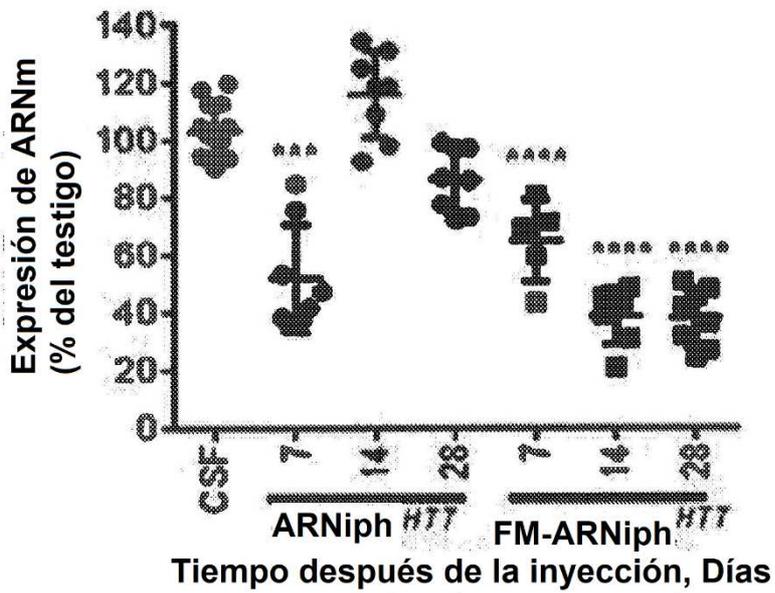


Fig. 102D

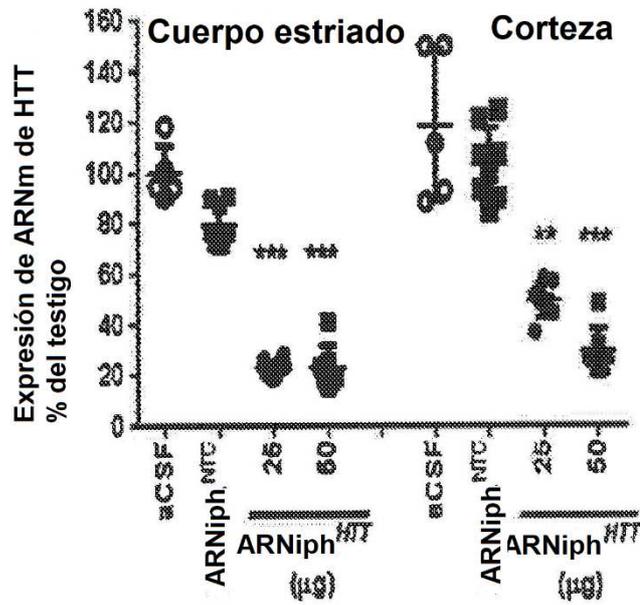


Fig. 103A

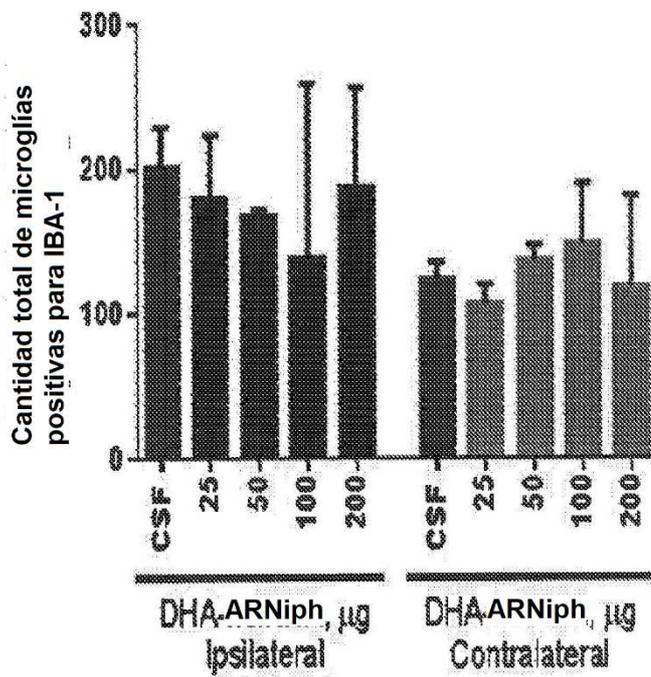


Fig. 103B

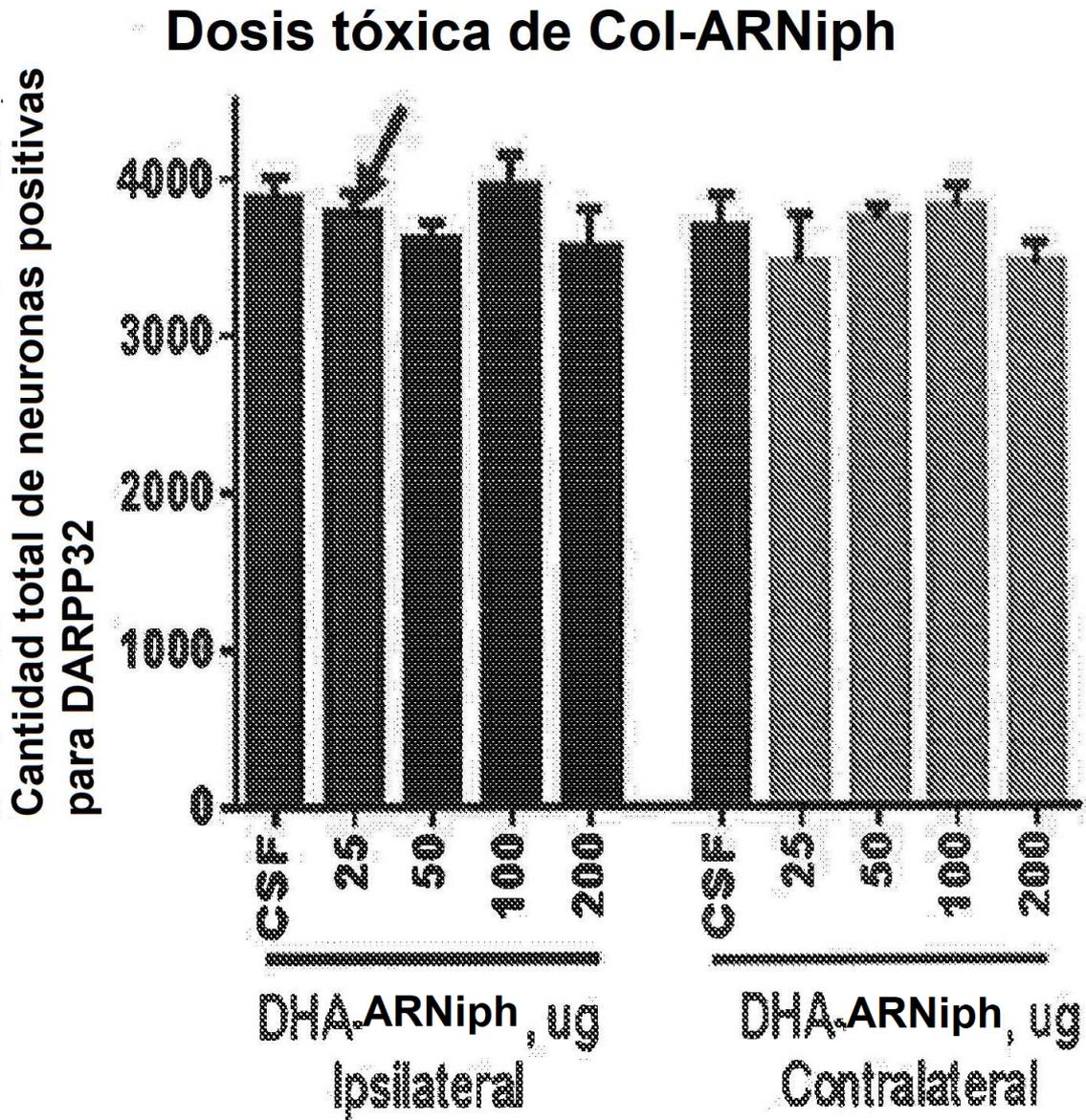


Fig. 103C

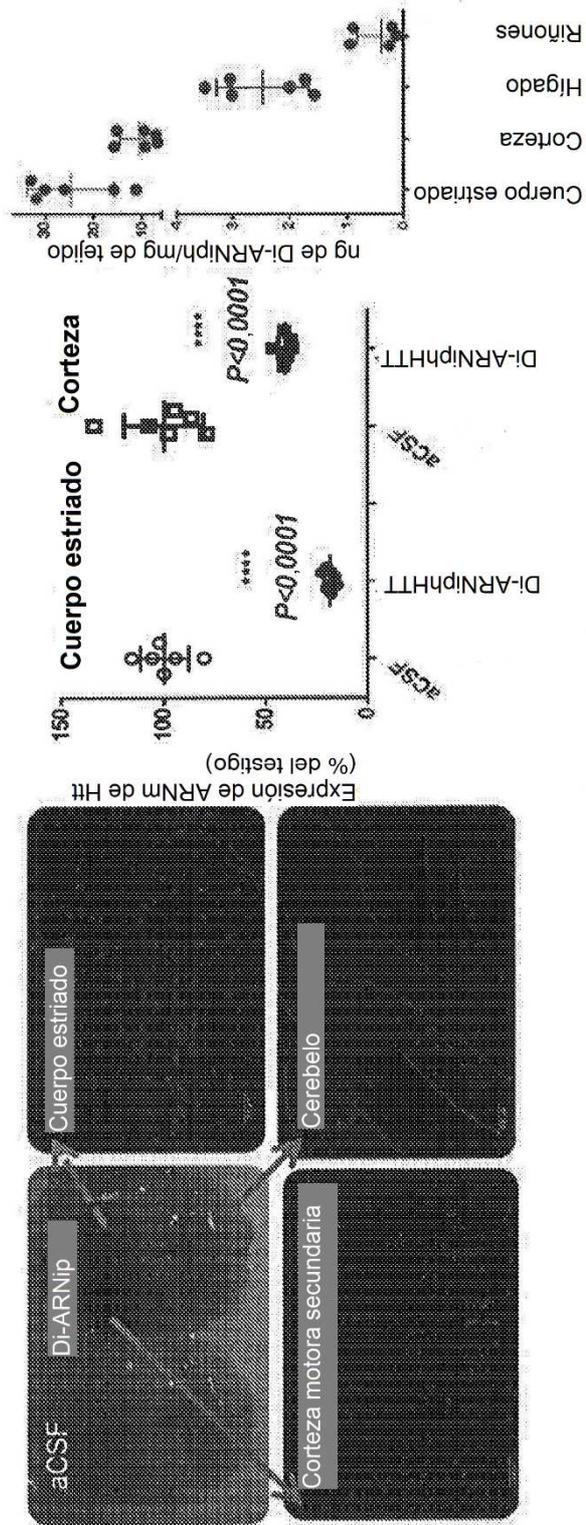


Fig. 104

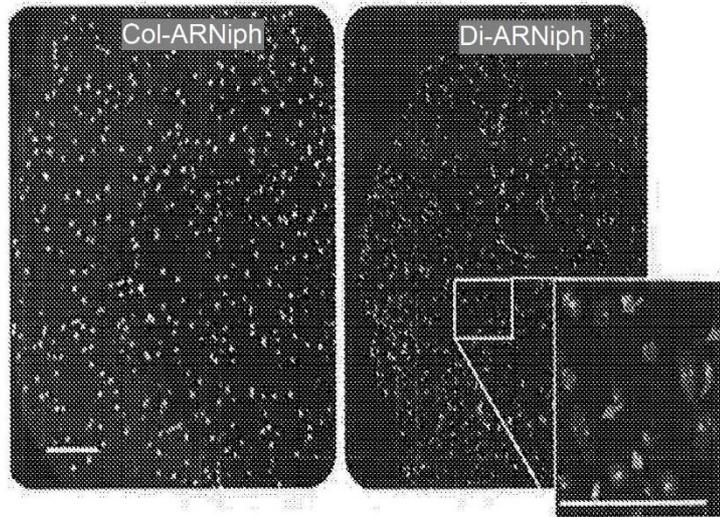


Fig. 105A

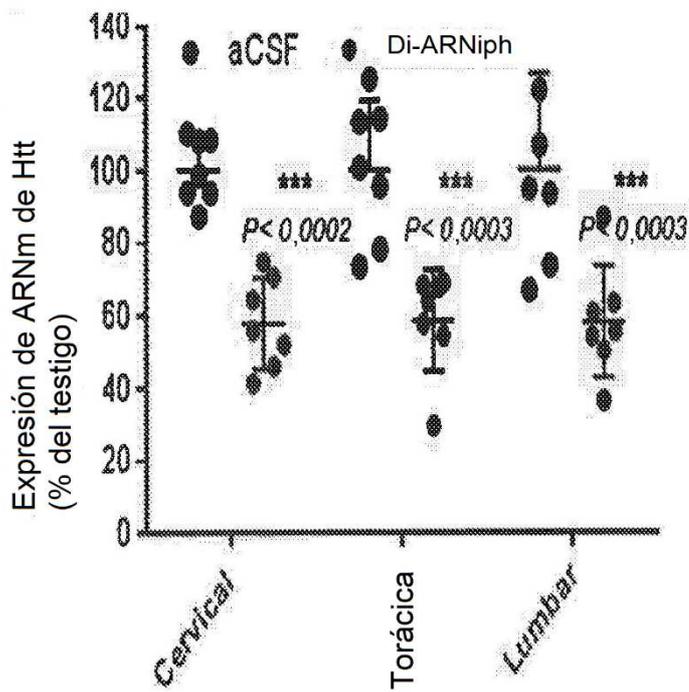


Fig. 105B

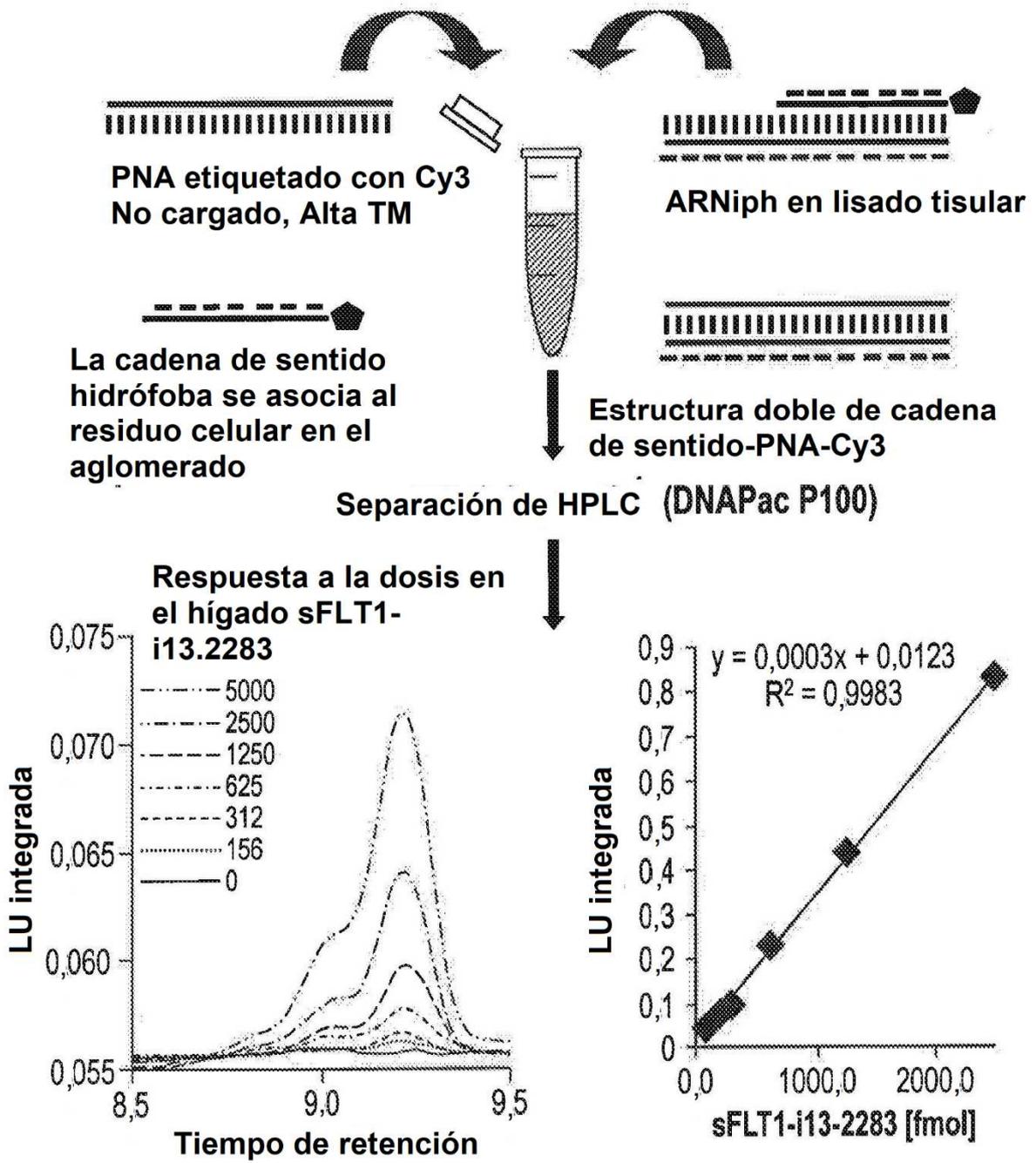
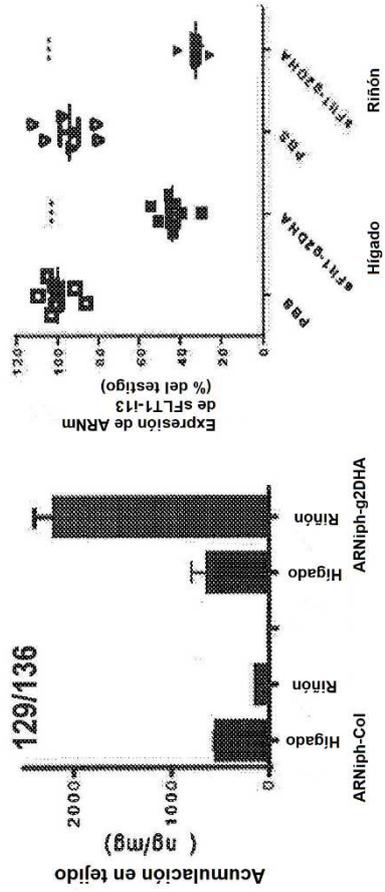
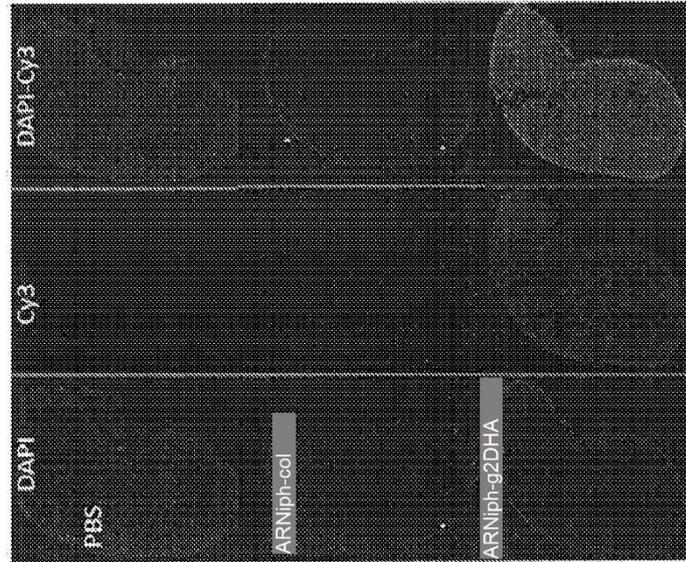


Fig. 106

Captación y eficacia de g2DHA-ARNiiph en riñón después de una única inyección (1 x 15 mg/kg, 1 semana)



g2DHA-ARNiiph se acumula en los túbulos contoneados proximales



Fig. 107

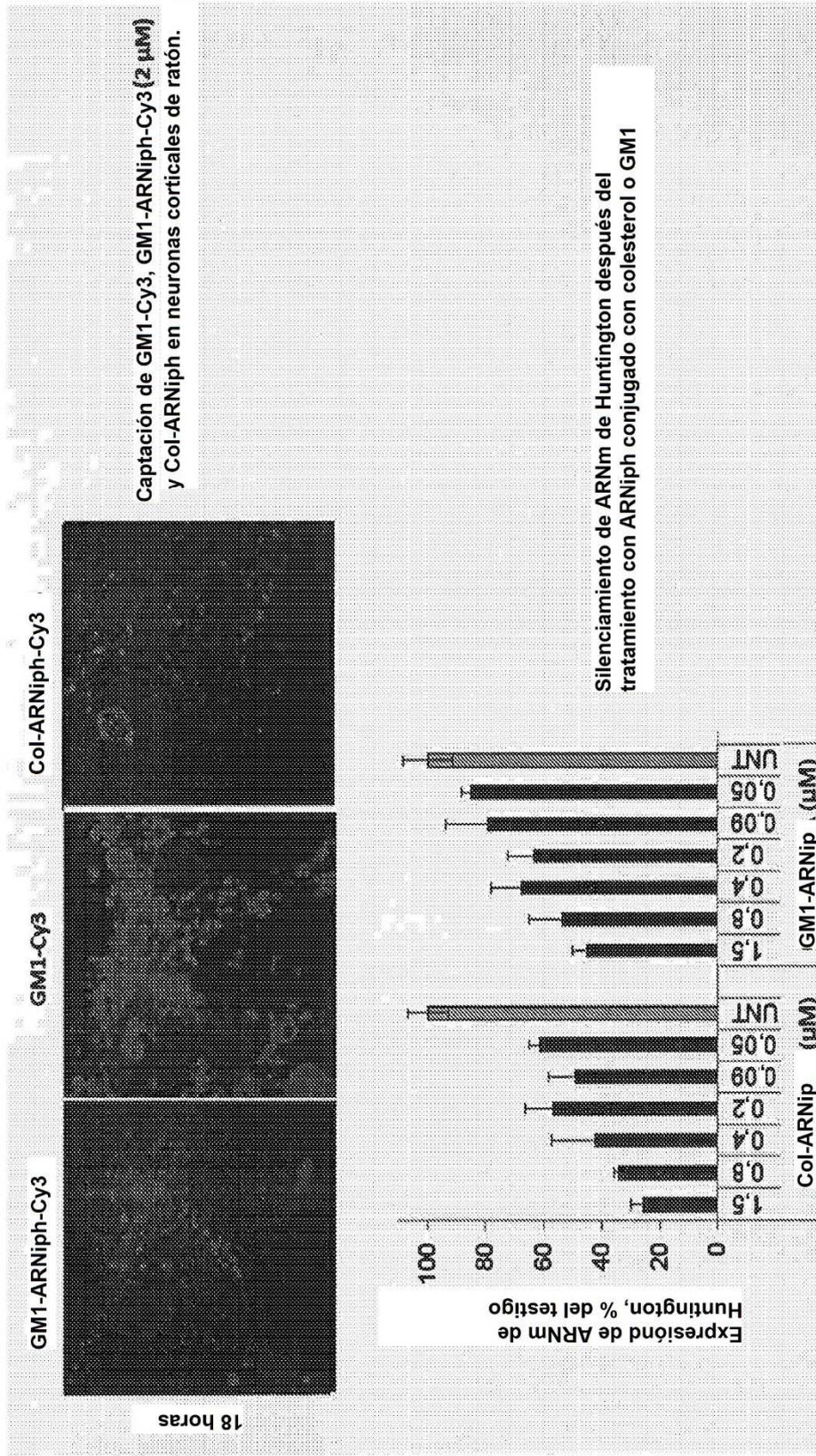


Fig. 108

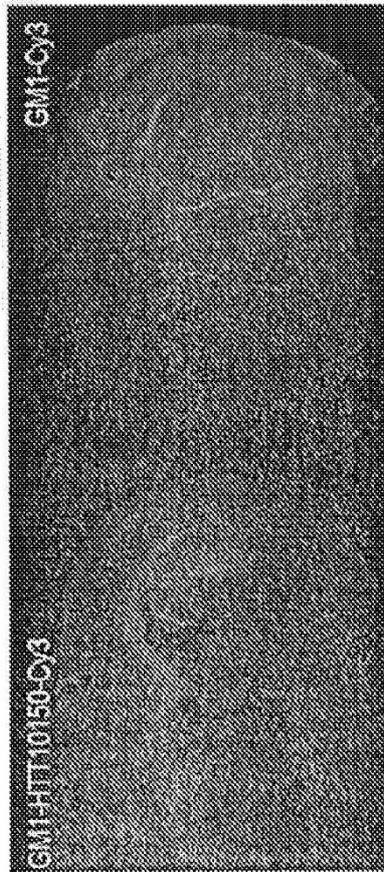


Fig. 109

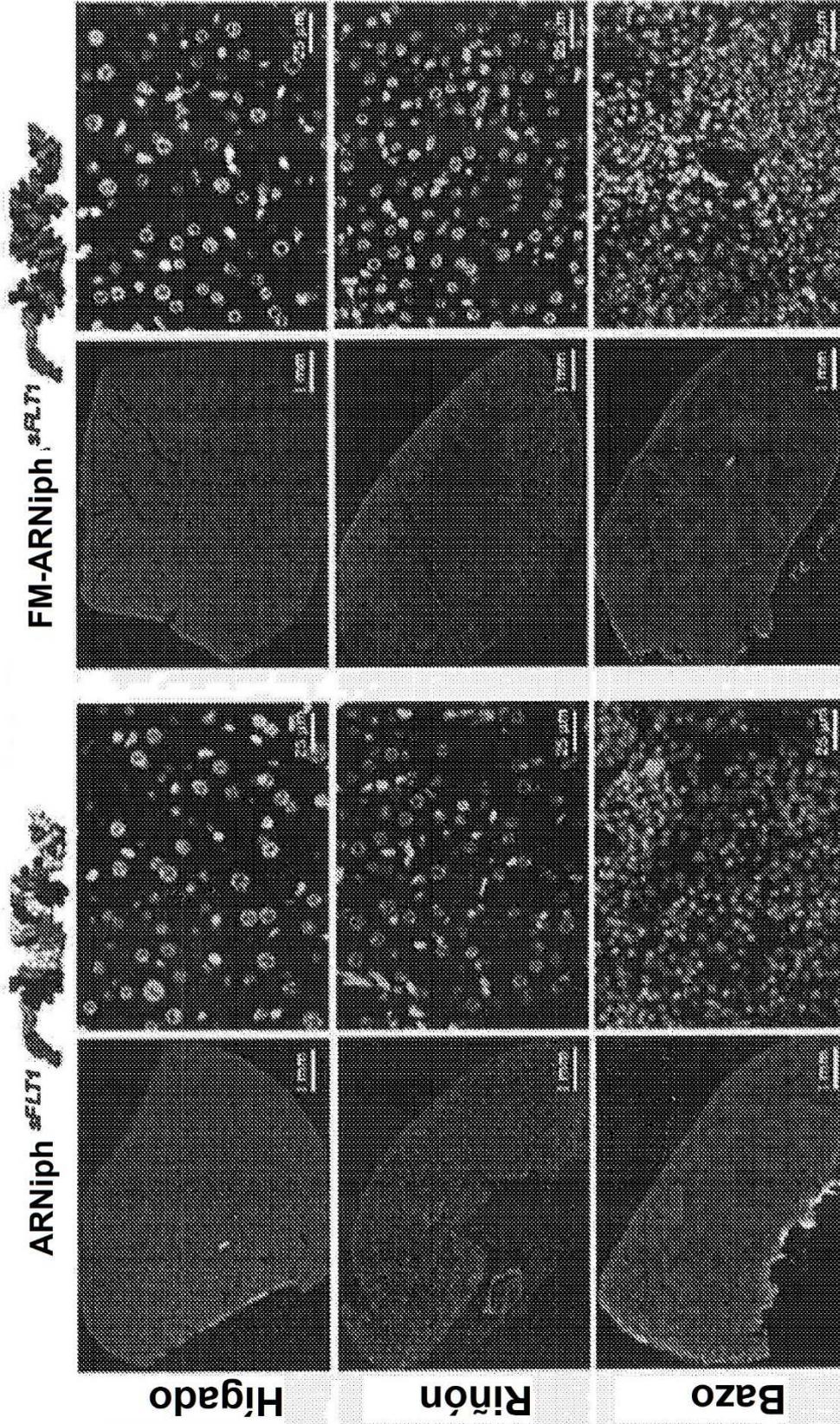


Fig. 110A

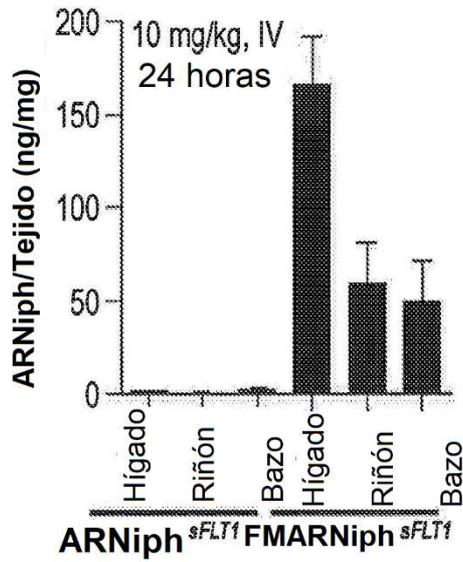


Fig. 110B

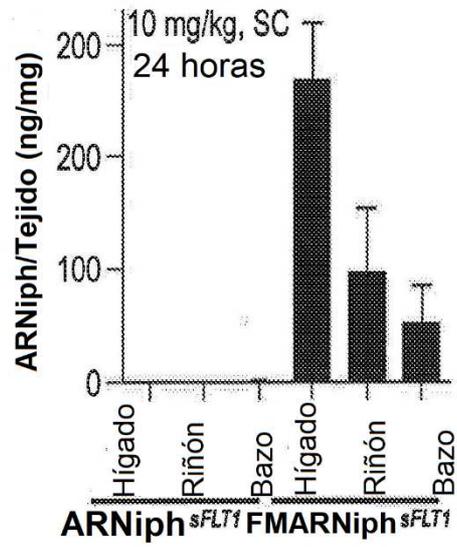


Fig. 110C

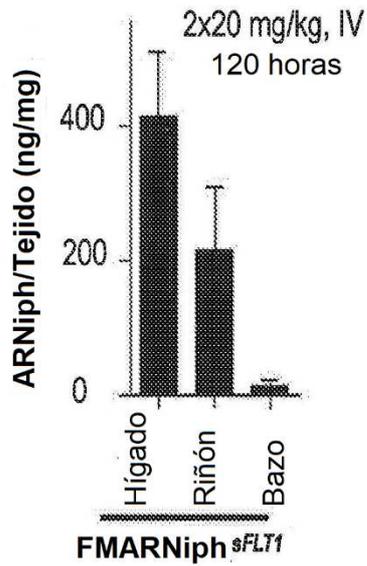


Fig. 110D

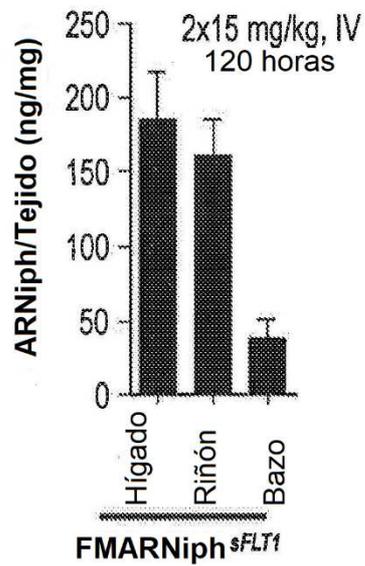


Fig. 110E

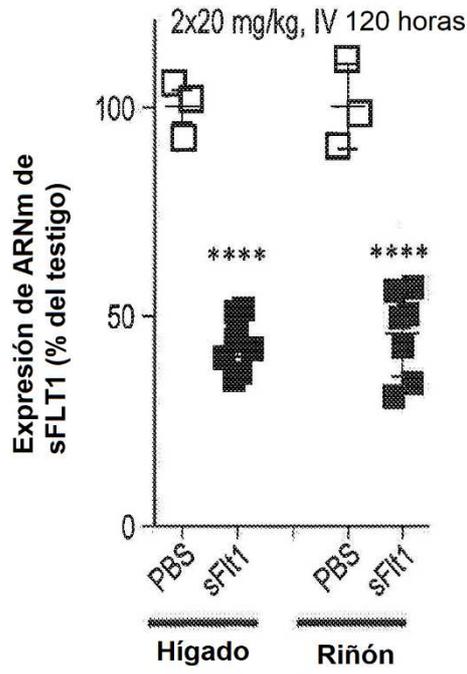


Fig. 110E

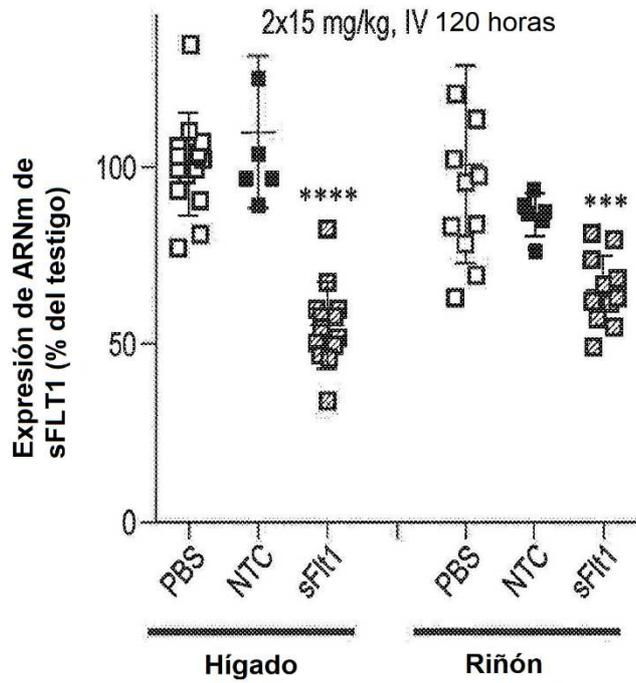


Fig. 110F

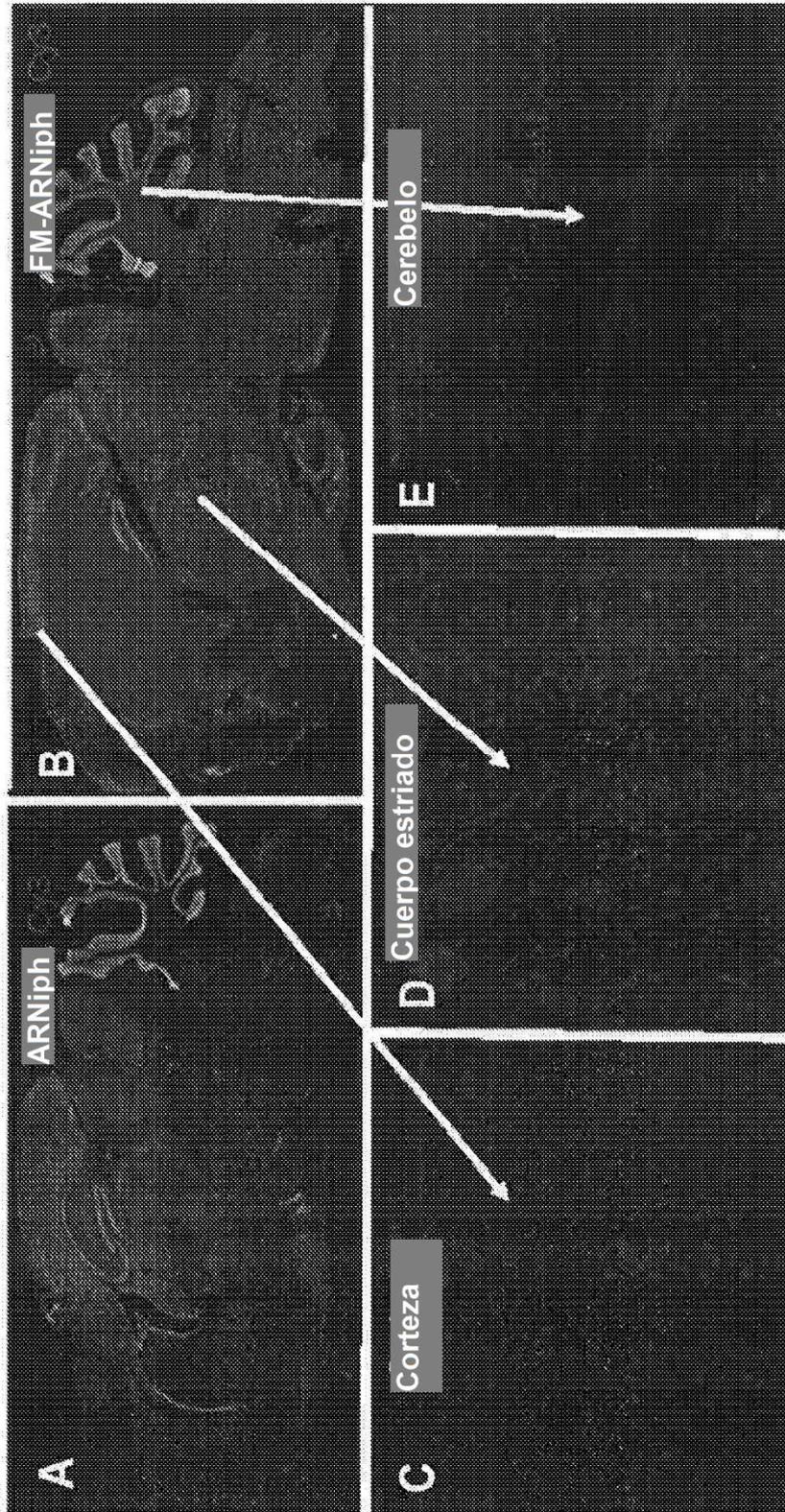


Fig. 111A-E

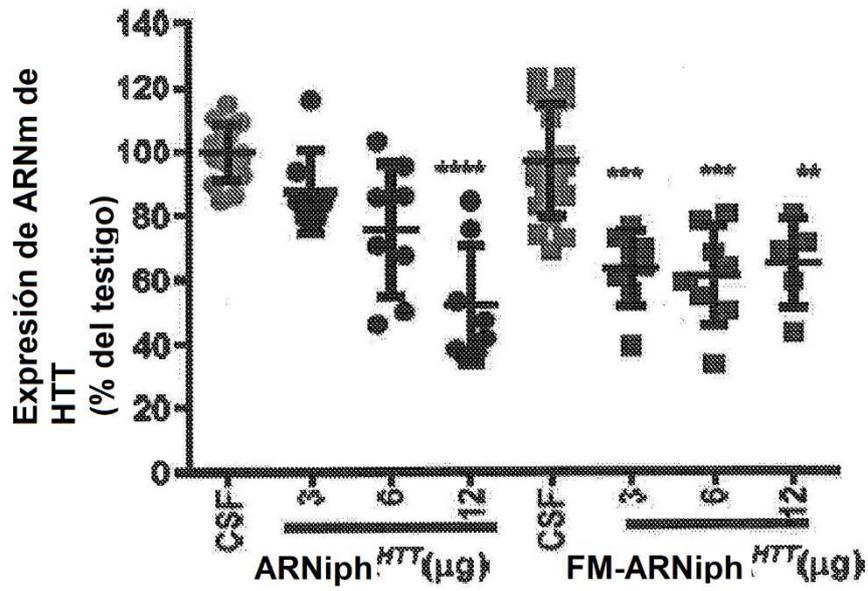


Fig. 111F

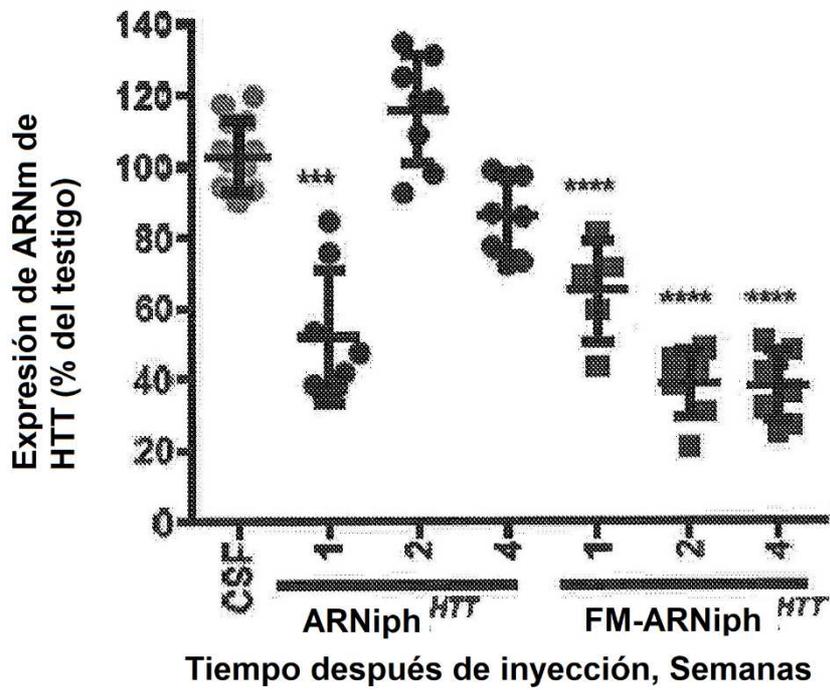


Fig. 111G