

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 555**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2011 E 19174058 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2022 EP 3599280**

54 Título: **Moléculas de ácido nucleico que inducen la interferencia de ARN y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**22.10.2010 KR 20100103701**

**27.06.2011 KR 20110062504**

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

**16.12.2022**

73 Titular/es:

**OLIX PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
1014, Gwanggyo Ace Tower 1 17, Daehak 4-ro,  
Yeongtong-gu, Suwon-si  
Gyeonggi-do 16226, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, DONG KI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones:**

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

**ES 2 930 555 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Moléculas de ácido nucleico que inducen la interferencia de ARN y usos de las mismas

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi, que tiene una nueva estructura, y al uso de la misma, y más particularmente a una nueva molécula de ácido nucleico, que tiene una estructura que consiste en una primera cadena, que tiene una longitud de 24-121 nucleótidos (nt) y comprende una región parcial complementaria a un ácido nucleico diana, y una segunda cadena, que tiene una longitud de 13-21 nt y tiene una región que se une de manera complementaria a la región parcial complementaria al ácido nucleico diana en la primera cadena, para que la molécula de ácido nucleico inhiba la expresión del gen diana con mayor eficacia y a un método para inhibir la expresión de un gen diana utilizando la molécula de ácido nucleico.

15 **Antecedentes de la técnica**

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo capaz de inhibir la expresión de un gen de forma muy específica y eficaz, en la que se induce la degradación del ARNm de un gen diana mediante la introducción de un ARN bicatenario, que comprende una cadena en sentido que tiene una secuencia homóloga al ARNm del gen diana y una cadena en antisentido que tiene una secuencia complementaria al ARNm del gen diana, en células o similares, inhibiendo así la expresión del gen diana.

En la mayoría de los ARNip que se han utilizado en la técnica, la longitud de la cadena antisentido se limita a 19-23 nucleótidos (nt). Esto se debe a que la estructura de los ARNip que se han utilizado por los investigadores imita la estructura de los productos obtenidos al cortar largos ARNbc en las células mediante un dicer (Elbashir *et al.* Nature 2001, 411:494-498). Además, los primeros estudios de cristalografía de rayos X sugirieron un modelo en el que los extremos 5' y 3' de la cadena antisentido del ARNip introducida en Argonaute-2 (Ago2), que es el elemento clave de un complejo RISC, se unen al dominio medio y al compartimento de unión del dominio PAZ, respectivamente (Song *et al.* Nat. Struct. Biol. 2003, 10: 1026-1032), pero estudios posteriores revelaron que el extremo 3' posterior al 16<sup>o</sup> nucleótido de la cadena antisentido no se une al dominio PAZ (Wang *et al.* Nature 2009, 461: 754-761). Esto sugiere que puede haber flexibilidad en la secuencia y la longitud del extremo 3' de la cadena antisentido del ARNip.

Mientras tanto, un estudio adicional sobre el ARNip informó de una construcción modificada de ARNip-ADN, que comprende una molécula de ADN monocatenario que puede funcionar como cebador para PCR con el fin de detectar el ARNip en una muestra (Documento US 2009/0012022 A1). Sin embargo, la construcción de ARNip-ADN modificada sólo tiene una herramienta adicional para la cuantificación, pero no influye positivamente en la eficacia con la que se inhibe un gen diana.

Los documentos WO 2009/029690 A1 y WO 2009/078685 A2 divulgan agentes inductores de ARNi con una cadena en sentido y una cadena antisentido.

En consecuencia, los actuales inventores han realizado grandes esfuerzos para determinar una nueva molécula de ácido nucleico inductora de ARNi que inhibe un gen diana con mayor eficacia, y como resultado, han diseñado una molécula de ácido nucleico bicatenario que comprende una primera cadena, que tiene una longitud de 24-121 nt y comprende una región complementaria a un ácido nucleico diana, y una segunda cadena que tiene una longitud de 13-21 nt y tiene una región que se une de manera complementaria a la región de la primera cadena, que es complementaria al ácido nucleico diana, y los presentes inventores han predicho que un oligonucleótido de ácido nucleico que se encuentre en la región monocatenaria en el extremo 3' de la primera cadena se dirigirá a otros genes diana o guiará esta molécula de ácido nucleico al gen diana. Además, los presentes inventores han construido una estructura de molécula de ácido nucleico, que tiene una región monocatenaria extensa en el extremo 3' de la primera cadena, utilizando una estructura de ARNip (Publicación de patente coreana abierta N.º 10-2009-0065880 presentada por los presentes inventores) que muestra efectos inespecíficos minimizados y no satura la maquinaria de ARNi, y los presentes inventores han predicho que un oligonucleótido de ácido nucleico, que se encuentra en la región monocatenaria del extremo 3' de la primera cadena, puede mostrar el efecto de dirigirse a otros genes diana o guiar el ARNip en el extremo 5' hacia el gen diana, al tiempo que se minimizarán los efectos inespecíficos, completando de este modo la presente invención.

La información anterior divulgada en esta sección de Antecedentes es únicamente para mejorar la comprensión de los antecedentes de la presente invención y, por lo tanto, puede contener información que no forma parte de la técnica anterior que ya es conocida por un experto habitual en la materia.

**Sumario de la invención**

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi que tenga una

estructura novedosa y un efecto mejorado en la inhibición de la expresión génica.

Para conseguir el objetivo anterior, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi que comprende una primera cadena, que tiene una longitud de 24-66 nt y comprende una región 100 % complementaria a un ARN mensajero (ARNm) diana, y una segunda cadena que tiene una longitud de 16 nt que se une de manera complementaria a la primera cadena, en donde la segunda cadena se une a la primera cadena de manera que la primera cadena tiene una región bicatenaria a la que se une la segunda cadena y una región monocatenaria de 50 nt o menos de longitud a la que no se une la segunda cadena, y en donde el extremo 5' de la primera cadena y el extremo 3' de la segunda cadena forman un extremo romo.

La presente invención también proporciona un complejo de ácido nucleico que comprende un vehículo de suministro celular unido a la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi.

La presente invención también proporciona una composición para inhibir la expresión génica, que contiene la citada molécula de ácido nucleico inductora de ARNi.

La presente invención también proporciona un método *in vitro* para inhibir la expresión génica, que comprende una etapa de introducción de la citada molécula de ácido nucleico inductora de ARNi en una célula.

Otras características y realizaciones de la presente invención serán más evidentes a partir de las siguientes descripciones detalladas y las reivindicaciones adjuntas.

#### Breve descripción de los dibujos

Las figuras que no pertenecen a la invención son para fines únicamente ilustrativos.

La figura 1 es una vista esquemática que muestra una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi según la presente divulgación.

La figura 2 muestra un ARNip antisentido largo (ARNipl) obtenido mediante la ampliación del extremo 3' de la cadena antisentido para proporcionar una secuencia complementaria a un ARNm diana.

La figura 3 muestra un ARNipla antisentido largo (ARNipla) obtenido mediante la ampliación del extremo 3' de la cadena antisentido de una estructura de ARNipa para proporcionar una secuencia complementaria a un ARNm diana.

La figura 4 muestra una estructura obtenida mediante la ampliación de una secuencia de ribozima o DNAzima dirigida al ARNm diana en el extremo 3' de una estructura de ARNip.

La figura 5 muestra estructuras de moléculas de ARNip que inhiben la expresión del gen KRAS, que está implicado en el crecimiento de las células cancerosas.

La figura 6 es un diagrama gráfico que muestra los niveles relativos de ARNm de KRAS causados por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la figura 5.

La figura 7 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la medición de los niveles de expresión del ARNm de KRAS, causados por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la figura 5, el día 1, el día 2 y el día 3.

La figura 8 muestra las estructuras de las moléculas de ARNipa y ARNipla para KRAS.

La figura 9 es un diagrama gráfico que muestra los niveles relativos de ARNm de KRAS causados por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la figura 8.

La figura 10 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la medición de las viabilidades de una línea celular AGS, causada por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la figura 8, el día 5.

La figura 11 muestra el ARNi<sub>pl</sub> (21S+10r) y el ARNi<sub>pl</sub>a (16S+10r), que tienen una secuencia ampliada complementaria al ARNm, para KRAS, y estructuras de moléculas (21S+10rc y 16S+10rc) que tienen una secuencia ampliada no complementaria al ARNm.

La figura 12 muestra los niveles relativos de ARNm de KRAS causados por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la figura 11.

La figura 13 muestra las estructuras de las moléculas de ARNipa y ARNipla para CTNNB1-2.

La figura 14 muestra los niveles de expresión del ARNm de KRAS causados por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la figura 13.

La figura 15 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la medición de las viabilidades de una línea celular Hep3B, causada por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la figura 13, el día 5.

La figura 16 es una fotografía que muestra los resultados del análisis 5'RACE (amplificación rápida de los extremos deal ADNc).

#### Descripción detallada

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los métodos de experimentación que se

describirán más adelante son los conocidos y comúnmente empleados en la técnica.

La definición de los principales términos utilizados en la descripción detallada de la invención es la siguiente.

5 Como se usa en el presente documento, el término "ARNi" (ARN de interferencia) se refiere a un mecanismo por el cual un ARN bicatenario (ARNbc) formado por una cadena complementaria al ARNm de un gen diana y una cadena que tiene una secuencia complementaria a la misma se introduce en las células o similares para inducir la degradación del ARNm del gen diana e inhibir así la expresión de dicho gen.

10 Como se usa en el presente documento, el término "ARNip" (ARN de interferencia pequeño) se refiere a un ARN corto bicatenario (ARNbc) que media en el silenciamiento génico eficiente de una manera específica de la secuencia.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "cadena antisentido" se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente o 100 % complementario a un ácido nucleico diana de interés. Por ejemplo, una cadena antisentido puede ser complementaria, en su totalidad o en parte, a una molécula de ARNm (ARN mensajero), una secuencia de ARN que no es ARNm (por ejemplo, microARN, ARNpiwi, ARNt, ARNr y ARNhn) o una secuencia de ADN codificante o no codificante. Las expresiones "cadena antisentido" y "cadena guía" se utilizan indistintamente en el presente documento.

20 La expresión "cadena en sentido" se refiere a un polinucleótido que tiene la misma secuencia de nucleótidos, en su totalidad o en parte, que un ácido nucleico diana, en el que el polinucleótido es idéntico, en su totalidad o en parte, a una molécula de ARNm (ARN mensajero), una secuencia de ARN que no es ARNm (por ejemplo, microARN, ARNpiwi, ARNt, ARNr y ARNhn) o una secuencia de ADN codificante o no codificante.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "gen" pretende tener el significado más amplio, y el gen puede codificar una proteína estructural o una proteína reguladora. En el presente documento, la proteína reguladora incluye un factor transcripcional, una proteína de choque térmico, o una proteína que participa en la replicación, transcripción y/o traducción del ADN/ARN. Además, el gen diana cuya expresión se quiere inhibir reside en un genoma viral que se ha integrado en el gen animal o puede estar presente como elemento extracromosómico. Por ejemplo, el gen diana puede ser un gen del genoma del VIH. En este caso, la construcción genética es útil para inactivar la traducción del gen del VIH en una célula de mamífero.

30 Se divulga una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi que comprende una primera cadena, que tiene una longitud de 24-121 nt y comprende una región complementaria a un ácido nucleico diana, y una segunda cadena que tiene una longitud de 13-21 nt y tiene una región que se une de manera complementaria a la región de la primera cadena, que es complementaria al ácido nucleico diana (véase la figura 1).

En la presente invención, el ácido nucleico diana es el ARNm (ARN mensajero).

40 En la presente invención, la región complementaria al ácido nucleico diana en la primera cadena tiene una longitud de 24-66 nt. Por lo tanto, la primera cadena comprende una región monocatenaria que no se une a la segunda cadena.

45 La región monocatenaria de la primera cadena, que no se une de manera complementaria a la segunda cadena, puede unirse directamente o mediante un enlazador a la región que se une de manera complementaria a la segunda cadena. En el presente documento, el enlazador puede ser un enlazador químico. Algunos ejemplos del enlazador químico incluyen, pero sin limitación, un resto de ácido nucleico, APN (un resto de APN), un resto peptídico, un enlace disulfuro o un resto de polietilenglicol.

50 La región monocatenaria tiene una longitud de 50 nt o menos. Más preferentemente, la región monocatenaria puede tener una longitud de 10-15 nt.

55 En la presente invención, al menos uno de los nucleótidos de la región monocatenaria de la primera cadena puede comprender un análogo de base voluminosa. Cuando una secuencia ampliada comprende un análogo de base voluminoso, tal como un derivado de la desoxiadenosina que tiene un grupo fenilo, una cadena de ARNm que se une de forma complementaria a la secuencia ampliada se escinde en el lugar del análogo de base voluminosa. Cualquier análogo de base voluminosa que induzca esta escisión puede utilizarse sin limitación en la presente invención.

60 En la presente invención, se predijo que el extremo 5' de una estructura nucleica obtenida mediante la ampliación de la cadena antisentido del ARNip de forma complementaria a una secuencia de ARNm diana funcionará como mecanismo de ARNi, mientras que el extremo 3' funcionará como mecanismo antisentido o guiará el ARNip del extremo 5' al ARNm diana. Cuando la secuencia del extremo 3' del antisentido, que es complementario al ARNm, es DNA, puede inducir la escisión del ARNm dependiente de RNasa H. Además, se predijo que cuando al menos uno de los nucleótidos de la región monocatenaria del extremo 3' del antisentido comprende un análogo de base voluminosa o la región monocatenaria se une al ARNm para formar una estructura abultada, se puede inducir la escisión.

65 Adicionalmente, cuando una molécula de ácido nucleico que comprende la ribozima o la DNAzima se introduce en la región monocatenaria de la primera cadena puede inducir una escisión sinérgica.

La publicación de patente coreana abierta N.º 10-2009-0065880 divulga una estructura de ARNi que es una molécula de ARNi que consiste en una cadena antisentido de 19-21 nt y una cadena en sentido de 13-16 nt, en la que el extremo 5' de la cadena antisentido es un extremo romo. Esta estructura de ARNi inhibe la expresión génica con gran eficacia sin causar efectos inespecíficos por parte de la cadena en sentido del ARNi ni inhibir otros mecanismos de ARNi. Cuando la estructura de la presente invención se aplica a este ARNi, se pueden minimizar los efectos inespecíficos mientras se obtiene el efecto descrito anteriormente del oligonucleótido de ácido nucleico contenido en la región monocatenaria de la primera cadena. Como se usa en el presente documento, la expresión "efectos inespecíficos" se refiere a cualquier caso en el que la cadena en sentido del ARNi causa la degradación inesperada de otros ARNm o el silenciamiento de los genes correspondientes, y la cadena antisentido del ARNi se empareja con dianas no deseadas para causar la degradación de otros ARNm o el silenciamiento de los genes correspondientes, aunque el ARNi se utiliza originalmente para inducir la degradación del ARNm que tiene una secuencia complementaria a la cadena antisentido para obtener el efecto de inhibir la expresión génica del ARNm.

La molécula de ARNi de la presente invención puede ser una molécula sintetizada según un método general, aunque sin limitación a la misma. En otras palabras, en la presente invención, la molécula de ARNi puede sintetizarse química o enzimáticamente. La molécula de ARNi de la presente invención puede proceder de genes naturales mediante técnicas recombinantes convencionales. En este caso, la molécula de ARNi puede ser sustancialmente complementaria a nivel de secuencia de nucleótidos a al menos una porción de ARNm del gen diana, cuya expresión se va a cambiar.

En consecuencia, la molécula de ácido nucleico de la presente invención puede comprender una modificación química. La modificación química puede obtenerse mediante la sustitución del grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de al menos un nucleótido, incluido en la molécula de ácido nucleico, por uno cualquiera de un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo O-alquilo, un grupo O-acilo, y un grupo amino, aunque sin limitación a los mismos. Para aumentar la capacidad de suministro de la molécula de ácido nucleico, el grupo hidroxilo puede sustituirse por uno cualquiera de -Br, -Cl, -R, -R'OR, -SH, -SR, -N<sub>3</sub> y -CN (R= alquilo, arilo o alquileo). Además, la modificación química puede obtenerse sustituyendo la cadena principal de fosfato de al menos un nucleótido por una cualquiera de una forma de fosforotioato, forma de fosforoditioato, forma de alquilfosfonato, forma de fosfoamidato y forma de boranofosfato. Adicionalmente, la modificación química puede obtenerse sustituyendo al menos un nucleótido incluido en la molécula de ácido nucleico por uno cualquiera de ANB (ácido nucleico bloqueado), AND (ácido nucleico desbloqueado), morfolino y APN (ácido peptidonucleico). Además, la modificación química puede obtenerse mediante la unión de la molécula de ácido nucleico a uno o más seleccionados del grupo que consiste en lípidos, péptidos de penetración celular y ligandos que se dirigen a células.

Además, la molécula de ácido nucleico según la presente invención puede unirse a un vehículo de suministro celular para su introducción en una célula. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un complejo de ácido nucleico que comprende un vehículo de suministro celular unido a la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi.

En la presente invención, el vehículo de suministro celular puede seleccionarse del grupo que consiste en polímeros catiónicos, lípidos, péptidos de penetración celular y ligandos que se dirigen a células. Los vehículos de suministro celular catiónicos, tal como los polímeros catiónicos y los lípidos catiónicos, son reactivos cargados positivamente que se utilizan para suministrar ácido nucleico (es decir, ARNi) en las células *in vitro* o *in vivo*. El vehículo catiónico de suministro celular puede interactuar de manera fuerte con la molécula de ácido nucleico de la presente invención para formar un complejo de modo que la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi pueda introducirse eficazmente en una célula. El vehículo de suministro celular que se utiliza en la presente invención puede ser un polímero catiónico tal como la polietilenoimina (PEI) o un liposoma como Lipofectamine 2000 (Invitrogen), aunque sin limitación a las mismas. Será obvio para los expertos en la materia que se puede utilizar un reactivo cargado positivamente para proporcionar el complejo según la presente invención. Adicionalmente, un lípido tal como el colesterol puede estar unido directamente a la molécula de ácido nucleico o puede estar unido indirectamente a la molécula de ácido nucleico a través de otro vehículo de suministro celular.

Además, las realizaciones de la presente invención sugieren que la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de la presente invención proporciona el efecto de inhibir eficazmente la expresión de un gen diana. Por lo tanto, en otro aspecto más, la presente invención se refiere a una composición para inhibir la expresión génica, que contiene la citada molécula de ácido nucleico inductora de ARNi. En el presente documento, la molécula de ácido nucleico puede estar en forma de un complejo de ácido nucleico que tiene el vehículo de suministro celular unido al mismo.

En un ejemplo de la presente invención, se descubrió que, cuando la estructura de ácido nucleico de la presente invención se aplicaba a un ARNi dirigido al gen diana KRAS o CTNNB1-2, la eficiencia con la que se inhibe la expresión del gen diana podría aumentar significativamente, y su eficacia también podría mantenerse durante un largo periodo de tiempo. Por lo tanto, será obvio para los expertos en la materia que, incluso cuando se proporcionan moléculas de ácido nucleico dirigidas a otros genes diana según la presente invención, se pueden obtener los mismos resultados.

Mientras tanto, la composición para inhibir la expresión génica según la presente invención puede proporcionarse en forma de un kit para inhibir la expresión génica. El kit de inhibición de la expresión génica puede adoptar la forma de frascos, cubos, bolsitas, sobres, tubos, ampollas y similares, que pueden estar formados en parte o en su totalidad por plástico, vidrio, papel, papel de aluminio, cera y similares. El recipiente puede estar equipado con una tapa total o parcialmente desmontable que puede ser inicialmente parte del recipiente o puede fijarse al recipiente por medios mecánicos, adhesivos u otros medios. El recipiente también puede estar equipado con un tapón, permitiendo el acceso al contenido mediante una aguja de jeringa. El kit puede comprender un paquete exterior que puede incluir instrucciones sobre el uso de los componentes.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método *in vitro* de inhibición de la expresión de un gen diana en una célula utilizando la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi anterior. Es decir, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana en una célula, que comprende una etapa de introducción de la citada molécula de ácido nucleico inductora de ARNi en una célula.

En la presente invención, la primera cadena del ácido nucleico inductor de ARNi es complementaria a la secuencia de ARNm de un gen diana.

En la presente invención, el gen diana puede ser un gen endógeno o un transgén.

La molécula de ácido nucleico según la presente invención no se limita necesariamente a un ARNi sintético y también puede aplicarse de manera ventajosa a ARNip o ARNh, que se expresa en las células mediante un vector de expresión o similar. En otras palabras, la molécula de ácido nucleico de la presente invención puede expresarse en células para inhibir la expresión del gen diana. Por lo tanto, se divulga un método para inhibir la expresión de un gen diana en una célula, comprendiendo el método una etapa de expresión de la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi antes mencionada en la célula.

Mientras tanto, la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de la presente invención puede utilizarse para inhibir la expresión de un gen diana, tal como un gen que causa o hace crecer el cáncer por sobreexpresión, es decir, un gen relacionado con tumores. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi es útil como composición anticancerosa. En el presente documento, el gen relacionado con tumores puede ser uno cualquiera de KRas, Wnt-1, Hec1, Survivina, Livina, Bcl-2, XIAP, Mdm2, EGF, EGFR, VEGF, VEGFR, Mcl-1, IGF1R, Akt1, Grp78, STAT3, STAT5a,  $\beta$ -catenina, WISP1 y c-myc, aunque sin limitación a los mismos. En un ejemplo de la presente invención, se descubrió que el gen KRAS implicado en el crecimiento de las células cancerosas se inhibía al introducir la molécula de ARNi de la presente invención en las células. Además, se demostró que una molécula de ARNi dirigida al gen de la beta-catenina destruía una línea celular cancerosa.

La composición anticancerosa puede proporcionarse como una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi o un complejo que comprende la molécula de ácido nucleico unida a un vehículo de suministro celular solo o en combinación con al menos un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. El complejo puede encontrarse en la composición farmacéutica en una cantidad farmacéuticamente eficaz según la enfermedad y la gravedad de la misma, la edad del paciente, el peso, el estado de salud y el sexo, la vía de administración y el periodo de tratamiento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición fisiológicamente aceptable y que no provoca trastornos gástricos, reacciones alérgicas, tales como trastornos gastrointestinales o vértigo, o reacciones similares, cuando se administra a seres humanos. Los ejemplos de dicho transportador, excipiente o diluyente pueden incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábiga, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, estearato de magnesio y aceites minerales.

La composición farmacéutica puede contener además cargas, agentes antiagregantes, lubricantes, agentes humectantes, perfumes, emulsionantes y conservantes. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede formular utilizando un método bien conocido en la técnica, de tal manera que pueda proporcionar la liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de su administración a mamíferos. La formulación puede encontrarse en forma de soluciones para inyección estériles, etc.

Mientras tanto, la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de la presente invención o un complejo que comprenda la molécula de ácido nucleico unida a un vehículo de suministro celular puede comprender además un agente quimioterapéutico anticanceroso conocido para proporcionar efectos combinados. Los ejemplos de un agente quimioterapéutico anticanceroso conocido que puede utilizarse en la presente invención incluyen cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, valubicina, curcumina, gefitinib, erlotinib, irinotecán, topotecán, vinblastina, vincristina, docetaxel, paclitaxel, y similares.

## 65 Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los ejemplos. Los ejemplos que no pertenecen a la invención tienen únicamente fines ilustrativos.

#### **Ejemplo 1: Construcción de ARNip antisentido largo guiado: Ejemplo de preparación 1**

5 Se construyó un ARNip de la siguiente manera: la segunda cadena tenía una longitud corta de 21 nt; la región de la primera cadena, que forma una doble cadena con la segunda cadena, tenía 19 nt de longitud; y el extremo 3' de la primera cadena tenía una región monocatenaria de 17 nt complementaria a un ARNm diana. El ARNip construido con la cadena antisentido larga se denominó "ARNip antisentido largo (ARNipla)". El oligonucleótido de ácido nucleico  
10 incluido en la secuencia ampliada permite guiar el ARNip hasta el ARNm diana o funcionar como un mecanismo antisentido típico (véase la figura 2).

#### **Ejemplo 2: Construcción de ARNip antisentido largo: Ejemplo de preparación 2**

15 Se construyó un ARNip de la siguiente manera: la segunda cadena tenía una longitud corta de 15 nt; la región de la primera cadena, que forma una doble cadena con la segunda cadena, tenía 19 nt de longitud; el extremo 3' de la primera cadena tenía una secuencia ampliada de 17 nt complementaria a un ARNm diana; y el extremo 5' de la primera cadena era un extremo romo. El ARNip construido que tenía la cadena antisentido larga se denominó "ARNip largo antisentido (ARNipla)". El oligonucleótido de ácido nucleico incluido en la secuencia ampliada permite guiar el ARNip  
20 hasta el ARNm diana o funcionar como un mecanismo antisentido típico (véase la figura 3).

#### **Ejemplo 3: Construcción de ARNip guiado por enzimas de ADN (o ribozimas) (ARNZip): Ejemplo de preparación 3**

25 Se construyó una estructura con una cadena antisentido larga utilizando ARNip de CTNNB1-2 y DNAzima Dz339 de la siguiente manera: la cadena en sentido tenía una longitud corta de 21 nt; y el extremo 3' de la cadena antisentido de 19 nt tenía DNAzima. La estructura construida se denominó "ARNip guiado por DNAzima (ARNZip)" (véase la figura 4).

#### **Ejemplo 4: Construcción de ARNipl que inhibe la expresión del gen KRAS y examen de la capacidad para inhibir la expresión del gen KRAS**

Se diseñó un ARNip que inhibe la expresión del gen KRAS implicado en el crecimiento de las células cancerosas. Además, los ARNip antisentido largos (ARNipl) se construyeron añadiendo cada uno de 5 nt, 10 nt y 15 nt al extremo  
35 3' de la cadena antisentido de una estructura de ARNip convencional (19+2). En el presente documento, se construyeron las estructuras (21S+5d, 10d y 15d) que tienen una secuencia de ADN ampliada complementaria a un ARNm diana, y las estructuras de control (21S+5c, 10c y 15c) que tienen una secuencia de ADN ampliada no complementaria a un ARNm diana, y se compararon entre sí las eficiencias con las que las estructuras construidas inhiben la expresión del gen diana (véase la figura 5). Además, se construyó una estructura (21 + 15d-mut) mutando la secuencia semilla del ARNipl, y se analizó si la capacidad del ARNipl para inhibir la expresión del gen depende de la secuencia semilla, como el ARNip. Cada uno de los ARNip y ARNipl se transfectó en células AGS (ATCC CRL 1739, adenocarcinoma gástrico, humano) a una concentración de 10 nM utilizando lipofectamine 2000 (Invitrogen). Los cebadores utilizados en PCR en tiempo real para la medición del ARNm son los siguientes:

45 KRAS

secuencia directa 5'-GAGTGCCTTGACGATACAGC-3' (SEQ ID NO: 15); y  
secuencia inversa 5'-CCCTCATTGCACTGTACTCC-3' (SEQ ID NO: 16).

50 Como resultado, como se puede observar en la figura 6, el ARNipl que tiene la región monocatenaria complementaria al ARNm diana mostró una mayor capacidad de inhibición del gen diana, en comparación con la estructura de ARNip convencional, y esta tendencia era proporcional a la longitud de la región monocatenaria. Sin embargo, en el caso del ARNip de control que tiene la región monocatenaria no complementaria al ARNm diana, no se pudo observar esta capacidad mejorada de inhibición de la expresión de los genes. En el caso del ARNipl que tiene la mutación de la secuencia semilla, la capacidad de inhibir el gen diana casi desapareció. Esto sugiere que el ARNipl inhibe el gen diana mediante el mecanismo de ARNi dependiente de secuencia semilla, como el ARNip convencional, y no muestra un silenciamiento génico inespecífico causado por la estructura modificada.

60 A continuación, se examinó si la capacidad del ARNipl para inhibir el gen diana se mantiene suficientemente tras la introducción intracelular en comparación con la del ARNip. Se demostró que la capacidad de la estructura convencional de ARNip para inhibir la expresión génica alcanzaba un máximo a 1 día de la introducción intracelular y se reducía a los 2 y 3 días de la introducción intracelular (véase la figura 7). Sin embargo, la capacidad del ARNipl para inhibir la expresión del gen diana se mantuvo incluso hasta 3 días después de la introducción intracelular. Por el contrario, en el caso del ARNip de control que tiene la región monocatenaria no complementaria al ARNm diana, no se pudo  
65 observar esta capacidad mejorada de inhibición de la expresión de los genes. Dichos resultados sugieren que el ARNipl que tiene la región monocatenaria complementaria al ARNm del gen diana presenta la eficacia elevada con la

que inhibe la expresión génica, en comparación con la estructura convencional de ARNip, y su eficacia también se mantiene durante un periodo de tiempo más largo.

**Ejemplo 5: Construcción de ARNipla que inhibe la expresión del gen KRAS y examen de la capacidad para inhibir la expresión del gen KRAS**

Además del ejemplo 4, se realizó un examen para determinar si la estructura de la molécula de ácido nucleico de la presente invención, cuando se aplica a un ARNip asimétrico de doble hélice más corto (ARNipa), puede mejorar la capacidad de inhibir la expresión del gen diana.

De una manera similar al ejemplo 4, las estructuras (16S+5d, 10d y 15d) se construyeron ampliando el extremo 3' de la cadena antisentido de la estructura de ARNipla convencional con ADN que tenía una secuencia complementaria a un ARNm diana, y se construyeron las estructuras de control (16S+5c, 10c y 15c; el ARNip largo antisentido (ARNipla) con una secuencia de ADN ampliada no complementaria a un ARNm diana (véase la figura 8). Las estructuras construidas se transfectaron en células AGS y se comparó su capacidad para inhibir el crecimiento de células cancerosas. Estos ARN se transfectaron en células AGS y, a continuación, se llevó a cabo una PCR en tiempo real de la misma manera que se describe en el ejemplo 4, para verificar las eficiencias con las que las estructuras inhiben la expresión del gen diana KRAS (véase la figura 9). Cada uno de los ARNiipa y ARNipla se transfectó en células AGS (ATCC CRL 1739, adenocarcinoma gástrico, humano) a una concentración de 10 nM utilizando lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Como resultado, la capacidad de inhibición del ARNm diana del ARNipla que tiene la secuencia monocatenaria ampliada complementaria al ARNm diana aumentó de forma proporcional a la longitud de la secuencia ampliada, similar al caso del ARNip. Sin embargo, este efecto no se observó en el caso en que la secuencia ampliada no era complementaria al ARNm diana.

**Ejemplo 6: ARNipla que inhibe la expresión del gen KRAS y examen de la capacidad del ARNipla para inhibir el crecimiento de las células cancerosas AGS**

A continuación, se realizó un examen para determinar si las estructuras de ARNipl y ARNipla dirigidas a KRAS mostraban una mayor capacidad de inhibición del gen diana, en comparación con el ARNip y el ARNiipa, y también si tienen una mayor capacidad para inhibir el crecimiento de las células cancerosas AGS. Concretamente, las células AGS sembradas en una placa de 96 pocillos se transfectaron con 10 nM de ARN utilizando lipofectamine 2000, y después de 5 días, se midió la viabilidad de las células mediante recuento visual del número de células a través de observación microscópica.

Como resultado, se demostró que la capacidad para inhibir la expresión del ARNm de KRAS tenía una alta relación con la capacidad para inhibir el crecimiento de las células cancerosas. Concretamente, se demostró que el ARNipl (21S+15d) que tiene la secuencia ampliada de 15 nucleótidos mostró una fuerte capacidad para inhibir el crecimiento de las células cancerosas, en comparación con el ARNip, y la capacidad del ARNipla (16S+15d) para inhibir el crecimiento de las células cancerosas aumentó en comparación con la del ARNiipa (véase la figura 10). Mientras tanto, el ARNipl con una mutación introducida en la secuencia semilla (LASmut) no indujo la inhibición del crecimiento de las células cancerosas, lo que sugiere que no aparece citotoxicidad inespecífica por la estructura de la secuencia larga ampliada. Estos resultados sugieren que, cuando se introduce una región monocatenaria complementaria a un ARNm diana en el extremo 3' de la cadena antisentido de cada uno de los ARNip y ARNiipa, la capacidad de inhibir la expresión génica y la expresión de fenotipos en las células puede aumentar.

**Ejemplo 7: Examen de las capacidades de ARNipl y ARNipla (que tienen ARN como secuencia ampliada) para inhibir la expresión del gen KRAS**

A continuación, el examen se realizó para determinar si las capacidades del ARNipl y del ARNipla (que tiene cada uno de ellos ARN en lugar de ADN como secuencia ampliada) para inhibir la expresión de un gen diana aumentan en comparación con las del ARNip y el ARNiipa, que les corresponden.

Como se muestra en la figura 11, se construyeron el ARNipl (21S+10r) y ARNipla (16S+10r), cada uno con una secuencia ampliada de 10 nt complementaria al ARNm, y también se construyeron las estructuras de control (21S+10rc, y 16S+10rc), cada una con una secuencia ampliada no complementaria al ARNm. Las estructuras construidas se transfectaron en células AGS y, a continuación, se examinaron las eficiencias con las que inhibían la expresión del ARNm de KRAS de la misma manera que se describe en el ejemplo 4.

Como resultado, como se puede observar en la figura 12, el ARNipl y ARNipla, que tienen la secuencia de ARN ampliada, tuvieron una gran capacidad para inhibir la expresión del gen diana, en comparación con el ARNip y el ARNiipa, que les corresponden. Particularmente, el ARNipla con una secuencia de ARN ampliada mostró una mayor capacidad inhibitoria en comparación con el ARNipla con una secuencia de ADN ampliada. Esto sugiere que la capacidad de inhibir la expresión del gen diana puede lograrse incluso cuando la secuencia antisentido larga es ARN además de ADN.

**Ejemplo 8: Construcción de ARNipla que inhibe la expresión del gen CTNNB1 y examen de la capacidad para inhibir la expresión del gen CTNNB1**5 **8-1: Medición del nivel de expresión del ARNm de CTNNB1**

A continuación, para examinar si la estructura de la molécula de ácido nucleico de la presente invención puede aumentar la actividad de los ARNi que se dirigen a otros genes, se construyeron estructuras de ARNi correspondientes a los ARNi dirigidos a la beta-catenina (CTNNB1) (véase la figura 13). A continuación, cada una de las estructuras construidas se transfirió en células Hep3B (ATCC HB 8064) a una concentración de 10 nM utilizando lipofectamine 2000, y a continuación se examinó la capacidad de inhibir la expresión del gen diana mediante PCR en tiempo real.

CTNNB1

secuencia directa 5'-ATGTCCAGCGTTTGGCTGAA-3' (SEQ ID NO: 32); y  
secuencia inversa 5'-TGGTCCTCGTCATTTAGCAGTT-3' (SEQ ID NO: 33).

Como resultado, como se puede observar en la figura 14, la capacidad del ARNi para inhibir la expresión del gen diana disminuyó en comparación con la de la estructura de ARNi convencional, pero la capacidad de inhibición del gen diana del ARNi (16S+15d) que tiene una secuencia de ADN de 15 nt complementaria a la secuencia del mRNA en el extremo 3' de la cadena antisentido aumentó hasta un nivel similar al del ARNi. Por otra parte, en el caso de que la estructura (16S+15c) tenga una secuencia de ADN ampliada no complementaria al gen diana, la disminución de la capacidad de inhibición del gen diana fue insignificante en comparación con la del ARNi. Por lo tanto, se descubrió que la estructura del ARNi tiene una mayor capacidad para inhibir el gen diana, independientemente de la secuencia del ARNi.

**8-2: Medición de la capacidad para inhibir el crecimiento de las células cancerosas Hep3B**

El aumento de la capacidad de la estructura del ARNi para inhibir el gen diana se verificó de nuevo midiendo la capacidad de inhibir el crecimiento de las células cancerosas Hep3B. Concretamente, 10 nM de cada uno de ARNi, ARNi y ARNi se transfirieron en células Hep3B, y después de 5 días, se examinó el grado de crecimiento celular contando el número de células. La viabilidad de las células se examinó mediante el recuento visual del número de células a través de observación microscópica. En resumen, las células AGS sembradas en una placa de 96 pocillos se transfirieron con 10 nM de cada uno de ARNi, ARNi y ARNi, y después de 5 días, se contó de manera visual el número de células viables.

Como resultado, como se puede observar en la figura 15, la capacidad del ARNi para eliminar las células cancerosas disminuyó en comparación con la del ARNi, pero el ARNi que tenía una secuencia ampliada complementaria al gen diana mostró una capacidad de destrucción de células similar a la del ARNi. Por otra parte, la capacidad de destrucción de células del ARNi con una secuencia ampliada no complementaria al gen diana no aumentó en comparación con la del ARNi. Esto sugiere que la molécula de ARNi que contiene una secuencia ampliada complementaria al gen diana en el extremo 3' de la cadena antisentido tiene una mayor capacidad para inhibir la expresión del gen diana.

**Ejemplo 9: Análisis del mecanismo de inhibición de la expresión génica**

Para examinar si la molécula de ácido nucleico de la presente invención inhibe la expresión génica según el mismo mecanismo de ARNi que el ARNi 19+2 convencional o el ARNi, se realizó la siguiente prueba. Concretamente, para analizar un sitio de escisión de un ARNm diana, se realizó el análisis 5'RACE (amplificación rápida de los extremos del ADNc).

En primer lugar, cada uno de siKRAS, asiKRAS, LaiKRAS y LasiKRAS, construidos en los ejemplos 4 y 5, se introdujo en células HeLa utilizando PEI, y después de 18 horas, el ARN total se extrajo utilizando un kit Tri-reagent (Ambion). El ARN total (3µg) se unió con 0,25 µg de oligo de ARN GeneRacer, y el ARN total unido con el oligo de ARN GeneRacer se transcribió de forma inversa utilizando el oligo dT GeneRacer y el kit SuperScript™ III RT (Invitrogen). El ARNm oligounido se amplificó utilizando cebadores específicos de gen. El producto de PCR se clonó en un vector T&A (RBC) y luego se secuenció con un cebador directo M13.

Cebador específico del gen KRAS:  
5'-CTGCATGCACAAAACCCCAAGACA-3' (SEQ ID NO: 34);  
Cebador específico del gen KRAS anidado:  
5'-CACAAAGAAAGCCCTCCCCAGTCCTCA -3' (SEQ ID NO: 35).

Como resultado, como se puede observar en la figura 16, los casos de tratamiento con siKRAS, asiKRAS, LsiKRAS y Lasi-KRAS podrían proporcionar productos RACE del mismo tamaño. Además, estos productos RACE se clonaron en

vectores T (RBC), y se examinó una posición de escisión precisa en la secuencia de nucleótidos mediante secuenciación. Como resultado, se demostró que, en los casos de siKRAS, asiKRAS, LsiKRAS y LasiKRAS, se escindía la posición del ARNm correspondiente a la posición entre el 10° nucleótido y el 11° nucleótido del extremo 5' del antisentido.

5

### Aplicabilidad industrial

Como se ha descrito anteriormente, la estructura de la molécula de ácido nucleico de la presente invención se dirige a un gen diana complementario a una porción de la primera cadena por el oligonucleótido nucleico incluido en la región monocatenaria en el extremo 3' de la primera cadena para guiar el ARNip hacia el gen diana y aumentar así la eficiencia con la que la molécula de ácido nucleico inhibe el gen diana. Como alternativa, la molécula de ácido nucleico de la presente invención puede aumentar la capacidad del ARNip para unirse al gen diana o provocar una escisión sinérgica, mediante la introducción de ADN antisentido, ARN antisentido, ribozima o DNAzima, aumentando así la eficiencia con la que la molécula de ácido nucleico inhibe el gen diana. Además, cuando se utiliza la molécula de ácido nucleico según la presente invención, la eficiencia con la que se inhibe el gen diana puede mantenerse durante un largo periodo de tiempo. En consecuencia, la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de la presente invención puede utilizarse de manera eficaz para el tratamiento de cáncer o infección viral en lugar de las moléculas de ARNip convencionales.

10

15

20

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> OliX Pharmaceuticals, Inc.

<120> Moléculas de ácido nucleico que inducen la interferencia del ARN y usos de las mismas

25

<130> 237-057T1

<150> EP 11834541.2

<151> 07/09/2011

30

<150> PCT/KR2011/006632

<151> 07/09/2011

35

<150> KR10-2010-0103701

<151> 22/10/2010

<150> KR10-2011-0062504

<151> 27/06/2011

40

<160> 35

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Cadena en sentido del ARNip de CTNNB1-2

50

<400> 1

**cuaucagau gaugcagaac u**

21

55

<210> 2

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Cadena antisentido del ARNip de CTNNB1-2

<400> 2

**uucugcauca ucuugauagu u**

21

65

<210> 3

ES 2 930 555 T3

<211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> DNAzima Dz339

<400> 3  
 agcatgaaag gctagctaca acgatgtgta gat 33

10 <210> 4  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Híbrido Dz339 AS

20 <220>  
 <223> La molécula es una combinación de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(19)  
 25 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20)..(58)  
 30 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 4  
 uucugcauca ucuugauagt ttttagcat gaaaggctag ctacaacgat gtgtagat 58

35 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cadena en sentido del ARNip de KRAS

<400> 5  
 ggaagcaagu aguaauugau u 21

45 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Cadena antisentido del ARNip (19+2) de KRAS

<400> 6  
 ucaauuacua cuugcuuccu u 21

55 <210> 7  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Cadena antisentido del ARNipl (21S+5d) de KRAS

65 <220>

<223> La molécula es una combinación de ARN/ADN  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (1)..(21)  
 <223> ribonucleótidos  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (22)..(26)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 <400> 7  
 15 **ucaauuacua cuugcuuccu gtagga** 26  
 <210> 8  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Cadena antisentido del ARNipl (21S+5c) de KRAS  
 <220>  
 25 <223> La molécula es una combinación de ARN/ADN  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (1)..(21)  
 <223> ribonucleótidos  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> (22)..(26)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 <400> 8  
 40 **ucaauuacua cuugcuuccu gagcat** 26  
 <210> 9  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Cadena antisentido del ARNipl (21S+10d) de KRAS  
 <220>  
 50 <223> La molécula es una combinación de ARN/ADN  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (1)..(21)  
 <223> ribonucleótidos  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (22)..(31)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 <400> 9  
 65 **ucaauuacua cuugcuuccu gtaggaatcc t** 31  
 <210> 10  
 <211> 31

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Cadena antisentido del ARNipl (21S+10c) de KRAS

<220>  
 <223> La molécula es una combinación de ARN/ADN

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(21)  
 <223> ribonucleótidos

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (22)..(31)  
 <223> desoxirribonucleótidos

20 <400> 10  
 ucaauuacua cuugcuuccu gagcatgacc a 31

<210> 11  
 <211> 36  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> Cadena antisentido del ARNipl (21S+15d) de KRAS

<220>  
 <223> La molécula es una combinación de ARN/ADN

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(21)  
 <223> ribonucleótidos

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (22)..(36)  
 <223> desoxirribonucleótidos

45 <400> 11  
 ucaauuacua cuugcuuccu gtaggaatcc tctatt 36

<210> 12  
 <211> 36  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cadena antisentido del ARNipl (21S+15c) de KRAS

55 <220>  
 <223> La molécula es una combinación de ARN/ADN

<220>  
 60 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(21)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 65 <221> misc\_feature  
 <222> (22)..(36)

ES 2 930 555 T3

<223> desoxirribonucleótidos  
 <400> 12  
**ucaauuacua cuugcuuccu gagcatgacc acggtt** 36  
 5  
 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cadena en sentido del ARNipl (21S+15d-mut) de KRAS  
 <400> 13  
**ggaagcaagu aguuuaacau u** 21  
 15  
 <210> 14  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Cadena antisentido del ARNipl (21S+15d-mut) de KRAS  
 25  
 <220>  
 <223> La molécula es una combinación de ARN/ADN  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(21)  
 <223> ribonucleótidos  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (22)..(36)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 35  
 <400> 14  
**uguuaaacua cuugcuuccu gtaggaatcc tctatt** 36  
 40  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Secuencia directa de KRAS  
 <400> 15  
**gagtgccttg acgatacagc** 20  
 50  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Secuencia inversa de KRAS  
 60  
 <400> 16  
**ccctcattgc actgtactcc** 20  
 65  
 <210> 17  
 <211> 16  
 <212> ARN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cadena en sentido del ARNipa de KRAS	
	<400> 17	
	<b>agcaaguagu aauga</b>	<b>16</b>
10	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cadena antisentido del ARNipa de KRAS	
	<400> 18	
	<b>ucaauuacua cuugcuuccu u</b>	<b>21</b>
20	<210> 19	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cadena antisentido del ARNipla (16S+5d) de KRAS	
30	<220>	
	<223> La molécula es una combinación de ARN/ADN	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
	<223> ribonucleótidos	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (22)..(26)	
	<223> desoxirribonucleótidos	
45	<400> 19	
	<b>ucaauuacua cuugcuuccu gtagga</b>	<b>26</b>
50	<210> 20	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cadena antisentido del ARNipla (16S+5c) de KRAS	
60	<220>	
	<223> La molécula es una combinación de ARN/ADN	
65	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
	<223> ribonucleótidos	
70	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (22)..(26)	
	<223> desoxirribonucleótidos	
75	<400> 20	

	<b>ucaauuacua cuugcuuccu gagcat</b>	<b>26</b>
	<210> 21	
	<211> 31	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Cadena antisentido del ARNi pla (16S+10d) de KRAS	
	<220>	
	<223> La molécula es una combinación de ARN/ADN	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
	<223> ribonucleótidos	
	<220>	
20	<221> misc_feature	
	<222> (22)..(31)	
	<223> desoxirribonucleótidos	
	<400> 21	
25	<b>ucaauuacua cuugcuuccu gtaggaatcc t</b>	<b>31</b>
	<210> 22	
	<211> 31	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cadena antisentido del ARNi pla (16S+10c) de KRAS	
35	<220>	
	<223> La molécula es una combinación de ARN/ADN	
	<220>	
40	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
	<223> ribonucleótidos	
	<220>	
45	<221> misc_feature	
	<222> (22)..(31)	
	<223> desoxirribonucleótidos	
	<400> 22	
50	<b>ucaauuacua cuugcuuccu gagcatgacc a</b>	<b>31</b>
	<210> 23	
	<211> 36	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cadena antisentido del ARNi pla (16S+15d) de KRAS	
	<220>	
60	<223> La molécula es una combinación de ARN/ADN	
	<220>	
	<221> misc_feature	
65	<222> (1)..(21)	
	<223> ribonucleótidos	

# ES 2 930 555 T3

5	<p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (22)..(36)          &lt;223&gt; desoxirribonucleótidos</p>	
	<p>&lt;400&gt; 23  <b>ucaauuacua cuugcuuccu gtaggaatcc tctatt</b></p>	36
10	<p>&lt;210&gt; 24          &lt;211&gt; 36          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
15	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Cadena antisentido del ARNipla (16S+15c) de KRAS</p>	
20	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; La molécula es una combinación de ARN/ADN</p>	
25	<p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (1)..(21)          &lt;223&gt; ribonucleótidos</p>	
30	<p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (22)..(36)          &lt;223&gt; desoxirribonucleótidos</p>	
	<p>&lt;400&gt; 24  <b>ucaauuacua cuugcuuccu gagcatgacc acggtt</b></p>	36
35	<p>&lt;210&gt; 25          &lt;211&gt; 31          &lt;212&gt; ARN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
40	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Cadena antisentido del ARNipla (21S+10r) o ARNipla (16S+10r) de KRAS</p>	
	<p>&lt;400&gt; 25  <b>ucaauuacua cuugcuuccu guaggaaucc u</b></p>	31
45	<p>&lt;210&gt; 26          &lt;211&gt; 31          &lt;212&gt; ARN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
50	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Cadena antisentido del ARNipla (21S+10rc) o ARNipla (16S+10rc) de KRAS</p>	
	<p>&lt;400&gt; 26  <b>ucaauuacua cuugcuuccu gagcaugacc a</b></p>	31
55	<p>&lt;210&gt; 27          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; ARN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
60	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Cadena en sentido del ARNip (19+2) de CTNNB1-2</p>	
	<p>&lt;400&gt; 27  <b>cuaucaagau gaugcagaau u</b></p>	21
65		

5	<p>&lt;210&gt; 28                  &lt;211&gt; 21                  &lt;212&gt; ARN                  &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cadena antisentido del ARNip (19+2) o ARNipa de KRAS</p>	
10	<p>&lt;400&gt; 28  <b>uucugcauca ucuugauagu u</b></p>	21
15	<p>&lt;210&gt; 29                  &lt;211&gt; 16                  &lt;212&gt; ARN                  &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cadena en sentido del ARNip de CTNNB1-2</p>	
20	<p>&lt;400&gt; 29  <b>ucaagaugau gcagaa</b></p>	16
25	<p>&lt;210&gt; 30                  &lt;211&gt; 36                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cadena antisentido del ARNipla (16S+15d) de KRAS</p>	
30	<p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; La molécula es una combinación de ARN/ADN</p>	
35	<p>&lt;220&gt;                  &lt;221&gt; misc_feature                  &lt;222&gt; (1)..(21)                  &lt;223&gt; ribonucleótidos</p>	
40	<p>&lt;220&gt;                  &lt;221&gt; misc_feature                  &lt;222&gt; (22)..(36)                  &lt;223&gt; desoxirribonucleótidos</p>	
45	<p>&lt;400&gt; 30  <b>uucugcauca ucuugauagu uaatcaagtt tacaac</b></p>	36
50	<p>&lt;210&gt; 31                  &lt;211&gt; 36                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cadena antisentido del ARNipla (16S+15c) de KRAS</p>	
55	<p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; La molécula es una combinación de ARN/ADN</p>	
60	<p>&lt;220&gt;                  &lt;221&gt; misc_feature                  &lt;222&gt; (1)..(21)                  &lt;223&gt; ribonucleótidos</p>	
65	<p>&lt;220&gt;                  &lt;221&gt; misc_feature                  &lt;222&gt; (22)..(36)</p>	

	<223> desoxirribonucleótidos	
	<400> 31	
5	<b>uucugcauca ucuugauagu uggagcatga ccacgg</b>	36
	<210> 32	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia directa de CTNNB1	
	<400> 32	
15	<b>atgtccagcg tttggctgaa</b>	20
	<210> 33	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia inversa de CTNNB1	
	<400> 33	
25	<b>tggtcctcgt catttagcag tt</b>	22
	<210> 34	
	<211> 26	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador específico del gen KRAS	
35	<400> 34	
	<b>ctgcatgcac caaaaacccc aagaca</b>	26
	<210> 35	
40	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador específico del gen KRAS anidado	
	<400> 35	
	<b>cacaaagaaa gccctcccca gtcctca</b>	27

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi, que comprende:
- 5 una primera cadena de 24-66 nt de longitud que es el 100 % complementaria a un ARN mensajero (ARNm) diana;  
y  
una segunda cadena de 16 nt de longitud que se une de manera complementaria a la primera cadena,  
en donde la segunda cadena se une a la primera cadena de manera que la primera cadena tiene una región  
bicatenaria, a la que se une la segunda cadena, y una región monocatenaria de 50 nt o menos de longitud, a la  
10 que no se une la segunda cadena, y en donde el extremo 5' de la primera cadena y el extremo 3' de la segunda  
cadena forman un extremo romo.
2. La molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de la reivindicación 1, en la que la región monocatenaria de la  
15 primera cadena tiene una longitud de 10-15 nucleótidos.
3. La molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde la molécula  
de ácido nucleico inductora de ARNi comprende una modificación química.
4. La molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de la reivindicación 3, en la que:
- 20 la modificación química comprende una sustitución del grupo hidroxilo en la posición 2' de al menos un nucleótido  
por uno cualquiera de hidrógeno, flúor, un grupo O-alquilo o un grupo amino, y/o  
la modificación química comprende la sustitución de la cadena principal de fosfato de al menos un nucleótido por  
uno cualquiera de fosforotioato, de fosfoditioato, de alquilfosfonato, de fosforoamidato y de boranofosfato, y/o  
25 la modificación química comprende la sustitución de al menos un nucleótido por uno cualquiera de ANB (ácido  
nucleico bloqueado), AND (ácido nucleico desbloqueado), morfolino y APN (ácido peptidonucleico), y/o  
la modificación química comprende un lípido, un péptido penetrante celular o un ligando, dirigido a células, unido  
a la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi.
- 30 5. La molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que un  
vehículo de suministro celular se une a la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi, y en donde el vehículo de  
suministro celular se selecciona opcionalmente entre: polímeros catiónicos, lípidos, péptidos de penetración celular y  
ligandos que se dirigen a células.
- 35 6. La molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de la reivindicación 5, en la que un colesterol se une a la molécula  
de ácido nucleico inductora de ARNi.
7. La molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que un  
vehículo de suministro celular, que consiste en un colesterol, se une a la molécula de ácido nucleico inductora de  
40 ARNi.
8. La molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el ácido  
nucleico diana es un gen relacionado con tumores.
- 45 9. Una composición para inhibir la expresión génica, que incluye la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de  
una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Un método *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana en una célula, que comprende una etapa de  
50 introducción de la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en  
una célula.

FIG. 1

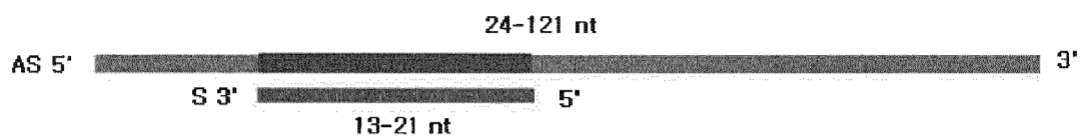


FIG. 2

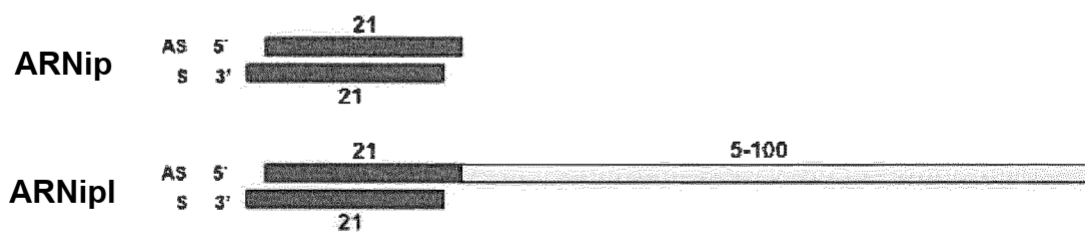


FIG. 3

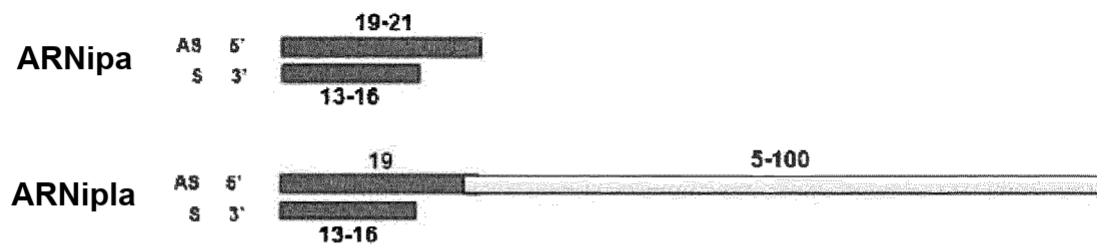


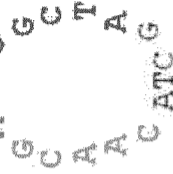
FIG. 4

**ARNip de CTNNB1**

S 5' -CUAUC AAGAUGAUGCAGACU-3' SEQ ID NO: 1  
 AS 3' -UUCAUAGUUCUACUACGUCUU-5' SEQ ID NO: 2

**DNAzima Dz339**

3' -TAGATG TGT AAAGTACGA-5' SEQ ID NO: 3



**híbrido Dz339-AS**

3' -TAGATG TGT AAAGTACGA TTTT<sup>S</sup>TGAUAGUUCUACUACGUCUU-5' SEQ ID NO: 4

enlazador

AS



FIG. 5

KRAS	19+2	5' -GGAAGCAAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -UCCUUCGUCAUCAUUAACU-5' (AS)	SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:6
	21S+5d	5' -GGAAGCAAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -aggatguc <u>cu</u> ccgucaucauuaacu-5' (AS)	SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:7
	21S+5c	5' -GGAAGCAAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -tagaguc <u>cu</u> ccgucaucauuaacu-5' (AS)	SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:8
	21S+10d	5' -GGAAGCAAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -tcctaaggatguc <u>cu</u> ccgucaucauuaacu-5' (AS)	SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:9
	21S+10c	5' -GGAAGCAAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -accagtagaguc <u>cu</u> ccgucaucauuaacu-5' (AS)	SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:10
	21S+15d	5' -GGAAGCAAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -ttatctcctaaggatguc <u>cu</u> ccgucaucauuaacu-5' (AS)	SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:11
	21S+15c	5' -GGAAGCAAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -ttggcaccagtagaguc <u>cu</u> ccgucaucauuaacu-5' (AS)	SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:12
	21S+15d-mut	5' -GGAAGCAAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -ttatctcctaaggatguc <u>cu</u> ccgucaucauua <u>ad</u> tg <del>u</del> -5' (AS)	SEQ ID NO:13 SEQ ID NO:14

FIG. 6

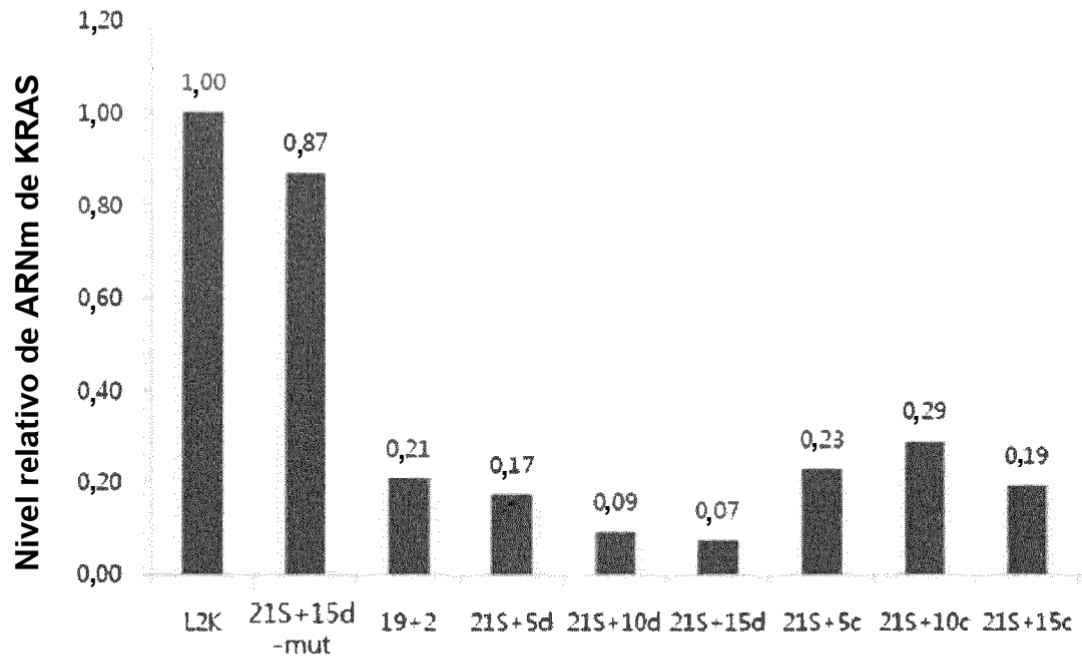


FIG. 7

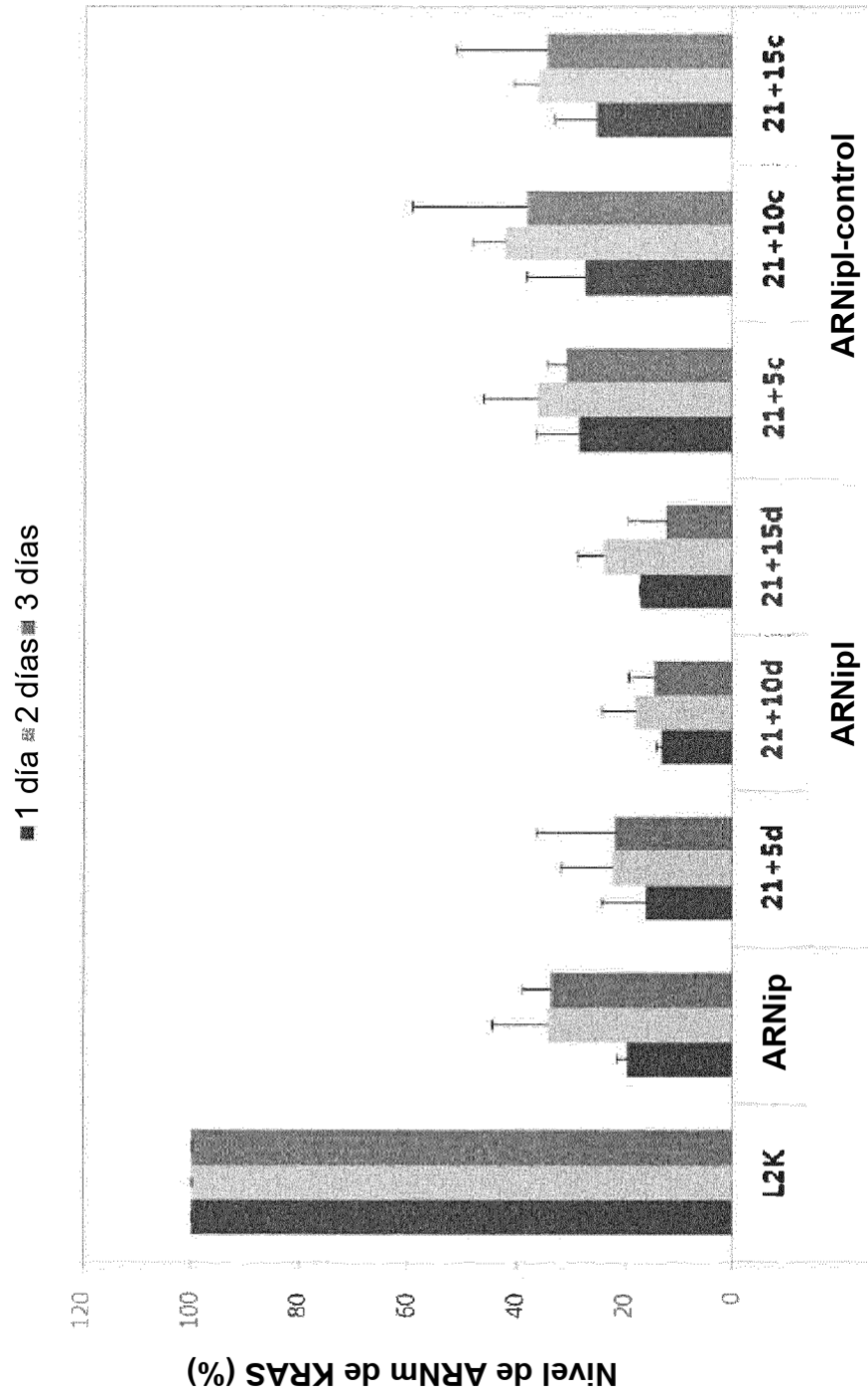


FIG. 8

<b>KRAS</b>	<b>ARNipa</b>	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -UUCUUCGUUCAUCAUUAACU -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 18
	<b>16S+5d</b>	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -aggatgucctucgucucaucauuaacu -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 19
	<b>16S+5c</b>	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -tacgagucctucgucucaucauuaacu -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 20
	<b>16S+10d</b>	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -tcctaagga tguccuucgucucaucauuaacu -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 21
	<b>16S+10c</b>	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -accagta cga gucctucgucucaucauuaacu -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 22
	<b>16S+15d</b>	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -ttatctcctaagga tguccuucgucucaucauuaacu -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 23
	<b>16S+15c</b>	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -ttggcaccagta cga gucctucgucucaucauuaacu -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 24

FIG. 9

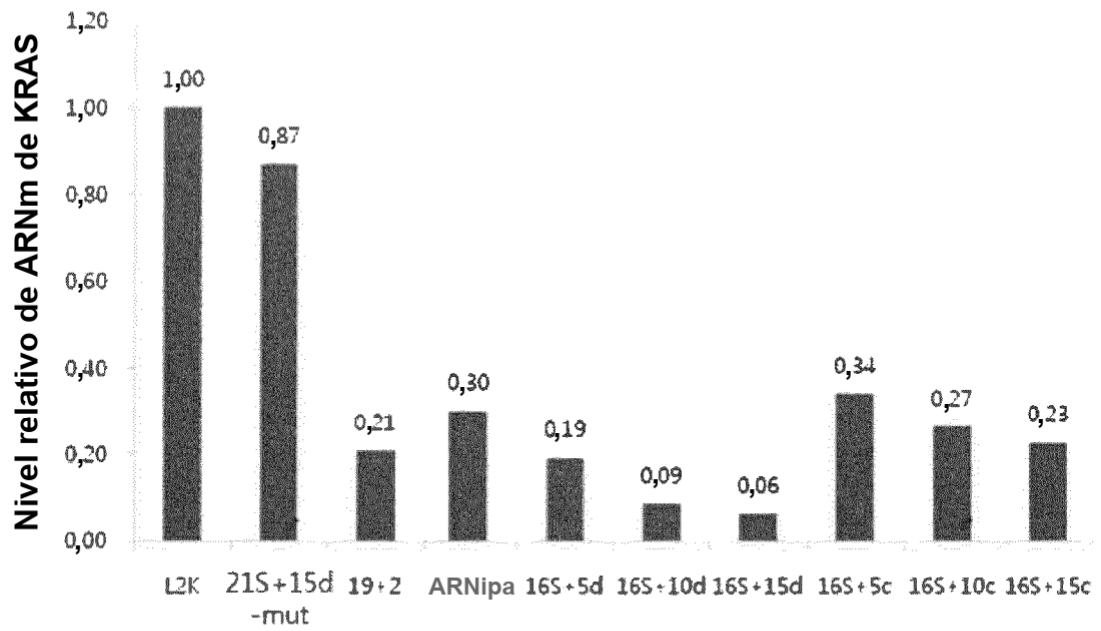


FIG. 10

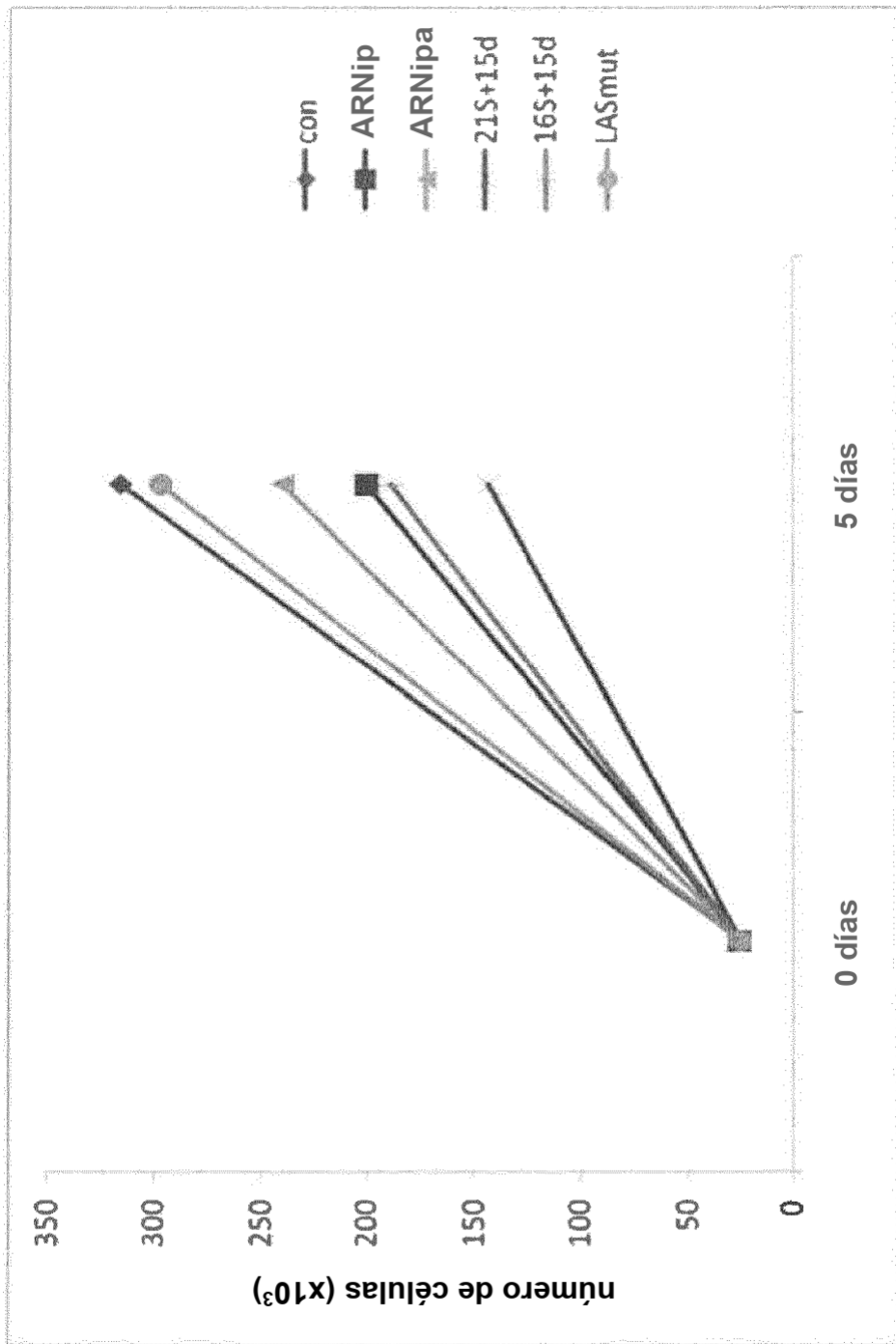


FIG. 11

KRAS	21S+10r	3' -UCCUAAGGAUGCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS) 5' -GGAAGCAAGUAGUAAUUGAUU-3' (S)	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 25
	21S+10rc	3' -ACCAGUACGAGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS) 5' -GGAAGCAAGUAGUAAUUGAUU-3' (S)	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 26
	16S+10r	3' -UCCUAAGGAUGCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS) 5' -AGCAAGUAGUAAUUGA-3' (S)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 25
	16S+10rc	3' -ACCAGUACGAGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS) 5' -AGCAAGUAGUAAUUGA-3' (S)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 26

FIG. 12

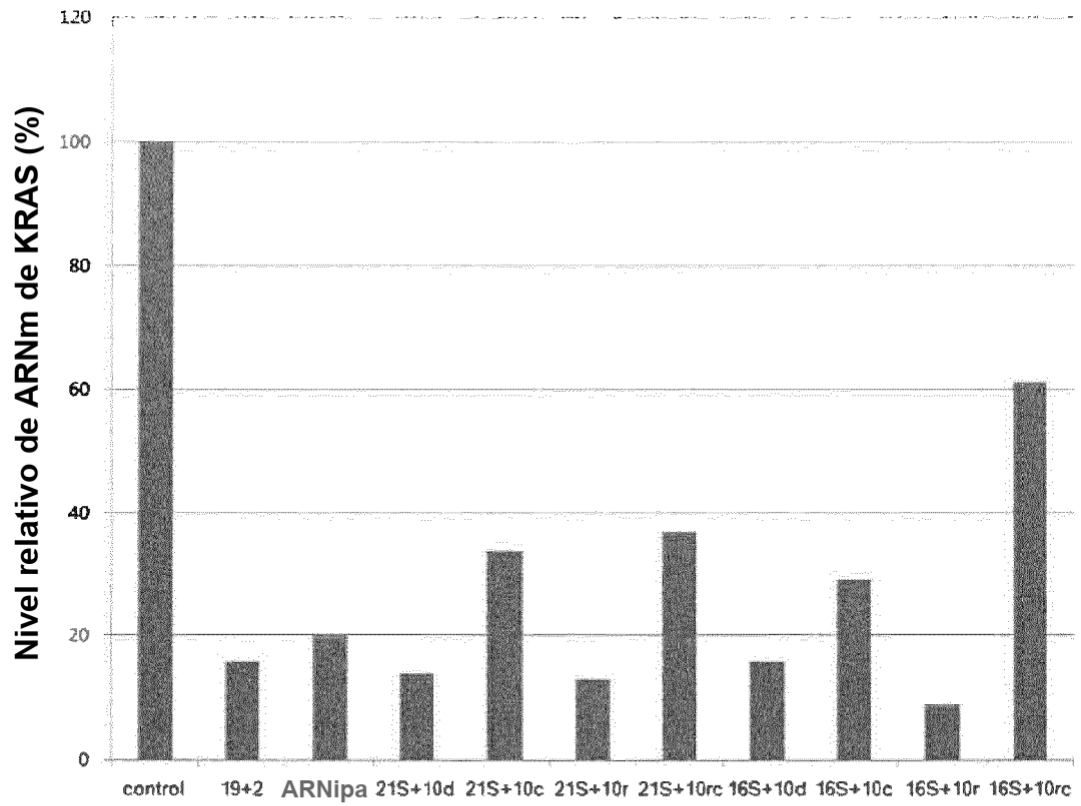


FIG. 13

CTNNB1- 2	19+2	5' -CUAUCAGGAUGCAGAAUU-3' (S) 3' -UUGAUAUUUUAUACUACGUCUU-5' (AS)	SEQ ID NO:27 SEQ ID NO:28
	ARNipa	5' -UCAAGGAUGCAGAA-3' (S) 3' -UUGAUAUUUUAUACUACGUCUU-5' (AS)	SEQ ID NO:29 SEQ ID NO:28
	16S+15d	5' -UCAAGGAUGCAGAA-3' (S) 3' -caacat ttgaactaaUUGAUAUUUUAUACUACGUCUU-5' (AS)	SEQ ID NO:29 SEQ ID NO:30
	16S+15c	5' -UCAAGGAUGCAGAA-3' (S) 3' -ggcaccagtaggUUGAUAUUUUAUACUACGUCUU-5' (AS)	SEQ ID NO:29 SEQ ID NO:31

FIG. 14

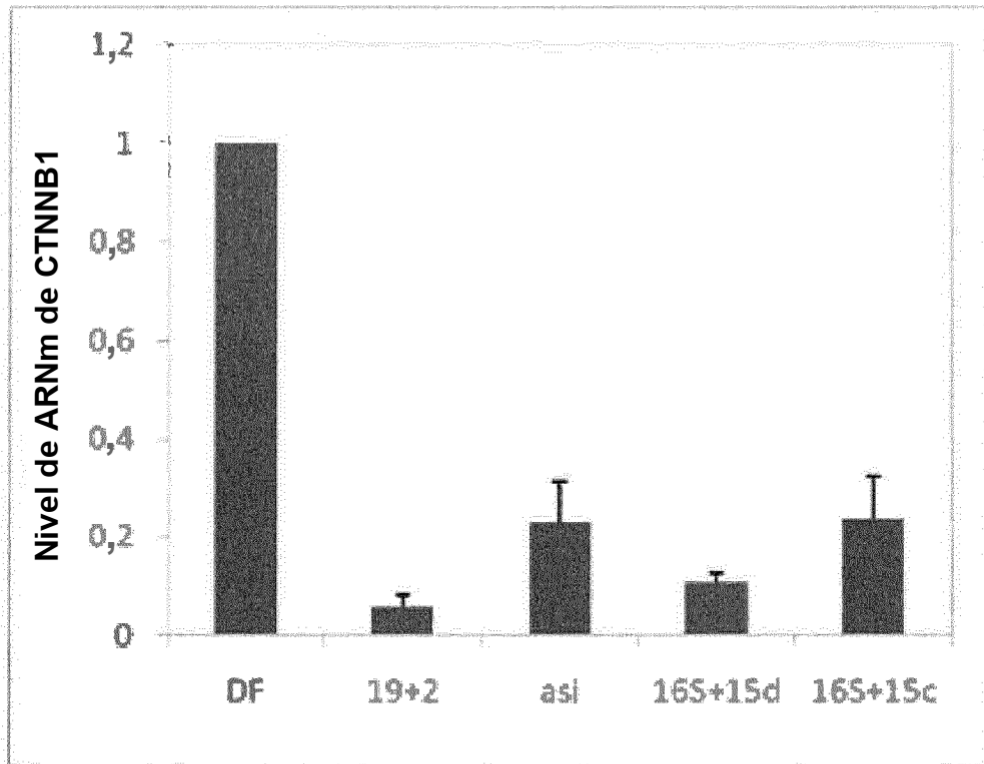


FIG. 15

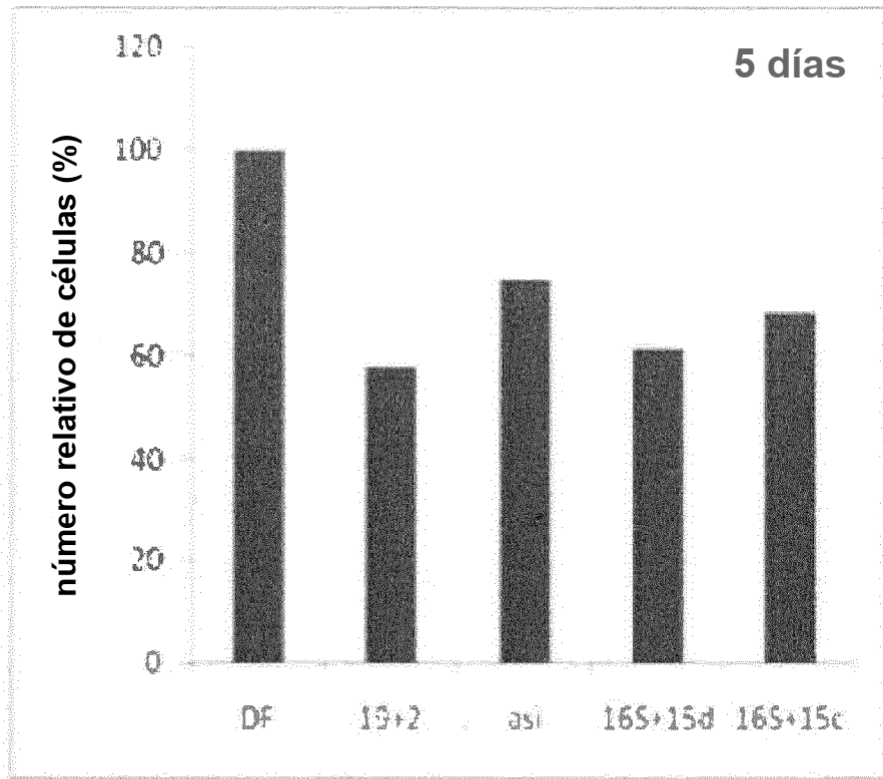


FIG. 16

