

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 851 904**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2013 E 16204495 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020 EP 3178498**

54 Título: **Composición para el tratamiento de cáncer asociado a infección por VPH**

30 Prioridad:

02.08.2012 KR 20120084820

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

09.09.2021

73 Titular/es:

**ENHANCEDBIO INC. (100.0%)
Suite 903, 242, Digital-ro, Guro-gu
08394 Seoul, KR**

72 Inventor/es:

**SHIN, YOUNG KEE;
KIM, YOUNG DEUG;
JUNG, HUN SOON y
KIM, DEUK AE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 851 904 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

Composición para el tratamiento de cáncer asociado a infección por VPH

5 **Campo técnico**

La presente solicitud de patente reivindica la prioridad de la solicitud de patente coreana N.º 10-2012-0084820, presentada el 2 de agosto de 2012.

- 10 La presente invención se refiere a una composición para terapia génica para una enfermedad asociada con la infección por el VPH que incluye cáncer de cuello uterino.

Antecedentes de la técnica

- 15 Los tipos 16 y 18 del virus del papiloma humano (en lo sucesivo, "VPH") de alto riesgo son factores principales de cáncer de cuello uterino y displasia de cuello uterino, y se convierten en causas de otros cánceres genitales y un carcinoma escamoso de cabeza y cuello. El cáncer de cuello uterino es uno de los tipos más generales de tumores malignos en mujeres. Aunque la incidencia de cáncer de cuello uterino invasivo se ha reducido lentamente, el cáncer de cuello uterino invasivo es un cáncer aún más frecuente en mujeres en países en desarrollo, que representa el 25 % de los cánceres femeninos. El VPH es un virus de ADN pequeño que tiene aproximadamente 8.000 secuencias de bases que causa tumores benignos o malignos. Hasta ahora, dependiendo de una diferencia genómica, se han identificado al menos unos 100 subtipos de VPH y se han analizado completamente los genotipos de aproximadamente 90 VPH. Entre estos tipos, los tipos de VPH de alto riesgo (por ejemplo, VPH-16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 y 56) se relacionan con casi el 90 % de los cánceres de cuello uterino. Al menos el 50 % de los cánceres de cuello uterino infectados con el VPH se relacionan con el VPH tipo 16, seguido del VPH tipo 18 (12 %), VPH tipo 45 (8 %) y VPH tipo 31 (5 %). Estos VPH codifican 2 proteínas oncogénicas, que son, las proteínas E6 y E7. Ambas proteínas están implicadas en la inmortalización celular y transformación celular mediada por el VPH. La proteína oncogénica E6 se une a la proteína supresora de tumores p53 de tipo silvestre para degradar de ese modo p53 a través de una ruta de ubiquitina. Por otro lado, la proteína E7 se une directamente a Rb para fosforilar así en exceso a Rb. En primer lugar, E6 forma un complejo con una proteína asociada a E6 (E6-AP) que es una proteína ubiquitina ligasa E3. A continuación, el complejo E6/E6-AP se une a una p53 de tipo silvestre y se ubiquitina y, entonces, interfiere la reacción celular mediada por p53 ante el daño del ADN. En su mayoría, la proteína supresora de tumores p53 está regulada mediante ubiquitinación mediada por Mdm2, sin embargo, en células de cáncer de cuello uterino infectadas por VPH, la degradación de p53 se cambia completamente a ubiquitinación mediada por E6 a partir de ubiquitinación mediada por Mdm2. Por tanto, a diferencia de muchos otros cánceres, la mayoría de los casos de cáncer de cuello uterino infectado por VPH tienen el gen p53 de tipo silvestre. Sin embargo, el nivel de expresión de la proteína p53 es muy bajo debido a la degradación constante mediante la proteína E6. Particularmente, la proteína E6 del VPH ha sido significativamente evidente como una diana específica para destruir solo células de cáncer de cuello uterino. Estas estrategias, dirigidas a E6 o al complejo E6/E6-AP, incluyen varios tratamientos.

- 40 Los ejemplos incluyen: uso de un agente tóxico celular, un inhibidor para liberar zinc de la proteína oncogénica E6, un péptido epítipo (mimotopo) que imita a E6-AP, ribozima anti-E6, un aptámero peptídico que se dirige a la proteína oncogénica E6 de un virus, ARNip que se dirige a la proteína oncogénica E6 del virus y un tratamiento combinado de los mismos. Recientemente, se ha demostrado que el ARNip silencia selectivamente un gen intrínseco en células animales, y además, silencia selectivamente un gen vírico en una enfermedad causada por un virus. La interferencia por el ARN (iARN) debida a la transfección de ARNip se ha convertido en una nueva terapia para tratar infecciones víricas en el ser humano. El ARNip, que se dirige a los genes E6 y E7 en las células de cáncer de cuello uterino infectadas por el VPH, provoca acumulación de p53 y pRb que conduce a la apoptosis o senescencia celular. Para una línea celular de cáncer de cuello uterino infectada por el VPH-16 y una línea celular infectada por el VPH-18, se ha encontrado que la iARN, que se dirige a los oncogenes E6 y E7 de los virus, detecta selectivamente la expresión de estas proteínas.

- A su vez, la eficacia de un ácido nucleico que tiene varias modificaciones para los ácidos nucleicos (por ejemplo, en una base, un azúcar y/o fosfato) mejora mediante la inhibición de la degradación causada por la ribonucleasa sérica. Se conocen en la materia varios ejemplos, que describen modificaciones de azúcar, bases y fosfatos, que pueden introducirse en un ácido nucleico. Por ejemplo, un oligonucleótido se modifica para mejorar la estabilidad y/o mejorar la actividad biológica a través de una modificación mediante un grupo resistente a nucleasa, por ejemplo, a través de la modificación de las bases nucleotídicas 2'-amino, 2'-C-alilo, 2'-fluoro, 2'-O-metilo y 2'-H (véanse Eckstein *et al.*, publicación PCT abierta al público WO 92/07065; documento [Perrault *et al.*, *Nature* 344:565-568, 1990]; documento [Pieken *et al.*, *Science* 253: 314-317, 1991]; documento [Usman y Cedergren, *Trends in Biochem. Sci.* 17: 334-339, 1992]; Usman *et al.* Publicación PCT abierta al público WO 93/15187; Sproat, patente de EE.UU. n.º 5.334.711 y documento [Beigelman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:25702, 1995]; Beigelman *et al.*, publicación PCT abierta al público WO 97/26270; Beigelman *et al.*, patente de EE.UU. n.º 5.716.824; Usman *et al.*, patente de EE.UU. n.º 5.627.053; Woolf *et al.*, publicación PCT abierta al público WO 98/13526; Thompson *et al.*, solicitud de patente de EE.UU. n.º 60/082.404, presentada el 20 de abril de 1998); documento [Karpeisky *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 39:1131, 1998]; documento [Earnshaw y Gait, *Biopolymers(Nucleic acid Sciences)* 48:39-55, 1998]; documento [Verma y Eckstein,

Annu. Rev. Biochem. 67:99-134, 1998]; y documento [Burlina *et al.*, Bioorg. Med. Chem. 5: 1999-2010, 1997]). Se pueden utilizar modificaciones similares para modificar el ácido nucleico de la presente invención.

En 1999, como resultado de la terapia combinada de quimioterapia a base de cisplatino y radioterapia, la tasa de supervivencia de las mujeres que tenían un cáncer de cuello uterino grave a nivel local mejoró significativamente. En la actualidad, el cisplatino es un fármaco que daña el ADN que se usa ampliamente para tratar cánceres, que incluyen cánceres de ovario, de cuello uterino, de cabeza y cuello, broncopulmonares no microcíticos, etc. Más recientemente, se ha investigado un mecanismo de trabajo de un medicamento basado en platino. Sin embargo, aún no se comprende completamente un proceso en las células que incluye la reparación del ADN, la muerte celular, la trayectoria del ciclo celular, la señalización del daño en el ADN y la regulación en la absorción y secreción de un fármaco debido al tratamiento con cisplatino. En las células HeLa con VPH-18, la proteína p53 se escapa de la degradación mediada por E6 y se acumula preferentemente en el nucléolo del núcleo después del tratamiento con cisplatino. Además, las células SiHa con VPH-16 recuperan la función de p53 mediante radioterapia y tratamiento con cisplatino simultáneos, aumentando así la radiosusceptibilidad.

Por lo tanto, como resultado de intentar investigar un ARNip eficaz que tiene una secuencia novedosa que presenta una modificación química en el ARNip específico de E6/E7 para que el ARNip pueda mostrar el efecto antineoplásico, solo o en una combinación compleja, o mostrar un efecto sinérgico cuando se realiza una terapia combinada con quimioterapia o radioterapia convencional, los presentes inventores han descubierto que los nucleótidos enumerados en los siguientes ejemplos y reivindicaciones y combinaciones particulares de los mismos reducen la expresión de las proteínas relacionadas TP53 y E7, y del ARNm de E6 del VPH, e inducen la muerte celular, y también han probado experimentalmente que la eficacia alcanzada cuando se usan solos o en combinación con agentes antineoplásicos es mucho mejor que la del ARN, que no tiene una modificación de restos de secuencia de bases.

La solicitud internacional WO 2007/111998 divulga moléculas de ARNip para tratar la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Una de estas moléculas coincide con la SEQ ID NO: 12 (SEQ ID NO: 1459 en el documento WO 2007/111998) y su cadena complementaria (SEQ ID NO: 1631 en el documento WO 2007/111998). La solicitud internacional WO 2008/139938 divulga moléculas de ARNip para tratar o prevenir una enfermedad inducida por una infección por el VPH. La molécula de ARNip citada como ARNip 497 en esta solicitud corresponde a la SEQ ID NO: 12 (SEQ ID NO: 18 en el documento WO 2008/139938) y a la SEQ ID NO: 14 (SEQ ID NO: 19 en el documento WO 2008/139938). La solicitud internacional WO 2011/087343 también divulga la molécula de ARNip citada como ARNip 497 en el documento WO 2008/139938 correspondiente a la SEQ ID NO: 12 (SEQ ID NO: 7 en el documento WO 2011/087343) y su cadena complementaria.

A lo largo de la memoria descriptiva, se hace referencia a numerosas revistas y documentos de patentes, y la cita se indica para describir más claramente el nivel del campo técnico al que pertenece la presente invención y las características de la presente invención.

Divulgación de la invención

Problema técnico

Los presentes inventores estudian y tratan de desarrollar de forma continua un agente terapéutico génico eficaz para diversas enfermedades causadas por la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Como resultado, la presente invención se ha completado al encontrar que cuando se usa un ARN particular para inhibir la expresión, que está dirigido a un gen E6/E7 del virus VPH tipo 16 o VPH tipo 18, o una secuencia de ARN que tiene una modificación en una base del ARN, la expresión génica del VPH se inhibe de forma eficaz, para mostrar así una excelente actividad terapéutica en enfermedades asociadas con la infección por el VPH, incluyendo cáncer de cuello uterino.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición para prevenir o tratar una enfermedad asociada con la infección por el VPH, más particularmente, un cáncer asociado a la infección por el VPH, y todavía más particularmente cáncer de cuello uterino.

Otros objetivos y beneficios de la presente invención se aclaran mediante la descripción detallada adjunta de la invención, las reivindicaciones y los dibujos.

Solución técnica

La presente invención se refiere a una composición para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con la infección por el virus del papiloma humano (VPH), comprendiendo la composición como principio activo, o bien un par de oligonucleótidos de SEQ ID NO: 12 y 15, o un grupo de oligonucleótidos de SEQ ID NO: 2, 4, 8, 9, 12 y 15.

La presente memoria descriptiva divulga una composición para tratar o prevenir una enfermedad asociada con la infección por el virus del papiloma humano (VPH), incluyendo la composición, como principio activo, una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en las secuencias de SEQ ID NO: 16, 22, 28, 34, 40,

66, 72, 84, 90 y 108, y las secuencias de nucleótidos antisentido de las mismas.

Los presentes inventores estudian y tratan de desarrollar de forma continua un agente terapéutico génico eficaz para diversas enfermedades causadas por la infección por el VPH. En consecuencia, se ha encontrado que cuando se usa un ARN particular para inhibir la expresión, que está dirigido a genes E6/E7 del virus VPH tipo 16 o VPH tipo 18, o una secuencia de ARN que tiene una modificación en una base del ARN, la expresión génica del VPH se inhibe de forma eficaz para mostrar de ese modo una excelente actividad terapéutica en enfermedades asociadas con la infección por el VPH, incluyendo el cáncer de cuello uterino.

Las secuencias de SEQ ID NO: 16, 22, 28, 34 y 40 y las secuencias de SEQ ID NO: 72, 84, 90 y 108 son secuencias de ácido nucleico de ARN para inhibir la expresión, en donde las secuencias de SEQ ID NO: 16, 22, 28, 34 y 40 están dirigidas al virus VPH tipo 16; y las secuencias de SEQ ID NO: 72, 84 90 y 108 están dirigidas al virus VPH tipo 16.

Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" significa un ribonucleótido presente en una forma monocatenaria o bicatenaria, e incluye un análogo nucleotídico natural a menos que se indique específicamente otra cosa (véanse Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, Nueva York (1980); Uhlman y Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).

Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibición de la expresión" significa provocar una disminución en una función de un gen diana y, preferentemente, significa que la expresión del gen diana se vuelve indetectable o, como resultado, existe en un nivel sin sentido.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la secuencia de nucleótidos de la presente invención es una secuencia de ARN que tiene la capacidad de silenciar los genes E6/E7 del virus VPH tipo 18 o VPH tipo 16, y preferentemente, ARNip, ARNhc, o un oligonucleótido antisentido.

Como se usa en el presente documento, el término "ARNip" significa ARN de cadena doble corta que puede inducir interferencia por ARN (iARN) a través de la escisión de un ARNm particular. El ARNip consta de una cadena de sentido de ARN que tiene una secuencia homóloga con el ARNm de un gen diana, y una cadena de antisentido de ARN que tiene una secuencia complementaria a la misma. El ARNip puede inhibir la expresión del gen diana y, por tanto, se proporciona como un método eficaz de atenuación de genes o un método de terapia génica.

El ARNip no se limita de manera que el ARNip que tenga una parte de ARN de doble cadena con pares de ARN esté completamente emparejado; más bien incluye una parte que no forma un par debido a un error de emparejamiento (es decir, una base correspondiente no es complementaria), abultamiento (es decir, no hay una base que corresponda a la cadena lateral), etc. La longitud total es de 10 a 100 bases, preferentemente de 15 a 80 bases y lo más preferentemente de 17 a 23 bases. Tanto un extremo como un extremo cohesivo están disponibles como una estructura de extremo del ARNip, si es posible inhibir la expresión del gen diana mediante el efecto de la iARN. Para la estructura de extremo cohesivo, se dispone tanto de una estructura de saliente en el extremo 3' como una estructura de saliente en el extremo 5'. El número de bases salientes no está limitado. Por ejemplo, el número de bases puede llegar a ser de 1 a 8 bases, y, preferentemente, de 2 a 6 bases. Además, el ARNip puede incluir, por ejemplo, ARN de bajo peso molecular (por ejemplo, moléculas de ARN natural tales como ARNt, ARNr y ARN vírico o moléculas de ARN sintético) en una parte saliente de un extremo en el intervalo en el que se puede conservar el efecto de inhibición de la expresión del gen diana. En la estructura final del ARNip, no es necesario tener una estructura de escisión en ambos lados, y la estructura puede ser una estructura de tallo-bucle en la que una porción final de un lado del ARN de doble cadena está conectada mediante ARN enlazador. La longitud del enlazador no está particularmente limitada a menos que la longitud afecte al corte en una parte del tallo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ARN en horquilla pequeña (ARNhc)" significa de 50 a 70 nucleótidos monocatenarios y forma la estructura de tallo-bucle *in vivo*. Dicho de otra forma, el ARNhc es una secuencia de ARN para formar una estructura de horquilla apretada para inhibir la expresión génica a través de la interferencia por el ARN. Un tallo de doble cadena se forma mediante el emparejamiento de bases de ARN largo que tiene de 15 a 30 nucleótidos complementarios en ambos lados de un sitio de bucle que tiene de 5 a 10 nucleótidos. Para la expresión constitutiva, el ARNhc se transduce en células a través de un vector que incluye el promotor U6, y se transfiere principalmente a las células hijas para transmitir de forma genética la inhibición de la expresión génica. La estructura de horquilla del ARNhc se escinde mediante un mecanismo intracelular para convertirse en ARNip, y a continuación se une a un complejo silenciador inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés). Estos RISC se unen y escinden ARNm. El ARNhc se transcribe mediante la ARN polimerasa III. De acuerdo con la presente invención, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede formar la estructura del ARNhc que tiene una secuencia de tallo de doble cadena en ambos lados del sitio del bucle.

Como se usa en el presente documento, el término "microARN (miARN)" significa una molécula de ARN monocatenario que regula la expresión génica e incluye de 10 a 50 nucleótidos en longitud completa, preferentemente de 15 a 40 nucleótidos y más preferentemente de 17 a 25 nucleótidos. El miARN es un oligonucleótido que no se expresa en las células y tiene una estructura corta de tallo-bucle. El miARN es total o parcialmente homólogo con al menos un ARN mensajero (ARNm) e inhibe la expresión del gen diana mediante la unión complementaria al ARNm.

Como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido de antisentido" significa ARN que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de ARNm particular, o un derivado de la misma, e inhibe la traducción de ARNm en una proteína mediante la unión a la secuencia complementaria en ARNm. La secuencia de nucleótidos de antisentido de la presente invención significa una secuencia de ARN que puede ser complementaria al ARNm de un gen diana para unirse al ARNm del gen diana, y puede inhibir la traducción del gen diana al ARNm, la translocación al citoplasma, la maduración u otras actividades esenciales para las funciones biológicas generales.

Para mejorar la eficacia del oligonucleótido de antisentido, se puede realizar una modificación en una posición de una o más de las bases, azúcares o cadena principal (véase De Mesmaeker *et al.*, *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). La cadena principal del oligonucleótido se puede modificar con fosforotioato, fosfotriéster, fosfonato de metilo, alquilo monocaténario, cicloalquilo, heteroatómico monocaténario, sulfonato de azúcar heterocíclico, etc. Además, un ácido nucleico de antisentido puede incluir uno o más fracciones de azúcar sustituidos. El oligonucleótido de antisentido puede incluir una base modificada. Ejemplos de bases modificadas incluyen hipoxantina, 6-metiladenina, 5-metilpirimidina (en particular, 5-metilcitosina), 5-hidroximetilcitosina (HMC), HMC glicosilo, HMC gentobiosilo, 2-aminoadenina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-desazaguanina, N6 (6-aminoheptil)adenina, 2,6-diaminopurina, 2-O-metiluracilo, 2-O-metilguanina, 2-fluorocitosina, etc.

La secuencia de nucleótidos de la presente invención es una secuencia de ARNip.

La presente memoria descriptiva divulga una composición para tratar o prevenir una enfermedad asociada con la infección por el VPH, incluyendo la composición, como principio activo, una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en las secuencias de SEQ ID NO: 1, 7, 12, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 51, 56, 62, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102 y 108, y secuencias de nucleótidos de antisentido de las mismas, que tienen una cadena principal modificada o una o más bases modificadas.

Las modificaciones de una cadena principal o una base a aplicar al oligonucleótido pueden incluir cualquier modificación que se emplee de forma convencional en la materia para aumentar la estabilidad o la actividad deseada.

Preferentemente, la cadena principal modificada incluye una o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosfoamidato, éster de fosfato, carbamato, acetamidato, éster carboximetílico, carbonato y triéster de fosfato.

Preferentemente, la base modificada incluye una o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en metilación, glucosilación y halogenación. Más preferentemente, la base modificada es una base 2'-O metilada o 2'-fluorada.

Cuando se presenta una modificación tal como la 2'-O metilación o la 2'-fluoración en una posición particular del ARN dirigido a los genes E6/E7 del virus VPH tipo 16 o VPH tipo 18 para inhibir la expresión, en comparación con una molécula de ácido nucleico sin modificar, los presentes inventores han descubierto que: aumenta notablemente la eficacia de la inhibición de la expresión de los genes diana; aumenta la estabilidad en suero humano; y aumenta considerablemente la semivida al menos dos veces en un experimento farmacocinético en animales.

2'-O metilación significa que un grupo hidroxilo unido al carbono número dos de la ribosa de una molécula de ARN está metilado y se modifica así a un grupo 2'-metoxi; y 2'-fluoración significa que el grupo hidroxilo unido al carbono número dos de la ribosa de la molécula de ARN está sustituido con un grupo fluoro y se modifica así a un grupo 2'-fluoro.

La base 2'-O metilada en el nucleótido de la presente invención es U o G.

La base 2'-fluorada en el nucleótido de la presente invención es C.

La secuencia de nucleótidos que tiene una o más de las bases 2'-O metiladas o 2'-fluoradas se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 41, 42, 44, 45, 47, 49, 50, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 63, 65, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 76, 77, 79, 80, 82, 83, 85, 86, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 97, 98, 100, 101, 103, 104, 106, 107, 109, 110, 112 y 113.

La presente invención proporciona una composición para usar en la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con la infección por el VPH, incluyendo la composición, como principio activo, el grupo de oligonucleótidos que tiene secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, 4, 8, 9, 12 y 15. Un grupo que tiene secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 18, 21, 29 y 32; un grupo que tiene secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 42, 45, 52 y 55; un grupo que tiene secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 58, 59, 63 y 65; un grupo que tiene secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 68, 71, 91 y 94; y un grupo que tiene secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 98, 100, 109 y 112 no forman parte de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, los presentes inventores han descubierto que cuando la secuencia de

nucleótidos de la presente invención se usa como un grupo que tiene una combinación particular, la eficacia de la inhibición de la expresión del gen diana aumenta considerablemente, en comparación con el caso en el que se utiliza una única secuencia de ARN, de modo que se logra una actividad terapéutica más destacada para una enfermedad asociada con la infección por el VPH.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, una enfermedad asociada con la infección por el VPH a ser tratada por la composición de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en condiloma acuminado, inflamación de la vagina, inflamación pélvica y cáncer, y más preferentemente, un cáncer tratado con la composición de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cuello uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, cáncer de ano, cáncer de pene, cáncer de amígdalas, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de cabeza y cuello y adenocarcinoma de pulmón. Mucho más preferentemente, el cáncer que se va a tratar con la composición de la presente invención es cáncer de cuello uterino.

La composición de la presente invención puede prepararse como una composición farmacéutica que incluye una cantidad farmacéuticamente eficaz de la molécula de ácido nucleico de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente para lograr la actividad o eficacia de tratar, aliviar o prevenir la artritis, tal como se describe anteriormente, de la presente invención.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable, que se incluye en la composición farmacéutica de la presente invención, es uno que se usa normalmente en la preparación, e incluye, pero sin limitación, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato cálcico, alginato, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, ciclodextrina y un copolímero de la misma, aceite mineral, etc. La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir además un lubricante, un humectante, un agente edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión y un agente conservante además de los componentes anteriores. Un vehículo farmacéuticamente aceptable y una preparación adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral, y preferentemente administrarse por vía parenteral. Para administración parenteral, se pueden usar la infusión intravenosa, la infusión subcutánea, la infusión intramuscular, la infusión peritoneal, la administración tópica, la administración transdérmica y la administración intraarticular.

La dosis de administración adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención se puede prescribir de manera diferente dependiendo de varios factores tales como el método de formulación, el modo de administración, la edad, el peso, el sexo y los estados de enfermedad, la alimentación de los pacientes, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de secreción y la susceptibilidad de reacción. Una dosis de administración preferida de la composición farmacéutica de la presente invención es de 0,0001 a 100 mg/kg por día.

Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se utiliza como agente antineoplásico, la composición puede usarse como combinación con la composición antineoplásica que se usa normalmente en la materia. Más específicamente, la composición se puede administrar de forma combinatoria con agentes antineoplásicos tales como cisplatino o paclitaxel.

La composición farmacéutica de la presente invención se prepara en una forma de dosificación unitaria mediante la formulación con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, o se prepara mediante la incorporación en un recipiente multidosis, de acuerdo con un método mediante el cual una persona con conocimientos ordinarios en el campo técnico al que pertenece la presente invención podría llevar a cabo fácilmente. En este caso, la formulación puede encontrarse en forma de solución, suspensión o emulsión en aceite o medio acuoso, o en forma de extracto, polvo, gránulo, comprimido o cápsula, y puede incluir además un agente dispersante o un estabilizante.

De acuerdo con una realización más preferida de la presente invención, la molécula de ácido nucleico de la presente invención está incluida en un sistema de inserción de genes.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sistema de inserción de genes" significa un mediador para introducir un gen diana deseado en células del sujeto para expresarlo. El sistema de inserción de genes ideal no debe ser tóxico para el cuerpo humano, producirse en masa fácilmente y administrar el gen de forma eficaz.

Como se usa en el presente documento, la expresión "inserción de genes" significa insertar el gen a las células y tiene el mismo significado que la transducción celular del gen. A nivel de tejido, la expresión inserción de genes tiene el mismo significado que la propagación de un gen. Por tanto, el sistema de inserción de genes de la presente invención puede describirse como el sistema de transducción de genes y el sistema de propagación de genes.

Para preparar el sistema de inserción de genes de la presente invención, la secuencia de nucleótidos de la presente

invención está presente preferentemente dentro de una construcción de expresión adecuada. En la construcción de expresión, se prefiere que la secuencia de nucleótidos de la presente invención esté unida operativamente a un promotor. Como se usa en el presente documento, la expresión "unida operativamente a" significa una unión funcional entre una secuencia reguladora de la expresión de ácido nucleico (por ejemplo, un promotor, una secuencia señal, o una matriz en un sitio de unión del factor regulador de la transcripción) con otras secuencias de ácido nucleico, y la secuencia reguladora regula así la transcripción y/o traducción de las otras secuencias de ácido nucleico. En la presente invención, un promotor, que se une a la secuencia de nucleótidos de la presente invención, puede funcionar preferentemente en células animales, y más preferentemente en células de mamíferos, para regular la transcripción del gen de relaxina, e incluye, pero sin limitación, un promotor procedente de virus de mamífero y un promotor procedente de un genoma de células de mamífero, tal como el promotor del citomegalovirus (CMV) de mamífero, promotor tardío de adenovirus, promotor 7,5K del virus de la vaccinia, promotor de SV40, promotor de tk de VHS, promotor de VRS, promotor de EF1 alfa, promotor de metalotioneína, promotor de beta-actina, un promotor del gen IL-2 humano, un promotor del gen IFN humano, un promotor del gen IL-4 humano, un promotor del gen de la linfoxina humano, un promotor del gen GM-CSF humano y el promotor U6.

El sistema de inserción de genes de la presente invención puede construirse de diversas formas que son (i) una molécula de ADN recombinante no marcado, (ii) un plásmido, (iii) un vector vírico y (iv) un liposoma o una forma nociva que incluye la molécula de ADN recombinante no marcado o el plásmido.

La secuencia de nucleótidos de la presente invención puede aplicarse a un sistema completo de inserción de genes usado para la terapia génica normal. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede aplicarse a un plásmido, adenovirus (Lockett LJ *et al.*, Clin. Cancer Res. 3:2075-2080(1997)), virus adenoasociado (AAV, Lashford LS., *et al.*, Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations Ed. A. Meager, 1999), retrovirus (Gunzburg WH, *et al.*, Retroviral vectors. Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations Ed. A. Meager, 1999), lentivirus (Wang G. *et al.*, J. Clin. Invest. 104(11):R55-62(1999)), virus del herpes simple (Cámara R., *et al.*, Proc. Natl. Act. Sci USA 92:1411-1415(1995)), virus de la vaccinia (Puhlmann M. *et al.*, Human Gene Therapy 10:649-657(1999)), un liposoma (Metho s in Molecular Biology, Vol 199, S.C. Basu and M. Basu (Eds.), Human Press 2002) o un niosoma.

Mucho más preferentemente, la secuencia de nucleótidos de la presente invención se inserta utilizando un liposoma catiónico.

Efectos ventajosos

Las características y beneficios de la presente invención se resumen a continuación:

(a) La presente invención proporciona una composición para usar en la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con la infección por el virus del papiloma humano (VPH), más particularmente, un cáncer asociado a la infección por el VPH y, más particularmente todavía, un cáncer de cuello uterino;

(b) La combinación particular de secuencias de nucleótidos de la presente invención inhibe significativamente la expresión de los genes E6/E7 de los virus VPH tipo 16 o VPH tipo 18 y, por lo tanto, se emplea de manera útil como una composición para usar en el tratamiento eficaz de una enfermedad asociada con la infección por el VPH.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestran imágenes de resultados que verifican una mejora en la estabilidad (Figura 1a), un aumento en un efecto a nivel molecular de una proteína (Figura 1b), y un aumento en un efecto a nivel molecular de ARNm (Figura 1c) de acuerdo con una modificación por sustitución de un resto de una secuencia de bases en el ARNip del VPH de tipo 16 y 18.

La figura 2 muestran imágenes de resultados que verifican un excelente efecto de inducción de la senescencia celular (Figura 2a) y un excelente efecto de destrucción celular (Figura 2b) de ARNip que tiene un resto sustituido en una secuencia de bases del VPH de tipo 18.

La figura 3 son imágenes que muestran el efecto de la inducción de la senescencia celular mediante el tratamiento combinado del agente antineoplásico, cisplatino y ARNip 426 que tiene una sustitución en una secuencia de bases en una línea celular HeLa de cáncer de cuello uterino infectada con el virus VPH de tipo 18 (Figura 3a) y un resultado observado microscópicamente del mismo (Figura 3b).

La figura 4 muestra imágenes de resultados que verifican un efecto terapéutico de un grupo de ARNip excelente que tiene una sustitución en una secuencia de bases del VPH de tipos 16 y 18, y un efecto sinérgico mediante terapia combinada con cisplatino. Las figuras 4a, 4b y 4c muestran, respectivamente, un efecto inhibidor de la proliferación celular, un efecto destructor de células y un efecto a nivel molecular de una proteína.

La figura 5 muestra imágenes de resultados que verifican un efecto inespecífico del ARNip del VPH tipo 18 en células y animales. Las figuras 5a y 5b muestran, respectivamente, un efecto de reducción de IL-6 en células y un efecto de reducción de INF-gamma en animales.

La figura 6 muestra una imagen de resultados que cuantifican el ARNip 426 del VPH tipo 18 a través de PCT en tiempo real de tallo-bucle.

La figura 7 muestra una imagen de resultados que verifican el hecho de que los ARNip en varios tipos de liposomas

muestran el mismo efecto destructor de células en las células.

La figura 8 son imágenes que muestran un efecto sinérgico mediante el tratamiento combinado de un agente antineoplásico y un conjunto de ARNip, que tienen una sustitución en una secuencia de bases y muestran un excelente efecto, en un experimento con animales.

- 5 Las figuras 8a, 8b y 8c muestran, respectivamente, una variación en el tamaño de un tumor de un ratón, una imagen del tumor del ratón y una variación en el peso corporal del ratón.

Modo para realizar la invención

- 10 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos en los que solo la combinación 13 y el grupo SP1 forman parte de la invención.

Ejemplo

15 MÉTODO DE EXPERIMENTO

CONSTRUCCIÓN DE ARNip DEL VPH TIPOS 16 Y 18

- 20 Los ARNip de las Tablas 1 y 2 a continuación se obtienen de Bioneer Corporation (Corea) mediante producción personalizada. En la siguiente tabla, la secuencia de ARNip subrayada indica un nucleótido sustituido con un nucleótido modificado con 2'-O-Me en el que un grupo metilo está unido a un resto de la base, y la secuencia gruesa en cursiva indica una base sustituida con un nucleótido modificado con 2'-F en el que un grupo hidroxilo de un resto de la base está sustituido con flúor.

25

[Tabla 1]

ARNip del VPH tipo 16		
SEQ. ID. NO.	Secuencia	Nota
secuencia 1	5'-GCA AAG ACA UCU GGA CAA A- 3'	ARNip 366 del VPH tipo 16
secuencia 2	5'-GCA AAG CA <u>UCU</u> <u>GGA</u> CAA A- 3'	
secuencia 3	5'- <u>GCA</u> AAG <u>ACA</u> UCU <u>GGA</u> CAA A- 3'	
secuencia 4	5'-UUU GUC CAG AUG UCU UUG C- 3'	
secuencia 5	5'-UUU <u>GUC</u> CAG <u>AUG</u> UCU <u>UUG</u> C- 3'	
secuencia 6	5'-UUU <u>GUC</u> CAG <u>AUG</u> UCU <u>UUG</u> C- 3'	
secuencia 7	5'-UCA AGA ACA CGU AGA GAA A- 3'	ARNip 448 del VPH tipo 16
secuencia 8	5'-UCA <u>AGA</u> ACA <u>CGU</u> <u>AGA</u> <u>GAA</u> A- 3'	
secuencia 9	5'-UUU CUC UAC GUG UUC UUG A- 3'	
secuencia 10	5'-UUU CUC UAC <u>GUG</u> UUC <u>UUG</u> A- 3'	
secuencia 11	5'-UUU CUC UAC <u>GUG</u> <u>UUC</u> <u>UUG</u> A- 3'	
secuencia 12	5'-GAC CGG UCG AUG UAU GUC UUG-3'	ARNip 497 del VPH tipo 16
secuencia 13	5' -GAC CGG <u>UCG</u> <u>AUG</u> <u>UAU</u> <u>GUC</u> <u>UUG</u> -3'	
secuencia 14	5' -AGA CAU ACA UCG ACC GGU CCA- 3'	
secuencia 15	5'-AGA CAU <u>ACA</u> <u>UCG</u> ACC GGU <u>CCA</u> - 3'	
secuencia 16	5'-GGA GCG ACC CAG AAA GTT A- 3'	ARNip 39 del VPH tipo 16
secuencia 17	5'- <u>GGA</u> GCG <u>ACC</u> CAG AAA GTT A- 3'	
secuencia 18	5'-GGA <u>GCG</u> <u>ACC</u> <u>CAG</u> AAA GTT A- 3'	
secuencia 19	5'-UAA CUU UCU GGG UCG CUC C- 3'	
secuencia 20	5'-UAA <u>CUU</u> <u>UCU</u> GGG <u>UCG</u> <u>CUC</u> C- 3'	
secuencia 21	5'-UAA CUU UCU <u>GGG</u> <u>UCG</u> CUC C- 3'	

ES 2 851 904 T3

(continuación)

ARNip del VPH tipo 16		
SEQ. ID. NO.	Secuencia	Nota
secuencia 22	5'-CAG AAA GTT ACC ACA GTT A- 3'	ARNip 48 del VPH tipo 16
secuencia 23	5'-CAG AAA GTT ACC ACA GTT A- 3'	
secuencia 24	5'-CAG AAA GTT ACC ACA GTT A- 3'	
secuencia 25	5'-UAA CUG UGG UAA CUU UCU G- 3'	
secuencia 26	5'-UAA CUG UGG UAA CUU UCU G- 3'	
secuencia 27	5'-UAA CUG UGG UAA CUU UCU G- 3'	
secuencia 28	5'-GCA CAG AGC TGC AAA CAA C- 3'	ARNip 68 del VPH tipo 16
secuencia 29	5'-GCA CAG AGC TGC AAA CAA C- 3'	
secuencia 30	5'-GCA CAG AGC TGC AAA CAA C- 3'	
secuencia 31	5'-GUU GUU UGC AGC UCU GUG C- 3'	
secuencia 32	5'-GUU GUU UGC AGC UCU GUG C- 3'	
secuencia 33	5'-GUU GUU UGC AGC UCU GUG C- 3'	
secuencia 34	5'-GCA AAC AAC TAT ACA TGA T- 3'	ARNip 78 del VPH tipo 16
secuencia 35	5'-GCA AAC AAC TAT ACA TGA T- 3'	
secuencia 36	5'-GCA AAC AAC TAT ACA TGA T- 3'	
secuencia 37	5'-AUC AUG UAU AGU UGU UUG C- 3'	
secuencia 38	5'-AUC AUG UAU AGU UGU UUG C- 3'	
secuencia 39	5'-AUC AUG UAU AGU UGU UUG C- 3'	
secuencia 40	5'-AGC AAA GAC ATC TGG ACA A- 3'	ARNip 365 del VPH tipo 16
secuencia 41	5'-AGC AAA GAC ATC TGG ACA A- 3'	
secuencia 42	5'-AGC AAA GAC ATC TGG ACA A- 3'	
secuencia 43	5'-UUG UCC AGA UGU CUU UGC U-3'	
secuencia 44	5'-UUG UCC AGA UGU CUU UGC U-3'	
secuencia 45	5'-UUG UCC AGA UGU CUU UGC U-3'	
secuencia 46	5'-CAC CUA CAU UGC AUG AAU AUA- 3'	ARNip 573 del VPH tipo 16
secuencia 47	5'-CAC CUA CAU UGC AUG AAU AUA- 3'	
secuencia 48	5'-UAU AUU CAU GCA AUG UAG GUG- 3'	
secuencia 49	5'-UAU AUU CAU GCA AUG UAG GUG- 3'	
secuencia 50	5'-UAU AUU CAU GCA AUG UAG GUG- 3'	
secuencia 51	5'-CUU CGG UUG UGC GUA CAA AGC- 3'	ARNip 792 del VPH tipo 16
secuencia 52	5'-CUU CGG UUG UGC GUA CAA AGC- 3'	
secuencia 53	5'-GCU UUG UAC GCA CAA CCG AAG- 3'	
secuencia 54	5'-GCU UUG UAC GCA CAA CCG AAG- 3'	
secuencia 55	5'-GCU UUG UAC GCA CAA CCG AAG- 3'	

[Tabla 2]

ARNip del VPH tipo 18		
SEQ. ID. NO.	Secuencia	Nota
secuencia 56	5'-CAA CCG AGC ACG ACA GGA A- 3'	ARNip 426 del VPH tipo 18
secuencia 57	5'- <u>CAA</u> <u>CCG</u> AGC <u>ACG</u> <u>ACA</u> GGA A- 3'	
secuencia 58	5'-CAA CCG AGC ACG ACA <u>GGA</u> A- 3'	
secuencia 59	5'-UUC CUG UCG UGC UCG GUU G- 3'	
secuencia 60	5'-UUC <u>CUG</u> <u>UCG</u> <u>UGC</u> <u>UCG</u> GUU G- 3'	ARNip 450 del VPH tipo 18
secuencia 61	5'- <u>UUC</u> <u>CUG</u> <u>UCG</u> <u>UGC</u> <u>UCG</u> GUU G- 3'	
secuencia 62	5'-CCA ACG ACG CAG AGA AAC A- 3'	
secuencia 63	5'-CCA ACG <u>ACG</u> <u>CAG</u> <u>AGA</u> AAC A- 3'	
secuencia 64	5'-UGU UUC UCU GCG UCG UUG G- 3'	ARNip 72 del VPH tipo 18
secuencia 65	5'-UGU <u>UUC</u> UCU GCG <u>UCG</u> <u>UUG</u> G- 3'	
secuencia 66	5'-ACT GCA AGA CAT AGA AAT A- 3'	
secuencia 67	5'-ACT <u>GCA</u> <u>AGA</u> CAT <u>AGA</u> AAT A- 3'	
secuencia 68	5'- <u>ACT</u> <u>GCA</u> AGA <u>CAT</u> AGA AAT A- 3'	ARNip 97 del VPH tipo 18
secuencia 69	5'-UAU UUC UAU GUC UUG CAG U-3'	
secuencia 70	5'-UAU <u>UUC</u> UAU <u>GUC</u> <u>UUG</u> CAG U- 3'	
secuencia 71	5'-UAU UUC UAU <u>GUC</u> <u>UUG</u> <u>CAG</u> U- 3'	
secuencia 72	5'-GTA TAT TGC AAG ACA GTA T- 3'	ARNip 103 del VPH tipo 18
secuencia 73	5'- <u>GTA</u> TAT <u>TGC</u> AAG <u>ACA</u> <u>GTA</u> T- 3'	
secuencia 74	5'-GTA TAT <u>TGC</u> AAG <u>ACA</u> GTA T- 3'	
secuencia 75	5'-AUA CUG UCU UGC AAU AUA C- 3'	
secuencia 76	5'- <u>AUA</u> <u>CUG</u> UCU UGC AAU <u>AUA</u> C- 3'	ARNip 113 del VPH tipo 18
secuencia 77	5'-AUA CUG <u>UCU</u> <u>UGC</u> AAU AUA C- 3'	
secuencia 78	5'-GCA AGA CAG TAT TGG AAC T- 3'	
secuencia 79	5'-GCA <u>AGA</u> <u>CAG</u> TAT <u>TGG</u> AAC T- 3'	
secuencia 80	5'- <u>GCA</u> AGA <u>CAG</u> TAT TGG <u>AACT</u> - 3'	ARNip 103 del VPH tipo 18
secuencia 81	5'-AGU UCC AAU ACU GUC UUG C- 3'	
secuencia 82	5'-AGU <u>UCC</u> AAU ACU <u>GUC</u> <u>UUG</u> C- 3'	
secuencia 83	5'-AGU UCC AAU ACU <u>GUC</u> <u>UUG</u> C- 3'	
secuencia 84	5'-ATT GGA ACT TAC AGA GGT A- 3'	ARNip 113 del VPH tipo 18
secuencia 85	5'-ATT <u>GGA</u> ACT TAC <u>AGA</u> <u>GGT</u> A- 3'	
secuencia 86	5'-ATT GGA <u>ACT</u> TAC <u>AGA</u> GGT A- 3'	
secuencia 87	5'-UAC CUC UGU AAG UUC CAA U-3'	
secuencia 88	5'-UAC <u>CUC</u> <u>UGU</u> AAG <u>UUC</u> CAA U- 3'	
secuencia 89	5'-UAC CUC <u>UGU</u> AAG <u>UUC</u> CAA U- 3'	

(continuación)

ARNip del VPH tipo 18		
SEQ. ID. NO.	Secuencia	Nota
secuencia 90	5'-CTC CAA CGA CGC AGA GAA A- 3'	ARNip 448 del VPH tipo 18
secuencia 91	5'-CTC CAA <u>CGA</u> <u>CGC</u> <u>AGA</u> <u>GAA</u> A- 3'	
secuencia 92	5'-CTC CAA <u>CGA</u> <u>CGC</u> AGA GAA A- 3'	
secuencia 93	5'-UUU CUC UGC GUC GUU GGA G- 3'	
secuencia 94	5'-UUU CUC UGC <u>GUC</u> <u>GUU</u> GGA G- 3'	
secuencia 95	5'-UUU CUC <u>UGC</u> <u>GUC</u> <u>GUU</u> <u>GGA</u> G- 3'	
secuencia 96	5'-ACG CAG AGA AAC ACA AGT A- 3'	ARNip 456 del VPH tipo 18
secuencia 97	5'-ACG CAG <u>AGA</u> AAC ACA <u>AGT</u> A- 3'	
secuencia 98	5'-ACG CAG AGA AAC <u>ACA</u> AGT A- 3'	
secuencia 99	5'-UAC UUG UGU UUC UCU GCG U-3'	
secuencia 100	5'-UAC <u>UUG</u> <u>UGU</u> <u>UUC</u> <u>UCU</u> <u>GCG</u> U-3'	
secuencia 101	5'-UAC UUG <u>UGU</u> UUC UCU <u>GCG</u> U-3'	
secuencia 102	5'-GCA GAG AAA CAC AAG TAT A- 3'	ARNip 458 del VPH tipo 18
secuencia 103	5'-GCA <u>GAG</u> AAA CAC AAG TAT A- 3'	
secuencia 104	5'-GCA GAG AAA <u>CAC</u> AAG TAT A- 3'	
secuencia 105	5'-UAU ACU UGU GUU UCU CUG C- 3'	
secuencia 106	5'-UAU ACU UGU <u>GUU</u> <u>UCU</u> <u>CUG</u> C- 3'	
secuencia 107	5'-UAU ACU <u>UGU</u> <u>GUU</u> UCU CUG C- 3'	
secuencia 108	5'-CAG AGA AAC ACA AGT ATA A- 3'	ARNip 459 del VPH tipo 18
secuencia 109	5'-CAG <u>AGA</u> AAC ACA <u>AGT</u> ATA A- 3'	
secuencia 110	5'-CAG AGA AAC <u>ACA</u> AGT ATA A- 3'	
secuencia 111	5'-UUA UAC UUG UGU UUC UCU G- 3'	
secuencia 112	5'-UUA UAC <u>UUG</u> UGU <u>UUC</u> <u>UCU</u> G- 3'	
secuencia 113	5'-UUA UAC <u>UUG</u> <u>UGU</u> UUC UCU G- 3'	

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL ARNip

- 5 El ARNip se mezcló con suero bovino fetal al 10 % o suero humano al 10 % mientras se mantenía a 37 °C, y se tomaron muestras según el tiempo. A continuación, las muestras se congelaron rápidamente y se almacenaron a -70 °C. Las muestras recogidas se sometieron a electroforesis durante una hora y media en gel de poliacrilamida al 12 % a 50 V seguido de tinción con Et-Br para la medición de UV.

10 CULTIVO CELULAR Y TRANSDUCCIÓN DEL ARNip

- Se sembró una célula de cáncer de cuello uterino, una línea celular HeLa de cáncer de cuello uterino (ATCC CCL-2) infectada con virus VPH de tipo 18, o una línea celular SiHa (ATCC HTB-35) o CaSki (ATCC CRL-1550) de cáncer de cuello uterino infectada con virus VPH de tipo 16 en una placa de 6 pocillos en un número de células de 2×10^5 o $1,6 \times 10^5$, y se cultivó respectivamente en medio RPMI1640 o DMEM al que se le añadió suero bovino fetal al 10 % durante 24 horas en la condición de 37 °C, y CO₂ al 5 %. Después de cultivar durante 24 horas en el medio para unir las células a una superficie de la placa de cultivo, el ARNip no modificado como control y un oligonucleótido de ARNip modificado mediante el método descrito anteriormente como grupo experimental (20 nM para cada uno), se transdujeron utilizando DharmaFECT 1 (Dharmacon, EE.UU.), y el resultante se cultivó durante 24 horas.

20

TRATAMIENTO CON AGENTES ANTINEOPLÁSICOS

Una línea celular HeLa o Caski, que se sembró en una placa de 6 pocillos a 2×10^5 células o $1,5 \times 10^5$ células y a continuación se cultivó durante un día mediante el método descrito anteriormente, se transdujo con ARNip. A continuación, cada línea celular transducida se trató con cisplatino (CDDP) a una concentración final de $2,5 \mu\text{M}$ y se cultivó.

5

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA ASOCIADA A LA SENESCENCIA CELULAR (Sa- β -gal)

Mediante el método que se ha descrito anteriormente, se transdujo una línea celular HeLa o Caski con ARNip, sola o en combinación con un agente antineoplásico y a continuación se cultivó durante un día. Mediante la utilización del kit de ensayo de senescencia celular (BioVision, EE.UU.), las células se lavaron con PBS y se trataron con solución de tinción SA- β -gal durante 12 horas a 37°C . Las células teñidas de azul se observaron utilizando un microscopio óptico general con un aumento de 100 a 200 veces.

10

MEDICIÓN DE LA MUERTE CELULAR MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE CITOMETRÍA DE FLUJO

15

Mediante el método que se ha descrito anteriormente, se transdujo una línea celular HeLa o Caski con ARNip, sola o en combinación con un agente antineoplásico y a continuación se cultivó durante un día. Las células se tiñeron y reaccionaron con los reactivos anexina V y yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés) durante 30 minutos a temperatura ambiente usando un kit de ensayo de muerte celular (BD, EE.UU.), y después se evaluó la muerte celular mediante la utilización de citometría de flujo.

20

INVESTIGACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON ARNip

Mediante el método que se ha descrito anteriormente, se transdujo una línea celular HeLa o Caski con ARNip, sola o en combinación con un agente antineoplásico y a continuación se cultivó durante un día. Para observar un cambio en una proteína, se alteraron las células mediante la adición de tampón de lisis celular RIPA [NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, SDS al 0,1 %, desoxicolato al 0,5 % y NP-40 al 1 %]. A continuación, se observó la variación en el nivel de proteína mediante el método general de transferencia de Western. Se adquirieron anticuerpos de ratón anti-TP53, anti-E7 y antiactina de Santa Cruz (EE.UU.), se diluyeron a 1:1000 y se utilizaron. El anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP se adquirió de Jackson Laboratories (EE.UU.), se diluyó a 1:3000 y se utilizó.

25

30

Además, para observar la variación en el nivel de ARNm, se alteraron las células utilizando una solución de Trizol (Invitrogen, EE.UU.), y se detectó el ARN pasando a través de la purificación con etanol para observar así la variación en el nivel de ARNm a través del método general de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

35

INVESTIGACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL EFECTO INESPECÍFICO DEL ARNip

Se sembró una línea celular HeLa o Caski en una placa de 6 pocillos y se cultivó respectivamente durante 24 horas en medio RPMI1640 o DMEM con suero bovino fetal al 10 % en condiciones de 37°C y CO_2 al 5 %. El ARNip con β -gal, que era un control positivo, y el ARNip se transdujeron y cultivaron, y, a continuación, se recogió el medio para realizar el método general ELISA de IL-6 (BD, EE.UU.).

40

A un ratón de 6 semanas de edad se inyectó por vía intravenosa ARNip con β -gal como control positivo, ARNip como control negativo y ARNip, y la reacción se llevó a cabo durante 6 horas. Posteriormente, se extrajo sangre del ratón y se separó el suero para realizar ELISA INF-gamma (BD, EE.UU.).

45

PCR EN TIEMPO REAL DE TALLO-BUCLE PARA CUANTIFICAR ARNip

A una rata que pesaba alrededor de 260 a 300 g (a la edad de 4 semanas) se le inyectó por vía intravenosa ARNip, y, a continuación, se recogió sangre de la rata para separar el plasma. El plasma separado se diluyó en tampón Triton X-100 al 0,25 %. El ADNc se sintetizó utilizando el kit de transcripción inversa microARN de Taqman (Applied Biosystem, EE.UU.) y se cuantificó mediante el método de PCR en tiempo real para detectar ARNip.

50

PRUEBA EN ANIMALES DE ARNip

55

Se xenoinjertó una hembra de ratón atímico con 5×10^6 células HeLa de VPH tipo 18, y se evaluó la generación de células cancerosas 10 días después. A continuación, se inyectaron por vía intravenosa en las colas 3 mg/kg de ARNip a utilizar en el intervalo de 2-3 días. Se inyectaron repetidamente cisplatino (2 mg/kg) y paclitaxel (4 mg/kg) 9 veces mediante una inyección intraperitoneal en intervalos de 3-4 días. El tamaño de tumoral se midió en un intervalo de 2-3 días.

60

RESULTADOS EXPERIMENTALES

VARIACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DEL TRATAMIENTO CON ARNip Y NÚMERO DE TRATAMIENTO

65

Para una línea celular Caski o HeLa infectada con el VPH tipo 16 o 18, al realizar la transducción de ARNip y un

tratamiento con un agente antineoplásico, sola o en combinación, en la técnica convencional, se mostró la eficacia del ARNip en tratamientos sucesivos durante un período prolongado a una concentración alta (100 nM), mientras que el ARNip modificado de la presente invención exhibió una eficacia excelente en un solo tratamiento durante un período corto a una concentración baja (20 nM).

PRUEBA DE ESTABILIDAD DE ARNip CON RESTO SUSTITUIDO

Los ARNip de las combinaciones 51 a 54, obtenidos mediante el método descrito anteriormente, se mezclaron con suero humano al 10 %. A continuación, cada ARNip se tomó en función del tiempo a una temperatura de 37 °C y se almacenó a -70 °C. Después de eso, se realizó electroforesis en gel en gel de poliacrilamida al 12 %. El resultante se tiñó con Et-Br y se midió con UV. En consecuencia, como se muestra en la figura 1a, el ARNip de la combinación 51 que tiene un resto no sustituido en una secuencia de bases desapareció en dos horas, mientras que los ARNip de las combinaciones 52 a 54 que tienen un resto sustituido en una secuencia de bases permanecieron al menos 4 horas, lo que indica un aumento considerable de la estabilidad. En particular, la combinación 54 mostró la estabilidad más destacada que dura más de 24 horas.

EFFECTO DEL ARNip CON RESTO SUSTITUIDO A NIVEL MOLECULAR

Mediante el método que se ha descrito anteriormente, se transdujo una línea celular HeLa con ARNip de las combinaciones 44 a 50, ARNip simulado y de GFP, y, a continuación, se evaluó la variación en los niveles de proteína TP53 y E7, mientras se usaba actina como gen de mantenimiento, en donde los ARNip de las combinaciones 44 a 50 eran ARNip del VPH tipo 18, y los controles eran simulados y de GFP. Como se muestra en la figura 1b, se comparó la variación en el nivel de proteínas TP53 y E7 de la combinación 44 con la de las combinaciones 45 a 50, en donde la combinación 44 tiene un resto no sustituido en una secuencia de bases, y las combinaciones 45 a 50 tienen un resto sustituido en una secuencia de bases. Se demostró que la eficacia de la combinación 48 para aumentar la expresión de la proteína TP53 y reducir la expresión de la proteína E7 fue superior a otras secuencias.

Además, para el ARNip 497 del VPH tipo 16, se transdujo una línea celular Caski con las combinaciones 12 a 15 mediante el método descrito anteriormente, y a continuación se extrajo el ARNm para evaluar los niveles de expresión del ARNm de E6 y P21. En consecuencia, como se muestra en la figura 1c, se ha comprobado que la combinación 13 redujo en un 60 % o más el ARNm de E6 y aumentó en un 1100 % o más el ARNm de p21 con respecto al control, en donde, la combinación 13 tiene un resto sustituido en una secuencia de bases. También se ha evaluado que la combinación 13 fue superior a otras secuencias en comparación con la combinación 12 que tiene un resto no sustituido en una secuencia de bases.

EFFECTO INDUCTOR DE SENESCENCIA CELULAR DEL ARNip CON RESTO SUSTITUIDO

Se midió la actividad SA β -Gal de una línea celular HeLa o Caski, que se trató mediante el método descrito anteriormente. En consecuencia, en la figura 2a, en los casos donde se transdujeron ARNip de E6/E7 del VPH 18 y la combinación 51, la actividad de SA- β Gal aumentó entre 10 y 20 veces, mientras que la actividad SA- β Gal para la combinación 54 aumentó 50 veces o más en comparación con la del ARNip de control, en donde se utilizó ARNip de E6/E7 del VPH 18 en la invención anterior; la combinación 51 consistió en ARNip 450 que tiene un resto no sustituido en una secuencia de bases; y la combinación 54 consistió en ARNip que tiene un resto sustituido en una secuencia de bases. El resultado mostró que el efecto de senescencia celular de la combinación 54 que tiene una sustitución en una secuencia de bases fue considerablemente mejor que el de la combinación 51 que no tiene sustitución de una secuencia de bases.

EFFECTO DE DESTRUCCIÓN CELULAR DEL ARNip CON RESTO SUSTITUIDO

Mediante el método que se ha descrito anteriormente, se midió el efecto de destrucción celular usando citometría de flujo. Como resultado obtenido mediante la evaluación del efecto de destrucción celular comparando ARNip de E6/E7 del VPH 18, de E6 de 18, combinación 48 y combinación 54 (que tienen un resto sustituido en una secuencia de bases) con el control, se ha demostrado que los grupos de ARNip de E6/E7 del VPH 18 y E6 de 18 mostraron un efecto de destrucción celular de solo un 15 a un 20 %, mientras que los grupos de ARNip que tienen un resto sustituido mostraron alrededor de un 60 % o más de efecto de destrucción celular, con respecto al control (Figura 2b). El resultado mostró que las secuencias de ARNip que tienen sustitución en una secuencia de bases mostraron un efecto de destrucción de células cancerosas más significativo que el ARNip normal.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO DE CISPLATINO Y ARNip CON RESTO SUSTITUIDO

Como resultado de medir la actividad de SA β -Gal mediante el tratamiento de una línea celular HeLa con cisplatino y la combinación 48 que tiene un resto sustituido en una secuencia de bases mediante el método descrito anteriormente, como se muestra en las figuras 3a y 3b, las células se tiñeron de azul en las líneas celulares tratadas respectivamente con cisplatino y la combinación 48 sola, mostrando actividad SA β -Gal.

Sin embargo, casi todas las células se tiñeron de azul oscuro, lo que indica una fuerte actividad SA β -Gal para el grupo

de tratamiento combinado de combinación 48 y cisplatino. El resultado mostró que el grupo de tratamiento combinado exhibió un efecto de senescencia celular muy superior al grupo de unitratamiento con ARNip o cisplatino.

5 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE UNITRATAMIENTO O TRATAMIENTO COMBINADO DE GRUPOS DE ARNip

Mediante el método que se ha descrito anteriormente, se trataron líneas celulares de Caski del VPH tipo 16 respectivamente con 20 nM de la combinación de ARNip 2, 9 y 13 sola, en donde la combinación de ARNip 2, 9 y 13 tiene sustitución en una secuencia de bases del VPH tipo 16, y las líneas celulares de Caski del VPH tipo 16 se transdujeron con: el grupo de combinación 2 y combinación 9 (10 nM, para cada una); el grupo de combinación 2 y combinación 13 (10 nM, para cada una); el grupo de combinación 9 y combinación 13 (10 nM, para cada una); y el grupo de combinación 2, combinación 9 y combinación 13 (7 nM, para cada una). A continuación, se midió el número de células 24 horas después. En consecuencia, como se muestra en la figura 4a, la proliferación celular se redujo en los grupos de unitratamiento de cada ARNip que tiene sustitución en una secuencia de bases, y el grupo de tratamiento combinado de ARNip de una manera similar. Particularmente, aunque cada ARNip se trató en una cantidad de 7 nM, el grupo de 3 tipos de ARNip mostró el efecto equivalente al caso donde se trató 20 nM de cada ARNip.

La combinación del grupo de ARNip utilizado en el presente documento se mostró en la Tabla 3 a continuación, y el grupo de ARNip que se muestra en la Tabla 4 a continuación incluye una mezcla de dos o más combinaciones que tienen efectos inhibidores de la proliferación celular particularmente superiores.

[Tabla 3]

Combinación de ARNip			
Número de combinación	Sentido	Antisentido	nota
combinación 1	secuencia 1	secuencia 4	ARNip 366 del VPH tipo 16
combinación 2	secuencia 2	secuencia 4	
combinación 3	secuencia 2	secuencia 5	
combinación 4	secuencia 2	secuencia 6	
combinación 5	secuencia 3	secuencia 4	
combinación 6	secuencia 3	secuencia 5	
combinación 7	secuencia 3	secuencia 6	
combinación 8	secuencia 7	secuencia 9	ARNip 448 del VPH tipo 16
combinación 9	secuencia 8	secuencia 9	
combinación 10	secuencia 8	secuencia 10	
combinación 11	secuencia 8	secuencia 11	
combinación 12	secuencia 12	secuencia 14	ARNip 497 del VPH tipo 16
combinación 13	secuencia 12	secuencia 15	
combinación 14	secuencia 13	secuencia 14	
combinación 15	secuencia 13	secuencia 15	ARNip 39 del VPH tipo 16
combinación 16	secuencia 16	secuencia 19	
combinación 17	secuencia 17	secuencia 20	
combinación 18	secuencia 18	secuencia 21	ARNip 48 del VPH tipo 16
combinación 19	secuencia 18	secuencia 21	
combinación 20	secuencia 22	secuencia 25	
combinación 21	secuencia 23	secuencia 25	
combinación 22	secuencia 24	secuencia 26	
combinación 23	secuencia 24	secuencia 27	

(continuación)

Combinación de ARNip			
Número de combinación	Sentido	Antisentido	nota
combinación 24	secuencia 28	secuencia 31	ARNip 68 del VPH tipo 16
combinación 25	secuencia 29	secuencia 32	
combinación 26	secuencia 30	secuencia 32	
combinación 27	secuencia 30	secuencia 33	
combinación 28	secuencia 34	secuencia 34	ARNip 78 del VPH tipo 16
combinación 29	secuencia 35	secuencia 37	
combinación 30	secuencia 36	secuencia 38	
combinación 31	secuencia 36	secuencia 39	
combinación 32	secuencia 40	secuencia 43	ARNip 365 del VPH tipo 16
combinación 33	secuencia 41	secuencia 44	
combinación 34	secuencia 42	secuencia 44	
combinación 35	secuencia 42	secuencia 45	
combinación 36	secuencia 46	secuencia 48	ARNip 573 del VPH tipo 16
combinación 37	secuencia 46	secuencia 49	
combinación 38	secuencia 47	secuencia 48	
combinación 39	secuencia 47	secuencia 50	
combinación 40	secuencia 51	secuencia 53	ARNip 792 del VPH tipo 16
combinación 41	secuencia 51	secuencia 55	
combinación 42	secuencia 52	secuencia 54	
combinación 43	secuencia 52	secuencia 55	
combinación 44	secuencia 56	secuencia 59	ARNip 426 del VPH tipo 18
combinación 45	secuencia 57	secuencia 59	
combinación 46	secuencia 57	secuencia 60	
combinación 47	secuencia 57	secuencia 61	
combinación 48	secuencia 58	secuencia 59	
combinación 49	secuencia 58	secuencia 60	
combinación 50	secuencia 58	secuencia 61	
combinación 51	secuencia 62	secuencia 64	ARNip 450 del VPH tipo 18
combinación 52	secuencia 62	secuencia 65	
combinación 53	secuencia 63	secuencia 64	
combinación 54	secuencia 63	secuencia 65	
combinación 55	secuencia 66	secuencia 69	ARNip 72 del VPH tipo 18
combinación 56	secuencia 67	secuencia 70	
combinación 57	secuencia 67	secuencia 69	
combinación 58	secuencia 68	secuencia 71	

(continuación)

Combinación de ARNip			
Número de combinación	Sentido	Antisentido	nota
combinación 59	secuencia 72	secuencia 76	ARNip 97 del VPH tipo 18
combinación 60	secuencia 73	secuencia 75	
combinación 61	secuencia 73	secuencia 77	
combinación 62	secuencia 74	secuencia 77	ARNip 103 del VPH tipo 18
combinación 63	secuencia 78	secuencia 83	
combinación 64	secuencia 79	secuencia 82	
combinación 65	secuencia 80	secuencia 81	
combinación 66	secuencia 80	secuencia 82	ARNip 113 del VPH tipo 18
combinación 67	secuencia 84	secuencia 89	
combinación 68	secuencia 85	secuencia 87	
combinación 69	secuencia 86	secuencia 88	
combinación 70	secuencia 86	secuencia 89	ARNip 448 del VPH tipo 18
combinación 71	secuencia 90	secuencia 95	
combinación 72	secuencia 91	secuencia 94	
combinación 73	secuencia 92	secuencia 93	
combinación 74	secuencia 92	secuencia 95	ARNip 456 del VPH tipo 18
combinación 75	secuencia 96	secuencia 99	
combinación 76	secuencia 97	secuencia 99	
combinación 77	secuencia 98	secuencia 100	
combinación 78	secuencia 98	secuencia 101	
combinación 79	secuencia 102	secuencia 107	ARNip 458 del VPH tipo 18
combinación 80	secuencia 103	secuencia 106	
combinación 81	secuencia 103	secuencia 107	
combinación 82	secuencia 104	secuencia 105	
combinación 83	secuencia 108	secuencia 113	ARNip 459 del VPH tipo 18
combinación 84	secuencia 109	secuencia 112	
combinación 85	secuencia 110	secuencia 112	
combinación 86	secuencia 110	secuencia 113	

[Tabla 4]

Grupo de ARNip				
Número de grupo	Sentido	Antisentido	Número de combinación	Nota
SP1	secuencia 2	secuencia 4	2	ARNip 366/448/497 del VPH tipo 16
	secuencia 8	secuencia 9	9	
	secuencia 12	secuencia 15	13	

(continuación)

Grupo de ARNip				
Número de grupo	Sentido	Antisentido	Número de combinación	Nota
SP2	secuencia 18	secuencia 21	18	ARNip 39/68 del VPH tipo 16
	secuencia 29	secuencia 32	25	
SP3	secuencia 42	secuencia 45	35	ARNip 365/792 del VPH tipo 16
	secuencia 52	secuencia 55	43	
SP4	secuencia 58	secuencia 59	48	ARNip 426/450 del VPH tipo 18
	secuencia 63	secuencia 65	54	
SP5	secuencia 68	secuencia 71	58	ARNip 72/448 del VPH tipo 18
	secuencia 91	secuencia 94	72	
SP6	secuencia 98	secuencia 100	77	ARNip 456/459 del VPH tipo 18
	secuencia 109	secuencia 112	84	

EFFECTO DE DESTRUCCIÓN CELULAR DEL UNITRATAMIENTO Y TRATAMIENTO COMBINADO DE GRUPOS DE ARNip

Mediante el método que se ha descrito anteriormente, se trató una línea celular HeLa con VPH tipo 18 con la combinación 48 y la combinación 54 (20 nM, para cada una) en donde, la combinación 48 y la combinación 20 tienen ARNip del VPH tipo 18 que tiene una sustitución en una secuencia de bases y se transduce con los 10 nM del grupo SP4, que es el grupo de ARNip de 5 nM de la combinación 48 y 5 nM de la combinación 54. Después de 24 horas, la línea celular se tiñó con Anexina V y yoduro de propidio, y se midió el efecto de destrucción celular usando citometría de flujo. En consecuencia, como se muestra en la figura 4b, ambos grupos de unitratamiento de ARNip, que tienen sustitución en una secuencia de bases, y el grupo de ARNip (SP4) mostraron el efecto de destrucción en un 80 % o más de las células. Como resultado, se ha demostrado que 20 nM del grupo de unitratamiento con ARNip mostró un efecto de destrucción celular similar al de 10 nM del grupo de ARNip, lo que indica que el grupo de ARNip era mejor.

EFFECTO DE GRUPOS DE ARNip EN UNITRATAMIENTO Y TRATAMIENTO COMBINADO A NIVEL MOLECULAR

Mediante el método que se ha descrito anteriormente, en una línea celular CaSki del VPH tipo 16, se utilizó el método de transferencia western para comparar el nivel de expresión de la proteína TP53 para un grupo de tratamiento combinado de cisplatino y las combinaciones 2, 9, 13; un grupo de unitratamiento de cisplatino; un grupo de tratamiento combinado de cisplatino y las combinaciones 2 y 9; un grupo de tratamiento combinado de cisplatino y las combinaciones 2 y 13; un grupo de tratamiento combinado de cisplatino y las combinaciones 9 y 13; y un grupo de tratamiento combinado de cisplatino y el grupo SP1 (un grupo de combinación 2, combinación 9 y combinación 13), en donde las combinaciones 2, 9 y 13 tienen sustitución en una secuencia de bases. En consecuencia, como se muestra en la figura 4C, entre los grupos de tratamiento combinado de grupos de ARNip y cisplatino, el mayor aumento en el nivel de expresión de la proteína TP53 se mostró en el grupo SP1 que se trató con una concentración baja de 7 nM.

El resultado mostró que, dado que el grupo consistía selectivamente en ARNip que era competente y eficaz al tiempo que imitaba las características del grupo de ARNip de origen natural, es posible mezclar y usar en una concentración más baja que la concentración del tratamiento normal y reducir el efecto inespecífico.

EFFECTO INESPECÍFICO DEL ARNip

Mediante el método que se ha descrito anteriormente, se transdujo una línea celular HeLa con VPH tipo 18 con ARNip con β -gal como control positivo, la combinación 44 que tiene un resto no sustituido y la combinación 48 que tiene un resto sustituido en una secuencia de bases. A continuación, se realizó un experimento de respuesta inmunitaria de IL-6. En consecuencia, como se muestra en la figura 5a, la respuesta inmunitaria de IL-6 aumentó en el control positivo y la combinación 44, mientras que la respuesta inmunitaria de IL-6 se redujo a la mitad del nivel del control positivo para la combinación 48 que tiene un resto sustituido en una secuencia de bases.

Además, se inyectó por vía intravenosa a un ratón de 6 semanas de edad con ARNip con β -gal y la combinación 44 y 48 de ARNip del VPH tipo 18 que surgen de la respuesta inmunitaria, y se hizo reaccionar durante 6 horas para realizar un experimento de respuesta inmunitaria de INF-gamma (Figura 5b). Aunque se observó una respuesta inmunitaria en el ARNip de β -gal de control positivo y la combinación 44 que se expresó mediante un aumento en el nivel de INF-

gamma, no se observó respuesta inmunitaria en la combinación 48 ya que INF-gamma en la combinación 48 mostró un nivel similar al del control negativo y no aumentó.

Por tanto, se ha encontrado que la respuesta inmunitaria se redujo en el grupo de tratamiento de ARNip que tiene un resto sustituido en comparación con el ARNip que tiene un resto no sustituido.

EXPERIMENTO FARMACOCINÉTICO DE ARNip CON RESTO SUSTITUIDO

Mediante el método que se ha descrito anteriormente, se inyectó por vía intravenosa a una rata la combinación 44 y la combinación 48 de ARNip del VPH tipo 18 y se extrajo sangre en función del tiempo. A continuación, se separó el plasma para cuantificar el ARNip mediante el método de PCR en tiempo real de tallo-bucle. En consecuencia, como se muestra en la figura 6a, la semivida de la combinación 48 fue al menos dos veces más larga que la de la combinación 44, lo que significa que la combinación 48, que tiene un resto sustituido en una secuencia de bases, es más estable *in vivo*.

EFFECTO DEL ARNip EN VARIOS TIPOS DE LIPOSOMAS

Mediante el método que se ha descrito anteriormente, se transdujo una línea celular HeLa del VPH tipo 18 con ARNip mediante la utilización sistemas de administración de fármacos Dharmafect (Dharmacon), oligofectamina y lipofectamina 2000 (Invitrogen) disponibles comercialmente y un liposoma catiónico preparado por los presentes inventores. Después de 24 horas, se midió el número de células para evaluar el efecto de la inhibición de la proliferación celular. En consecuencia, como se muestra en la figura 7a, el ARNip se inserta de forma eficaz a una línea celular infectada con VPH en varios sistemas de administración de fármacos.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO DE GRUPOS DE ARNip Y AGENTE ANTINEOPLÁSICO

Mediante el método que se ha descrito anteriormente, se xenoinjertaron células cancerosas en un ratón. Después de 10 días, se evaluó la generación de células cancerosas. A continuación, se inyectaron repetidamente ARNip y un agente antineoplásico 9 veces, y se midió el tamaño tumoral en un intervalo de 2-3 días. En consecuencia, como se muestra en la figura 8a, el grupo de tratamiento combinado del fármaco antineoplásico y SP4 (un grupo de combinación 48 y 54) mostró un efecto terapéutico significativamente más destacado que el grupo de tratamiento combinado del fármaco antineoplásico y el grupo de combinación 44 y 51. Se ha descubierto que el SP4 que tiene un resto sustituido en una secuencia de bases mostró una mejor eficacia y efecto que el grupo de ARNip de la combinación 44 y 51 que tienen un resto no sustituido en una secuencia de bases. Además, como se muestra en la figura 8b, cuando se comparó el tamaño de los tumores de un ratón del grupo de administración de agentes antineoplásicos de cisplatino y paclitaxel con el del grupo de tratamiento combinado del agente antineoplásico y el grupo de SP4 el día 17, se comprobó que existen grandes diferencias de tamaño y estado. Además, como se muestra en la figura 8c, un resultado obtenido mediante la observación de cantidades de variación en el peso corporal del ratón los días 9 y 28 no mostró reducción en el peso corporal causada por toxicidad. Por tanto, se ha determinado que no hubo ningún efecto secundario causado por toxicidad del ARNip.

<110> REFERENCE BIOLABS

<120> Composición para el tratamiento del cáncer relacionado con el VPH

<130> PN120369

<160> 113

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 1

gcaaagacau cuggacaaa

19

<210> 2

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

	<220> <223> oligonucleótido sintético	
5	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
10	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(14) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
15	<400> 2 gcaaagacau cnnacaaa	19
20	<210> 3 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido sintético	
30	<220> <221> misc_feature <222> (1) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
35	<220> <221> misc_feature <222> (6) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
40	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(14) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
45	<400> 3 ncaaanacau cunnacaaa	19
50	<210> 4 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido sintético	
60	<400> 4 uuuguccaga ugucuuugc	19
65	<210> 5 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<220> <221> misc_feature <222> (4) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	

5	<220> <221> misc_feature <222> (9) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
10	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
15	<220> <221> misc_feature <222> (18) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
20	<400> 5 uuunuccana unucuuunc	19
25	<210> 6 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <221> misc_feature <222> (2) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
35	<220> <221> misc_feature <222> (4) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
40	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
45	<220> <221> misc_feature <222> (16) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
50	<400> 6 ununuccaga unucunugc	19
55	<210> 7 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> oligonucleótido sintético	
65	<400> 7 ucaagaacac guagagaaa	19
	<210> 8 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	

	<220> <223> oligonucleótido sintético	
5	<220> <221> misc_feature <222> (5) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
10	<220> <221> misc_feature <222> (11) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
15	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
20	<220> <221> misc_feature <222> (16) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
25	<400> 8 ucaanaacac nuananaaa	19
30	<210> 9 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> oligonucleótido sintético	
40	<400> 9 uuucucuacg uguucuuga	19
45	<210> 10 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> oligonucleótido sintético	
55	<220> <221> misc_feature <222> (10) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
60	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
65	<220> <221> misc_feature <222> (18) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<400> 10 uuucucuacn unuucuuna	19
	<210> 11 <211> 19 <212> ARN	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)	
10	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)	
15	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13)	
20	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (17)	
25	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<400> 11	
	unucucuacg ngnucunga	19
	<210> 12	
30	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 12	
	gaccggucga uguaugucu g	21
40	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
50	<222> (7)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
55	<222> (11)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
60	<222> (13)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
65	<222> (15)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	

5	<220> <221> misc_feature <222> (17) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
10	<220> <221> misc_feature <222> (19) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
15	<400> 13 gaccggncca ngnangncnu g	21
20	<210> 14 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido sintético	
30	<400> 14 agacauacau cgaccggucc a	21
35	<210> 15 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido sintético	
45	<220> <221> misc_feature <222> (6) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
50	<220> <221> misc_feature <222> (10) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
55	<220> <221> misc_feature <222> (18) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
60	<400> 15 agacanacan cgaccgncc a	21
65	<210> 16 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 16 ggagcgaccc agaaagtta	19
	<210> 17 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	

	<220> <223> oligonucleótido sintético	
5	<220> <221> misc_feature <222> (2) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
10	<220> <221> misc_feature <222> (6) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
15	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
20	<220> <221> misc_feature <222> (16) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
25	<400> 17 gnagcnaccc anaaantta	19
30	<210> 18 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> oligonucleótido sintético	
40	<220> <221> misc_feature <222> (5) <223> n indica citosina modificada con F	
45	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(10) <223> n indica citosina modificada con F	
50	<400> 18 ggagngannn agaaagtta	19
55	<210> 19 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> oligonucleótido sintético	
65	<400> 19 uaacuuucug ggucgcucc	19
	<210> 20 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	

5	<220> <221> misc_feature <222> (5) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
10	<220> <221> misc_feature <222> (9) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
15	<220> <221> misc_feature <222> (13) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
20	<220> <221> misc_feature <222> (17) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
25	<400> 20 uaacnuucng ggnogcncc	19
30	<210> 21 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <221> misc_feature <222> (10) .. (11) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
40	<220> <221> misc_feature <222> (15) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
45	<400> 21 uaacuuucun ngucnucucc	19
50	<210> 22 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido sintético	
60	<400> 22 cagaaagtta ccacagtta	19
65	<210> 23 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<220> <221> misc_feature	

	<222> (3) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
5	<220> <221> misc_feature <222> (7) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
10	<220> <221> misc_feature <222> (16) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
15	<400> 23 canaaantta ccacantta	19
20	<210> 24 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido sintético	
30	<220> <221> misc_feature <222> (1) <223> n indica citosina modificada con F	
35	<220> <221> misc_feature <222> (11) .. (12) <223> n indica citosina modificada con F	
40	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica citosina modificada con F	
45	<400> 24 nagaaagtta nnanagtta	19
50	<210> 25 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido sintético	
60	<400> 25 uaacuguggu aacuuucug	19
65	<210> 26 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<220> <221> misc_feature <222> (5) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	

5	<220> <221> misc_feature <222> (10) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
10	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
15	<220> <221> misc_feature <222> (18) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
20	<400> 26 uaacnguggn aacnuucng	19
25	<210> 27 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> oligonucleótido sintético	
35	<220> <221> misc_feature <222> (6) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
40	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(9) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
45	<220> <221> misc_feature <222> (19) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
50	<400> 27 uaacununnu aacuuucun	19
55	<210> 28 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> oligonucleótido sintético	
65	<220> <221> misc_feature <222> (1)	

	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
5	<222> (6)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
10	<222> (8)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
15	<222> (8)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
20	<222> (11)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<400> 29	
25	ncacananct ncaaacaac	19
	<210> 30	
	<211> 19	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
35	<222> (2)	
	<223> n indica citosina modificada con F	
	<220>	
	<221> misc_feature	
40	<222> (9)	
	<223> n indica citosina modificada con F	
	<220>	
	<221> misc_feature	
45	<222> (12)	
	<223> n indica citosina modificada con F	
	<220>	
	<221> misc_feature	
50	<222> (16)	
	<223> n indica citosina modificada con F	
	<400> 30	
55	gnacagagnt gnaaanaac	19
	<210> 31	
	<211> 19	
	<212> ARN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 31	
65	guuguuugca gcucugugc	19

5	<210> 32 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
10	<220> <221> misc_feature <222> (2) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
15	<220> <221> misc_feature <222> (6) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
20	<220> <221> misc_feature <222> (15) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
25	<220> <221> misc_feature <222> (17) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
30	<400> 32 gnugunugca gncugngc	19
35	<210> 33 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
40	<220> <221> misc_feature <222> (4) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
45	<220> <221> misc_feature <222> (8) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
50	<220> <221> misc_feature <222> (11) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
55	<220> <221> misc_feature <222> (16) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
60	<400> 33 guunuuunca ncucunugc	19
65	<210> 34 <211> 19 <212> ARN	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
5		
	<400> 34	
	gcaaacaact atacatgat	19
10	<210> 35	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (17)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<400> 35	
	ncaaacaact atacatnat	19
30	<210> 36	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)	
	<223> n indica citosina modificada con F	
45	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (6)	
	<223> n indica citosina modificada con F	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (9)	
	<223> n indica citosina modificada con F	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)	
	<223> n indica citosina modificada con F	
60	<400> 36	
	gnaaanaant atanatgat	19
65	<210> 37	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

	<223> oligonucleótido sintético	
5	<400> 37 aucauguaua guuguuugc	19
	<210> 38 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido sintético	
15	<220> <221> misc_feature <222> (2) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
20	<220> <221> misc_feature <222> (7) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
25	<220> <221> misc_feature <222> (15) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
30	<220> <221> misc_feature <222> (17) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
35	<400> 38 ancaugnaua guugnungc	19
	<210> 39 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido sintético	
45	<220> <221> misc_feature <222> (6) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
50	<220> <221> misc_feature <222> (11) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
55	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
60	<220> <221> misc_feature <222> (18) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
65	<400> 39 aucaunuaua nuunuuunc	19

5	<210> 40 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
10	<400> 40 agcaaagaca tctggacaa	19
15	<210> 41 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
20	<220> <221> misc_feature <222> (2) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
25	<220> <221> misc_feature <222> (7) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
30	<220> <221> misc_feature <222> (14)..(15) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
35	<400> 41 ancaaanaca tctnnacaa	19
40	<210> 42 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
45	<220> <221> misc_feature <222> (3) <223> n indica citosina modificada con F	
50	<220> <221> misc_feature <222> (9) <223> n indica citosina modificada con F	
55	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica citosina modificada con F	
60	<220> <221> misc_feature <222> (17) <223> n indica citosina modificada con F	
65	<220> <221> misc_feature <222> (17) <223> n indica citosina modificada con F	

	<400> 42 agnaaagana tntgganaa	19
5	<210> 43 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 43 uuguccagau gucuuugcu	19
15	<210> 44 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido sintético	
25	<220> <221> misc_feature <222> (2) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
30	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
35	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
40	<220> <221> misc_feature <222> (16) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
45	<400> 44 unguccagau gncnungcu	19
50	<210> 45 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
55	<220> <221> misc_feature <222> (3) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
60	<220> <221> misc_feature <222> (8) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
65	<220> <221> misc_feature <222> (11)	

	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
5	<221> misc_feature	
	<222> (17)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
10	<400> 45 uunuccanau nucuunucu	19
	<210> 46	
	<211> 21	
	<212> ARN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
20	<400> 46 caccuacauu gcaugaauau a	21
	<210> 47	
	<211> 21	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
45	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (20)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
50	<400> 47 cacnacauu ncangaauan a	21
	<210> 48	
	<211> 21	
55	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
60	<400> 48 uauauucaug caauguaggu g	21
	<210> 49	
65	<211> 21	
	<212> ARN	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3)	
10	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)	
15	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)	
20	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (20)	
25	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<400> 49	
	uananucaug caanguaggn g	21
30	<210> 50	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (10)	
40	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (15)	
45	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (18)..(19)	
50	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<400> 50	
	uauauucaun caaunuannu g	21
55	<210> 51	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 51	
65	cuucgguugu gcguacaaag c	21
	<210> 52	

	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (2)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (5)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
20	<221> misc_feature	
	<222> (11)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<222> (14)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<400> 52	
30	cnucnguugu ncgnacaaag c	21
	<210> 53	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 53	
40	gcuuuguacg cacaaccgaa g	21
	<210> 54	
	<211> 21	
	<212> ARN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3)..(5)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (7)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
60	<400> 54	
	gcnnngnacg cacaaccgaa g	21
	<210> 55	
	<211> 21	
65	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220> <223> oligonucleótido sintético	
5	<220> <221> misc_feature <222> (6) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
10	<220> <221> misc_feature <222> (10) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
15	<220> <221> misc_feature <222> (18) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
20	<220> <221> misc_feature <222> (21) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
25	<400> 55 gcuuunuacn cacaaccnaa n	21
30	<210> 56 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 56 caaccgagca cgacaggaa	19
40	<210> 57 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> oligonucleótido sintético	
50	<220> <221> misc_feature <222> (1) <223> n indica citosina modificada con F	
55	<220> <221> misc_feature <222> (4).. (5) <223> n indica citosina modificada con F	
60	<220> <221> misc_feature <222> (9) <223> n indica citosina modificada con F	
65	<220> <221> misc_feature <222> (11) <223> n indica citosina modificada con F	

	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica citosina modificada con F	
5	<400> 57 naanngagna nganaggaa	19
10	<210> 58 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> oligonucleótido sintético	
20	<220> <221> misc_feature <222> (6) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
25	<220> <221> misc_feature <222> (8) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
30	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
35	<220> <221> misc_feature <222> (16)..(17) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
40	<400> 58 caaccnanca cnacannaa	19
45	<210> 59 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> oligonucleótido sintético	
55	<400> 59 uuccugucgu gcucgguug	19
60	<210> 60 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<220> <221> misc_feature <222> (5) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220> <221> misc_feature <222> (7)	

	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
5	<221> misc_feature	
	<222> (10)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (13)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<400> 60	
15	uuccngncgn gcncgguug	19
	<210> 61	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(2)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (5)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
35	<221> misc_feature	
	<222> (7)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
40	<221> misc_feature	
	<222> (10)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
45	<221> misc_feature	
	<222> (13)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<400> 61	
50	nncngncgn gcncgguug	19
	<210> 62	
	<211> 19	
	<212> ARN	
55	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
60	<400> 62	
	ccaacgacgc agagaaaca	19
	<210> 63	
	<211> 19	
65	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220> <223> oligonucleótido sintético	
5	<220> <221> misc_feature <222> (6) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
10	<220> <221> misc_feature <222> (9) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
15	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
20	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
25	<400> 63 ccaacnacnc ananaaaca	19
30	<210> 64 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> oligonucleótido sintético <400> 64 uguuucucug cgucguugg	19
40	<210> 65 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> oligonucleótido sintético	
50	<220> <221> misc_feature <222> (4) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
55	<220> <221> misc_feature <222> (9) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
60	<220> <221> misc_feature <222> (13) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
65	<220> <221> misc_feature <222> (16) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	

	<400> 65 ugunucucng cgnocnugg	19
5	<210> 66 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 66 actgcaagac atagaaata	19
15	<210> 67 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido sintético	
25	<220> <221> misc_feature <222> (4) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
30	<220> <221> misc_feature <222> (8) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
35	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
40	<400> 67 actncaanac atanaaata	19
45	<210> 68 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
50	<220> <221> misc_feature <222> (2) <223> n indica citosina modificada con F	
55	<220> <221> misc_feature <222> (5) <223> n indica citosina modificada con F	
60	<220> <221> misc_feature <222> (10) <223> n indica citosina modificada con F	
65	<400> 68 antgnaagan atagaaata	19

5	<210> 69 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
10	<400> 69 uauuucuaug ucuugcagu	19
15	<210> 70 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
20	<220> <221> misc_feature <222> (3) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
25	<220> <221> misc_feature <222> (5) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
30	<220> <221> misc_feature <222> (11) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
35	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
40	<400> 70 uanuncuaug ncungcagu	19
45	<210> 71 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> oligonucleótido sintético	
55	<220> <221> misc_feature <222> (10) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
60	<220> <221> misc_feature <222> (15) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
65	<220> <221> misc_feature <222> (18) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<400> 71	

	uauuucuaun ucuuncanu	19
5	<210> 72 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido sintético <400> 72 gtatattgca agacagtat 19	
15	<210> 73 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido sintético	
25	<220> <221> misc_feature <222> (1) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
30	<220> <221> misc_feature <222> (8) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
35	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
40	<220> <221> misc_feature <222> (16) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
45	<400> 73 ntatattnca anacantat	19
50	<210> 74 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido sintético <220> <221> misc_feature <222> (9) <223> n indica citosina modificada con F	
60	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica citosina modificada con F	
65	<400> 74 gtatattgna aganagtat	19
	<210> 75	

	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 75	
10	auacugucuu gcaauauac	19
	<210> 76	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<220>	
20	<221> misc_feature	
	<222> (2)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<222> (5)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (15)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<220>	
35	<221> misc_feature	
	<222> (17)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
	<400> 76	
40	anacngucuu gcaananac	19
	<210> 77	
	<211> 19	
	<212> ARN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (6)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
60	<400> 77	
	auacunucuu ncaauauac	19
	<210> 78	
	<211> 19	
65	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220> <223> oligonucleótido sintético	
5	<400> 78 gcaagacagt attggaact	19
10	<210> 79 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> oligonucleótido sintético	
20	<220> <221> misc_feature <222> (5) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
25	<220> <221> misc_feature <222> (9) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
30	<220> <221> misc_feature <222> (14)..(15) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<400> 79 gcaanacant attnnaact	19
35	<210> 80 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido sintético	
45	<220> <221> misc_feature <222> (2) <223> n indica citosina modificada con F	
50	<220> <221> misc_feature <222> (7) <223> n indica citosina modificada con F	
55	<220> <221> misc_feature <222> (18) <223> n indica citosina modificada con F	
60	<400> 80 gnaaganagt attggaant	19
	<210> 81 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> oligonucleótido sintético	

	<400> 81 aguuccaaua cugucuugc	19
5	<210> 82 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido sintético	
15	<220> <221> misc_feature <222> (3) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
20	<220> <221> misc_feature <222> (9) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
25	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
30	<400> 82 agnuccaana cugncuugc	19
35	<210> 83 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido sintético	
45	<220> <221> misc_feature <222> (2) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
50	<220> <221> misc_feature <222> (13) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
55	<220> <221> misc_feature <222> (18) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
60	<400> 83 anuuccaana cugucuunc	19
65	<210> 84 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 84 attggaactt acagaggta	19

5	<210> 85 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
10	<220> <221> misc_feature <222> (5) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
15	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
20	<220> <221> misc_feature <222> (16).. (17) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
25	<400> 85 attgnaactt acananta	19
30	<210> 86 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
35	<220> <221> misc_feature <222> (8) <223> n indica citosina modificada con F	
40	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica citosina modificada con F	
45	<400> 86 attggaantt anaggta	19
50	<210> 87 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial <220> <223> oligonucleótido sintético	
55	<400> 87 uaccucugua aguuccaau	19
60	<210> 88 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> oligonucleótido sintético	

5	<220> <221> misc_feature <222> (5) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
10	<220> <221> misc_feature <222> (7) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
15	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(14) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
20	<400> 88 uaccncngua agnnccaaau	19
25	<210> 89 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> oligonucleótido sintético	
35	<220> <221> misc_feature <222> (8) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
40	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
45	<400> 89 uaccucunua anuuccaaau	19
50	<210> 90 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido sintético	
60	<400> 90 ctccaacgac gcagagaaa	19
65	<210> 91 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<220> <221> misc_feature <222> (8) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220> <221> misc_feature	

	<222> (11) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
5	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
10	<220> <221> misc_feature <222> (16) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
15	<400> 91 ctccaacnac ncananaaa	19
20	<210> 92 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido sintético	
30	<220> <221> misc_feature <222> (3) <223> n indica citosina modificada con F	
35	<220> <221> misc_feature <222> (7) <223> n indica citosina modificada con F	
40	<220> <221> misc_feature <222> (10) <223> n indica citosina modificada con F	
45	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica citosina modificada con F	
50	<400> 92 ctncaangan gnagagaaa	19
55	<210> 93 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> oligonucleótido sintético	
65	<400> 93 uuucucugcg ucguuggag	19
	<210> 94 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	

5	<220> <221> misc_feature <222> (2) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
10	<220> <221> misc_feature <222> (5) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
15	<220> <221> misc_feature <222> (11) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
20	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
25	<400> 94 ununcugcg ncnuggag	19
30	<210> 95 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> oligonucleótido sintético	
40	<220> <221> misc_feature <222> (8) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
45	<220> <221> misc_feature <222> (10) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
50	<220> <221> misc_feature <222> (13) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
55	<220> <221> misc_feature <222> (17) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
60	<400> 95 uuucucuncn ucnuugnag	19
65	<210> 96 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 96 acgcagagaa acacaagta	19
	<210> 97	

	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (3)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (6)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
20	<221> misc_feature	
	<222> (8)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<222> (17)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<400> 97	
30	acncananaa acacaanta	19
	<210> 98	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<220>	
40	<221> misc_feature	
	<222> (2)	
	<223> n indica citosina modificada con F	
	<220>	
45	<221> misc_feature	
	<222> (4)	
	<223> n indica citosina modificada con F	
	<220>	
50	<221> misc_feature	
	<222> (12)	
	<223> n indica citosina modificada con F	
	<220>	
55	<221> misc_feature	
	<222> (14)	
	<223> n indica citosina modificada con F	
	<400> 98	
60	angnagagaa ananaagta	19
	<210> 99	
	<211> 19	
	<212> ARN	
65	<213> Secuencia Artificial	

	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
5	<400> 99 uacuuuguguu ucucugcgu	19
	<210> 100	
	<211> 19	
10	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (7)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (15)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
35	<400> 100 uacungnguu ncucngcgu	19
	<210> 101	
	<211> 19	
40	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
45	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (6)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (8)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (18)	
	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
65	<400> 101	

	uacuuunuuu ucucuncnu	19
5	<210> 102 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 102 gcagagaaac acaagtata	19
15	<210> 103 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido sintético	
25	<220> <221> misc_feature <222> (1) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
30	<220> <221> misc_feature <222> (4) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
35	<220> <221> misc_feature <222> (6) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
40	<220> <221> misc_feature <222> (15) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
45	<400> 103 ncananaaac acaantata	19
50	<210> 104 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido sintético	
60	<220> <221> misc_feature <222> (2) <223> n indica citosina modificada con F	
65	<220> <221> misc_feature <222> (10) <223> n indica citosina modificada con F	
	<220> <221> misc_feature <222> (12) <223> n indica citosina modificada con F	

	<400> 104 gnagagaaan anaagtata	19
5	<210> 105 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido sintético	
15	<400> 105 uauacuugug uuucucugc	19
20	<210> 106 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <221> misc_feature <222> (3) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
30	<220> <221> misc_feature <222> (11) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
35	<220> <221> misc_feature <222> (15) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
40	<220> <221> misc_feature <222> (17) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
45	<400> 106 uanacuugug nuucncngc	19
50	<210> 107 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido sintético	
60	<220> <221> misc_feature <222> (8) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
65	<220> <221> misc_feature	

	<222> (18)	
	<223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
5	<400> 107 uauacuunun uuucucunc	19
	<210> 108	
	<211> 19	
10	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
15	<400> 108 cagagaaaca caagtataa	19
	<210> 109	
	<211> 19	
20	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3)	
30	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)	
35	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)	
40	<223> n indica guanina modificada con o-metilo	
	<400> 109 cananaaaca caantataa	19
	<210> 110	
45	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
50	<223> oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)	
55	<223> n indica citosina modificada con F	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (9)	
60	<223> n indica citosina modificada con F	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)	
65	<223> n indica citosina modificada con F	

	<400> 110 nagagaaana naagtataa	19
5	<210> 111 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido sintético	
	<400> 111 uuauacuugu guuucucug	19
15	<210> 112 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido sintético	
25	<220> <221> misc_feature <222> (2) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
30	<220> <221> misc_feature <222> (8) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
35	<220> <221> misc_feature <222> (14) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
40	<220> <221> misc_feature <222> (18) <223> n indica uracilo modificado con o-metilo	
45	<400> 112 unauacungu guuncucng	19
50	<210> 113 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> oligonucleótido sintético	
55	<220> <221> misc_feature <222> (9) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
60	<220> <221> misc_feature <222> (11) <223> n indica guanina modificada con o-metilo	
65	<220> <221> misc_feature <222> (19)	

<223> n indica guanina modificada con o-metilo

<400> 113

uuauacuunu nuuucucun

19

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para usar en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada a la infección por el VPH (virus del papiloma humano), comprendiendo la composición, como principio activo, un par de oligonucleótidos de SEQ ID NO: 12 y 15.
- 10 2. Una composición para usar en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada a la infección por el VPH (virus del papiloma humano), comprendiendo la composición, como principio activo, un grupo de oligonucleótidos de SEQ ID NO: 2, 4, 8, 9, 12 y 15.
3. La composición para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde, la enfermedad asociada a la infección por el VPH se selecciona del grupo que consiste en condiloma acuminado, inflamación de la vagina, inflamación pélvica y un cáncer.
- 15 4. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en donde, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cuello uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, cáncer de ano, cáncer de pene, cáncer de amígdalas, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de cabeza y cuello y adenocarcinoma de pulmón.

Fig. 1a

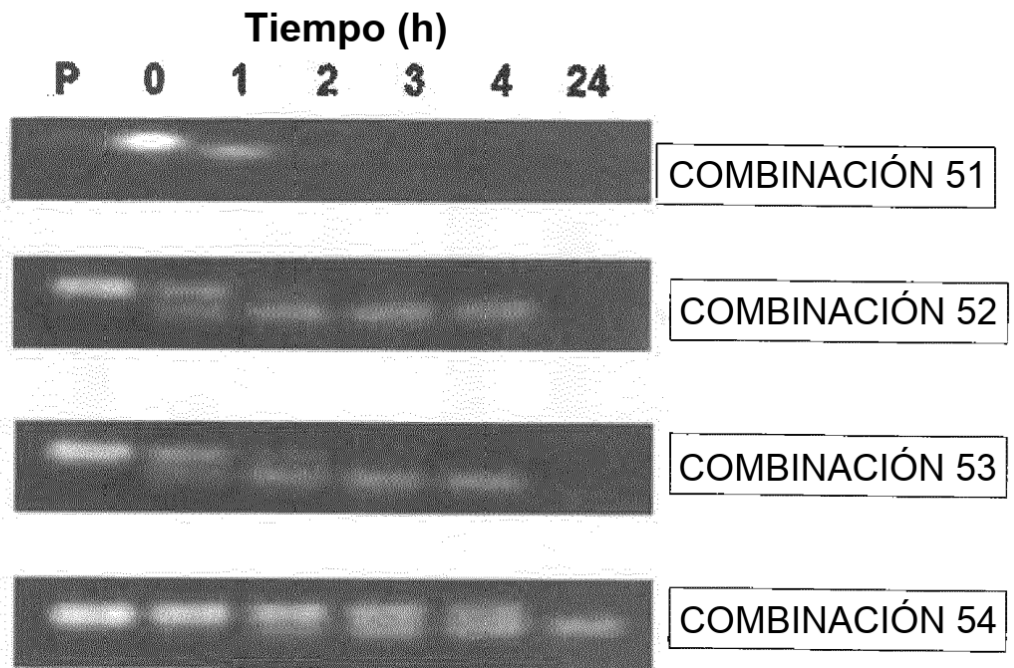


Fig. 1b

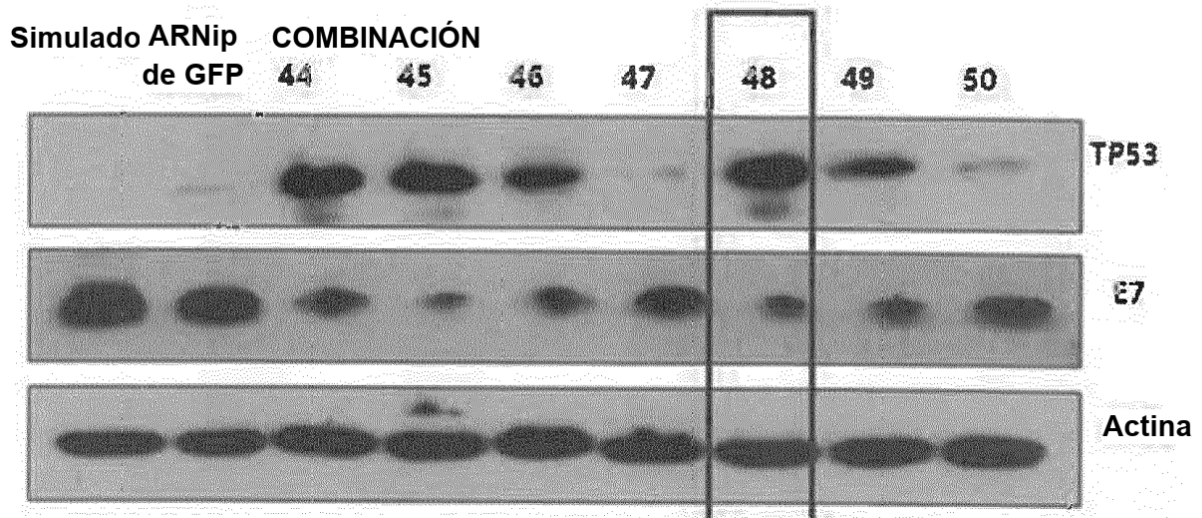


Fig. 1c

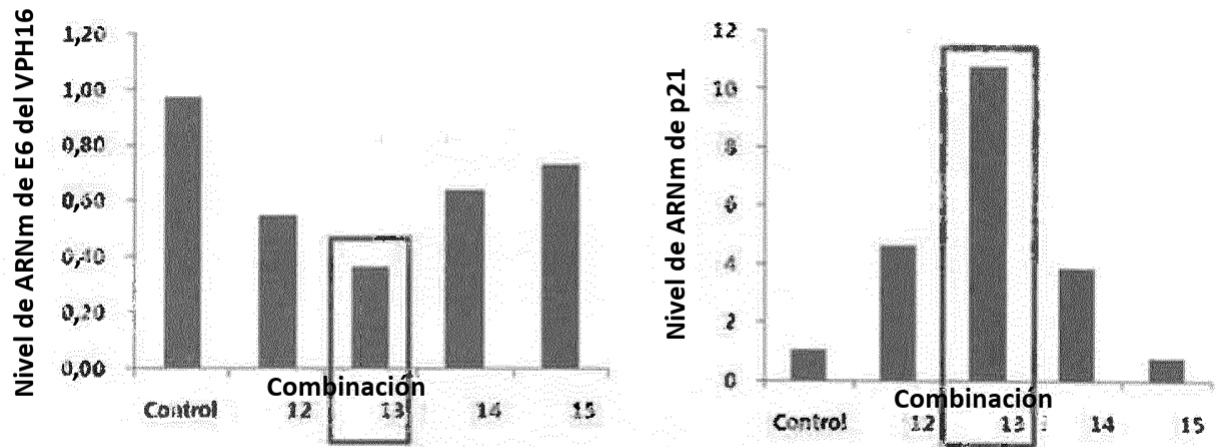


Fig. 2a

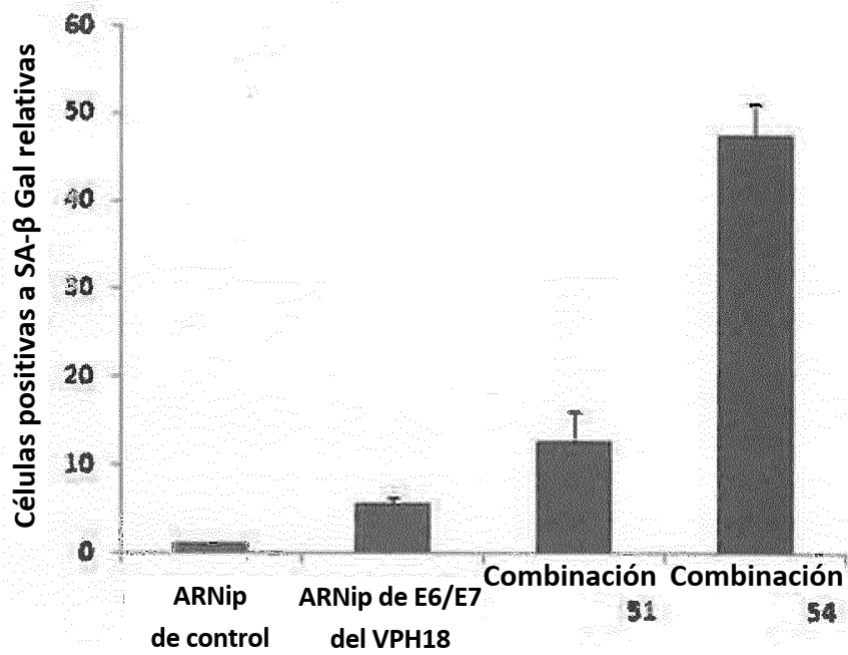


Fig. 2b

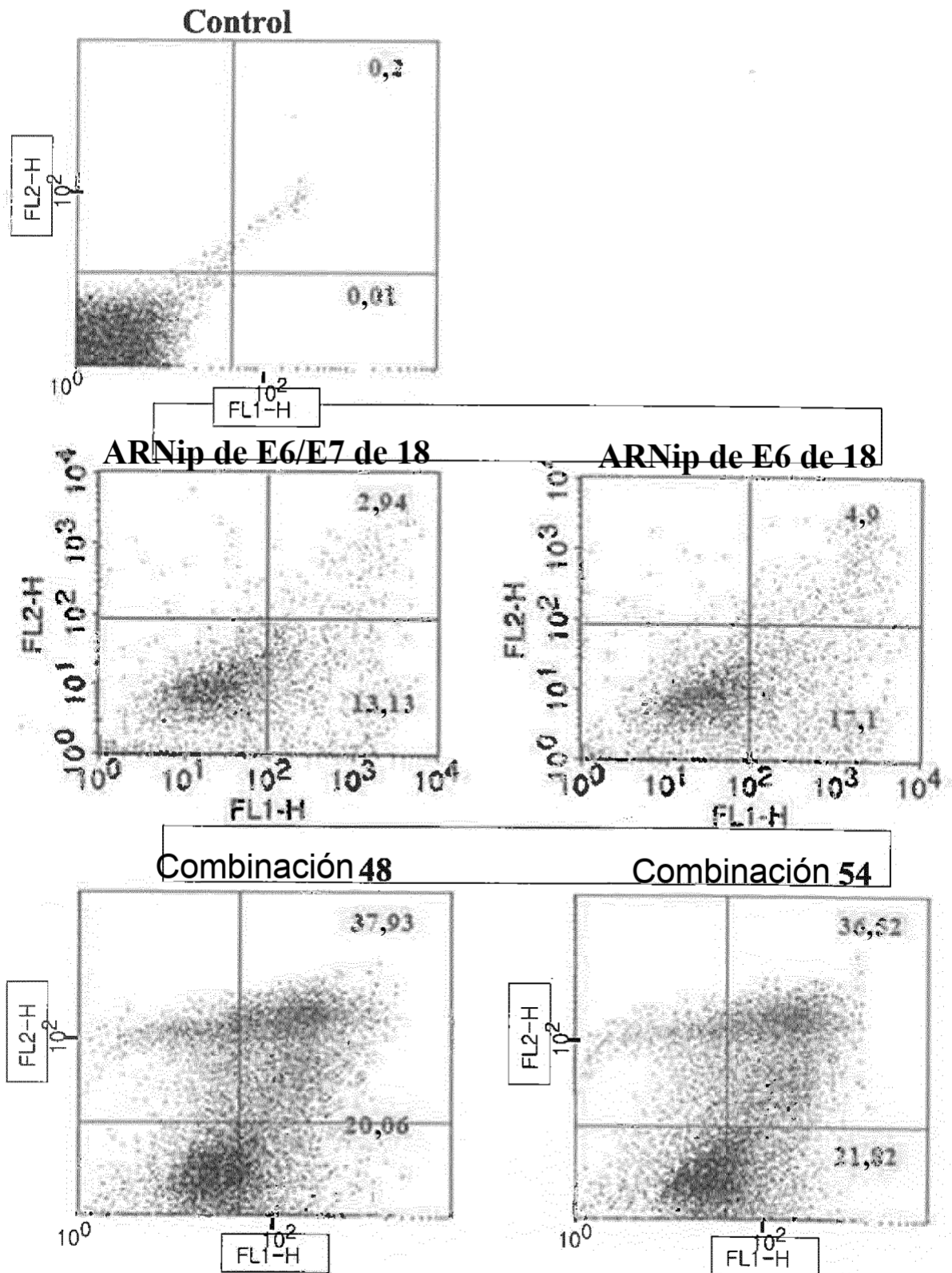


Fig. 3a

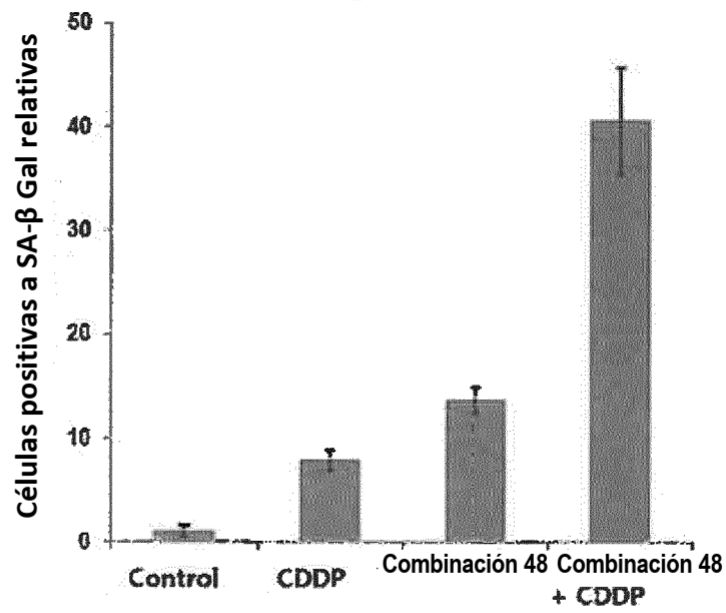


Fig. 3b

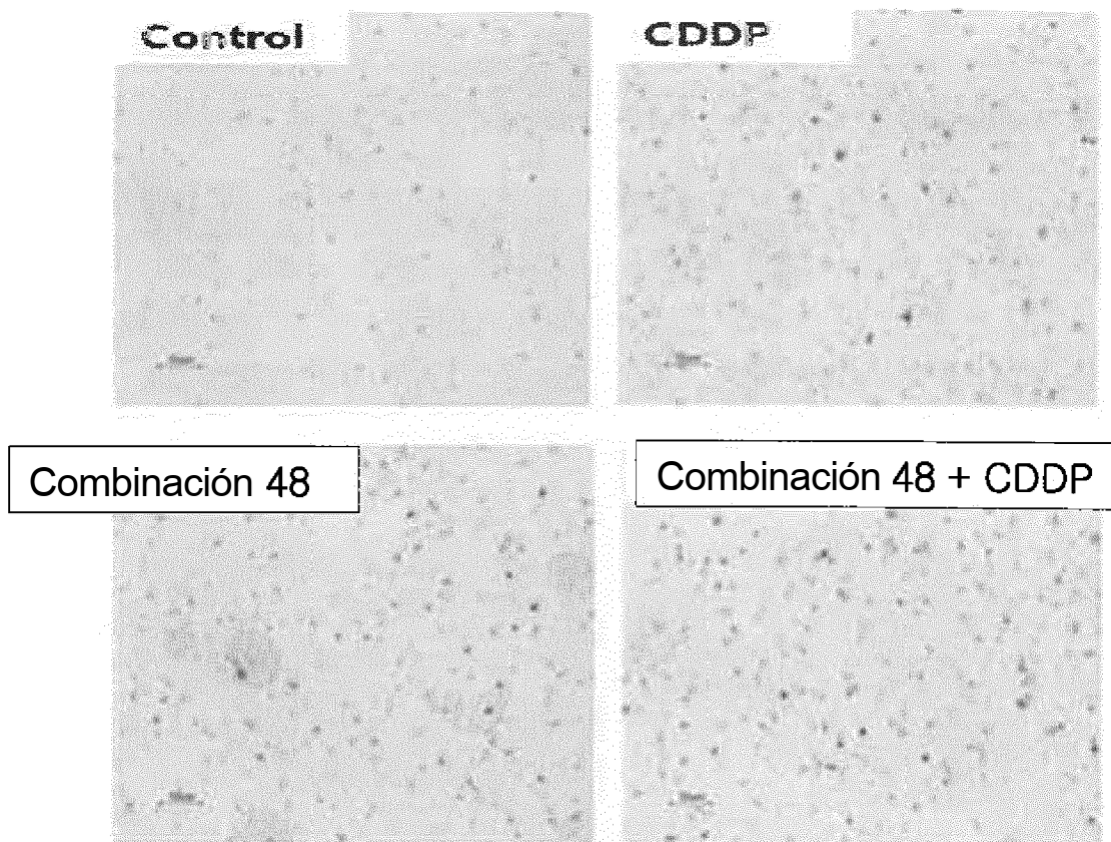
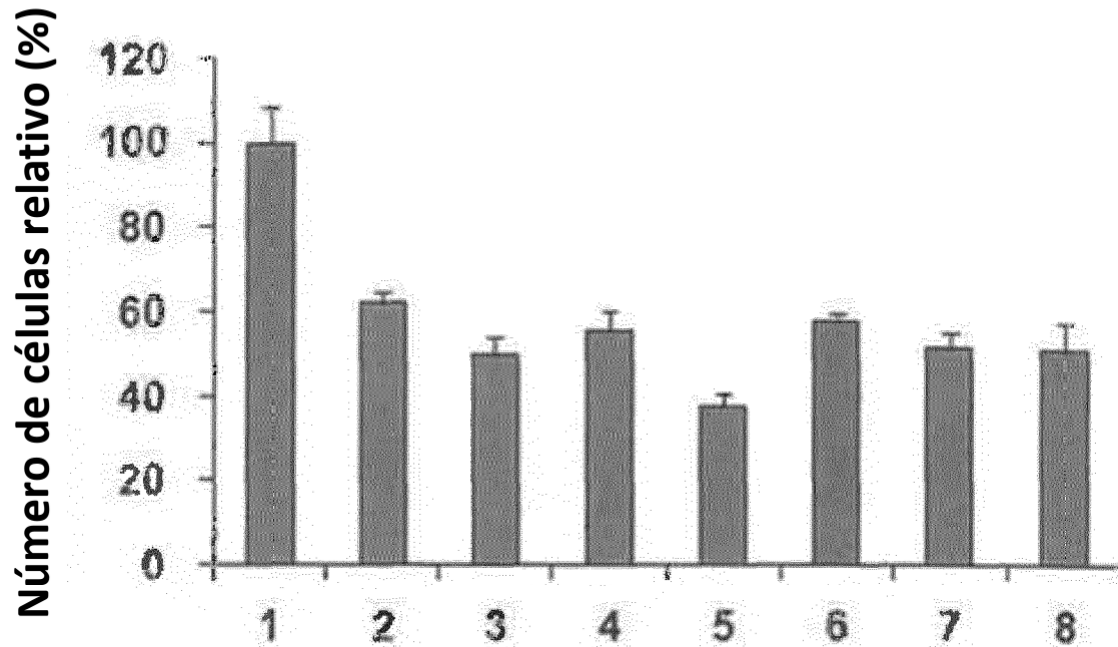


Fig. 4a

Carril	NOMBRE DEL MATERIAL CANDIDATO
1	Control
2	Combinación 2
3	Combinación 9
4	Combinación 13
5	Combinación 2 + Combinación 9
6	Combinación 2 + Combinación 13
7	Combinación 9 + Combinación 13
8	Combinación 2 + Combinación 9 + Combinación 13

Fig. 4b

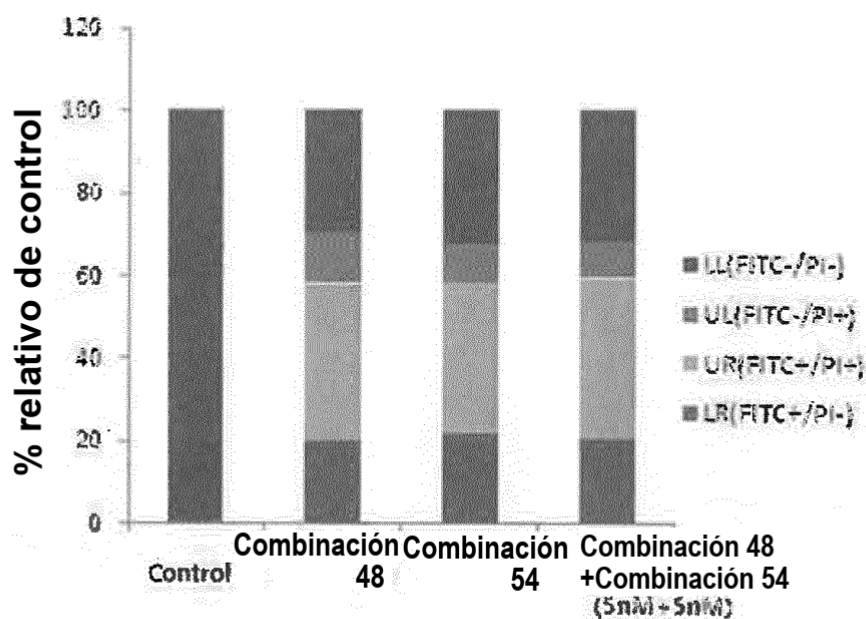
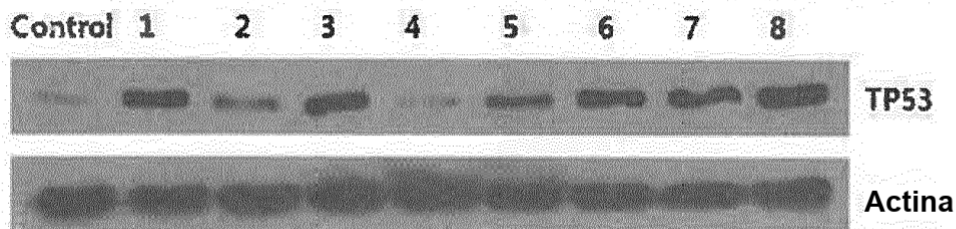


Fig. 4c



C : Control

1 : Combinación 2 (20nM) + CDDP

2 : Combinación 9 (20nM) + CDDP

3 : Combinación 13 (20nM) + CDDP

4 : CDDP

5 : Combinación 2 (10nM) + Combinación 9 (10nM) + CDDP

6 : Combinación 2 (10nM) + Combinación 13 (10nM) + CDDP

7 : Combinación 9 (10nM) + Combinación 13 (10nM) + CDDP

8 : Combinación 2 (7nM) + Combinación 9 (7nM) + Combinación 13 (7nM) + CDDP

Fig. 5a

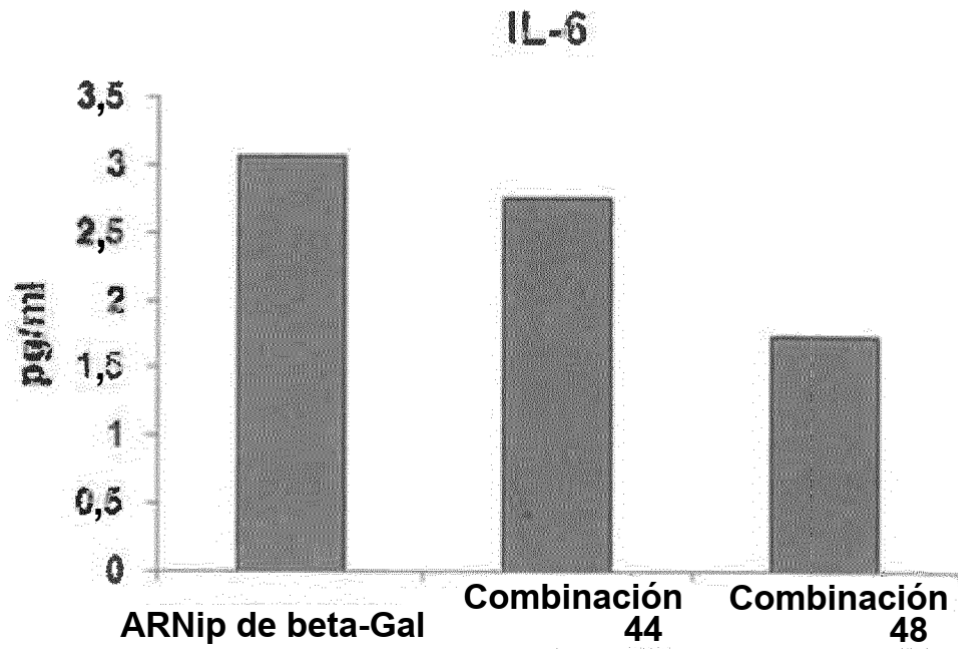


Fig. 5b

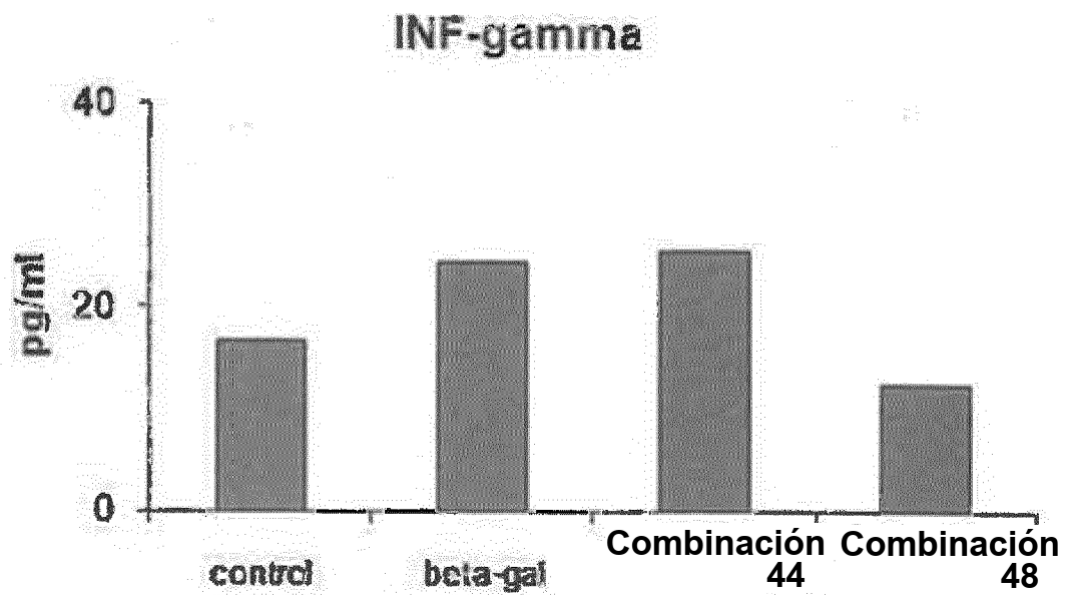
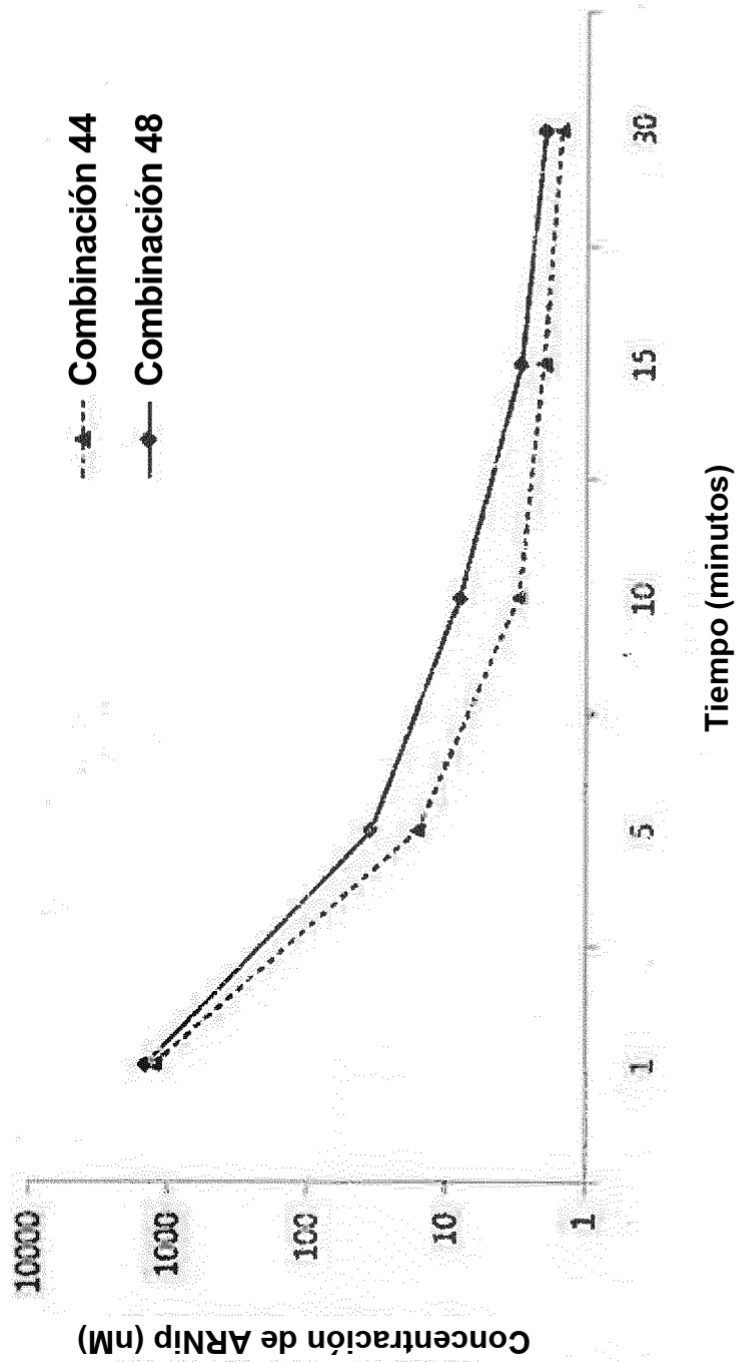
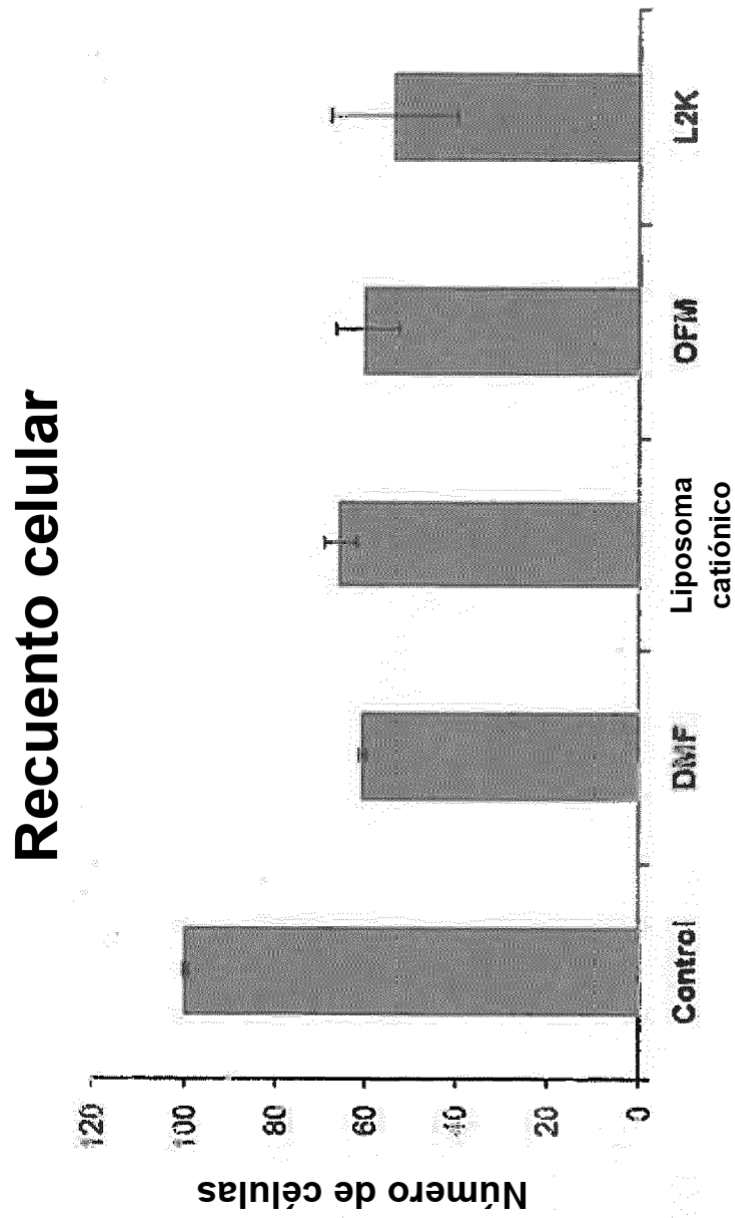


Fig. 6



SEMIVIDA	Tiempo (minutos)
Combinación 44	3,9
Combinación 48	8,5

Fig. 7



DMF: Dharmafect, Dharmacon
 OFM: Oligofectamina, Invitrogen
 L2K: Lipofectamina 2000, Invitrogen

Fig. 8a

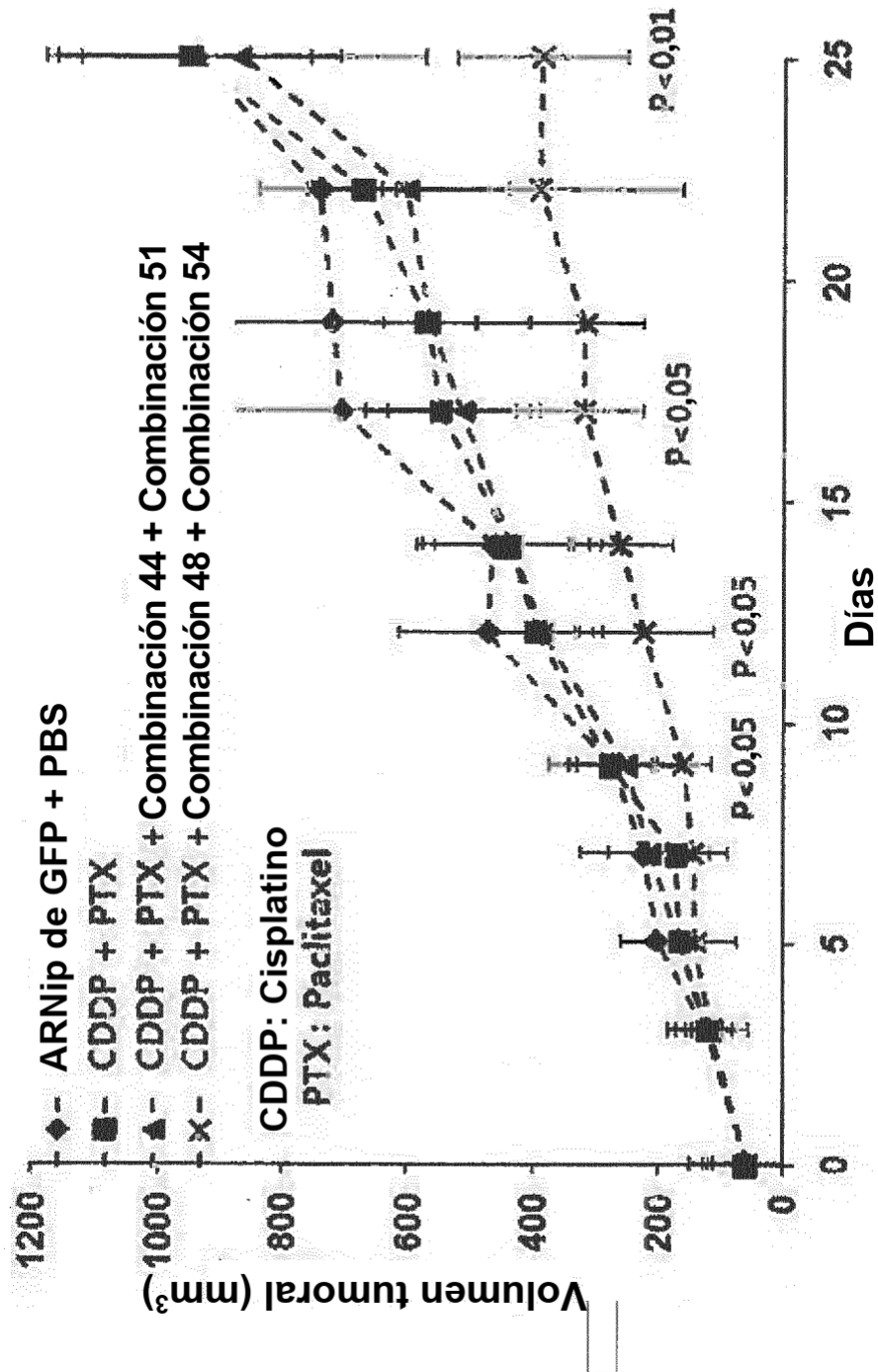


Fig. 8b



CDDP + PTX



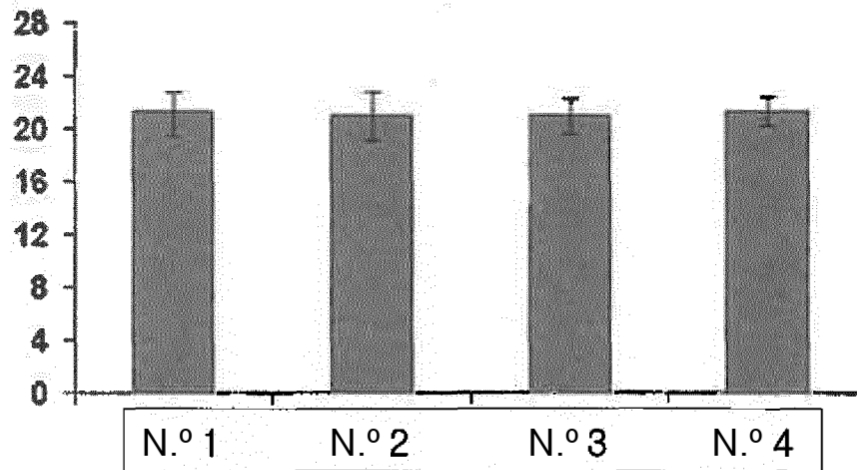
CDDP + PTX

+Combinación 48 + Combinación 54

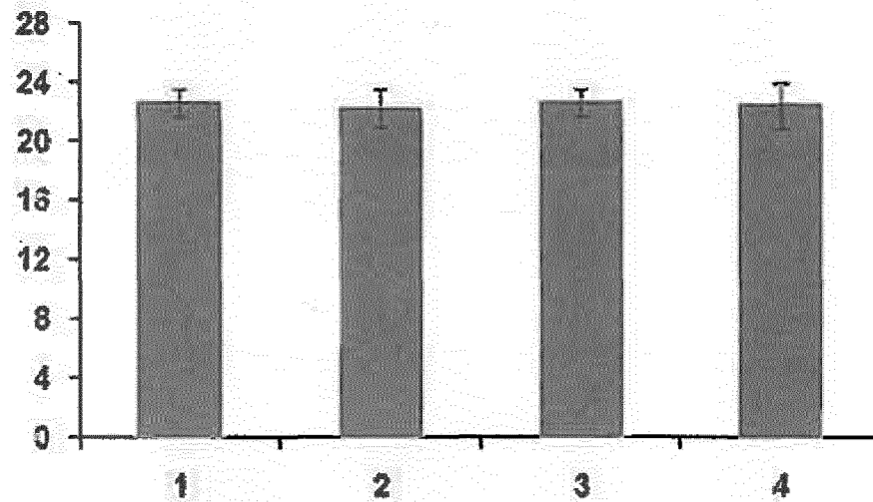
Fig. 8c

Peso corporal

Día 9



Día 28



1 : ARNip de GFP + PBS

2 : CDDP + PTX

3 : CDDP + PTX +

Combinación 44 + Combinación 51

4 : CDDP + PTX +

Combinación 48 + Combinación 54