

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 009**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2008 E 10188619 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 2316943**

54 Título: **ARNds para tratar infecciones virales**

30 Prioridad:

05.07.2007 US 948100 P

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

05.11.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LABOW, MARK ARON;
GAITHER, LARRY ALEXANDER y
BORWSKI, JASON**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 428 009 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

ARNds para tratar infecciones virales

Antecedentes de la Invención

5 Los virus de cadena de ARN positiva de ARN polimerasa dependientes de ARN constituyen una superfamilia grande de virus de muchas subfamilias distintas. Estos virus cubren tanto el reino vegetal como el animal causando patologías que varían desde fenotipos moderados hasta enfermedades debilitantes severas. La composición del supergrupo de polimerasa de virus de ARN de cadena positiva es como sigue. I. Picorna (HAV, polio, Coxsackie), noda, como, nepo, poty, bymo, sobemovirus y loteovirus (amarillos, amarillo enano, y virus de hoja enrollada). II. Carmo, tombus, 10 diantovirus, pestivirus, toga, eco, dengue, virus de la hepatitis C, flavivirus. III. Tobamo, tobra, hordei, tricoma, alfa, rubi, furovirus, virus de la hepatitis E, potex, carlatimovirus y virus de la mancha de hoja clorótica de la manzana. Los genomas de los virus de cadena positiva de ARN codifican ARN polimerasas dependientes de ARN que es la única proteína viral que contiene motivos conservados a lo largo de esta clase de virus. Esta conservación es significativa puesto que esta clase de virus contiene variabilidad filogenética, con lo que se puede predecir que hay muchas formas en los cuales los virus infectan las células y mantienen una replicación estable. Además de las muchas diferencias, 15 todos los virus en esta clase dependen de una etapa fundamental de la transcripción de la cadena de ARN positiva dependiente de ARN. Puesto que esta etapa es esencial para el ciclo vital del virus este virus usa muchas proteínas del anfitrión para iniciar y mantener la actividad de la ARN polimerasa dependiente de ARN. Sin la interacción de los factores del anfitrión los virus serían incapaces de sobrevivir. Por lo tanto una intervención terapéutica posible para inhibir la infección viral consistiría en bloquear la interacción anfitrión virus. Si los factores del anfitrión esencial para el virus pero no esencial para el anfitrión pueden ser manipulados, entonces podría alcanzarse la capacidad para bloquear la infección viral. Apuntar a proteínas del anfitrión ha demostrado ser una metodología eficaz para perturbar la infección viral y la replicación de VIH, HCV, viruela, etc.

25 El significado de los virus de ARN de cadena positiva es el impacto sobre la salud y viabilidad humanas. Varios virus de cadena positiva de ARN infecta en humanos y en muchos casos lleva a enfermedades y/o morbilidades debilitantes. Varios virus con una carga particular sobre la salud humana son el virus del dengue (fiebre hemorrágica), HCV (enfermedad crónica del hígado, fallo, fibrosis y cáncer de hígado) y HEV (fallo hepático fulminante). Las enfermedades del hígado y la sangre causadas por estos virus producen millones de muertes en el mundo y cuesta a la industria del cuidado de la salud billones de dólares en enfermedades relacionadas con el hígado. El significado del hallazgo de terapias para controlar la infección viral es grande y mejoraría la salud humana alrededor del mundo.

30 Como tal existe una necesidad no satisfecha por un tratamiento efectivo de infecciones causadas por HCV y otros virus de ARN de cadena positiva (listados anteriormente).

Esta especificación también se relaciona con moléculas de ARN de cadena doble (dsARN). Las dsARN han demostrado bloquear la expresión genética en un mecanismo regulador altamente conservado conocido como interferencia por ARN (ARNi). La WO 99/32b19 (Fire et al.) divulga el uso de dsARN de al menos 25 nucleótidos de longitud para inhibir la expresión de genes en *C. elegans*. El dsARN también ha demostrado degradar ARN objetivo en otros organismos incluyendo plantas (véase, por ejemplo, WO 99/53050, Waterhouse et al.; y WO 99/61631, Heifetz et al.), *Drosophila* (véase, e.g., Yang, D., et al *Curr. Biol.* (2000) 10: 1191-1200), and mammals (véase WO 00/44895, Limmer; y DE 101 00 586.5, Kreutzer et al.). Este mecanismo natural se ha convertido ahora en el foco del desarrollo de una nueva clase de agentes farmacéuticos para tratar trastornos que son causados por la regulación aberrante o indeseada de un gen tal como la divulgada en WO 2005 119262.

Las publicaciones PCT WO 20030 16572, WO 2003070750, WO 2005028650 y WO 2007001928 divulgan esfuerzos previos para desarrollar medicamentos de ARNi basados en ácidos nucleicos para el tratamiento de una enfermedad causada por infecciones de HCV. La publicación PCT WO 2006074346 divulga esfuerzos previos para tratar la infección por RSV utilizando medicamentos de ARNi.

45 A pesar de los significativos avances en los campos del ARNi y los avances en el tratamiento de procesos patológicos mediados por infecciones virales, sigue habiendo una necesidad por agentes que inhiban la progresión de la infección viral y que puedan tratar enfermedades asociadas con infecciones virales. La presente invención divulga compuestos, composiciones y métodos para satisfacer esta necesidad, y proveer otros beneficios también.

Resumen de la invención

50 La invención provee una molécula de ácido ribonucleico de cadena doble, que comprende una primera secuencia de cadena de SEQ ID NO 210 y una segunda secuencia de cadena de SEQ ID NO 314.

Adicionalmente, la invención provee una molécula de ácido ribonucleico de cadena doble, que comprende una secuencia de cadena antisentido de SEQ ID NO 314 y una secuencia de cadena en sentido de SEQ ID NO 210.

La molécula de ácido nucleico de doble cadena puede comprender al menos un nucleótido modificado químicamente.

5 El nucleótido modificado puede ser escogido del grupo consistente de: Un nucleótido modificado 2'-O-metilo; un nucleótido que comprende un grupo 5'-fósforotiorato; un nucleótido terminal enlazado a un derivado colesteroil o un grupo de bisdecilamida del ácido dodecanoico; un nucleótido 2'-desoxi-2'-fluoro modificado; un nucleótido 2'-desoxi modificado; un nucleótido asegurado; un nucleótido abásico; un nucleótido 2'-amino modificado; un nucleótido 2'-alquilo modificado; un morfolino nucleótido; un fosforamidato; y un nucleótido que comprende una base no natural.

En una realización la molécula por contacto con una célula que expresa gen PI4KA, inhibe la expresión de dicho gen.

10 La invención también provee una célula que comprende la molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de acuerdo con las realizaciones.

La invención provee una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido ribonucleico de doble cadena de acuerdo con las realizaciones de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 La composición farmacéutica puede comprender un liposoma completamente encapsulado, un complejo lipídico y un polímero. La invención también provee un método in vitro para inhibir la expresión del gen PI4KA en una célula, comprendiendo el método las etapas de:

a. introducir en la célula una molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de acuerdo con las realizaciones de la invención,

20 b. mantener la célula producida en la etapa a durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcripto de ARNn del gen PI4KA, inhibiendo por lo tanto la expresión del gen PI4KA en la célula.

Adicionalmente, la invención provee una molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de acuerdo con realizaciones de la invención para uso como medicamento.

La invención provee el uso de una molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de acuerdo con realizaciones de la invención para la manufactura de un medicamento.

25 La invención también provee la molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de acuerdo con realizaciones de la invención para uso como medicamento contra infecciones con virus de ARN de cadena positiva, en donde el virus de ARN de cadena positiva es el virus de la hepatitis C, (HCV).

30 Adicionalmente, la invención provee el uso de la molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de acuerdo con realizaciones de la invención para la manufactura de un medicamento contra infección con virus de ARN de cadena positiva, en donde el virus de ARN de cadena positiva es el virus de la hepatitis C (HCV).

Resumen de la divulgación

35 La divulgación provee composiciones y métodos para tratar la infección por virus de ARN de cadena positiva (tales como HCV, HPV, dengue y polio), reduciendo el nivel o actividad del factor anfitrión humano fosfatidilinositol 4-quinasa, catalítico, beta polipéptido (PIK4CB; NM_002651), y fosfatidilinositol 4-quinasa, catalítico, alfa polipéptido (PIK4CA; NM_002650) en células donde tales virus pueden replicarse, tal como el hígado.

Se divulga aquí que la proliferación de virus de ARN de cadena positiva que puede ser inhibida utilizando ácido ribonucleico de cadena doble (ARNds) para silenciar la expresión del gen de la célula anfitriona humana PI4CB, y/o PIK4CA requeridos para su proliferación.

La divulgación provee realizaciones múltiples, incluyendo en particular:

40 Un ácido ribonucleico de cadena doble (ARNds) para inhibir la expresión del nivel de actividad de fosfatidilinositol 4-quinasa (PI4K) en una célula, en donde dicho ARNds comprende al menos dos secuencias que son complementarias una con otra y en donde una cadena en sentido comprende una primera secuencia y una cadena antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad la cual es sustancialmente complementaria a al menos una parte del PI4K que codifica ARNm, en donde dicha región de complementariedad es menor de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNds, por contacto con una célula que expresa dicho gen

45

PI4K, inhibe la expresión de dicho gen PI4K. Tal ARNs puede tener modificaciones químicas, y puede ser conjugado con otras unidades estructurales. Además, tal ARNs puede ser provisto en una composición farmacéutica.

5 El método realizado es un método para inhibir la expresión del gen polipéptido beta catalítico de fosfatidilinositol 4-quinasa (PIK4CB) o el gen polipéptido beta, fosfatidilinositol 4-quinasa (PIK4CA) en una célula, comprendiendo el método:

(a) introducir en la célula ácido ribonucleico de cadena doble (ARNds), en donde el ARNs comprende al menos dos secuencias que son complementarias una con otra y en donde la cadena en sentido comprende una primera secuencia y una cadena antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad la cual es sustancialmente complementaria a al menos una parte del ARNm que codifica PIK4CB o PIK4CA, y en donde dicha región de complementariedad es menor de 30 nucleótidos en longitud; y

(b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante el tiempo suficiente para obtener la degradación del transcripto de ARNm del gen PIK4CB (o PIK4CA, según se seleccione), inhibiendo por lo tanto la expresión o actividad de PIK4CB (o PIK4CA, según se seleccione) en la célula.

15 Alternativamente, la divulgación realiza un método para tratar un proceso patológico, mediado por una infección viral de ARN de cadena positiva que comprende la administración a un paciente que requiere tratamiento, de un ARNs de la invención. El virus de ARN de cadena positiva puede ser seleccionado de entre virus de hepatitis C (HCV), virus de papiloma humano (HPV) y virus del dengue.

Alternativas incluyen un vector para inhibir la expresión de PIK4CB o PIK4CA en una célula; y células que comprenden tales vectores.

20 Una realización alternativa incluye un método para tratar una infección por HCV que comprende administrar a un paciente que requiere tal tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un ARNs de la invención.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1. Estructura de los constructos de HCV. A. El genoma completo de HCV. B. El replicón subgenómico de HCV, utilizado para las células del Clon A (replicón subgenómico). Las proteínas estructurales se reemplazan con un gen de resistencia a la neomicina y un reportador de luciferasa de luciérnaga corriente debajo de la 5' UTR. C. El constructo reportador con las proteínas HCV retiradas, utilizado para la célula Clon Ar (células que carecen del replicón subgenómico).

30 Figura 2. Validación del fenotipo de los aciertos de ARNs. Aciertos de la selección de ARNs del quinoma de gran escala reanalizados. A. Resultados de la prueba de ARNs como dúplex individuales PIK4CA1-PIK4CA4 (columna 1-4) como un PIK4CA Smart Pool (col. 5), como dúplex individuales PIK4CB1-PIK4CB4 (col. 6-9) o como un PIK4CB Smart Pool (Col. 10). Se miden los resultados con respecto a GAPDH (control; columna 11), ensayo llevado a cabo usando 25 nM de ARNs por pozo utilizando células de Clon A; actividad Bright-Glo medida a 72 horas posttransfección, GAPDH que apunta a ARNs (columna 11) fue utilizado como control negativo y el pGL2 que apunta a ARNs (columna 12) fue el control positivo.

35 Figura 3. **RTPCR of PIK4CA and PIK4CB.** Se transfectaron células de replicón Huh7 con ARNs durante 72 horas, se aisló el ARNm y el RTPCR fue analizado con Taqman. Los resultados fueron normalizados para células GAPDH transfectadas. A. Transfección de ARNs de PIK4CA, Taq man RTPCR usando cebadores PIK4CA. B. Transfección de ARNs de PIK4CA, Taq man RTPCR usando cebadores PIK4CB. C. Transfección de ARNs de P1K4CB, Taq man RTPCR usando cebadores PIK4CB. D. Transfección de ARNs de P1K4CB, Taq man RTPCR usando cebadores PIK4CA. GOI = Gen de interés. PIK4CAsp = P1K4CA Smart Pool; PIK4CBsp = PIK4CB Smart Pool.

Figura 4. A) Expresión de ARNm de PIK4CA (barras claras) o PIK4CB (barras oscuras) después de cerramiento por el PIK4CA indicado que apunta a ARNs (25 nM). B) Expresión de ARNm de PIK4CA (barras claras) o PIK4CB (barras oscuras) después del tratamiento por el PIK4CB que apunta a ARNs indicado (25 nM).

45 Figura 5. Resultados de inmunoprecipitación Western que demuestran el nivel de expresión de proteínas de PI4KB, NS3 o actina (según se indique) después del tratamiento de ARNs de PI4KA (col 1 - col 3 corresponden a la Tabla 2; P14KA1; PIK4A2 y PIK4A3, respectivamente); o P14KB siRNA (col 4 - col 6 corresponden a la Tabla 1; P14KBI; PIK4B2 y PIK4B3, respectivamente). El tratamiento de ARNs GAPDH se muestra como un control.

50 Figura 6. Secuencias de ARNsh que apuntan a PIK4CA y PIK4CB. A) Los resultados del tratamiento de células del Clon A con el constructo de ARNsh indicado. Las barras claras indican la actividad de la luciferasa; las barras oscuras indican la viabilidad celular. Todos los resultados se comparan con las células de control tratadas con GAPDH: B) Efecto del

tratamiento con ARNsh indicado sobre la expresión de PI4KA (GFP normalizado); C) Efecto del tratamiento con ARNsh sobre la expresión de PI4KB (GFP normalizado); D) Resultados de inmunoprecipitación Western que demuestran el nivel de la expresión proteínica de PI4KB, NS3 o actina (según se indica) después del tratamiento con ARNsh que apunta a PI4KA (col 1 – col 5 corresponden a shA1-shA5, respectivamente); o PI4KB que apunta a ARNsh (col 6 – col 10 corresponden a shB1 – shB5, respectivamente). El tratamiento con ARNsh GFP se muestra como un control, todos los resultados se toman a 96 horas después del tratamiento con el ARNsh indicado; E) Efectos de la medición de inmunoprecipitación Western de shA2 y shB1 en la expresión proteínica, 3 semanas después de la transducción de RNash (control GFP).

Figura 7. Inhibición de la replicación de HCV (virus vivo). La dependencia en la dosis de la replicación de HCV por tratamiento mediante el ARNsi indicado. Las células se tratan antes de la infección por HCV con el ARNsi indicado contra PI4CA o PI4CB. A) 25 nM (barra gris); 1.5 nM (barra blanca); 0.1 nM (barra oscura). Los resultados se normalizan para la replicación de HCV por tratamiento con ARNsi de GAPDH. ARNsi renilla es control positivo. B) Expresión de ARNm objetivo en células infectadas.

Figura 8. Inhibición de la replicación de HCV (virus vivo). La dependencia en la dosis de la replicación de HCV por tratamiento con el ARNsi indicado. Las células se tratan después de la infección con HCV con el ARNsi indicado contra PIK4CA o PIK4CB. A) Efecto sobre la replicación viral 24 horas después del tratamiento con el ARNsi indicado (25nM). Barras oscuras –luciferasa viral (actividad); barras claras – viabilidad celular. Los resultados están normalizados a la replicación de HCV por tratamiento con ARNsi GAPDH. El ARNsi de renilla es un control positivo. B) Dependencia del tiempo de la replicación de HCV después de tratamiento con el ARNsi indicado. Barra oscura (primera) 24h; barra clara (segunda) 48h; barra blanca (tercera) 72h; barra gris (cuarta) - 96h.

Descripción detallada

La divulgación provee una solución al problema de tratar enfermedades asociadas con la infección por virus de ARN de cadena positiva (tales como HCV, HPV, dengue y polio) reduciendo el nivel del polipéptido beta (PIK4CB; NM_002651) catalítico de factor anfitrión humano de fosfatidilinositol 4-quinasa; o del alfa polipéptido (PIK4CA; NM_002650) catalítico de fosfatidilinositol 4-quinasa en células donde tales virus se replicarían. Se divulga aquí que la proliferación de virus de ARN de cadena positiva puede ser inhibida utilizando ácido nucleico de cadena doble (ARNds) para silenciar la expresión del gen PIK4CB, y/o PIK4CA de célula anfitriona humana requerido para su proliferación.

Además, se divulga aquí por primera vez que las modificaciones químicas seleccionadas de estos ARNds son realizaciones altamente preferidas que proveen sorprendentemente toxicidad reducida, inmunogenicidad reducida, comportamiento farmacológico mejorado y otros beneficios.

La divulgación provee ácido ribonucleico de cadena doble (ARNds), así como composiciones, composiciones farmacéuticas y métodos para inhibir la propagación de virus de ARN de cadena positiva en una célula o en un mamífero usando el ARNds. La invención también provee composiciones y métodos para tratar condiciones patológicas y enfermedades en un mamífero causadas por infección con virus de ARN de cadena positiva utilizando ARNds.

El ARNds de la divulgación comprende una cadena de ARN (la cadena antisentido) que tiene una región que tiene menos de 30 nucleótidos en longitud, generalmente de 19 – 24 nucleótidos de longitud, y es sustancialmente complementaria a al menos parte del producto genético (preARNm o ARNm maduro) como transcripto de la subunidad polipeptídica beta (PIK4CB; NM_002651, catalítica de fosfatidilinositol 4-quinasa y/o el alfa polipéptido PIK4Ca; NM_002650 catalítico humano de fosfatidilinositol 4-quinasa). El uso de estos ARNds permite la degradación o inactivación dirigidas de ARNm de genes que están implicados en la replicación y/o mantenimiento de una infección por ARN de cadena positiva en mamíferos. Utilizando ensayos basados en células y animales, los presentes inventores han demostrado que dosis bajas de estos ARNds pueden mediar específica y eficientemente el ARNi, dando como resultado una inhibición significativa de la replicación e infección. Así, los métodos y composiciones de la divulgación que comprenden estos ARNds son útiles para tratar procesos patológicos mediados por infección con virus de ARN de cadena positiva.

El polipéptido subunidad beta, catalítico, fosfatidilinositol 4-quinasa humano (PIK4CB; NM 002651; también algunas veces denominado P14KB; PIK4B; pi4K92; P14K-beta; P14K-BETA; P14KIIIbeta), y el alfa polipéptido catalítico humano de fosfatidilinositol 4-quinasa (PIK4CA; NM_002650; también a veces llamado P14KA; PIK4A; pi4K230; FLJ16556; y P14K-ALFA) son fosfatidilinositol 4-quinasa. La fosfatidilinositol 4-quinasa es conocida alternativamente como P14k, PI 4-quinasa o PIK4 en la literatura. Esta especificación utiliza tales términos de manera intercambiable a menos que el contexto indique una selección específica. Hay cuatro enzimas P14K en las células de mamífero que caen dentro de dos clases. La primera es de tipo III P14Ks, incluyendo PIK4CA y PIK4CB, conservados desde la levadura hasta el hombre. Los ortólogos de levadura Stt4p y Pik1p respectivamente son ambos genes esenciales sin función de superposición. Los tipos II P14Ks, P14KIia y P14KIiβ, distintas de las enzimas de la clase III, también tienen un homólogo en levaduras, el LSB6, el cual es un gen no esencial. El PIK4CB es el gen de mamíferos mejor caracterizado que está localizado en los Golgi, funciona en un complejo con el factor pequeño de GTPasa para ribosilación de ADP (ARF), y se cree que regula la secreción de Golgi a la membrana del plasma. Las enzimas clase II α, y β también han

demostrado estar involucradas en el tráfico Golgi/trans-Golgi. La clase III α isoforma parece jugar un papel en la membrana del plasma y ER pero no en Golgi.

Además de la localización subcelular de los P14K están las funciones únicas de las enzimas en los respectivos compartimientos. El PIK4CB está involucrado en la producción de reservas de PtdIns4P y PtdIns4, 5P2, el transporte regulado de ceramida desde ER al Golgi, lo cual lleva a la síntesis de la espingomielina, y está involucrado en la integridad estructural del Golgi manteniendo los dominios ricos en PI (4) P que permiten el ajuste de la maquinaria de AP-1. La perturbación de PIK4CB produce cambios en la estructura del complejo Golgi, produce defectos secretores en células polarizadas e inhibe el transporte de proteínas a la membrana del plasma.

Las enzimas de clase II y III P14K α y β generan PtdIns 4-fosfato, el precursor de varios fosfoinosítidos reguladores. Estos fosfoinosítidos controlan diversos procesos de señalización y tráfico celular reclutando proteínas reguladoras en complejos de señalización organizados. La producción de PtdIns 4-fosfato [PtdIns4P] a partir de PtdIns, en la primera etapa en la formación del PtdIns (4,5) P2 y ptdIns (3,4,5)P3. El PtdIns (4,5)P2 es el sustrato principal de la enzima fosfolipasa C (PLC), produciendo inositol 1,4,5-trifosfato [Ins(1,4,5)P3] y diacilglicerol (DAG) involucrado en la señalización de Ca^{2+} . El PtdIns(4,5)P2 también controla varios tipos de canales de iones y enzimas, tales como la fosfolipasa D (PLD) e interactúa con proteínas que unen las membranas al citoesqueleto de actina 3 y 5. Los PtdIns(3,4,5)P3 generados a partir de los otros PtdIns(4,5)P2 por las quinasas de clase I PtdIns 3, regulan un rango de procesos, tales como el metabolismo celular y la ruta antiapoptótica a través de la quinasa Akt cerina/treonina pero también controla las tirosina quinasas, tales como Btk y los factores de intercambio de guanina para proteínas pequeñas que enlazan GTP. La producción de estos fosfoinosítidos de señalización se basa en la actividad de sus enzimas sintéticas y del suministro de su precursor, así las PtdIns 4-quininas juegan un papel en la regulación celular.

Los virus de ARN de cadena positiva de los cuales son dependientes del PIK4CB o PIK4CA humanos para su replicación se cree que incluyen I. Picorna- (HAV, polio, Coxsackie), noda-, como-, nepo-, poty-, bymo-, sobemovirus, y luteovirus (virus amarillo, enano amarillo y de hoja enrollada). 11. Carmo-, tombus-, dianthovirus, pestivirus, toga-, echo-, Dengue, hepatitis C virus, flavivirus. 111. Tobamo-, tobra-, hordei-, tricorna-, alpha, rubi-, furovirus, virus de la hepatitis E, potex-, carla-, tymoviruses, virus de mancha clorótica en hojas de manzano.

La siguiente descripción detallada divulga como hacer y usar el ARNds y las composiciones que contienen el ARNds para inhibir la expresión de virus de ARN de cadena positiva, así como composiciones y métodos para tratar enfermedades y trastornos causados por infección por virus de ARN de cadena positiva, por ejemplo, enfermedades del hígado, fallo del hígado, fibrosis, cáncer, enfermedades de los pulmones y sus complicaciones (descritas adicionalmente más abajo). Las composiciones farmacéuticas de la divulgación comprenden un ARNds que tiene una cadena antisentido que comprende una región de complementariedad la cual es menor a 30 nucleótidos de longitud, en general de 19 – 24 nucleótidos de longitud, y es sustancialmente complementaria a al menos parte de un transcrito de ARN de PIK4CB y/o PIK4CA junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una realización es el empleo de más de un ARNds, opcionalmente apuntando diferentes segmentos del transcrito de ARN de PIK4CB y/o PIK4CA, en combinación, en una formulación farmacéutica.

De acuerdo con lo anterior, ciertos aspectos proveen composiciones farmacéuticas que comprenden el ARNds de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, métodos para utilizar las composiciones para inhibir la expresión de PIK4CB y/o PIK4CA, y métodos para utilizar las composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades causadas por infección por virus de ARN de cadena positiva.

40 Definiciones

Para conveniencia, se provee a continuación el significado de ciertos términos y expresiones usados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones anexas. Si hay una discrepancia aparente entre el uso de un término en otras partes de esta especificación y su definición provista en esta sección, deberá prevalecer la definición en esta sección.

45 “G”, “C”, “A” y “U” indican cada una generalmente un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina y uracilo como base, respectivamente. Sin embargo, se entenderá que el término “ribonucleótido” o “nucleótido” también se puede referir a un nucleótido modificado, como se detalla adicionalmente más abajo, o una unidad estructural de reemplazo subrogada. La persona experimentada está al tanto de que la guanina, citosina, adenina y uracilo pueden ser reemplazados por otras unidades estructurales sin alterar sustancialmente las propiedades de los pares de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que porta tal unidad estructural de reemplazo. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende inosina como su base puede tener pares de bases con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. De esta forma, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina pueden ser reemplazados en las secuencias de nucleótidos de la invención por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. Las secuencias que comprenden tales unidades estructura de reemplazo son realizaciones de la invención.

Tal como se utiliza aquí, “secuencia objetivo” se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótido de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de PIK4CB, incluyendo ARNm que es un producto del procesamiento de ARN de un producto de transcripción primario.

5 Tal como se utiliza aquí, el término “cadena que comprende una secuencia” se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que es descrita por la secuencia citada para utilizar la nomenclatura de nucleótidos estándar.

10 Tal como se utiliza aquí, y al menos que se indique otra cosa, el término “complementario” cuando se utiliza para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación con una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos para hibridar y formar una estructura dúplex bajo ciertas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido, que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como será entendido por la persona experimentada. Tales condiciones pueden ser, por ejemplo, condiciones restrictivas, en donde las condiciones restrictivas pueden incluir: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM, pH 6.4, EDTA 1 mM, 50°C o 70°C durante 12-16 horas seguido por lavado. Pueden aplicarse ciertas condiciones tales como condiciones relevantes fisiológicamente tal como pueden ser encontradas dentro de un organismo. La persona experimentada será capaz de determinar el conjunto de condiciones las más apropiadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la aplicación más reciente de los nucleótidos hibridados.

20 Esto incluye el apareamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótido al oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos en la longitud completa de la primera y segunda secuencia de nucleótidos. Tales secuencias pueden ser denominadas como “completamente complementarias” una con respecto a otra aquí. Sin embargo, cuando se cita una primera secuencia como “sustancialmente complementaria” con respecto a una segunda secuencia aquí, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias o pueden formar uno o más, pero generalmente no más de 4, 3 o 2 pares de bases no coincidentes por hibridación, a la vez que retienen la capacidad para hibridar bajo las condiciones las más relevantes para su aplicación final. Sin embargo, cuando dos oligonucleótidos están diseñados para formar, por hibridación, uno o más sobrantes de cadena individual, tales sobrantes no deberán ser vistos como errores con respecto a la determinación de la complementariedad. Por ejemplo el ARNs que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos en longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en donde el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementario con el oligonucleótido más corto, puede aún ser denominado como “completamente complementario” para los propósitos de la invención.

30 Secuencias “complementarias” tal como se utiliza aquí, también pueden incluir, o estar conformado enteramente dentro de pares de bases que no son Watson-Crick formadas a partir de nucleótidos no naturales y modificados, en tanto los requerimientos anteriores con respecto a su capacidad para hibridar estén cumplidos.

35 El término “complementario”, “completamente complementario” y “sustancialmente complementario” aquí pueden ser utilizados con respecto a la coincidencia de bases entre la cadena en sentido y la cadena antisentido de ARNs o entre la cadena antisentido de un ARNs y una secuencia objetivo, como será entendido a partir del contexto de su uso.

40 Tal como se utiliza aquí, un polinucleótido el cual es “sustancialmente complementario” a al menos una parte del ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una porción contigua del ARNm de interés (PIK4CB o PIK4CA). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a al menos una parte de ARNm de PIK4CB si la secuencia es sustancialmente complementaria a una porción no interrumpida de un ARNm que codifica PIK4CB. De la misma manera un polinucleótido es complementario a al menos una parte del ARNm de PIK4CA si la secuencia es sustancialmente complementaria a una porción no interrumpida del ARNm que codifica PIK4CA.

45 El término “ARN de cadena doble” o “ARNs” tal como se utilizan aquí, se refieren a un complejo de las moléculas de ácido ribonucleico, que tienen una estructura dúplex que comprende dos cadenas de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias. Las dos cadenas que forman la estructura dúplex pueden ser diferentes porciones de una molécula de ARN más grande, o pueden ser moléculas de ARN separadas. Las moléculas de ARN separadas, tales como ARNs se citan frecuentemente en la literatura como ARNsi (“ARN de interferencia corta”). Cuando las dos cadenas son parte de una molécula más grande, y por lo tanto están conectadas mediante una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3’ de una cadena y el extremo 5’ de la otra respectiva cadena formando la estructura dúplex, la cadena de ARN de conexión se denomina como “bucle de horquilla”, “ARN de bucle corto” o “ARNsh”.
50 Cuando las dos cadenas están conectadas covalentemente por medios diferentes a una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3’ de una cadena y el extremo 5’ de la otra cadena respectiva formando una estructura dúplex, la estructura de conexión se denomina como “enlazante”. Las cadenas de ARN pueden tener el mismo o diferente número de nucleótidos. Además de la estructura dúplex, un ARNs puede comprender uno o más sobrantes de nucleótidos. Además, tal como se utiliza en esta especificación, “ARNs” puede incluir modificaciones químicas a ribonucleótidos, enlaces internucleósidos, grupos terminales, tapones y unidades estructurales conjugadas, incluyendo modificaciones sustanciales en nucleótidos múltiples e incluyendo todos los tipos de modificaciones divulgados aquí o conocidos en la técnica. Tales modificaciones, tal como se utilizan en una molécula tipo de ARNsi están abarcadas por
55 “ARNs” para los propósitos de esta especificación y reivindicaciones.

5 Tal como se utiliza aquí, un “sobrante de nucleótido” se refiere a un nucleótido o nucleótidos no apareados que protruyen de la estructura dúplex de un ARNs cuando un extremo 3’ de una cadena de ARNs se extiende más allá del extremo 5’ de la otra cadena o viceversa. “Romo” o “extremo romo” se refiere a que no hay nucleótidos no apareados al final del ARNs, esto es no hay una sobrecarga de nucleótidos. Un ARNs de “extremo romo” es un ARNs que tiene
 5 cadena doble en su longitud completa, esto es, no hay nucleótidos sobrantes en ningún extremo de la molécula. En búsqueda de claridad, los taponos químicos o las unidades estructurales químicas que no son nucleótidos conjugados con el extremo 3’ o el extremo 5’ del ARNs no se consideran en la determinación de si un ARNs tiene un sobrante o es de extremo romo.

10 El término “cadena antisentido” se refiere a la cadena de un ARNs que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia objetivo. Esta cadena también es conocida como la secuencia de “guía” y se utiliza en funcionamiento del complejo RISC para guiar el complejo al ARNm correcto para la escisión. Tal como se utiliza aquí el término “región de complementariedad” se refiere a la región sobre la cadena en antisentido que es sustancialmente
 15 complementaria a una secuencia, por ejemplo una secuencia objetivo, tal como se define aquí. Cuando la región de complementariedad no es completamente complementaria a la región objetivo, los errores son tolerados principalmente en las regiones terminales y, si están presentes, están generalmente en una región o regiones terminales, por ejemplo dentro de 6, 5, 4, 3 o 2 nucleótidos del término 5’ y/o 3’. Este uso de “antisentido” puesto que se relaciona con un compuesto de ARN, es diferente de los compuestos ADN antisentido, los cuales son diferentes en función del campo relacionado de terapia hacia ácidos nucleicos.

20 El término “cadena en sentido” tal como se utiliza aquí, se refiere a la cadena de un ARNs que incluye una región que es sustancialmente complementaria con una región de la cadena antisentido. Esta cadena también es conocida como la secuencia “antiguía” porque contiene la misma secuencia de nucleótidos que la secuencia objetivo y por lo tanto se enlaza específicamente a la secuencia de guía.

25 “Introducir en una célula”, cuando se refiere a ARNs, significa facilitar la toma o absorción en la célula, tal como es entendido por los experimentados en la técnica. La absorción o toma de ARNs puede ocurrir a través de procesos celulares difusos o activos no auxiliados, o por agentes o dispositivos auxiliares. El significado de este término no está limitado a células in vitro; un ARNs también puede ser “introducido en una célula”, cuando la célula es parte de un organismo viviente. En tal caso, la introducción en la célula incluirá la administración al organismo. Por ejemplo, para administración in vivo, el ARNs puede ser inyectado en un sitio de tejido o administrado sistémicamente. La introducción in vitro en una célula incluye métodos conocidos en la técnica tales como electroporación y lipofección.

30 Los términos “silencio” y “inhibir la expresión de”, en tanto se refieren a PIK4CB o PIK4CA, se refieren aquí a al menos una supresión parcial de la expresión de PIK4CB o PIK4CA en una célula tratada con ARNs dirigido a PIK4CB o PIK4CA, según se manifiesta mediante una reducción de la cantidad de ARNm transcrito o disponible en comparación con las células normales (no tratadas). Esta medición puede ser terminada comparando los niveles de ARNm en células tratadas (las cuales pueden ser aisladas a partir de una primera célula o grupo de células que han sido tratadas de tal
 35 forma que se inhiba la expresión de PIK4CB o PIK4CA), en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células pero que no han sido tratadas (células de control). El grado de inhibición se expresa usualmente en términos de

ARN en células de control- ARNm en células tratadas-100%

(ARNm en células de control)

40 Alternativamente, el grado de inhibición puede ser dado en términos de una reducción de un parámetro que está funcionalmente enlazado a la transcripción genética, por ejemplo, la cantidad de polipéptido, o el número de células que despliegan un cierto fenotipo, por ejemplo. Actividad de quinasa asociada específicamente con PIK4CB o PIK4CA, o susceptibilidad a la infección. En principio, el silenciamiento genético puede ser determinado en cualquier célula que exprese el gen de interés, bien sea constitutivamente o por ingeniería genética, y por cualquier prueba o propiedad. Sin embargo, cuando se requiere una referencia con el fin de determinar si un ARNs dado inhibe la expresión de PIK4CB o
 45 PIK4CA en un cierto grado y por lo tanto es abarcado por la presente invención, el ensayo provisto en los ejemplos más abajo servirá como tal referencia.

50 Por ejemplo, en ciertas sustancias, la expresión del gen PIK4CB o PIK4CA es inhibida, cuando se suprimen en al menos aproximadamente 20%, 25%, 35% o 50% por la administración del ARN de cadena doble de la invención. En algunas realizaciones, el gen de PIK4CB o PIK4CA es suprimido en al menos aproximadamente 60%, 70% u 80% por administración del oligonucleótido de cadena doble de la invención. En algunas realizaciones, el gen PIK4CB o PIK4CA es suprimido en al menos aproximadamente 85%, 90% o 95% por administración del oligonucleótido de cadena doble de la invención. Los resultados de la figura 2 demuestran que cada ARNs probado dirigido a PIK4CB (o PIK4CA) es efectivo para reducir el nivel relativo del producto de expresión en el ensayo del replicón de HCV de 10% a 90%. Los resultados en la figura 3 demuestran que cada ARNs probado dirigido a PIK4CB (o PIK4CA) es proclive a reducirse si
 55 el nivel de PIK4CB (o PIK4CA), de los niveles de ARNm en una célula va desde 10% a 90%.

Tal como se utiliza aquí en el contexto de la infección con virus de ARN de cadena positiva, los términos “tratar”, “tratamiento”, y similares, se refieren al alivio o disminución de procesos patológicos mediados por la infección de un virus de ARN de cadena positiva. Tal descripción incluye el uso de agentes terapéuticos de la invención para profilaxis o prevención de infección viral con ARN de cadena doble, y alivio de los síntomas o patologías causados por infección de virus con ARN de cadena positiva. En el contexto de la presente invención en cuanto se relaciona con cualquiera de las otras condiciones citadas aquí más adelante (diferentes a los procesos patológicos mediados por la infección con virus de ARN de cadena doble), los términos “tratar”, “tratamiento”, y similares significan aliviar o disminuir al menos un síntoma asociado con tal condición, o hacer más lenta o reversar la progresión de tal condición.

Tal como se utilizan aquí, las frases “cantidad terapéuticamente efectiva” y “cantidad profilácticamente efectiva” se refieren a la cantidad que provee un beneficio terapéutico en el tratamiento, prevención o manejo de procesos patológicos mediados por la infección con virus de ARN de cadena positiva o un síntoma abierto de procesos patológicos mediado por la infección con virus de ARN de cadena positiva. La cantidad específica que es terapéuticamente efectiva puede ser determinada fácilmente por un practicante médico normal, y puede variar dependiendo de factores conocidos en la técnica, tales como, el tipo de procesos patológicos mediados por la infección con virus de ARN de cadena positiva, la historia y edad del paciente, la etapa de los procesos patológicos mediados por la infección con virus de ARN de cadena positiva y la administración de otros agentes antipatológicos.

Tal como se utiliza aquí, una “composición farmacéutica” comprende una cantidad farmacológicamente efectiva de un ARNds y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza aquí, “cantidad farmacológicamente efectiva”, “cantidad terapéuticamente efectiva” o simplemente “cantidad efectiva” se refiere a aquella cantidad de un ARNds efectivo para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo buscado. Por ejemplo, si se considera que un tratamiento clínico dado es efectivo cuando hay al menos una reducción del 25% en un parámetro medible asociado con una enfermedad o trastorno, una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco para el tratamiento de esa enfermedad o trastorno es la cantidad necesaria para efectuar al menos una reducción del 25% en ese parámetro.

El término “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un vehículo para administración de un agente terapéutico. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución salina regulada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. El término excluye específicamente medios de cultivos celulares. Para fármacos administrados oralmente, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes inertes, agentes desintegrantes, agentes aglomerantes, agentes lubricantes, agentes endulzantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y conservantes. Diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio, y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido argínico son agentes desintegrantes adecuados. Los agentes aglomerantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, será generalmente estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, las tabletas pueden ser recubiertas con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retardar la absorción en el tracto gastrointestinal.

Tal como se utiliza aquí, una “célula transformada” es una célula en la cual se ha introducido un vector a partir del cual puede expresarse una molécula de ARNds.

Ácido ribonucleico de cadena doble (ARNds)

En una realización, la invención provee moléculas de ácido ribonucleico de cadena doble (ARNds) para inhibir la expresión de PIK4CB y/o PIK4CA, y por lo tanto inhibir la replicación o propagación del virus de ARN de cadena positiva, en una célula o mamífero, en donde el ARNds comprende una cadena antisentido que comprende una región de complementariedad la cual es complementaria a al menos una parte de un ARNm formado en la expresión de PIK4CB o PIK4CA, y en donde la región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente 19 – 24 nucleótidos de longitud, y en donde dicho ARNds, por contacto con una célula que expresa dicho gen de PIK4CB o PIK4CA, inhibe la expresión de dicho gen de PIK4CB o PIK4CA en al menos 10%, 25% o 40%.

El ARNds comprende dos cadenas de ARN que son suficientemente complementarias para hibridar con el fin de formar una estructura dúplex. Una cadena del ARNds (la cadena antisentido) comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria, y en general completamente complementaria, con una secuencia objetivo, derivada de la secuencia de producto genético del gen de PIK4CB o PIK4CA, la otra cadena (la cadena en sentido) comprende una región que es complementaria a la cadena antisentido, de tal manera que las dos cadenas hibridan y forman una estructura dúplex cuando se combinan bajo condiciones adecuadas. En general, la estructura dúplex está entre 15 y 30, más generalmente entre 18 y 25, aún más generalmente entre 19 y 24 y lo más generalmente entre 19 y 21 pares de bases de longitud. De la misma forma, la región de complementariedad a la secuencia objetivo está entre 15 y 30, más generalmente entre 18 y 25, aún más generalmente entre 19 y 24, y lo más generalmente entre 19 y 21 nucleótidos de longitud. El ARNds de la invención puede tener un extremo romo (por ejemplo donde cada nucleótido en cada cadena tiene un nucleótido adecuado para el apareamiento de bases sobre la otra cadena), o puede comprender adicionalmente uno o más sobrantes de nucleótidos de cadena sencilla, comúnmente en el extremo 3'. El ARNds puede ser sintetizado por métodos estándar conocidos en la técnica tal como se discuten más adelante, por ejemplo, mediante

el uso de un sintetizador automatizado de ADN, tal como es comercialmente disponible de, por ejemplo, Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

- 5 En realizaciones específicas, el ARNds comprende, para dirigirse a PIK4CB, una cadena seleccionada de las secuencias en sentido de la Tabla 1 y una segunda secuencia seleccionada del grupo consistente de la secuencia antisentido de la Tabla 1. Agentes antisentido que se dirigen a cualquier otro lugar en la secuencia objetivo PIK4CB, por ejemplo, ligeramente corriente arriba o corriente abajo de los agentes identificados en la Tabla 1, pueden ser determinados fácilmente utilizando la secuencia alistada en la Tabla 1, y el ARNm flanqueante o la secuencia genómica encontrada en NCBI Accession No.: NM_002651.
- 10 En realizaciones específicas, el ADNds comprende, para dirigirse a PIK4CA, una cadena seleccionada de las secuencias en sentido de la Tabla 2 y una segunda secuencia seleccionada del grupo consistente de las secuencias antisentido de la Tabla 2. Agentes alternativos que se dirigen a otro lugar en la secuencia objetivo de PIK4CA, por ejemplo, ligeramente corriente arriba o corriente abajo de los agentes identificados en la Tabla 2, pueden determinarse fácilmente usando la secuencia listada en la Tabla 2, y el ARNm flanqueante o la secuencia genómica encontrada en NCBI Accession No.: NM_002650.
- 15 En realizaciones adicionales, el ARNds comprende al menos una secuencia dúplex seleccionada de las secuencias dúplex provistas en la Tabla 1 o de la Tabla 2. En otras realizaciones, el agente terapéutico puede comprender dos o más secuencias dúplex seleccionadas de la Tabla 1 y/o de la Tabla 2. En general, cada ARNds comprende dos cadenas de oligonucleótidos, en donde un oligonucleótido es descrito como la cadena en sentido en la Tabla y el segundo oligonucleótido es descrito como la cadena antisentido en la misma Tabla. Cada Tabla provee un nombre
- 20 dúplex para cada ARNds. Las bases de nucleótidos están indicadas utilizando la notación estándar para nucleótidos.

ES 2 428 009 T3

TABLA 1 – ARNsi dúplex (ARNds) dirigido a PIK4CB

NOMBRE DÚPLEX	SECUENCIA ANTISENTIDO (SECUENCIA DE GUÍA)	SEQ ID No.:	SECUENCIA EN SENTIDO	SEQ ID No.:
PIK4CB1	GGACGUGGGUGAUGCCAUUUUTT	1	AAAUGGCAUCACCCACGUCCTT	105
PIK4CB2	GGGAUGACCUUCGGCAAGAUUTT	2	AAUCUUGCCGAAGGUCAUCCCTT	106
PIK4CB3	GAGAUCCGUUGCCUAGAUGUUTT	3	AACAUCUAGGCAACGGAUCUCTT	107
PIK4CB4	GCACCGAGAGUAUUGAUAAUUTT	4	AAUUAUCAAUACUCUCGGUGCTT	108
PIK4CB5	SMARTpool PIK4CB1-B4		PIK4CB1-B4	
PIK4CB6	UUAUCAAUACUCUCGGUGCTGTT	5	GCACCGAGAGUAUUGAUAAATT	109
PIK4CB7	UUGUACUCCAGGCUCUUGGATT	6	CAAGGAGCCUGGAGUACAATT	110
PIK4CB8	UUGGACACUGAGGCAUCCGTTTT	7	CGGAUGCCUCAGUGUCCAATT	111
PIK4CB9	UAGUCAACCAAGUGUAAUUCTGTT	8	GAUUACACUUGGUUGACUATT	112
PIK4CB10	UUGGGCACAGUGCUGAAGCTGTT	9	GCUUCAGCACUGUGCCCAATT	113
PIK4CB11	AUGGGUAAUACCACAUUCGGGTT	10	CGAAUGUGGUAAUACCCAATT	114
PIK4CB12	AAUCAUGCCACUAUCAGCCGATT	11	GGCUGAUAGUGGCAUGAUUTT	115
PIK4CB13	UCUCGUUUGAAGGCUGUCGGGTT	12	CGACAGCCUCAAACGAGATT	116
PIK4CB14	UACCACAUGAUCCUUCGUGTTTT	13	CACGAAGGAUCAUGUGGUATT	117
PIK4CB15	UAAUGCUCUGGCGGCAACGGTTT	14	CGUUGCCGCCAGAGCAUUATT	118
PIK4CB16	AUCUUGUAUGGCUUGAUCCAATT	15	GGAUCAAGCCAUACAAGAATT	119
PIK4CB17	AUCACAUCCACAAACUCUGTGTT	16	CAGAGUUUGUGGAUGUGAUUTT	120
PIK4CB18	UUCUCCACUUUAGGGUUGCTGTT	17	GCAACCCUAAAGUGGAGAATT	121
PIK4CB19	UGUCACAUGAUGCCGUUGGTGTT	18	CCAACGGCAUCAUGUGACATT	122
PIK4CB20	UGAUAGACCGCAUACUGCCATTT	19	GGCAGUAUGCGGUCUAUCATT	123
PIK4CB21	UUCGAGCGGCAAUCAGCCCTTT	20	GGCUGAUUGCCGCUCGGAATT	124
PIK4CB22	UUUCGAAUGGUGCUGGAGCCATT	21	GCUCCAGCACCAUUCGAAATT	125
PIK4CB23	UGUACAUGUUAAGCAACUGGGTT	22	CAGUUGCUUAAACAUGUACATT	126
PIK4CB24	UCUACGGACCUCGUACUCCGATT	23	GGAGUACGAGGUCCGUAGATT	127
PIK4CB25	UUCCAUUUCCCUUGGGUGGATTT	24	CCACCCAAGGGAAAUGGAATT	128
PIK4CB26	UUCUCAGACAAGGGCCCUCTATT	25	GAGGGCCCUUGUCUGAGAATT	129

ES 2 428 009 T3

(continuación)

NOMBRE DÚPLEX	SECUENCIA ANTISENTIDO (SECUENCIA DE GUÍA)	SEQ ID No.:	SECUENCIA EN SENTIDO	SEQ ID No.:
PIK4CB27	UUGCCGAUCGCCAUCAGGGACTT	26	CCCUGAUGGCGAUCGGCAATT	130
PIK4C828	UGGAUCAUCUAGGCAACGGATTT	27	CCGUUGCCUAGAUGAUCCATT	131
PIK4CB29	UUCCCAAUUGGACUGCAGUTGTT	28	ACUGCAGUCCAUUUGGGAATT	132
PIK4CB30	UCCACUACUGUAUCUCCCATGTT	29	UGGGAGAUACAGUAGUGGATT	133
PIK4CB31	UAGGAAGUAAUCGAGCAAGGATT	30	CUUGCUCGAUUACUCCUATT	134
PIK4CB32	AAGAAUCUCAUCAAUUUCCATT	31	GAAAUUGAAUGAGAUUCUUTT	135
PIK4CB33	UAGCUUGGUCCACGGGAGTGTT	32	CUCCCGUGGGACCAAGCUATT	136
PIK4CB34	UUGAACAUUGCGCAUCCAGGTT	33	UGGAUGGCGACAUGUUAATT	137
PIK4CB35	UCAAGUCCUAAGUACCGAGAATT	34	CUCGGUACUUAGGACUUGATT	138
PIK4CB36	AUGACUGACAGGAGCCGCCAATT	35	GGCGGCUCCUGUCAGUCAUTT	139
PIK4CB37	UGUUAUCCCUUAGUGGCTTT	36	CCACUAAGAGGGAUGAACATT	140
PIK4CB38	UUGGAGUUGAGGACAACAGCCTT	37	CUGUUGUCCUCAACUCCAATT	141
PIK4CB39	AAUAAGAGGAUGGCCUGUGGATT	38	CACAGGCCAUCCUCUUAUUTT	142
PIK4CB40	UGAUCCGCCGUACUUUCUCCTTT	39	GAGAAAGUACGGCGGAUCATT	143
PIK4CB41	AAUUCACAUGGCUAGGCCAGTT	40	GGCCUAGCCAUGUGGAAUUTT	144
PIK4CB42	AUCUGACUUAGAGCGCUGGTGTT	41	CCAGCGCUCUAAGUCAGAUUTT	145
PIK4CB43	CUCAGUGGUGUAACUGCCGTGTT	42	CGGCAGUUACACCACUGAGTT	146
PIK4CB44	UCAGCUUAAAGGCUGACGUCTTT	43	ACGUCAGCCUUUAAGCUGATT	147
PIK4CB45	AAGCCGUCAUAGAGUUUGGTGTT	44	CCAAACUCUAUGACGGCUUTT	148
PIK4CB46	UCCGUGAUGACACUUAGCAGGTT	45	UGCUAAGUGUCAUCACGGATT	149
PIK4CB47	UCGCCUAUGUCAUCCACCGACTT	46	CGGUGGAUGACAUAGGCGATT	150
PIK4CB48	UGGAAGGCCCGCCCUUCUCAGTT	47	GAGAAGGGCGGGCCUUCATT	151
PIK4CB49	AACUGGGAGAUGUUGUCACAGTT	48	GUGACAACAUCUCCAGUUTT	152
PIK4CB50	UAGAGACUGCCACGCCUCCATTT	49	GGAGGCGUGGCAGUCUCUATT	153
PIK4CB51	UUGACCACUGGUUCAUCATGTT	50	UGAUUGAACCAGUGGUCAATT	154
PIK4CB52	UUAGGGUUGCUGGCUGUUCGTTT	51	GAACAGCCAGCAACCCUAATT	155

ES 2 428 009 T3

(continuación)

NOMBRE DÚPLEX	SECUENCIA ANTISENIDO (SECUENCIA DE GUÍA)	SEQ ID No.:	SECUENCIA EN SENTIDO	SEQ ID No.:
PIK4CB53	UCUGUGGUCAGCUUAAAGGCTTT	52	CCUUUAAGCUGACCACAGATT	156
PIK4CB54	AUUUAUCAAUACUCUCGGUGCTTT	53	CACCGAGAGUAUUGAUAAUTT	157
PIK4CB55	UUGGUGAGGUACUGGAAGCCGTT	54	GCUUCCAGUACCUCACCAATT	158
PIK4CB56	UGUAUGGCUUGAUCCAAAGGGTT	55	CUUUGGAUCAAGCCAUACATT	159
PIK4CB57	UUGGAGUUUAUACAGGUAUGAATT	56	CAUACCUGUAUAACUCCAATT	160
PIK4CB58	UCGAGCUUCCAAGAAUCUCATTT	57	GAGAUUCUUGGAAGCUCGATT	161
PIK4CB59	AAAGUUAAUUGCUCUGGCGGCATT	58	CCGCCAGAGCAUUAACUUUTT	162
PIK4CB60	UAUCAGCCGAAAUCACAAGAATT	59	CUUGUGAUUUCGGCUGAUATT	163
PIK4CB61	UUGUCAUAGUUGGGCACAGTGTT	60	CUGUGCCCAACUAUGACAATT	164
PIK4CB62	UCCGUAGCUUGGUCCCACGGGTT	61	CGUGGGACCAAGCUACGGATT	165
PIK4CB63	UGAGGUUUCGAAUGGUGCUGGTT	62	AGCACCAUUCGAAACCUCATT	166
PIK4CB64	UUGUAUGGCUUGAUCCAAAGGTT	63	UUUGGAUCAAGCCAUACAATT	167
PIK4CB65	UAAGUACCGAGAACCUACUCTTT	64	AGUAGGUUCUCGGUACUJATT	168
PIK4CB66	UUUCCGAGCGGCAAUCAGCCCTT	65	GCUGAUUGCCGCUCGGAAATT	169
PIK4CB67	UGAGGUACUGGAAGCCGUCATTT	66	GACGGCUUCCAGUACCUCATT	170
PIK4CB68	UCUCAGACAAGGGCCCUCUAGTT	67	AGAGGGCCCUUGUCUGAGATT	171
PIK4CB69	UGUAGGCUUGUACUCCAGGCTTT	68	CCUGGAGUACAAGCCUACATT	172
PIK4CB70	UUAAUGCUCUGGCGGCAACGGTT	69	GUUGCCGCCAGAGCAUUAATT	173
PIK4CB71	GAAUUUAUCAAUACUCUCGGTGTT	70	CCGAGAGUAUUGAUAAUUCTT	174
PIK4CB72	UUCCACAUGGCUAGGCCAGTATT	71	CUGGCCUAGCCAUGUGGAATT	175
PIK4CB73	UGAGGCAUCCGUUCAUACCTCTT	72	GGUAUGAACGGAUGCCUCATT	176
PIK4CB74	UUGCUGGCUGUUCGUUUCAGGTT	73	UGAAACGAACAGCCAGCAATT	177
PIK4CB75	AACAUGUCGCCAUCCAGGCCGTT	74	GCCUGGAUGGCGACAUGUUTT	178
PIK4CB76	UGCUCGGAGUAGUCAACCAATT	75	GGUUGACUACUCCGGAGCATT	179
PIK4CB77	ACUGGUUCAAUCAUGCCACTATT	76	GUGGCAUGAUUGAACCAGUTT	180
PIK4CB78	UAGACCGCAUACUGCCAUCCATT	77	GAUGGCAGUAUGCGGUCUATT	181

ES 2 428 009 T3

(continuación)

NOMBRE DÚPLEX	SECUENCIA ANTISENTIDO (SECUENCIA DE GUÍA)	SEQ ID No.:	SECUENCIA EN SENTIDO	SEQ ID No.:
PIK4CB79	UGGAGUUGAGGACAACAGCCTTT	78	GCUGUUGUCCUCAACUCCATT	182
PIK4CB80	UAGUUGGGCACAGUGCUGAAGTT	79	UCAGCACUGUGCCCAACUATT	183
PIK4CB81	UCAAUACUCUCGGUGCUGGAGTT	80	CCAGCACCGAGAGUAUUGATT	184
PIK4CB82	UACUCCGAAUUCGGUUCUCGGTT	81	GAGAACCGAAUUCGGAGUATT	185
PIK4CB83	UUACCACAUGAUCCUUCGUGTTT	82	ACGAAGGAUCAUGUGGUAATT	186
PIK4CB84	UGGCUAGGCCAGUACCCUCAGTT	83	GAGGGUACUGGCCUAGCCATT	187
PIK4CB85	UUCUACGGACCUCGUACUCGGTT	84	GAGUACGAGGUCCGUAGAATT	188
PIK4CB86	UGACAGGAGCCGCCAAUUGGGTT	85	CAAUUGGCGGCUCUCUGATT	189
PIK4CB87	UCAGACAAGGGCCCUJAGGGTT	86	CUAGAGGGCCCUUGUCUGATT	190
PIK4CB88	AUUGACCACUGGUUCAUCATTT	87	GAUUGAACCCAGUGGUCAAUTT	191
PIK4CB89	UCCGGAGUAGUCAACCAAGTGT	88	CUUGGUUGACUACUCCGGATT	192
PIK4CB90	UCAUGGGUAAUACCACAUUCGTT	89	AAUGUGGUAAUACCCAUGATT	193
PIK4CB91	UUCAAUCAUGCCACUAUCAGCTT	90	UGAUAGUGGCAUGAUUGAATT	194
PIK4CB92	UCUAGGCAACGGAUCUCACTGTT	91	GUGAGAUCCGUUGCCUAGATT	195
PIK4CB93	UGAUCUGGGCAGGUGGAUCATTT	92	GAUCCACCGGCCAGAUCAATT	196
PIK4CB94	UAUCAAUACUCUCGGUGCUGGTT	93	AGCACCGAGAGUAUUGAUATT	197
PIK4CB95	AAUGCUCUGGGCGCAACGGTGT	94	CCGUUGCCGCCAGAGCAUUTT	198
PIK4CB96	UCCCACGGGAGUGUCGUUGAGTT	95	CAACGACACUCCCGUGGGATT	199
PIK4CB97	UUUCUCAGACAAGGGCCCUCTTT	96	AGGGCCCUUGUCUGAGAAATT	200
PIK4CB98	AUCUUCUGGGUCUCGUUUGAATT	97	CAAACGAGACCCAGAAGAUTT	201
PIK4CB99	UCGUACUCCGAAUUCGGUUCTTT	98	AACCGAAUUCGGAGUACGATT	202
PIK4CB100	UUUAGGGUUGCUGGCUGUUCGTT	99	AACAGCCAGCAACCCUAAATT	203
PIK4CB101	CUCCUGUAGGAAGUAAUCGAGTT	100	CGAUUACUCCUACAGGAGTT	204
PIK4CB102	UGGUGAGGUACUGGAAGCCGTTT	101	GGCUUCCAGUACCUCACCATT	205
PIK4CB103	UCAUCCACCGACCAGGCCUCATT	102	AGGCCUGGUCGGUGGAUGATT	206
PIK4CB104	ACUCCGAAUUCGGUUCUCGGGTT	103	CGAGAACCGAAUUCGGAGUTT	207

(continuación)

NOMBRE DÚPLEX	SECUENCIA ANTISENTIDO (SECUENCIA DE GUÍA)	SEQ ID No.:	SECUENCIA EN SENTIDO	SEQ ID No.:
PIK4CB105	UCAGGUAGGGAGCCUUGUCCTTT	104	GACAAGGCUCCCUACCUGATT	208

TABLA 2 – ARNsi dúplex (ARNds) dirigido a PIK4CA

NOMBRE DÚPLEX	SECUENCIA ANTISENTIDO (SECUENCIA DE GUÍA)	SEQ ID No.:	SECUENCIA EN SENTIDO	SEQ ID No.:
PIK4CA1	GAGCAUCUCUCCCUACCUAUUTT	209	AAUAGGUAGGGAGAGAUGCUCTT	313
PIK4CA2	GUGAAGCGAUGUGGAGUUAUUTT	210	AAU AACUCCACAUCGCUUUCTT	314
PIK4CA3	CCACAGGCCUCUCCUACUUUUTT	211	AAAAGUAGGAGAGGCCUGUGGTT	315
PIK4CA4	GCAGAAUUUGGCCUGUUUUTT	212	AAACAGGCCAAAUUUCUGCTT	316
PIK4CA5	SMARTpool, PIK4CA1-A4		PIK4CA1-A4	
PIK4CA6	UUCUUAUCUGAGAACAUGGCGTT	213	CCAUGUUCUCAGAUAGAATT	317
PIK4CA7	UUUGGGUUGACUUGCUUCCGATT	214	GGAAGCAAGUCAACCCAAATT	318
PIK4CA8	UAGAAGAGGAUGGCGUCCGGATT	215	CGGACGCCAUCCUCUUCUATT	319
PIK4CA9	UAUGUGUUGAUCCAGCCUUGGTT	216	AAGGCUGGAUCAACACAUATT	320
PIK4CA10	UUGAACUUGGCCAGAU AUGGGTT	217	CAUAUCUGGCCAAGUUCAATT	321
PIK4CA11	AUGAUAGCCGACACGUUGGTGTT	218	CCAACGUGUCGGCUAUCUATT	322
PIK4CA12	UUCAGGCACAUCACUAACGGCTT	219	CGUUAGUGAUGUGCCUGAATT	323
PIK4CA13	UUCGGAUGAAGUUGUAGCGGGTT	220	CGCUACAACUUCUCCGAATT	324
PIK4CA14	UUCAAGUUCACUAACUCCACATT	221	UGGAGUUAGUGAACUUGAATT	325
PIK4CA15	UCAUCCUCGGAGUCUGAGCGGTT	222	GCUCAGACUCCGAGGAUGATT	326
PIK4CA16	UUUCUGCUCCACCGUCAUGTGTT	223	CAUGACGGUGGAGCAGAAATT	327
PIK4CA17	AGGAAUGUUAGCUCCUCUGTGTT	224	CAGAGGAGCUAACAUUCCUTT	328
PIK4CA18	AAGUAGUCA AAGGCAGUGGAGTT	225	CCACUGCCUUUGACUACUUTT	329
PIK4CA19	UUCACUUCAGACAGGGCCGACTT	226	CGGCCUUGUCUGAAGUGAATT	330
PIK4CA20	UUGUAGUCGAUGUCCAGCACATT	227	UGCUGGACAUCGACUACAATT	331
PIK4CA21	UUCGUUCCCAAUGGCUUCUGTTT	228	AGAAGCCAUUGGGAACGAATT	332

ES 2 428 009 T3

(continuación)

NOMBRE DÚPLEX	SECUENCIA ANTISENTIDO (SECUENCIA DE GUÍA)	SEQ ID No.:	SECUENCIA EN SENTIDO	SEQ ID No.:
PIK4CA22	UCGGCGUCGAUGGUGUGCCAGTT	229	GGCACACCAUCGACGCCGATT	333
PIK4CA23	AAAGAGGUCCAGGCCGACCAGTT	230	GGUCGGCCUGGACCUCUUUTT	334
PIK4CA24	UUAGAUCUCCAGUUGGCCACGTT	231	UGGCCAACUGGAGAUCUAATT	335
PIK4CA25	UGUGAUCUCCUCUACCAACTGTT	232	GUUGGUAGAGGAGAUCACATT	336
PIK4CA26	UUGGUCAGAGCUCGAGUACTTTT	233	GUACUGCAGCUCUGACCAATT	337
PIK4CA27	UGAUGCUUAUGUCUUCACGCATT	234	CGUGAAGACAUAAAGCAUCATT	338
PIK4CA28	AUUUUGGAACCACAUCGGCATGTT	235	UGCCGAUGUGGUUCCAAAUUTT	339
PIK4CA29	UCCCGGGUCCAACCGAACGAGTT	236	CGUUCGGUUGGACCCGGGATT	340
PIK4CA30	UCUGCUUCCUUUAUCUCAGCATT	237	CUGAGAUAAAGGAAGCAGATT	341
PIK4CA31	AAGUCGAUCCAGAUGUAGUGGTT	238	ACUACAUCUGGAUCGACUUTT	342
PIK4CA32	AAGAGGUCGAUGAUCUGCAGGTT	239	UGCAGAUCAUCGACCUCUUTT	343
PIK4CA33	AGAGCCGACAGUUAUGUCCAGTT	240	GGACAUAAACUGUCGGCUCUTT	344
PIK4CA34	UCCUUGAGUAGGGAACUUUGGTT	241	AAAGUCCCUACUCAAGGATT	345
PIK4CA35	UCCGGCCUGGUCUAGUCCAGTT	242	GGAACUAGACCAGGCCGGATT	346
PIK4CA36	UGUGAUGAGACGCUCGAUCTCTT	243	GAUCGAGCGUCUCAUCACATT	347
PIK4CA37	AAGUAGGAGAGGCCUGUGGGTTT	244	CCACAGGCCUCUCCUACUUTT	348
PIK4CA38	UCCGGGUGUCCUGAUUAUCTGTT	245	GAUAAUCAGGACACCCGGATT	349
PIK4CA39	GAGAUGGUGGACAUGCCGCTGTT	246	GCGGCAUGUCCACCAUCUCTT	35
PIK4CA40	UGCCUGCCAGGAGAUCUUCTGTT	247	GAAGAUCUCCUGGCAGGCATT	351
PIK4CA41	CUUCUCGCGAAGCACAUUGCGTT	248	CAAUGUGCUUCGCGAGAAGTT	352
PIK4CA42	UGCACGGCUAGGUAGGGAGAGTT	249	CUCCCUACCUAGCCGUGCATT	353
PIK4CA43	UCUCCCGCAUGAACUACAGGTTT	250	CUGUAGUUCAUGCGGGAGATT	354
PIK4CA44	AGAAAUCAAACUCCCGCUGGTTT	251	CAGCGGGAGUUUGAUUUCUTT	355
PIK4CA45	UUAUCUGAGAACAUGGCGGTCTT	252	CCGCCAUGUUCUCAGAUAAATT	356
PIK4CA46	UUGGGUUGACUUGCUUCCGAGTT	253	CGGAAGCAAGUCAACCCAATT	357
PIK4CA47	UCUUAUCUGAGAACAUGGCGGTT	254	GCCAUGUUCUCAGAUAAAGATT	358

ES 2 428 009 T3

(continuación)

NOMBRE DÚPLEX	SECUENCIA ANTISENTIDO (SECUENCIA DE GUÍA)	SEQ ID No.:	SECUENCIA EN SENTIDO	SEQ ID No.:
PIK4CA48	UCUGAGAACAUGGCGGUCCAATT	255	GGACCGCCAUGUUCUCAGATT	359
PIK4CA49	UUGCUUCCGAGGCAGCCAGGGTT	256	CUGGCUGCCUCGGAAGCAATT	360
PIK4CA50	UCAAGUUCACUAACUCCACATTT	257	GUGGAGUUAGUGAACUUGATT	361
PIK4CA51	AUCUCCACUUGGUCAGAGCTGTT	258	GCUCUGACCAAGUGGAGAU TT	362
PIK4CA52	AACGAGACGGGUCACUUCGTTTT	259	CGAAGUGACCCGUCUCGUUTT	363
PIK4CA53	UGUGUUGAUCCAGCCUUGGGTTT	260	CCAAGGCUGGAUCAACACATT	364
PIK4CA54	UUCUGCUCCACCGUCAUGUGCTT	261	ACAUGACGGUGGAGCAGAATT	365
PIK4CA55	UGGAGCAUCGGCGUCGAUGGTTT	262	CAUCGACGCCGAUGCUCATT	366
PIK4CA56	UCGAUGUCCAGCACA AUGGCCTT	263	CCAUUGUGCUGGACAUCGATT	367
PIK4CA57	UCGUUCCCAAUGGCUUCUGTGTT	264	CAGAAGCCAUUGGGAACGATT	368
PIK4CA58	UAACUCCACAUCGCUUCACCTTT	265	GUGAAGCGAUGUGGAGUUATT	369
PIK4CA59	UGAUCUCCUCUACCAACUGATTT	266	CAGUUGGUAGAGGAGAU CATT	370
PIK4CA60	UUGGCGAUCUCA AACCGCUGCTT	267	AGCGGUUUGAGAUCGCCAATT	371
PIK4CA61	AUGUGUUGAUCCAGCCUUGGGTT	268	CAAGGCUGGAUCAACACAUTT	372
PIK4CA62	CUGAUGUACUJAGAUCUCCAGTT	269	GGAGAUCUAAGUACAUCAGTT	373
PIK4CA63	UGGAGUAGAUCUUCUCGCGAATT	270	CGCGAGAAGAUCUACUCCATT	374
PIK4CA64	UCAGGCACAUCACUAACGGCTTT	271	CCGUUAGUGAUGUGCCUGATT	375
PIK4CA65	UAGGCGGCCAUGCUUCGGATGTT	272	UCCGAAGCAUGGCCGCCUATT	376
PIK4CA66	GAUGC UUAUGUCUUCACGCAGTT	273	GCGUGAAGACAU AAGCAUCTT	377
PIK4CA67	UCUCCAGUUGGCCACGCUGTTTT	274	CAGCGUGGCCAACUGGAGATT	378
PIK4CA68	UGAAGUUGUAGCGGGCCUGCTTT	275	CAGGCCCGCUACAACUUCATT	679
PIK4CA69	UGAGCUCUGGAGCAUCGGCGTTT	276	GCCGAUGCUC CAGAGCUCATT	380
PIK4CA70	AAGGAAUGUUAGCUCCUCUGTTT	277	AGAGGAGCUAACAUUCCUUTT	381
PIK4CA71	UGUUCUUA AACCUGGCAGGCATT	278	CCUGCCAGGUUU AAGAACATT	382
PIK4CA72	AUGUCCAGCACA AUGGCCUCATT	279	AGGCCAUUGUGCUGGACAUTT	383
PIK4CA73	UACAGAAGGAAUGUUAGCUCCTT	280	AGCUAACAUCCUUCUGUATT	384

ES 2 428 009 T3

(continuación)

NOMBRE DÚPLEX	SECUENCIA ANTISENTIDO (SECUENCIA DE GUÍA)	SEQ ID No.:	SECUENCIA EN SENTIDO	SEQ ID No.:
PIK4CA74	AAGAUCUCCACUUGGUCAGAGTT	281	CUGACCAAGUGGAGAUCUUTT	385
PIK4CA75	UCACUUCGUUCCCAAUGGCTTTT	282	GCCAUUGGGAACGAAGUGATT	386
PIK4CA76	UGAGACGCUCGAUCUCAGUGGTT	283	ACUGAGAUCGAGCGUCUCATT	387
PIK4CA77	UGGCGAUCUCAACCGCUGCATT	284	CAGCGGUUUGAGAUCGCCATT	388
PIK4CA78	UGCCAGGUGACCAGGAACUTGTT	285	AGUUCCUGGUCACCUGGCATT	389
PIK4CA79	UACUUAGAUCUCCAGUUGGCCTT	286	CCAACUGGAGAUCUAAGUATT	390
PIK4CA80	CUUAUCUGAGAACAUUGGCGGTTT	287	CGCCAUGUUCUCAGAUAAAGTT	391
PIK4CA81	UCCACAUCGCUUCACCUUGAATT	288	CAAGGUGAAGCGAUGUGGATT	392
PIK4CA82	UCGGAUGAAGUUGUAGCGGGCTT	289	CCGCUACAACUUCAUCCGATT	393
PIK4CA83	AGUGGAGUAGAUCUUCUCGCGTT	290	CGAGAAGAUCUACUCCACUTT	394
PIK4CA84	CUUCGUUCCCAAUGGCUUCTGTT	291	GAAGCCAUUGGGAACGAAGTT	395
PIK4CA85	AAGAGGAUGGCGUCCGGAGGGTT	292	CUCCGGACGCCAUCCUCUUTT	396
PIK4CA86	GUGGAGUAGAUCUUCUCGCGATT	293	GCGAGAAGAUCUACUCCACTT	397
PIK4CA87	AGACGGGUCACUUCGUUCCCATT	294	GGAACGAAGUGACCCGUCUTT	398
PIK4CA88	AGGAAGUCGAUCCAGAUGUAGTT	295	ACAUCUGGAUCGACUUCCUTT	399
PIK4CA89	UUUGGAACCACAUCGGCAUGCTT	296	AUGCCGAUGUGGUUCCAAATT	400
PIK4CA90	UGAUGAGACGCUCGAUCUCAGTT	297	GAGAUCGAGCGUCUCAUATT	401
PIK4CA91	CUGUAGGCGGCCAUGCUUCGGTT	298	GAAGCAUGGCCGCCUACAGTT	402
PIK4CA92	UCUCAAAACCGCUGCACCAGGATT	299	CUGGUGCAGCGGUUUGAGATT	403
PIK4CA93	AAGGAGCCUGUGAUCUCCUCTTT	300	AGGAGAUCACAGGCUCCUUTT	404
PIK4CA94	AGCUGAAGUAGUCAAGGCAGTT	301	GCCUUUGACUACUUCAGCUTT	405
PIK4CA95	AUGAGACGCUCGAUCUCAGTGTT	302	CUGAGAUCGAGCGUCUCAUTT	406
PIK4CA96	UUCCCAAUGGCUUCUGUGUTCTT	303	ACACAGAAGCCAUUGGGAATT	407
PIK4CA97	UGUCCAGCACAAUGGCCUCAGTT	304	GAGGCCAUUGUGCUGGACATT	408
PIK4CA98	UGGGUUGACUUGCUUCCGAGGTT	305	UCGGAAGCAAGUCAACCCATT	409
PIK4CA99	ACUAACUCCACAUCGCUUCCACTT	306	GAAGCGAUGUGGAGUUAGUTT	410

(continuación)

NOMBRE DÚPLEX	SECUENCIA ANTISENTIDO (SECUENCIA DE GUÍA)	SEQ ID No.:	SECUENCIA EN SENTIDO	SEQ ID No.:
PIK4CA100	UGGUCAGAGCUGCAGUACUTGTT	307	AGUACUGCAGCUCUGACCATT	411
PIK4CA101	CCUGAUUUCUUGGAGAUGGTGTT	308	CCAUCUCCAAGAAAUCAGGTT	412
PIK4CA102	UAGUCGAUGUCCAGCACAAATGTT	309	UUGUGCUGGACAUCGACUATT	413
PIK4CA103	AAGUUGUAGCGGGCCUGCUGGTT	310	AGCAGGCCCGCUACAACUUTT	414
PIK4CA104	UGCACUCAUCCUCGGAGUCTGTT	311	GACUCCGAGGAUGAGUGCATT	415
PIK4CA105	AUCUCCCGCAUGAACUACAGGTT	312	UGUAGUUCAUGC GGGAGAU TT	416

La persona experimentada está bien notificada de que el ARNs que comprende una estructura dúplex de entre 20 y 23, pero específicamente 21, pares de bases ha sido reconocida como particularmente efectiva en la inducción de la interferencia de ARN (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). Sin embargo, otros han encontrado que ARNs más cortos o más largos pueden ser efectivos también. En las realizaciones descritas anteriormente, en virtud de la naturaleza de la secuencia de oligonucleótidos provistos en la Tabla 1 o Tabla 2, los ARNs de la invención pueden comprender al menos una cadena de una longitud mínima de 21nt. Puede esperarse razonablemente que ARNs más cortos que comprenden una de las secuencias de la Tabla 1 o Tabla 2 menos solamente unos pocos nucleótidos en uno o ambos extremos pueden ser efectivos de la misma forma en comparación con los ARNs descritos anteriormente. Por lo tanto, los ARNs que comprenden una secuencia parcial de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos contiguos de una de las secuencias de la Tabla 1 o Tabla 2 y difieren en su capacidad para inhibir la expresión del gen de PIK4CB o PIK4CA en una prueba de FACS u otra prueba como se describe aquí más adelante, por no más de 5, 10, 15, 20, 25 o 30% de inhibición a partir de un ARNs que comprende la secuencia completa, son contemplados en la invención. ARNs adicionales que escinden dentro de la secuencia objetivo provisto en la Tabla 1 o la Tabla 2 puede hacerse fácilmente utilizando la secuencia de referencia y las secuencias objetivo provisto.

Además, los agentes de ARNi provistos en la Tabla 1 o la Tabla 2 identifican un sitio útil en el ARNm de PIK4CB o PIK4CA que es particularmente susceptible a la escisión con base en ARNi. Como tal la presente invención incluye agentes de ARNi que están dirigidos dentro de la secuencia buscada por uno de los agentes de la presente invención. Tal como se utiliza aquí se dice que un segundo agente de ARNi está dirigido dentro de la secuencia de un primer agente de ARNi si el segundo agente de ARNi escinde el mensaje en cualquier lugar dentro del ARNm que es complementario a la cadena antisentido del primer agente de ARNi. Tal segundo agente consistirá en general de al menos 15 nucleótidos contiguos, de una de las secuencias provistas en la Tabla 1 o 2, acoplado a secuencias de nucleótido adicionales tomadas en la región contigua a la secuencia seleccionada en el gen objetivo. Por ejemplo, los últimos 15 nucleótidos de SEQ ID NO: 5 combinados con los siguientes 6 nucleótidos del gen PIK4CB producirán un agente de cadena sencilla de 21 nucleótidos que está basado en una de las secuencias provistas en la Tabla 1. Con base en esta cadena doble, podría generarse fácilmente una cadena en sentido complementaria. Esta escindiría el ARNm objetivo en la misma región de sensibilidad que el dúplex original SEQ ID NO: 5. Lo mismo podría hacerse para el PIK4CA con base en las secuencias provistas en la Tabla 2.

El ARNs de la invención puede contener uno o más errores en la secuencia objetivo. En una realización preferida el ARNs de la invención contienen no más de 3 errores. Si la cadena antisentido del ARNs contiene errores frente a una secuencia objetivo, es preferible que el área de errores no esté localizada en el centro de la región de complementariedad. Si la cadena antisentido del ARNs contiene errores con respecto a la secuencia objetivo, es preferible que los errores estén restringidos a 5 nucleótidos desde cada extremo, por ejemplo, nucleótido 5, 4, 3, 2, o 1 desde bien sea del extremo 5' o el 3' de la región de complementariedad. Por ejemplo, para una cadena de ARNs de 23 nucleótidos que es complementaria a una región del gen objetivo PIK4CB, el ARNs en general no contiene ningún error dentro de los 13 nucleótidos centrales. Los métodos descritos dentro de la invención pueden ser utilizados para determinar si un ARNs que contiene un error con respecto a una secuencia objetivo es efectivo en la reducción de la expresión del PIK4CB en una célula. La consideración de la eficacia del ARNs con errores en la inhibición de la expresión de PIK4CB es importante, especialmente si la región particular de complementariedad de PIK4CB es conocida por tener variaciones de secuencias polimórficas en humanos. El mismo análisis puede hacerse para ARNs dirigido a PIK4CA.

En una realización, al menos un extremo del ARNs tiene un sobrante de nucleótido de cadena sencilla de 1 a 4, generalmente 1 o 2 nucleótidos. Los ARNs que tienen al menos 1 nucleótido sobrante tienen propiedades inhibitoras inesperadamente superiores que sus contrapartes con extremos romos. Además, la presencia de solamente un nucleótido sobrante fortalece la actividad de interferencia del ARNs, sin afectar su estabilidad global. El ARNs que tiene solamente un sobrante se ha mostrado particularmente estable y efectivo in vivo, así como en una variedad de células, medios de cultivo celular, sangre y suero. En general, el sobrante de cadena sencilla está localizado en el extremo terminal 3' de la cadena antisentido o, alternativamente, en el extremo terminal 3' de la cadena en sentido. El ARNs también puede tener un extremo romo, generalmente localizado en el extremo 5' de la cadena antisentido. Tales ARNs tienen estabilidad y actividad inhibitora mejoradas, permitiendo así la administración de bajas dosificaciones, esto es menos de 5 mg/kg de peso corporal del receptor por día. En general, la cadena antisentido del ARNs tiene un sobrante de nucleótidos en el extremo 3'. En otra realización, uno o más de los nucleótidos en el sobrante deben ser reemplazados con un tiofosfato de nucleósido.

En la Tabla 1 y la Tabla 2, se muestran pares coincidentes de cadenas de ARN que tienen 2 nucleótidos de ARN de timidina en el extremo 3'. Este motivo T-T es ilustrado porque es un motivo utilizado comúnmente el cual tiende a prestar estabilidad u otras propiedades deseables al ARNs. Así el T-T es una realización adecuada de la invención. No obstante, es bien conocido por los experimentados en la técnica que otras disposiciones de nucleótidos, opcionalmente con enlaces internucleosidos modificados, modificaciones químicas o tapas protectoras pueden ser empleados en el extremo 3' de una cadena de ARNs. Los experimentados en la técnica saben que tales modificaciones llevan a moléculas equivalentes de funcionalidad mejorada porque la secuencia objetivo del ARNm sigue siendo la misma, pero los nucleótidos sobrantes cambiados pueden influir favorablemente sobre otros comportamientos farmacológicos.

En aún otra realización, el ARNs es modificado químicamente para potenciar la estabilidad o proveer otros beneficios terapéuticos. Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser sintetizados y/o modificados por métodos bien establecidos en la técnica, tales como los descritos en "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, Estados Unidos. Las modificaciones químicas pueden incluir, pero no se limitan a modificaciones 2', modificaciones en otros sitios del azúcar o base de un oligonucleótido, introducción de bases no naturales en la cadena de oligonucleótidos, unión covalente a un ligando o unidad estructural química, y reemplazo de los enlaces fosfato internucleótido con enlaces alternativos tales como tiofosfatos. Puede emplearse más de una de tales modificaciones.

El enlazamiento químico de las dos cadenas de ARNs separadas puede ser alcanzado por cualquiera de una variedad de técnicas conocidas, por ejemplo, introduciendo enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno; interacciones hidrófobas, interacciones de van der Waals o de apilamiento; por medio de coordinación metal-ión, o a través del uso de análogos de purina. En general, los grupos químicos que pueden ser utilizados para modificar el ARNs incluyen, sin limitación, azul de metileno; grupos bifuncionales, generalmente bis-(2-chloroetil)amina; N-acetil-N'-(p-gloxiibenzoil)cistamina; 4-tiouracilo; y psoralen. En una realización, el enlazante es un enlazante de hexaetilen glicol. En este caso, los ARNs son producidos por síntesis en fase sólida y el enlazante de hexaetilen glicol es incorporado de acuerdo con métodos estándar (por ejemplo, Williams, D.J., y K.B. Hall, *Biochem.* (1996) 35:14665-14670). En una realización particular, el extremo 5' de la cadena antisentido y el extremo 3' de la cadena en sentido están enlazados químicamente a través de un enlazante de hexaetilen glicol. En otra realización, al menos un nucleótido del ARNs comprende grupos fósforotioato o fósforditioato. El enlace químico en los extremos del ARNs se forma generalmente mediante enlaces de hélice triple. La Tabla 1 y la Tabla 2 proveen ejemplos de secuencias de ARNs que podrían ser modificadas de acuerdo con estas técnicas.

En aún otra realización, los nucleótidos en uno o en ambos de las dos cadenas sencillas pueden ser modificados para evitar o inhibir las actividades de degradación de enzimas celulares, tales como, por ejemplo, sin limitación, ciertas nucleasas. Las técnicas para inhibir la actividad de degradación de enzimas celulares contra ácidos nucleicos son conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitándose a, modificaciones 2'-amino, modificaciones 2'-amino azúcar, modificaciones 2'-F de azúcar, modificaciones 2'-F, modificaciones 2'-alquil azúcar, modificaciones en esqueletos no cargados, modificaciones morfolino, modificaciones 2'-O-metilo y fosforamidato (véase, por ejemplo, Wagner, *Nat. Med.* (1995) 1:1116-8). Así, al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos en un ARNs es reemplazado por un grupo químico generalmente un grupo 2'-amino o 2'-metilo. También, al menos un nucleótido puede ser modificado para formar un nucleótido asegurado. Tal nucleótido asegurado contiene un puente metileno que conecta el oxígeno 2' de la ribosa con el carbono 4' de la ribosa. Los oligonucleótidos que contienen el nucleótido asegurado están descritos en Koshkin, A.A., et al., *Tetrahedron* (1998), 54: 3607-3630) y Obika, S. et al., *Tetrahedron Lett.* (1998), 39: 5401-5404). La introducción de un nucleótido asegurado en un oligonucleótido mejora la afinidad por las secuencias complementarias e incrementa la temperatura de fusión en varios grados (Braasch, D.A. y D.R. Corey, *Chem. Biol.* (2001), 8:1-7).

La conjugación de un ligando a un ARNs puede potenciar su absorción celular así como dirigirse a un tejido particular o ser consumido por tipos específicos de células. En ciertos casos, un ligando hidrófobo se conjuga con el ARNs para facilitar la permeación directa de la membrana celular. Alternativamente, el ligando conjugado con el ARNs es un sustrato para endocitosis mediada por el receptor. Estas metodologías han sido utilizadas para facilitar la permeación en células de oligonucleótidos antisentido así como de agentes de ARNs. Por ejemplo, el colesterol ha sido conjugado con diversos oligonucleótidos antisentido dando como resultado compuestos que son sustancialmente más activos en

- comparación con sus análogos no conjugados. Véase M. Manoharan Antisense & Nucleic Acid Drug Development 2002, 12, 103. Otros compuestos lipofílicos que han sido conjugados con oligonucleótidos incluyen ácido 1-pireno butírico, 1,3-bis-O-(hexadecil)glicerol y mentol. Un ejemplo de un ligando para la endocitosis mediada por receptores es el ácido fólico. El ácido fólico entra en la célula por la endocitosis mediada por el receptor de folato. Los compuestos de ARNs
- 5 que portan ácido fólico podrían ser transportados eficientemente hacia la célula a través de la endocitosis mediada por el receptor de folato. Li y colaboradores reportan que la unión del ácido fólico al terminal 3' de un oligonucleótido dio como resultado un incremento de 8 veces en el consumo celular del oligonucleótido. Li, S.; Deshmukh, H. M.; Huang, L. Pham. Res.1998, 15, 1540. Otros ligandos que han sido conjugados con oligonucleótidos incluyen polietilén glicoles, aglomerados de carbohidratos, agentes de entrecruzamiento, conjugados de porfirina y péptidos de administración.
- 10 En ciertos casos, la conjugación de un ligando catiónico a oligonucleótido dan como resultado una resistencia mejorada a las nucleasas. Ejemplos representativos de ligandos catiónicos son propil amonio y dimetilpropil amonio. De forma interesante, los oligonucleótidos antisentido fueron reportados por retener su alta afinidad de enlazamiento al ARNm cuando el ligando catiónico estaba disperso a través de los oligonucleótidos. Véase M. Manoharan Antisense & nucleic Acid Drug Development 2002, 12, 103 y referencias aquí.
- 15 El ARNs conjugado con ligando de la invención puede ser sintetizado mediante el uso de ARNs que porta una funcionalidad pendiente reactiva, tal como la derivada de la unión de una molécula de enlazamiento sobre el ARNs. Este oligonucleótido reactivo puede hacerse reaccionar directamente con ligandos disponibles comercialmente, ligandos que son sintetizados portando cualquiera de una variedad de grupos protectores, o ligandos que tienen una unidad estructural de enlazamiento unida a los mismos. Los métodos de la invención facilitan la síntesis de ARNs conjugados
- 20 con ligandos mediante el uso de, en algunas realizaciones preferidas, monómeros de nucleósidos que han sido conjugados apropiadamente con ligandos que pueden ser unidos adicionalmente a materiales de soporte sólidos. Tales conjugados ligando-nucleósidos, unidos opcionalmente a un material de soporte sólido, se preparan de acuerdo con algunas realizaciones preferidas de los métodos de la invención a través de la reacción de un ligando seleccionado para enlazamiento de suero con una unidad estructural de enlazamiento localizado en la posición 5' de un nucleósido u
- 25 oligonucleósido. En ciertos casos, un ARNs que porta un ligando alquilo unido al terminal 3' del ARNs se prepara uniendo covalentemente primero un bloque de construcción de monómero a un soporte de vidrio poroso controlado a través de un grupo amino alquilo de cadena larga. Luego, los nucleótidos se enlazan a través de técnicas de síntesis estándar en fase sólida al bloque de construcción de monómero enlazado al soporte sólido. El bloque de construcción de monómero puede ser un nucleósido u otro compuesto orgánico que sea compatible con la síntesis en fase sólida.
- 30 El ARNs utilizado en los conjugados de la invención puede ser conveniente y rutinariamente hecho a través de la técnica bien conocida de la síntesis en fase sólida. Equipamiento para tal síntesis es vendido por varios proveedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Cualquier otro medio para tal síntesis conocida en la técnica puede ser empleado adicional o alternativamente. También es conocido utilizar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tal como los fósforotioatos y los derivados alquilados.
- 35 Las enseñanzas concernientes a la síntesis de oligonucleótidos modificados en particular pueden ser encontradas en las siguientes Patentes de los Estados Unidos: Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,138,045 y 5,218,105, referidas a oligonucleótidos conjugados con poliamina; Patente de los Estados Unidos No. 5,212,295, enfocada a monómeros para la preparación de oligonucleótidos que tienen enlaces de fósforo quirales; Patente de los Estados Unidos Nos. 5,378,825 y 5,541,307, enfocadas a oligonucleótidos que tienen esqueletos modificados, la Patente de los Estados
- 40 Unidos No. 5,386,023; enfocada en oligonucleótidos con esqueleto modificado y la preparación de los mismos a través de acoplamiento reductivo; Patente de los Estados Unidos No. 5,457,191, enfocada a nucleobases modificadas con base en el sistema de anillos de 3-deazapurina y síntesis de los mismos; Patente de los Estados Unidos No. 5,459,255, enfocada a nucleobases modificadas con base en purinas sustituidas en N-2; Patente de los Estados Unidos No. 5,521,302, enfocada a procesos para la preparación de oligonucleótidos que tienen enlace fósforo quirales; Patente de
- 45 los Estados Unidos No. 5,539,082, enfocada a ácidos nucleicos péptidicos; Patente de los Estados Unidos No. 5,554,746, enfocada a oligonucleótidos que tienen esqueletos β -lactama; Patente de los Estados Unidos No. 5,571,902, enfocada a métodos y materiales para la síntesis de oligonucleótidos; Patente de los Estados Unidos No. 5,578,718, enfocada a nucleósidos con grupos alquiltio, en donde tales grupos pueden ser utilizados como enlazantes a otras unidades estructurales unidas en cualquiera de una variedad de posiciones del nucleósido; Patentes de los Estados
- 50 Unidos Nos. 5,587,361 y 5,599,797, enfocadas a nucleótidos que tienen enlaces fósforo tiorato de alta pureza quiral; Patente de los Estados Unidos No. 5,506,351, enfocada a procesos para la preparación de 2'-O-alquil guanosina y compuestos relacionados, incluyendo compuestos de 2,6-diaminopurina; Patente de los Estados Unidos No. 5,587,469, enfocada a oligonucleótidos que tienen purinas sustituidas en N-2; Patente de los Estados Unidos No. 5,587,470, enfocada a oligonucleótidos que tienen 3-deazapurina; Patente de los Estados Unidos No. 5,223,168 y Patente de los
- 55 Estados Unidos No. 5,608,046 ambas enfocadas a análogos de 4'-desmetil nucleósidos; Patentes de los Estados Unidos No. 5,602,240 y 5,610,289, enfocadas a análogos de oligonucleótidos con esqueleto modificado; Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,262,241 y 5,459,255 enfocadas, entre otras cosas, a métodos para sintetizar 2'-fluor-oligonucleótidos. Otras modificaciones favorables se mencionan en US 6670486, Publicaciones PCT Nos. WO 2003082255 y WO 2005021749.

En el ARNs conjugado con ligando y en la molécula ligando que porta nucleósidos enlazados específicos de la secuencia de la invención, los oligonucleótidos y oligonucleósidos pueden ser ensamblados sobre un sintetizador de ADN adecuado utilizando precursores de nucleótidos o nucleósidos estándar, o precursores de conjugados de nucleótidos o nucleósidos que ya portan la unidad estructural de enlazamiento, precursores de ligando-nucleótido o nucleósido de un conjugado que ya porta la molécula del ligando o bloques de construcción no nucleósido-ligando.

Cuando se utilizan precursores nucleótido-conjugado que ya portan una unidad estructural de enlazamiento, la síntesis de los nucleósidos enlazados específicos a la secuencia se completa típicamente, y la molécula del ligando se hace reaccionar con la unidad estructural de enlazamiento para formar el oligonucleótido ligando-conjugado. Los conjugados de oligonucleótidos que portan una variedad de moléculas tales como esteroides, vitaminas, lípidos y moléculas informadoras, han sido descritos previamente (véase Manoharan et al., Solicitud PCT WO 93/07883). En una realización preferida, los oligonucleótidos o nucleósidos enlazados de la invención se sintetizan mediante un sintetizador automatizado utilizando fosforamiditas derivadas de conjugados ligando-nucleósido, además de las fosforamiditas estándar y fosforamiditas no estándar que están disponibles comercialmente y se utilizan rutinariamente en la síntesis de oligonucleótidos.

La incorporación de un grupo 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-alilo, 2'-O-aminoalquilo, 2'-O-metoxietoxi o 2'-desoxi-2'-fluoro en nucleósidos de un oligonucleótido puede proveer propiedades terapéuticas potenciadas para el oligonucleótido, tales como cinética de hibridación potenciada. Adicionalmente, los oligonucleótidos que contienen esqueletos de fósforotioato tienen estabilidad potencial a la nucleasa. Así, los nucleósidos enlazados, funcionalizados de la invención pueden ser aumentados para incluir uno o ambos un esqueleto de fósforotioato, o un grupo con 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-aminoalquilo, 2'-O-alilo, 2'-O-metoxietoxi o 2'-desoxi-2'-fluoro. Un resumen que lista algunas de las modificaciones de oligonucleótidos conocidas en la técnica se encuentran, por ejemplo, en la Publicación PCT WO 200370918.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleósidos funcionales de la invención que poseen un grupo amino en el terminal 5' se preparan utilizando un sintetizador de ADN y luego se hacen reaccionar con un derivado éster activo de un ligando seleccionado. Los derivados éster activos son bien conocidos para los experimentados en la técnica. Los ésteres activos representativos incluyen ésteres de N-hidrosuccinimida, ésteres tetrafluorofenólico, ésteres pentafluorofenólico y ésteres pentaclorofenólicos. La reacción del grupo amino y el éster activo produce un oligonucleótido en el cual el ligando seleccionado está enlazado a la posición 5' a través de un grupo de enlazamiento. El grupo amino en el extremo 5' puede ser preparado utilizando un reactivo C6 modificador de 5' amino. En una realización, las moléculas de ligando pueden ser conjugadas con oligonucleótidos en la posición 5' mediante el uso de una fosforamidita ligando-nucleósido en donde el ligando está enlazado al grupo 5'-hidroxilo directa o indirectamente a través de un enlazante. Tales fosforamiditas ligando-nucleosidos se usan típicamente en el extremo de un procedimiento automatizado de síntesis para proveer un oligonucleótido ligando-conjugado que portan ligando en el terminal 5'.

Ejemplos de enlaces o esqueletos de internucleosidos modificados incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fósforotioatos quirales, fósforditioatos, fósforotriesteres, aminoalquilo fósforotriesteres, metil y otros alquil fosfonatos, incluyendo 3'-alquilen fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquil fosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosforotriesteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, enlazados 2'-5' análogos de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazadas a 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mezcladas y formas ácidas libres.

Patentes representativas de los Estados Unidos relativas a la preparación de los enlaces anteriores que contienen átomos de fósforo incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; y 5,697,248.

Ejemplos de enlaces o esqueletos internucleosidos modificados que no incluyen un átomo de fósforo dentro de sí (por ejemplo oligonucleótidos) tienen esqueletos que son formados por enlaces interazúcar alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces interazúcar mixtos de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo o uno o más enlaces interazúcar heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolina (formados en parte a partir de la porción azúcar de un nucleósido); esqueletos siloxano; esqueletos sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos formacetilo y tioformacetilo; esqueletos metilen formacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos sulfamatos; esqueletos metilen imino y metilen hidrazilo; esqueletos sulfonato y sulfonamida; esqueletos amida; y otros que tienen partes componentes mixtas N, O, S y CH₂; como se nota en la Tabla 1 y la Tabla 2, un par dT-dT puede ser agregado en el extremo 3' de cualquiera (o ambas) cadenas del ARNs. El par dT-dT añadido en estas situaciones usualmente no es complementario con la secuencia objetivo. Estos pares dT-dT, los cuales pueden contener uniones internucleosidos fósforotioato (azufre), se agregan para potenciar la estabilidad.

Patentes de los Estados Unidos representativas relativas a la preparación de los oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; y 5,677,439.

En ciertos casos, el oligonucleótido puede ser modificado por un grupo no ligando. Un cierto número de moléculas no ligando han sido conjugadas a oligonucleótidos con el fin de potenciar la actividad, la distribución celular o el consumo celular del oligonucleótido, y en la literatura hay disponibles procedimientos para llevar a cabo tales conjugaciones. Tales unidades estructurales no ligando han incluido unidades estructurales lipídicos, tales como colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994,4:1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533), una cadena alifática, por ejemplo, residuos dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10:111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glycerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecylrac-glycero-3-H-phosphonate (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777), una poliamina o una cadena polietilen glicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969), o adamantano ácido acético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651), una unidad estructural palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229), o una unidad estructural octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Croke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923). Patentes de los Estados Unidos representativas para enseñar la preparación de tales conjugados de oligonucleótidos ya se han listado más arriba. Protocolos de conjugación típicos que involucran la síntesis de oligonucleótidos que portan un aminoenzimático en una o más posiciones de la secuencia. El grupo amino se hace reaccionar entonces con la molécula que está siendo conjugada utilizando reactivos de acoplamiento o activación apropiados. La reacción de conjugación puede llevarse a cabo bien sea con el oligonucleótido a un enlazado a soporte sólido o después de la escisión del oligonucleótido en fase de solución. La purificación del conjugado de oligonucleótido por HPLC produce típicamente el conjugado puro. El uso de un conjugado de colesterol se prefiere particularmente puesto que tal unidad estructural puede incrementar el direccionamiento hacia las células del hígado que son un sitio primario de infección por virus de ARN de cadena positiva (tal como HCV).

La divulgación presente describe una amplia variedad de realizaciones de ARNs que son útiles para silenciar la expresión de PIK4CB y así prevenir posibles propagaciones del virus de ARN de cadena positiva y para tratar trastornos asociados. Mientras que el diseño del agente terapéutico específico puede tomar una variedad de formas, ciertas características funcionales distinguirán las combinaciones preferidas de ARNs de otras combinaciones de ARNs. En particular, características tales como buena estabilidad en suero, alta potencia, falta de respuesta inmune inducida y buen comportamiento similar a fármaco, todas medibles por los experimentados en la técnica, se han probados para identificar ARNs preferidos de la invención. En algunas situaciones, no todos estos aspectos funcionales estarán presentes en la combinación de ARNs preferida. Pero los experimentados en la técnica son capaces de optimizar estas variables y otras para seleccionar los compuestos preferidos de la invención.

Los inventores están al tanto de los patrones de modificación química que tienden a proveer un beneficio farmacológico, inmunológico y finalmente terapéutico significativamente mejorado. Estos patrones se observan para mejorar el ARNs independientemente de la secuencia objetivo seleccionada. La Tabla 3 fija los patrones de modificaciones químicas preferidas para su uso con el dúplex de ARNs fijado en la Tabla 1 o la Tabla 2. Estos patrones no son mutuamente excluyentes.

Tabla 3 – Modificaciones químicas preferidas de ARNs

Serie de modificación química	Cambios hechos a la cadena en sentido (5' - 3')	Cambios hechos a cadena antisentido (5' - 3')
1	-dTsdT 3'	- dTsdT 3'
2	dTsdT 3', 2'OMe@allPy	dTsdT 3', 2'OMe@Ua, cA
3	dTsdT 3', 2'OMe@allPy	dTsdT 3', 2'OMe@uA,cA,uG,uU
4	Chol ("exo")	dTsdT 3'
5	Chol ("endo")	dTsdT 3', 2'OMe@Ua, cA

6	Chol ("endo")	dTsdT 3', 2'OMe@uA,cA,uG,uU
<p>s = enlace fosforitoato</p> <p>dT = desoxirribotimidina</p> <p>2'OMe = modificación 2'-O-metilo del ARN</p> <p>Py = nucleótido de pirimidina</p> <p>Chol = colesterol. "exo" se refiere a un enlace en el extremo 3'; "endo" significa que el enlace es a un nucleósido interno</p> <p>uA o cA = indica que en una secuencia de ARN UA o CA, la U o la C reciben la modificación indicada. Lo mismo se aplica para uG y uU.</p>		

Agentes de ARNi codificados en vector

5 El ARNs de la invención también puede ser expresado a partir de vectores virales recombinantes por vía intracelular in vivo. Los vectores virales recombinantes de la invención comprenden secuencias que codifican el ARNs de la invención y cualquier promotor adecuado para expresar las secuencias de ARNs. Promotores adecuados incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras U6 o H1 ARN pol III y el promotor del citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está dentro de la habilidad de la técnica. Los vectores virales recombinantes de la invención también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión del ARNs en un tejido en particular o en un ambiente intracelular en particular. El uso de vectores virales recombinantes para administrar el ARNs de la invención a células in vivo se discute en más detalle más adelante.

El ARNs de la invención puede ser expresado a partir de un vector viral recombinante bien sea como dos moléculas de ARN separadas complementarias, o como una molécula de ARN individual con dos regiones complementarias.

15 Puede utilizarse cualquier vector viral capaz de aceptar las secuencias de codificación para las moléculas de ARNs que se van a expresar, por ejemplo vectores derivados de adenovirus (AV); virus adenoasociados (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), Rhabdovirus, virus de leucemia murínica); virus del herpes y similares. El tropismo de los vectores virales puede ser modificado seudotipificando los vectores con proteínas de envoltura u otros antígenos de superficie de otros virus, o sustituyendo diferentes proteínas de cápside viral, según sea apropiado.

20 Por ejemplo, los vectores lentivirus de la invención pueden ser seudotipificados con proteínas de superficie de virus de estomatitis vesicular (VSV), rabia, ebóla, mocola y similares. Los vectores AAV de la invención pueden hacerse para dirigirse a células diferentes manipulando los vectores para expresar diferentes serotipos de proteínas de cápside. Por ejemplo, un vector AAV que expresa una cápside de serotipo 2 en un genoma de serotipo 2 se denomina AAV 2/2. Este gen de cápside de serotipo 2 en un vector AAV 2/2 puede ser reemplazado por un gen de cápside de serotipo 5 para producir el vector AAV 2/5. Las técnicas para construir vectores AAV que expresan diferentes serotipos de proteínas de cápside están dentro del alcance de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801.

30 La selección de vectores virales recombinantes adecuados para el uso de la invención, métodos para insertar secuencias de ácidos nucleicos para expresar el ARNs en el vector, y métodos para suministrar el vector viral a las células de interés están dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Domburg R (1995), Gene Therap. 2: 301-310; Eglitis M A (1988), Biotechniques 6: 608-614; Miller A D (1990), Hum Gene Therap. 1: 5-14; Anderson W F (1998), Nature 392: 25-30; and Rubinson D A et al., Nat. Genet. 33: 401-406.

Vectores virales preferidos son los derivados de AV y AAV. En realizaciones particularmente preferidas, el ARNs de la invención se expresa como dos moléculas de ARN de cadena sencilla complementaria separadas a partir de un vector de AAV que comprende, por ejemplo, los promotores U6 o H1 ARN, o el promotor de citomegalovirus (CMV).

35 Un vector AV adecuado para expresar el ARNs de la invención, un método para construir el vector AV recombinante y un método para administrar el vector en células objetivo, se describen en Xia H et al. (2002), Nat. Biotech 20: 1006-1010.

Vectores AAV adecuados para expresar el ARNs de la invención, métodos para construir el vector AV recombinante, y métodos para administrar los vectores en células objetivo están descritos en Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61:3096-

3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol, 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; Patente de los Estados Unidos No. 5,252,479; Patente de los Estados Unidos No. 5,139,941; solicitud Internacional de Patente No. WO 94/13788; y solicitud Internacional de Patente No. WO 93/24641.

Composiciones farmacéuticas que comprenden ARNds

- 5 En una realización, la invención provee composiciones farmacéuticas que comprenden el ARNds descrito aquí y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención comprende una combinación del ARNds y otro ingrediente de principio activo. La composición farmacéutica que comprende la combinación de ARNds y un ingrediente como principio activo es útil para tratar una enfermedad o trastorno asociado con los procesos patológicos mediados por infección con virus de ARN de cadena positiva.
- 10 Las composiciones farmacéuticas de la invención se administran en dosificaciones suficientes para inhibir la expresión o actividad el gen PIK4CB o PIK4CA. Los presentes inventores han determinado que las composiciones que comprenden el ARNds de la invención pueden ser administradas en dosificaciones sorprendentemente bajas. Una dosificación de 5 mg de ARNds por kilogramo de peso corporal del receptor por día es suficiente para inhibir o suprimir el gen PIK4CB o PIK4CA.
- 15 En general, una dosis adecuada de cada uno de los ARNds en la combinación está en el rango de 0.01 a 0.5 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, generalmente en el rango de 1 microgramo a 1 mg por kilogramo de peso corporal por día. La composición farmacéutica puede ser administrada una vez al día, o el ARNds puede ser administrado en 2, 3 o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día o incluso utilizando infusión continua o administración a través de una formulación de liberación controlada. En ese caso, el ARNds contenido en cada subdosis puede ser correspondientemente más pequeño con el fin de alcanzar la dosificación de área total. La unidad de dosificación puede ser compuesta también para administrar a lo largo de varios días, por ejemplo, utilizando una formulación de liberación sostenida convencional la cual provee liberación sostenida del ARNds a lo largo de un periodo de varios días. En esta realización, la unidad de dosificación contiene un múltiple correspondiente de la dosis diaria.
- 25 La persona experimentada apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y tiempos requeridos para tratar efectivamente un sujeto, incluyendo pero no limitándose a la severidad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición puede incluir un tratamiento sencillo o una serie de tratamientos. Los estimativos de dosificaciones efectivas y vidas medias in vivo para los ARNds individuales abarcados por la invención puede hacerse utilizando metodologías convencionales o sobre la base de pruebas in vivo utilizando un modelo animal apropiado, tal como se describe aquí en otro lugar.
- 30 Los inventores reconocen que por una variedad de razones, puede ser deseable tratar la infección con virus de ARN de cadena positiva con una combinación de dos o más ARNds. Un ARNds es seleccionado de entre el ARNds de la invención, y otro ARNds se seleccionan de entre aquellos ARNds conocidos para dirigirse al virus de ARN de cadena positiva mismo. El ARNds que se dirigen a HCV o HPV u otros virus de ARN de cadena positiva puede ser identificado a partir de publicaciones en la técnica anterior. Una composición farmacéutica de la invención que comprende más de un tipo de ARNds debería contener dosificaciones de ARNds individuales tal como se describen aquí.
- 35 Las combinaciones de ARNds pueden proveerse juntas en una composición farmacéutica en forma de dosificación individual. Alternativamente, puede proveerse una combinación de ARNds en formas de dosificación separados, en cuyo caso pueden ser administradas en el mismo momento o en tiempos diferentes, y posiblemente por medios diferentes. La invención contempla por lo tanto composiciones farmacéuticas que comprenden las combinaciones deseadas de ARNds de la invención y también contempla composiciones farmacéuticas de ARNds individuales que están previstas para ser suministradas como parte de un régimen de combinación. En este último caso, la invención de la terapia de combinación es por lo tanto un método de administración más que una combinación de materia.
- 40 Los avances en la genética de ratones han generado un cierto número de modelos de ratones para el estudio de diversas enfermedades humanas, tales como procesos patológicos mediados por infección de HCV. Tales modelos se utilizan para las pruebas in vivo de ARNds, así como para la determinación de una dosis terapéuticamente efectiva, y combinaciones preferidas de ARNds.
- 45 Puede utilizarse cualquier método para administrar un ARNds de la presente invención a un mamífero que contenga células infectadas con HCV. Por ejemplo, la administración puede ser tópica (por ejemplo, vaginal, transdérmica, etc.); oral; o parenteral (por ejemplo por inyección subcutánea, intraventricular, intramuscular o intraperitoneal, o por goteo intravenoso). La administración puede ser rápida (por ejemplo por inyección), o puede ocurrir durante un periodo de tiempo (por ejemplo, mediante infusión lenta o administración de formulaciones de liberación lenta).
- 50

Para administración tópica, los ARNs pueden ser formulados en composiciones tales como soluciones acuosas estériles y no estériles, soluciones no acuosas en solventes comunes tales como alcoholes, o soluciones en bases oleosas líquidas o sólidas. Tales soluciones también pueden contener reguladores, diluyentes y otros aditivos adecuados. Las composiciones para administración tópica pueden ser formuladas en la forma de parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Pueden formularse geles y cremas utilizando polímeros impermeabilizantes conocidos en la técnica.

Para administración parenteral, intratecal o intraventricular, una molécula de ARNs puede ser formulada en composiciones tales como soluciones acuosas estériles, las cuales también pueden contener reguladores, diluyentes y otros aditivos adecuados (por ejemplo, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos farmacéuticamente aceptables).

Además, las moléculas de ARNs de la invención pueden ser administradas a un mamífero que contiene células infectadas con virus de ARN de cadena positiva utilizando métodos no virales tales como medios biológicos o abiológicos tal como los que se describen en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,271,359. La administración abiológica puede ser lograda mediante una variedad de métodos incluyendo, sin limitación (1) liposomas de carga con una molécula de ácido de ARNs provista allí; (2) complejar una molécula de ARNs con lípidos o liposomas para formar complejos de ácido nucleico lipido o ácido nucleico liposoma; (3) proveer un sistema de administración terapéutica basado en un polímero, nanopartículas o nanoemulsión. Estas técnicas generalmente son bien conocidas en el arte y en otros contextos. Sigue una breve descripción.

El liposoma o complejo de lípidos puede ser compuesto de lípidos catiónicos o neutros utilizados comúnmente para transfectar células in vitro. Los lípidos catiónicos pueden complejarse (por ejemplo, asociarse por cargas) con ácidos nucleicos cargados negativamente para formar liposomas. Ejemplos de liposomas catiónicos incluyen, sin limitación, lipofectina, lipofectamina, lipofectasa y DOTAP. Los procedimientos para formar liposomas son bien conocidos en la técnica. Las composiciones liposómicas pueden formarse, por ejemplo, a partir de fosfatidilcolina, imiristoil fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dimiristoil fosfatidilglicerol, o dioleoil fosfatidiletanolamina. Numerosos agentes lipofílicos están disponibles comercialmente, incluyendo lipofectina.RTM. (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Calif.) and Effectene.TM. (Qiagen, Valencia, Calif.). Además, pueden optimizarse métodos de administración sistémica utilizando lípidos catiónicos comercialmente disponibles tales como DDAB o DOTAP, cada uno de los cuales puede ser mezclado con un lípido neutro tal como DOPE o colesterol. En algunos casos, pueden utilizarse liposomas tales como los descritos por Templeton et al. (Nature Biotechnology, 15: 647-652 (1997)). En algunas realizaciones, la dosificación estará completamente encapsulada en el liposoma, tal como en el SNALP descrito por Morrissey et al. Nat Biotechnol. 2005 Aug;23(8):1002-7. Epub 2005 Jul 24. Véase también Wheeler, J.J. et al. 1999. Gene Ther. 6, 271-281. En otras realizaciones, pueden utilizarse policonjugados tales como polietilenimida para alcanzar la administración in vivo y ex vivo (Boletta et al., J. Am Soc. Nephrol. 7: 1728 (1996)). Información adicional relativa al uso de liposomas para administrar ácidos nucleicos puede encontrarse en la Patente de los Estados Unidos No. 6,271,359, la Publicación PCT WO 96/40964 y Morrissey, D. et al. 2005. Nat Biotechnol. 23(8):1002-7.

La administración biológica puede ser lograda mediante una variedad de métodos, incluyendo, sin limitación, el uso de vectores virales. Por ejemplo, pueden utilizarse vectores virales (por ejemplo, vectores de adenovirus y virus de herpes) para administrar a moléculas de ARNs a células de piel y células cervicales. Las técnicas de biología molecular estándares pueden ser utilizadas para introducir uno o más de los ARNs provistos aquí en uno de los muchos vectores virales diferentes previamente desarrollados para administrar ácidos nucleicos a células. Estos vectores virales resultantes pueden ser utilizados para administrar el uno o más ARNs a células, por ejemplo, por infección.

Los ARNs de la presente invención pueden ser formulados en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" (también denominado aquí como un "excipiente") es un solvente, agente de suspensión u otro vehículo inerte farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos o sólidos, y pueden ser seleccionados con la manera de administración planificada en mente de tal manera que provean el volumen, consistencia y otras propiedades de transporte y químicas pertinentes. Los vehículos farmacéuticamente aceptables típicos incluyen, a manera de ejemplo y sin limitación: agua, solución salina; agentes aglomerantes, por ejemplo polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetil celulosa; agentes de relleno, por ejemplo, lactosa u otros azúcares, gelatina o sulfato de calcio; lubricantes (por ejemplo, almidón, polietilen glicol o acetato de sodio); desintegrantes (por ejemplo, almidón o glicolato de sodio almidón); y agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio).

Además, los ARNs que se dirigen hacia la expresión del gen PIK4CB pueden formularse en composiciones que contienen el ARNs mezclado, encapsulado, conjugado o asociado de alguna otra manera con moléculas (incluyendo agentes terapéuticos de moléculas pequeñas), estructuras moleculares, o mezclas de ácidos nucleicos. Por ejemplo una composición que contiene uno o más agentes de ARNs de la invención pueden contener otros agentes terapéuticos tales como fármacos antiinflamatorios (por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides) y fármacos antivirales (por ejemplo, ribivirin, vidarabine, aciclovir, y ganciclovir).

La toxicidad y eficacia terapéutica de tales compuestos puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar el LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y el ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que exhiben altos índices terapéuticos.

Los datos obtenidos a partir de ensayos en cultivos de células y estudios con animales pueden ser usados para la formulación de un rango de dosificaciones para uso en humanos. La dosificación de las composiciones de la invención cae generalmente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado dentro del método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede ser estimada inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede ser formulada en modelos animales para alcanzar un rango de concentración circulante en plasma del compuesto o, cuando se ha apropiado, del producto polipéptidico de una secuencia objetivo (por ejemplo, alcanzar una concentración disminuida de polipéptidos) que incluye el IC50 (esto es, la concentración del compuesto de prueba que alcanza la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) según se determina en el cultivo celular. Tal información puede ser utilizada para determinar con mayor exactitud las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden ser medidos, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Además de su administración individualmente o como una pluralidad, tal como se discutió anteriormente, los ARNs de la invención pueden ser administrados en combinación con otros agentes conocidos efectivos en el tratamiento de procesos patológicos, mediados por infección por HCV. En cualquier evento, el médico responsable de la administración puede ajustar la cantidad y temporización de la administración de ARNs sobre la base de resultados observados utilizando medidas estándar de eficacia conocidas en la técnica o descritas aquí. Las combinaciones de ARNs pueden ser probadas *in vitro* e *in vivo* usando los mismos métodos empleados para identificación de ARNs sencillos preferidos. Tales combinaciones pueden ser seleccionadas con base en bioinformática pura. Alternativamente, tales combinaciones pueden ser seleccionadas con base en evaluaciones *in vitro* o *in vivo*, junto con las líneas de las descritas aquí para agentes de ARNs sencillo. Una prueba preferida para probar las combinaciones de ARNs es la prueba citada en los ejemplos más adelante.

Métodos para tratar enfermedades causadas por infección con virus de ARN de cadena positiva

Los métodos y composiciones descritos aquí pueden ser usados para tratar enfermedades y condiciones causadas por infección con virus de ARN de cadena positiva (tales como HCV), los cuales pueden ser el resultado de infecciones clínicas o subclínicas.

En resumen, el método para tratar la infección causada por un virus de ARN de cadena positiva comprende administrar a un paciente que así lo requiere, un compuesto que inhibe selectivamente la actividad de la fosfatidilinositol 4-quinasa (PIK4). Tales compuestos pueden ser seleccionados entre moléculas pequeñas, ARNs, una ADN antisentido, una ribozima, o un vector de ADN que codifica las anteriores. Agentes de moléculas pequeñas que son selectivas para PIK4CB y/o PIK4CA en el hígado serían de interés considerable para los propósitos terapéuticos en el tratamiento de la infección por posibles virus de ARN de cadena positiva.

Tales enfermedades y condiciones, aquí denominadas a veces "procesos patológicos mediados por infección con virus de ARN de cadena positiva". La consecuencia hepatológica principal de la infección con HCV es la cirrosis y complicaciones de la misma incluyendo hemorragias, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular. La fibrosis es el resultado de la inflamación crónica que produce la deposición de componentes de matriz extracelular que distorsionan la arquitectura hepática y bloquean la microcirculación y la función del hígado. A medida que la cirrosis avanza y el tejido fibrótico se construye, surge una actividad necroinflamatoria severa y comienza la esteatosis. La esteatosis lleva a patologías extrahepáticas incluyendo diabetes, mala nutrición proteínica, hipertensión, toxinas celulares, obesidad y anoxia. A medida que la fibrosis y la esteatosis se hacen severas el hígado eventualmente fallará y requerirá trasplante de hígado.

En esta especificación, el "método para tratar" o "método de tratamiento" pretenden referirse a métodos que tratan, previenen, son profilácticos contra o reducen el significado de (en un nivel objetivo o subjetivo) uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o condición que es indicada por la expresión.

Al menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por una persona experimentada en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes son los descritos aquí pueden utilizarse en la práctica o probarse de la invención, métodos adecuados y materiales como se describen más adelante. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo las definiciones, tendrá control. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos únicamente y no pretenden ser limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de ARNdS

Fuente de reactivos

5 Cuando la fuente de un reactivo no está específicamente dada aquí, tal reactivo puede ser obtenido de cualquier proveedor de reactivos para biología molecular con un estándar de calidad/pureza para aplicación en biología molecular.

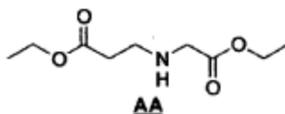
Síntesis de ARNsi

10 Los ARN de cadena sencilla fueron producidos mediante la síntesis en fase sólida en una escala de 1 μ mol usando un sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applied Deutschland GmbH, Darmstadt, Alemania) y vidrio de poro controlado (CPG, 500A, Prologo Biochemie GmbH, Hamburg, Alemania) como soporte sólido. Se generaron ARN y ARN que contenía 2'-O-metil nucleótidos por síntesis en fase sólida empleando las fosforamiditas correspondientes y las 2'-O-metil fosforamiditas, respectivamente (Prologo Biochemie GmbH, Hamburg, Alemania). Estos bloques de construcción fueron incorporados en sitios seleccionados dentro de la secuencia de la cadena de oligorribonucleótidos utilizando la química de nucleósido fosforamidita estándar tal como se describe en Current protocols in nucleic acid chemistry, 15 Beaucage, S.L. et al. (Edrs), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, Estados Unidos. Los enlaces fósforotioato fueron introducidos por reemplazo de la solución oxidante de yodo con una solución del reactivo de Beaucage (Chruachem Ltd, Glasgow, Reino Unido) en acetonitrilo (1%). Los reactivos auxiliares adicionales fueron obtenidos de Mallinckrodt Baker (Griesheim, Alemania).

20 La desprotección y purificación de los oligorribonucleótidos crudos por HPLC con intercambio aniónico fueron llevados a cabo de acuerdo con procedimientos establecidos. Los rendimientos y concentraciones fueron determinados por absorción UV de una solución del ARN respectivo a una longitud de onda de 260 nm utilizando un fotómetro espectral (DU 640B Beckman Coulter GmbH, Unterschleibheim, Alemania). El ARN de cadena doble fue generado mezclando una solución equimolar de cadenas complementarias en un regulador de fusión (fosfato de sodio 20 mM, pH 6.8; cloruro de sodio 100 mM), calentado en un baño de agua a 85 – 90°C durante 3 minutos y enfriado a temperatura ambiente 25 durante un periodo de 3- 4 horas. La solución de ARN fusionado fue almacenada a -20°C hasta su uso.

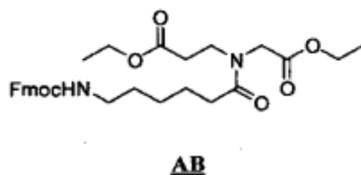
Para la síntesis de ARNsi conjugados con 3'-colesterol (denominados aquí como -Chol-3'), se utilizó un soporte sólido apropiadamente modificado para la síntesis de ARN. El soporte sólido modificado fue preparado como sigue:

Dietil-2-azabutano-1,4-dicarboxilato AA



30 Una solución acuosa 4.7 M de hidróxido de sodio (50 mL) fue agregada a una solución en agitación, y enfriada con hielo de hidroclorehidrato glicinato de etilo (32.19 g, 0.23 mol) en agua (50 mL). Luego se agregó acrilato de etilo (23.1 g, 0.23 mol) la mezcla fue agitada a temperatura ambiente hasta que la terminación de la reacción fue establecida mediante TLC. Después de 19 horas la solución fue sometida a partición con diclorometano (3 x 100 mL). La capa orgánica fue 35 secada con sulfato de sodio anhidro, filtrada y evaporada. El residuo fue destilado para producir el compuesto AA (28.8 g, 61%).

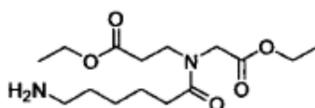
3-(Etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-yl)metoxicarbonil]-amino)-hexanoil]-amino)-propiónico acid etil éster AB



40 El ácido Fmoc-6-amino-hexanoico (9.12 g, 25.83 mmol) fue disuelto en diclorometano (50 mL), y enfriado con hielo. Se agregó diisopropilcarbodiimida (3.25 g, 3.99 mL, 25.83 mmol) a la solución a 0°C. Esto fue seguido entonces por la adición de dietil-azabutano-1,4-dicarboxilato (5 g, 24.6 mmol) y dimetilamino piridina (0.305 g, 2.5 mmol). La solución

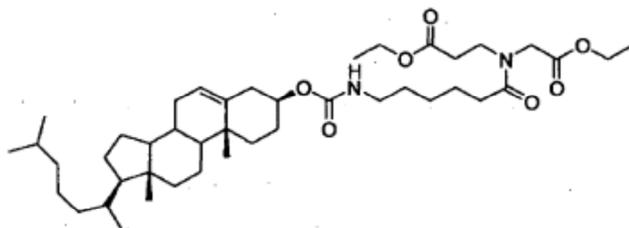
5 fue llevada a temperatura ambiente agitada adicionalmente durante 6 horas. La terminación de la reacción fue establecida por TLC. La mezcla de reacción fue concentrada bajo vacío y se agregó acetato de etilo para precipitar el isopropilo y la urea. La suspensión fue filtrada. El filtrado fue lavado con ácido clorhídrico acuoso al 5%, bicarbonato de sodio al 5% y agua. Las capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre sulfato de sodio y concentradas para dar el producto crudo el cual fue purificado por cromatografía de columna (50% EtOAC/Hexanes) para producir 11.87 g (88%) de AB.

Ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]-propiónico etil éster AC

**AC**

10 3-(etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ylmetoxicarbonilamino-hexanoil)-amino]-propiónico etil éster AB (11.5 g, 21.3 mmol) fue disuelto en piperidina al 20% en dimetilformamida a 0°C. La solución continúa en agitación durante 1 hora. La mezcla de reacción fue concentrada bajo vacío, se agregó agua al residuo, y el producto fue extraído con acetato de etilo. El producto crudo fue purificado por conversión en su sal de clorhidrato.

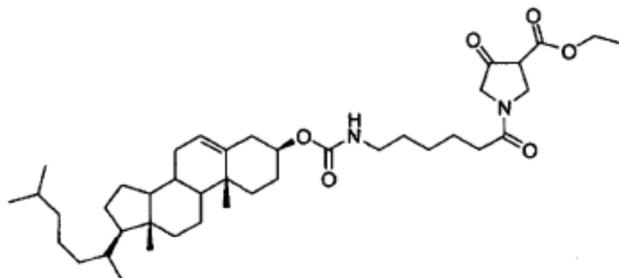
Ácido 3-({6-f 17-(1,5-Dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro- H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil)etoxicarbonilmetil-amino)-propiónico etil éster AD

**AD**

15 La sal de clorhidrato del ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]-propiónico etil éster AC (4.7 g, 14.8 mmol) fue tomada en diclorometano. La suspensión fue enfriada a 0°C sobre hielo. A la suspensión se agregó diisopropiletilamida (3.87 g, 5.2 mL, 30 mmol). A la solución resultante se agregó cloroformiato de colesterilo (6.675 g, 14.8 mmol). La mezcla de reacción fue agitada durante la noche. La mezcla de reacción fue diluida con diclorometano, y lavada con ácido clorhídrico al 10%. El producto fue purificado por cromatografía instantánea (10.3 g, 92%).

20

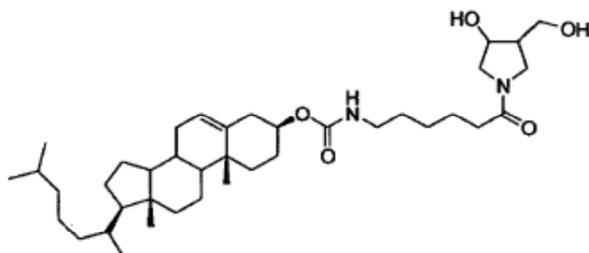
Ácido 1-[6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil]-4-oxo-pirrolidin-3-carboxílico etil éster AE

**AE**

25 Se suspendió t-butoxido de potasio (1.1 g, 9.8 mmol) en 30 mL de tolueno seco. La mezcla fue enfriada a 0°C sobre hielo y se agregaron 5 g (6.6 mmol) del diéster AD lentamente con agitación durante 20 minutos. La temperatura se mantuvo por debajo de 5°C durante la adición. La agitación se continuó durante 30 minutos a 0°C y se agregó 1 mL de

ácido acético glacial, seguido inmediatamente por 4 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 40 mL de agua. La mezcla resultante fue extraída dos veces con 100 mL de diclorometano cada vez y los extractos orgánicos combinados fueron lavados dos veces con 10 mL de regulador de fosfato cada uno, secados, y evaporados hasta sequedad. El residuo fue disuelto en 60 mL de tolueno, enfriado a 0°C y extraído con tres porciones de 50 mL de regulador de carbonato frío de pH 9.5. Los extractos acuosos fueron ajustados a pH 3 con ácido fosfórico, y extraídos con 5 porciones de 40 mL de cloroformo las cuales fueron combinadas, secada y evaporadas hasta sequedad. El residuo fue purificado por cromatografía de columna utilizando acetato de etilo/hexano al 25% para producir 1.9 g del b-cetoéster (39%).

Ácido [6-(3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidin-1-il)-6-oxo-hexil]-carbámico 17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il éster AF

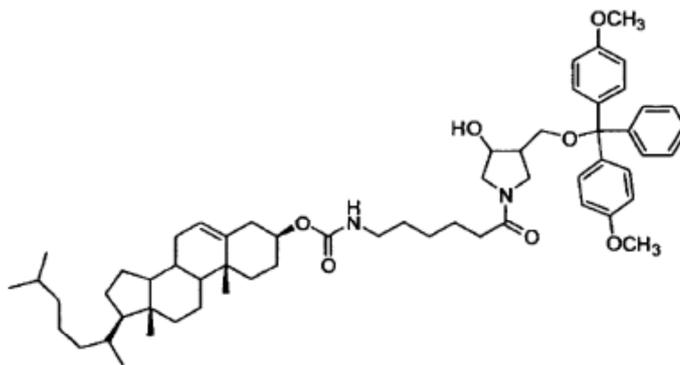
**AF**

10

Se agregó metanol (2 mL) gota a gota durante un periodo de 1 hora a una mezcla en reflujo del b-cetoéster AE (1.5 g, 2.2 mmol) y borohidruro de sodio (0.226 g, 6 mmol) en tetrahidrofurano (10 mL). Se continuó con agitación a temperatura de reflujo durante 1 hora. Después de enfriar a temperatura ambiente, se agregó HCl 1 N (12.5 mL), la mezcla fue extraída con acetato de etilo (3 x 40 mL). La capa combinada de acetato de etilo fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y concentrada bajo vacío para generar el producto el cual fue purificado por cromatografía de columna (10% MeOH/ CHCl_3) (89%).

15

Ácido (6-{3-[Bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-4-hidroxi-pirrolidin-1-il}-6-oxo-hexil)-carbámico 17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il éster AG

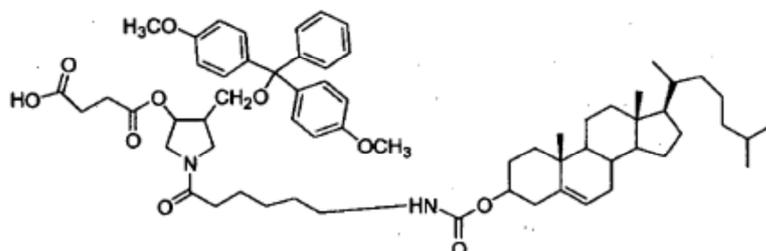
**AG**

Se secó el diol AF (1.25 gm, 1.994 mmol) evaporando con piridina (2 x 5 mL) in vacuo. Se agregó piridina anhidra (10 mL) y 4,4'-dimetoxitritilcloruro (0.724 g, 2.13 mmol) con agitación. La reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente durante la noche. La reacción fue detenida mediante la adición de metanol. La mezcla de reacción fue concentrada bajo vacío y se agregó diclorometano al residuo (50 mL). La capa orgánica fue lavada con bicarbonato de sodio acuoso 1 M. La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro, filtrada y concentrada. La piridina residual fue eliminada por evaporación con tolueno. El producto crudo fue purificado por cromatografía de columna MeOH/Cloroform, $R_f = 0.5$ in 5% MeOH/ CHCl_3) (1.75 g, 95%).

20

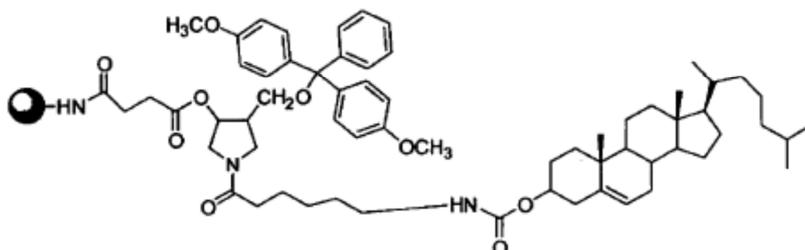
25

Ácido succínico mono-(4-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-1-(6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il)-oxi-carbonilamino]-hexanoil)-pirrolidin-3-il) éster AH

**AH**

5 El compuesto AG (1.0 g, 1.05 mmol) fue mezclado con anhídrido succínico (0.150 g, 1.5 mmol) y DMAP (0.073 g, 0.6 mmol) y se secó en un vacío a 40°C durante la noche. La mezcla fue disuelta en dicloroetano anhidro (3 mL), se agregó trietilamina (0.318 g, 0.440 mL, 3.15 mmol), y la solución fue agitada a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 16 horas. Se diluyó entonces con diclorometano (40 mL) y se lavó con ácido cítrico acuoso frío con hielo (5% en peso, 30 mL) y agua (2 x 20 mL). La fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro y concentrada hasta sequedad. El residuo fue utilizado como tal para la siguiente etapa.

CPG derivado de colesterol AI

**AI**

10

Se disolvió succinato AH (0.254 g, 0.242 mmol) en una mezcla de diclorometano/acetonitrilo (3:2, 3 mL). A esa solución se agregaron sucesivamente DMAP (0.0296 g, 0.242 mmol) en acetonitrilo (1.25 mL), 2,2'-Dithio-bis(5-nitropiridina) (0.075 g, 0.242 mmol) en acetonitrilo/diclorometano (3:1, 1.25 mL). A la solución resultante se agregó trifetilfosfina (0.064 g, 0.242 mmol) en acetonitrilo (0.6 ml). La mezcla de reacción cambió a un color naranja brillante. La solución se agitó brevemente utilizando un agitador con opción de muñeca (5 minutos). Se agregó un alquilamina-CPG (LCAA-CPG) de cadena larga (1.5 g, 61 mM). La suspensión fue agitada durante 2 horas. El CPG fue filtrado a través de un embudo sinterizado y lavado con acetonitrilo, diclorometano y éter sucesivamente. Los grupos amino sin reaccionar fueron enmascarados utilizando ácido acético/piridina. La carga lograda del CPG fue medida tomando mediciones UV (37 mM/g).

20 La síntesis de ARNs que porta un grupo 5'-12-dodecanoico acid bisdecilamide (denominada como "5'-C32-") o de un grupo derivado de 5'-colesterilo (denominada aquí como "5'-Chol-") fue llevada a cabo como se describe en WO 2004/065601, excepto que, para el derivado de colesterol, la etapa de oxidación fue llevada a cabo utilizando el reactivo de Beaucage con el fin de introducir un enlace fósforoitoato en el extremo 5' del oligómero del ácido nucleico.

Ejemplo 2: Vectores de expresión de ARNs

25 En otro aspecto de la invención, las moléculas de ARNs que modulan la actividad de la expresión de PIK4CB o la actividad de expresión de PIK4CA se expresan a partir de unidades de transcripción insertadas en los vectores de ADN o ARN (véase, por ejemplo, Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., International PCT Publication No. WO 00/22113, Conrad, International PCT Publication No. WO 00/22114, and Conrad, US Pat. No. 6,054,299). Estos transgenes pueden ser introducidos como un constructo lineal, un plásmido circular o un vector viral que pueden ser
30 incorporados y heredados como un transgen integrado en el genoma anfitrión. El transgen puede ser construido de tal

manera que permita ser heredado como un plásmido extracromosómico (Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 1292).

Las cadenas individuales de un ARNs pueden ser transcritas por promotores en dos vectores de expresión separados y constransfectadas en una célula objetivo. Alternativamente cada cadena individual del ARNs puede ser transcrita por promotores localizados ambos en el mismo plásmido de expresión. En una realización preferida, un ARNs es expresado como una repetición invertida unida por una secuencia de polinucleótidos enlazante tal que el ARNs tiene una estructura de tallo y bucle.

Los vectores de expresión de ARNs recombinantes son generalmente plásmidos de ADN o vectores virales, vectores virales que expresan ARNs pueden ser contruidos con base en, pero no limitándose a, virus adenoasociados (para una revisión, véase Muzycka, et al., Curr. Topics Micro. Inmunol. (1992) 158:97-129)); adenovirus (véase por ejemplo Berkner, et al., BioTechniques (1998) 6:616), Rosenfeld et al. (1991, Science 252:431-434), and Rosenfeld et al. (1992), Cell 68:143-155)); o alfavirus así como otros conocidos en el arte. SE han usado los retrovirus para introducir una variedad de genes en muchos tipos diferentes de células, incluyendo células epiteliales, in vitro y/o in vivo (véase, e.g., Eglitis, et al., Science (1985) 230:1395-1398; Danos and Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 85:6460-6464; Wilson et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:61416145; Huber et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury et al., 1991, Science 254:1802-1805; van Beusechem. et al., 1992, Proc. Nad. Acad. Sci. USA 89:7640-19 ; Kay et al., 1992, Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu et al., 1993, J. Immunol. 150:4104-4115; Patente de los Estados Unidos No. 4,868,116; Patente de los Estados Unidos No. 4,980,286; Solicitud PCT WO 89/07136; Solicitud PCT WO 89/02468; Solicitud PCT WO 89/05345; y Solicitud PCT WO 92/07573). Vectores retrovirales capaces de transducir y expresar genes insertados en el genoma de una célula pueden ser producidos por transfección del genoma retroviral recombinante en líneas celulares de empaque adecuado tales como PA317 y Psi-CRIP (Comette et al., 1991, Human Gene Therapy 2:5-10; Cone et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. Usa 81:6349). Pueden utilizarse vectores adenovirales recombinantes para infectar una amplia variedad de células y tejidos anfitriones susceptibles (por ejemplo, rata, hámster, perro y chimpancé) (Hsu et al., 1992, J. Infectious Disease, 166:769), y también tienen la ventaja de no requerir células mitóticamente activas para la infección.

La expresión de ARNs conductor promotor en bien sea un plásmido de ADN o en un vector viral de la invención puede ser una ARN polimerasa eucariótica I (por ejemplo promotor de ARN ribosómico), polimerasa II de ARN (por ejemplo promotor CMV temprano o promotor de actina o promotor de U1 ARNs) o el promotor de la polimerasa III ARN generalmente (por ejemplo promotor U6 ARNs o 7SK ARN) o un promotor procariótico, por ejemplo el promotor T7, provisto que el plásmido de expresión también codifica la T7 ARN polimerasa requerida para la transcripción a partir de un promotor T7. El promotor también puede dirigir la expresión transgénica al páncreas (véase, por ejemplo, la secuencia reguladora de insulina para el páncreas (Bucchini et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2511-2515)).

Además, la expresión del transgen puede ser regulada con precisión, por ejemplo, utilizando una secuencia reguladora inducible y sistemas de expresión tales como una secuencia reguladora que es sensible a ciertos reguladores fisiológicos, por ejemplo, niveles de glucosa en circulación, u hormonas (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24). Tales sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión transgénica de células o mamíferos incluyen la regulación por parte de la ecdisona, por parte del estrógeno, la progesterona, la tetraciclina, inductores químicos de la dimerización y el isopropil-beta-D1 – tiogalactopiranosido (EPTG). Una persona experimentada en la técnica será capaz de escoger la secuencia reguladora/promotora apropiada con base en el uso buscado del transgen de ARNs.

En general, los vectores recombinantes capaces de expresar las moléculas de ARNs son suministrados como se describe aquí, y son persistentes en células grandes. Alternativamente, los vectores virales pueden ser usados para proveer la expresión transiente de moléculas de ARNs. Tales vectores pueden ser administrados repetidamente según sea necesario. Una vez expresado, el ARNs se enlaza al ARN objetivo y modula su función expresión. La administración del vector de expresión de ARNs puede ser sistémica, tal como por ejemplo mediante administración intravenosa o muscular, por administración a células objetivo explantadas del paciente seguidas por la reintroducción en el paciente, o por cualquier otro medio que permita la introducción en una célula objetivo deseado.

Los plásmidos de ADN de expresión de ARNs se transfectan típicamente en células objetivo en forma de un complejo con portadores lipídicos catiónicos (por ejemplo, oligofectaminas) o portadores basados en lípidos no catiónicos (por ejemplo Transit-TKOTM). Las transfecciones lipídicas múltiples para eliminaciones mediadas por ARNs dirigidas a diferentes regiones del gen PIK4CB durante un periodo de una semana o más también son contempladas por la invención. La introducción exitosa de los vectores de la invención en las células huésped puede ser monitoreada utilizando diversos métodos conocidos. Por ejemplo, la transfección transiente puede ser señalizada con un informador, tal como un marcador fluorescente, tal como Proteína Fluorescente Verde (GFP). La transfección estable de las células ex vivo puede ser asegurada utilizando marcadores que provean la célula transfectada con resistencia a factores ambientales específicos (por ejemplo, antibióticos y fármacos), tales como resistencia a la higomicina B.

Las moléculas de ARNs específicas para PIK4CB y PIK4CA también pueden ser insertadas en vectores y utilizadas como vectores para terapia genética para pacientes humanos. Los vectores para terapia genética pueden ser administradas a un sujeto, por ejemplo, por inyección intravenosa, administración local (véase Patente de los Estados Unidos No. 5,328,470) o por inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia genética puede incluir el vector de terapia genética en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la cual el vehículo de liberación del gen está embebido. Alternativamente, cuando el vector de administración del gen completo puede ser producido intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores de retrovirus, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que produzcan el sistema de administración genéticos.

10 **Ejemplo 3: Identificación de PIK4CB y PIK4CA como objetivos esenciales en el anfitrión para infección por HCV**

Se utilizó un sistema de administración de ARNs basado en transfección a gran escala para identificar los objetivos PIK4CB y PIK4CA. El sistema fue descrito previamente (Borawski J, Lindeman A, Buxton F, Labow M, Gaither LA, Optimization procedure for small interfering RNA transfection in a 384-well format. J Biomol Screen. 2007 Jun;12(4):546-59. Epub 2007 Apr 13).

15 En el caso presente, el sistema empleó un sistema de replicón subgenómico de HCV diseñado para identificar proteínas anfitrionas esenciales para la replicación del HCV. Se seleccionó una línea celular de replicón subgenómico Huh7 (según lo describe Lohmann, V., et al (1999) Science. 285: 110) utilizando un quinoma (esto es las quinasas conocidas del genoma humano (Dharmacon (Boulder CO)) de biblioteca de ARNs. El sistema de replicón subgenómico de HCV permite que la replicación de HCV sea estudiada in vitro e in vivo utilizando células de hepatoma humano (Huh7) transformadas de manera estable con el genoma HCV modificado que carece de las proteínas estructurales. El replicón subgenómico HCV contiene las proteínas no estructurales en cis con un informador de luciferasa bajo un marcador de selección de neomicina. Este constructo fue diseñado para mediciones estables in vitro de los niveles de ARN del replicón de HCV y la actividad del replicón. La meta de este estudio era utilizar tecnología de selección de ARNs como herramienta para identificar proteína anfitrionas numerosas que inhiben el replicón de HCV subgenómico de células Huh7.

25 Con este fin, se seleccionó un conjunto de reservas inteligentes de ARNs 779 dirigidas al quinoma y se descubrieron nuevos reguladores del replicón de HCV y se verificaron. (Reservas inteligentes se refiere a las mezclas de 4 ARNs individuales en concentraciones equimolares antes de agregar la mezcla a las células). Se identificaron ARNs a PIK4CB (fosfatidilinositol 4-quinasa, catalítico, polipéptidos beta) o PIK4CA (fosfatidilinositol 4-quinasa catalítico, polipéptico alfa) que inhiben la acumulación de la luciferasa desde el replicón viral con alta potencia. Estos datos establecieron que esta proteína celular puede ser utilizada como un fármaco objetivo para la inhibición de la replicación de HCV.

35 La construcción de la línea celular del replicón subgenómico de Huh7 (también llamada aquí células de Clon A) se basa en el genoma de HCV. El genoma HCV de longitud completa está ilustrado en la figura 1A. El genoma de 9.6 kb es un virus de ARN de cadena sencilla positiva con cuatro proteínas estructurales y seis no estructurales. Un rasgo saliente del replicón es el UTR de 5' y 3' que se requieren para una actividad de replicón eficiente. Este virus puede replicar in vitro pero crea virus infecciosos, requiriendo un entrenamiento e instalaciones especiales (Thomson BJ, Finch RG. Hepatitis C virus infection. Clin Microbiol Infect. 2005 Feb; 11(2):86-94.). Por lo tanto el virus infeccioso fue alterado para crear un genoma viral mínimo capaz de replicación in vitro sin la responsabilidad de crear partículas infecciosas. El constructo se muestra en la figura 1B, la región subgenómica de HCV que se utilizó para crear las células Clon A (Lohmann V, Komer F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science. 1999 Jul 2;285(5424):110-3). Este virus fue altamente utilizado para capturar la actividad del replicón de HCV in vitro, en células de hígado humano. Puede crear partículas virales infecciosas pero puede autoreplicarse en el citoplasma, haciéndolo adecuado para estudios de cultivos celulares así como para selecciones de alto rendimiento. Las proteínas estructurales han sido reemplazadas con un gen de resistencia a la neomicina y un informador de la luciferasa de luciérnaga para medir la actividad del replicón. El constructo del Clon Ar está constituido del mismo esqueleto que el virus subgenómico pero las proteínas estructurales han sido retiradas (figura 1C). Esta línea celular fue utilizada para probar si el ARNs no podría inhibir específicamente la actividad o expresión de la luciferasa.

45 Las reservas inteligentes de ARNs dirigidas a 779 quinasas relacionadas filogenéticamente fueron transfectadas en las células del Clon A (replicón genómico de HCV). Se utilizó un dúplex ARNs dirigido contra la luciferasa pGL2 como control positivo para inhibir la actividad de la luciferasa. Las células fueron transfectadas durante 72 horas y la actividad de la luciferasa fue medida utilizando la prueba de luciferasa Bright-Glo (Borawski J, Lindeman A, Buxton F, Labow M, Gaither LA. Optimization procedure for small interfering RNA transfection in a 384-well format. J Biomol Screen. 2007 Jun; 12(4)-546-59. Epub 2007 Apr 13).

Se encontraron que varios ARNs son potentes inhibidores de la actividad de la luciferasa, incluyendo aquellas reservas dirigidas a PIK4CB (NM_002651) y PIK4CA (NM_002650).

Ejemplo 4: Confirmación y medición de la actividad de ARNsi en PIK4CB y PIK4CA

- La confirmación de los aciertos de ARNsi a partir de una selección fue lograda con una serie de etapas incluyendo el análisis de ARNsi específico de genes independientes múltiples así como correlacionando los ARNsi activos fenotípicamente con la eficiencia de la anulación de ARNm. Para confirmar primero la especificidad de los aciertos de ARNsi, se probaron ARNsi de secuencia independiente múltiple tanto para su capacidad para inhibir la actividad de la luciferasa y su incapacidad para afectar la viabilidad celular. Los aciertos de ARNsi también fueron probados en las células Clon Ar (similares a Clon A pero carecen de proteínas estructurales como en la figura 1c) para confirmar que los ARNsi estaban dirigidos específicamente a las proteínas del replicón y no inhiben la actividad de la luciferasa (o la expresión) de una manera independiente del replicón.
- La siguiente etapa fue la validación del fenotipo y de RTPCR. Cuatro ARNsi independientes para PIK4CB y cuatro ARNsi independientes para PIK4CA fueron analizados en cuanto a su capacidad para anular la actividad del replicón, efectos sobre la viabilidad celular y la capacidad para anular niveles de ARNm en el gen objetivo.

El ARNsi empleado en este ejemplo fue el mencionado en la Tabla 1 y Tabla 2.

- La figura 2 demuestra los resultados del ARNds dirigido a PIK4CB y PIK4CA en el ensayo del Clon A. Los resultados de la prueba de los dúplex individuales de asARNds PIK4CA-PIK4CA4 (columna 1-4) como un PIK4CA Smart Pool (col 5) como dúplex individuales PIK4CB 1-PIK4CB4 (col 6-9) o como PIK4CB Smart Pool (col 10). Las células fueron transfectadas durante 72 horas y se midió la actividad de la luciferasa utilizando el ensayo de luciferasa Bright-Glo (Borawski J, Lindeman A, Buxton F, Labow M, Gaither LA. Optimization procedure for small interfering RNA transfection in a 384-well format. J Biomol Screen. 2007 Jun; 12(4):546-59. Epub 2007 Apr 13). Los resultados se miden con respecto a GAPDH (control; columna 11), ensayo llevado a cabo utilizando 25 nM de ARNds por pozo utilizando células Clon A; la actividad Bright-Glo medida a 72 horas después de la transfección. Se utilizó ARNds dirigido a GAPDH (columna 11) como control negativo y ARNds dirigido a pGL2 (columna 12) como control positivo).

- Los resultados de la figura 2 muestran que con respecto a GAPDH, el ARNds dirigido a PIK4CB o PIK4CA puede reducir la expresión del replicón de HCV (medida por la expresión de la luciferasa) en las células de Clon A en al menos 20% y hasta aproximadamente 90%. Se identificó una variedad de actividades intermediarias. Los datos adicionales confirman que el ARNds de esta prueba no oculta la viabilidad celular ni demuestran un efecto significativo no específico sobre las células en la prueba de Clon Ar (datos no mostrados).

La figura 3A y 3B confirma que el ARNds dirigido a PIK4CA es específico para PIK4CA y no para PIK4CB; la figura 3C y 3D confirman que el ARNds dirigido a PIK4CB es específico para PIK4CB y no para PIK4CA.

- Los resultados de la figura 3 fueron generados utilizando un Real-Time PCR. En este método, dos pozos transfectados con ARNsi fueron juntados entre si y se aisló el ARNm utilizando el kit RNeasy96 (Quiagen #74182). Las preparaciones fueron tratadas dos veces con ADNasa 1 durante 15 minutos cada uno. Se genero ADNc utilizando el kit High Capacity Cdna Archive (Applied Biosystems #4322171), y el ARN fue cebado utilizando Oligo dT25 (Sigma Genosys). El regulador de PCR (Roche #1699105) fue suplementado con MgCl2 (Ambion #9530g) como sigue: 10x buffer at 10ml, 1M MgCl2 at 0.55ml, 50uM oligo dT25, 100mM dNTPs at 4ml, RNasin, 20U/ml at 1ml, Multiscribe 50U/ml at 5ml, agua a 12.45ml, y ARN a 66ml para un volumen total de 100ml. El ADNc fue cuantificado utilizando cebadores diseñados en casa, PIK4CA (NM_002650)

Avance: GCCCTGTCTGAAGTGAAGGT, SEQ ID No.: 417

Reverso: CTTTTGCAGCACTCTGCATC, SEQ ID No.: 418

- En 1.662: intrón de cruzamiento 3006 bp a 1690 a 1774 reversado: intrón de cruzamiento 3006 bp a 1690

Se midió la PIK4CB utilizando cebadores diseñados en casa contra PIK4CB (NM_002651)

Avance: ATGGACAAGGTGGTGCAGAT SEQ ID No.: 419

Reverso: CCTCAGTCATGCTCATGTGG SEQ ID No.:420

- En 2334 a 2452: intrón de cruzamiento 981 bp a 2374; (Sigma Genosys) utilizando verde Syber en un Applied Biosystems 7900HT (Applied Biosystems #4329001). En la figura 3, la etiqueta "sp" se refiere al término SMART pool. Se refiere a la mezcla de 4 ARNsi individuales en concentraciones equimolares antes de agregar la mezcla a las células. En un Smart pool, se agregan 4 ARNsi individuales a concentraciones relativamente más bajas (esto es, una concentración equimolar de 50 nM sería una concentración de 12.5 nM para cada ARNsi individual en el Smart pool).

La combinación adicional de los objetivos fue logrado utilizando otro conjunto de 3 dúplex individuales contra PIK4CA (NM_002650, Dharmacon #D-006776) y PIK4CB (NM_002651, Dharmacon #D-006777). El ARNsi se empleó como se indica en la Tabla 1 y en la Tabla 2.

5 Cada ARNsi fue resuspendido en regulador de ARNsi (Dharmacon, #B-002000-UB-015) hasta una concentración de reserva de 20 μ M. 2.5 μ L de cada solución de reserva fueron diluidos en 197.5 μ L de Opti-Mem en una placa de PCR de 96 pozos (ABgene, #AB-1000) para hacer una imagen de trabajo de 250 nM. Se agregaron 0.20 μ L de reactivo de transfección Dharmafect 1 (Dharmacon, #T2001-03) diluido en 10 μ L de Opti-Mem a cada pozo de una placa de cultivo de tejidos de 96 pozos (Costar, #3917). Se agregaron 10 μ L de cada imagen de ARNsi a la placa de 96 pozos que contiene el Dharmafect 1 y se incubó durante 20 minutos para permitir que se formaran los complejos. Después de la incubación, se agregaron 6000 células de replicación subgenómico de HCV en Huh7 en 80 μ L de medio de ensayo por pozo. Las células fueron incubadas durante 72 horas y probadas en cuanto a la actividad de luciferasa y la viabilidad celular (como se describió previamente para la figura 2).

15 En la figura 4 cada uno de los ARNsi fue validado utilizando el Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante. Los ARNsi fueron transfectados en células de replicación subgenómico de HCV Huh7 en un formato de 96 pozos como se describió anteriormente. El ARNm fue aislado utilizando el RNeasy96 kit (Quiagen, #74182). Los ARNm de los pozos duplicados fueron reunidos y se generó ADNc utilizando el Sprint Powerscript Preprimed 96 Plate Oligo (dt) (Clontech Laboratories, #639557). El ADNc fue cuantificado utilizando sondas y cebadores Taqman de Applied Biosystems, PIK4CA (NM_002650, Applied Biosystems #Hs01021073_ml) PIK4CB (NM_002651, Applied Biosystems #Hs00356327_ml) en formato de 384 pozos. Se agregaron 4.8 μ L de ADNc por pozo a una placa de PCR de 384 pozos (Applied Biosystems, #4309849). Se agregaron 0.6 μ L de la sonda Taqman para el gen de interés (GOI), 0.6 μ L sonda de control de β -Actina (Applied Biosystems, #4310881E) and 6 μ L 2x PCR Master Mix (Applied Biosystems, #4304437) al ADNc por pozo. La reacción se llevo a cabo en un sistema Applied Biosystems 7900HT Real Time PCR (Applied Biosystems, #4329001).

25 En la figura 4A las células fueron transfectadas con ARNsi de PI4KA y el ARNm fue medido utilizando las sondas Taqman para PI4KA y PI4KB RT-PCR. En la figure 4B las células fueron transfectadas con ARNsi de PI4KB y el ARNm fue medido utilizando ambas sondas PI4KA and PI4KB RT-PCR Taq man. Como se demuestra en la figura los ARNsi anulaban específicamente sus objetivos designados y no reaccionaron en cruzamiento e inhibieron el otro transcrito de ARNm de PI4K o el control (GAPDH).

Ejemplo 5: Inhibición de la expresión de proteínas anfitrionas y virales

30 En la figura 5 se hicieron lisados de células enteras a partir de células de replicación subgenómico de HCV Huh7 transfectadas con ARNsi o células ingenuas solas. El ARNsi empleado para los resultados en la figura 5 es como se nombra en la Tabla 1 y en la Tabla 2.

35 Las células fueron lisadas con un regulador de inmunoprecipitación (RIPA) (Boston Bioproducts, #BP-115) que contienen una tableta de inhibidor de un coctel de proteasa (Roche, #04693116001) por 10 ml de regulador de lisis. Los lisados fueron cuantificados utilizando el BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, #23227) según las instrucciones del fabricante. Se cargaron cantidades iguales del lisado sobre un gel de Tris-HCL al 15% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, #162-0232) y se corrieron a 200V durante 1 hora. El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, #162-0232), durante 1 hora a 100V. La membrana fue bloqueada en leche al 5% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, #162-0232), TBS-0.1% Tween (Bio-Rad Laboratories, #170-6435, #161-0787), durante 1 hora. Las inmunoprecipitaciones fueron sondeadas con un anticuerpo monoclonal de ratón contra PIK4CB (BD Biosciences, #611817) o un ratón monoclonal contra el NS3 de la proteína HCV (Virostat, #1828) y un anticuerpo monoclonal de ratón para la β -Actina (Sigma, St. Louis, Mo, #5441), como control de carga, diluido en regulador de bloqueo 1:1000 durante 1 hora (no había disponibilidad de anticuerpos contra PIK4CA). Después de tres lavados sucesivos con TBS-0.1% Tween (TBST), anticuerpo secundario conjugado con HRP para IgG de ratón (Sigma, #A4416), diluido en regulador de bloqueo 1:5000, fue agregado durante 1 hora. La membrana fue lavada tres veces en TBST y se visualizaron bandas inmunorreactivas utilizando el sustrato quimioluminiscente Super Signal West Femto (Pierce, #34096). No había anticuerpo para PI4KA disponible de tal manera que solo se detectó la proteína de PI4KB en la figura 5.

50 Los resultados en la figura 5 muestran que los ARNsi de PI4KA no tienen efecto sobre niveles de proteína de PI4KB mientras que los ARNsi de PI4KB ejercen ablación sobre la proteína PI4KB en las células Huh7. Cada ARNsi probado también mostró una reducción medible en la producción de proteína NS3 (viral) con respecto al control, confirmando así la actividad directa sobre la habilidad de la replicación viral. La reducción de los niveles de ARNm utilizando estos ARNsi se correlaciona con la anulación de la proteína sugiriendo que estas proteínas humanas se requieren para la replicación de HCV.

55

Ejemplo 6: Confirmación utilizando ARN de horquilla corto (ARNsh)

- En la figura 6 el ARN de horquilla corto (ARNsh) dirigido a PIK4CA (NM_002650) y PIK4CB (NM_002651), fueron ordenados como 5 ARNsh individuales de Sigma MISSION™. Los ARNsh dirigidos a CD38 (NM_000732), CD28 (NM_006139), CD29 (NM_033666) y GFP (U76561) fueron utilizados como controles negativos para inhibir la replicación de HCV (solamente se muestran datos de GFP). Todas las secuencias de ARNsh fueron construidas como en la biblioteca humana MISSION™ TRC-Hs 1.0 (Human) (Moffat J. et al., A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. Cell, 124, 1283-1298. 2006.; Stewart, S.A., et al., Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells., RNA, 9, 493-501 (2003); Zufferey R, et al., Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo., Nat. Biotechnol. 15, 871-85 (1997).; Zufferey R, et al., Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery., J Virol., 72, 9873-80 (1998).
- 10 Las secuencias de ARNsh fueron frecuencias independientes distintas de las ARNsi reportadas en los experimentos antes mencionados. La Tabla 4 representa las secuencias de ADN correspondientes a la cadena de ARN expresada.

Tabla 4

ARNsh	Secuencia (5´ a 3´)	SEQ ID No.
ShA-1	CCGGGCTGCACAAATACTACATGAACTCGAGTTCATGTAGTATTTGTGCAGCTTTTT	421
ShA-2	CCGGGCGTCTCATCACATGGTACAACCTCGAGTTGTACCATGTGATGAGACGCTTTTT	422
ShA-3	CCGGGCCAGGTTTAAGAACACAGAACTCGAGTTCTGTGTTCTTAAACCTGGCTTTTT	423
ShA-4	CCGGCCAGTTCATCTGGAACATGAACTCGAGTTCATGTTCCAGATGAACTGGTTTTT	424
ShA-5	CCGGCAAGCTCTTGAAGCACAGGTTCTCGAGAACCTGTGCTTCAAGAGCTTGTTTTT	425
ShB-1	CCGGCCAGTTGCTTAACATGTACATCTCGAGATGTACATGTTAAGCAACTGGTTTTT	426
ShB-2	CCGGCCGAGAGTATTGATAATTCATCTCGAGATGAATTATCAATACTCTCGGTTTTT	427
ShB-3	CCGGCCATACAAGATTCTTGTGATTCTCGAGAATCACAAAGATCTTGTATGGTTTTT	428
ShB-4	CCGGCGACATGTTCAACTACTATAACTCGAGTTATAGTAGTTGAACATGTCGTTTTT	429
ShB-5	CCGGTCTCGGTACTIONTAGGACTTGATCTCGAGATCAAGTCCTAAGTACCGAGATTTTT	430

- 15 Para probar el ARNsh, se sembraron 6000 células de replicón subgenómico de HCV Huh7 en placas de cultivo de tejidos de 96 pozos. Al día siguiente, el medio fue reemplazado con medio de transducción que contenía medio de ensayo con polibreno (Sigma H9268) con concentración final de 8 ug/ml y hepes (Invitrogen, # 15630080) con concentración final de 10 mM. Se agregó 1 µL de virus de ARNsh por pozo y las células fueron centrifugadas a 2100 rpm durante 90 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas durante 24 horas y se seleccionaron agregando puromicina (Sigma #9620) a 2 µg/ml de concentración final. Las células fueron incubadas entonces durante un mínimo de 72 horas y probadas en cuanto al fenotipo, analizadas por western y RT-PCR o propagadas durante estudios de anulación a largo plazo. En la figura 6A la expresión del replicón de HCV se mide mediante la actividad de la luciferasa y se normaliza a células transducidas con ARNsh de GAPDH. Los niveles de PI4KA y PI4KB fueron medidos en las células Huh7 después de la transducción del ARNsh utilizando una sonda PI4KA Taqman (figura 6B) o sonda PI4KB Taqman (figura 6C) para RTPCR. Los niveles de la proteína PI4KB y de la proteínaNS3 fueron determinados utilizando los métodos de inmunoprecipitación Western similares a los del ejemplo 5. Los niveles de proteína fueron medidos después de la transducción de ARNsh durante 96 horas (figura 6D) y durante 3 semanas (figura 6E).

- 30 Los resultados en las figuras 6A muestran que el ARNsh dirigido a PI4KA o PI4KB puede reducir la actividad de replicón de HCV medido mediante la actividad de luciferasa y normalizado a células transducidas GAPDH ARNsh. La figura 6B muestra niveles relativos de ARNm de PI4KA después del tratamiento. El ARNsh dirigido a PI4KA demuestra una anulación sustancial, mientras que solamente uno de los que se dirigen a PI4KB tienen un efecto sobre los niveles de

PI4KA (debido quizás al alto número de copias y a la baja reactividad cruzada con PI4KA). La figura 6C muestra que el ARNsh dirigido a PI4KA no tiene efecto sobre los niveles de ARN de PI4KB, mientras que la mayor parte del ARNsh dirigido a PI4KB tiene una anulación significativa de PI4KB. La figura 6D muestra a las 96 horas después del tratamiento, que el ARN dirigido a PI4KA o PI4KB hace disminuir exitosamente la producción de proteína viral NS3 (y que el ARNsh PI4KA no subregula los niveles de proteína PI4KB). Los resultados en la figura 6E muestran que la anulación de la producción de proteína viral puede persistir durante al menos 3 semanas. En conclusión, hubo una clara correlación entre los niveles de reducción de ARNm de PI4KA y de la proteína NS3 indicando que la carga viral en la célula fue inhibida. Hubo una clara correlación entre ARNm de PI4KB y la reducción de proteína y niveles de proteína NS3 indicando que la carga viral en la célula fue inhibida.

10 Ejemplo 7: Tratamiento antes de la infección o después de la infección con virus vivo

En este ejemplo, una inhibición efectiva de la replicación de HCV se logra tratando células antes de la infección con HCV y con ARNsi contra PIK4CA o PIK4CB (figura 7) o tratando las células después de la infección con HCV (figura 8). Este ejemplo también demuestra la dependencia en la dosis de la anulación de ARNm.

Para este experimento los ARNsi contra PIK4CA y PIK4CB (como se designan en la Tabla 1 y la Tabla 2) fueron resuspendidos en un regulador de ARNsi (Dharmacon, #B-002000-UB-015) hasta una concentración de reserva de 20 μ M. Se diluyeron 3 μ L de cada solución de reserva en 197 μ L de Opti-Mem en una placa de PCR de 96 pozos (ABgene, #AB-1000) para hacer una imagen de trabajo de 300 nM. Se diluyeron los ARNsi en Opti-Mem (Invitrogen Cat # 51985-034) como reservas 10x y se agregaron a un medio de cultivo celular completo hasta una concentración final de 25nM, 1.5nM, y 0.1nM. Se agregaron 0.20 μ L de reactivo de transfección Dharmafect 1 (Dharmacon, #T2001-03) diluido en 10 μ L de Opti-Mem a cada pozo de una placa de cultivos de tejidos de 96 pozos (Costar, #3917). 10 μ L de cada imagen de ARNsi fueron agregados a la placa de 96 pozos que contenía el Dharmafect 1 y se incubaron durante 20 minutos para permitir que se formaran los complejos. Después de la incubación, se agregaron 10000 células Huh7.5 en 100 μ L de medio de ensayo por pozo. Las células fueron incubadas durante 24 horas y luego infectadas con el virus del genotipo de HCV infeccioso JFH-1 que contenía un informador renilla. Se utilizó un ARNsi contra renilla como control positivo para inhibir la luciferasa de renilla. El ARNsi fue transfectado antes de la infección con virus vivo (Figure 7A) o después de la infección viral (figura 8A) demostrando que el ARNsi podría bloquear tanto el consumo como la replicación del virus HCV. Los sobrenadantes virales fueron recolectados durante el transcurso del tiempo para medir el virus secretado vivo de las células tal como fue medido por reinfección porcentual de células ingenuas (figura 8B). El porcentaje de anulación del ARNm en las células Huh7 fue determinado por RTPCR (Figure 7B).

Hemos utilizado una selección de ARNsi de replicón de HCV de Huh7 que identificó varios factores huésped novedosos requeridos para una actividad óptima de luciferasa conducida por un replicón. Esta selección fue utilizada para confirmar los hallazgos. Esta selección no mide directamente la replicación viral, se asume que los niveles de expresión de luciferasa están determinados directamente por el número de copias del replicón del virus. Los experimentos ilustrados en la figura 7 y la figura 8 indican que los ARNsi activos descritos aquí dan como resultado en efecto una reducción en la producción de ARN viral.

A partir de una selección de quinoma de reserva inteligente, se han identificado el PIK4CB y el PIK4CA como factores esenciales en el huésped para la replicación del HCV y otros virus de ARN de cadena positiva. Los ARNsi independientes múltiples dirigidos al gen podrían reducir significativamente los niveles de luciferasa a la vez que no tienen efecto sobre la viabilidad celular en las células de replicón. El ARNsi que reduce los niveles de luciferasa también reduce los niveles de ARNm de los genes objetivos respectivos. Así, podemos concluir que los ARNsi usados en este estudio están sobre el objetivo y modulan significativamente la replicación de HCV a través de la reducción de sus genes celulares objetivo.

Sin querer estar limitados por ningún mecanismo de acción particular para explicar nuestros hallazgos, es claro que el significado de estos hallazgos es múltiple. Se requieren enzimas PIK4 para la producción de PtdIns4P en el ER y en los compartimientos de Golgi. La producción de los PtdIns4P se requiere para mantener la integridad de Golgi, los vesículos de yema de los Golgi y las membranas ER, y para modular la producción de Ins (1,4,5)P₃, una molécula de señalización esencial a través del Ins (4,5)P₂ intermediario (Godi A, Pertile P, Meyers R, Marra P, Di Tullio G, Iurisci C, Luini A, Corda D, De Matteis MA. ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P₂ on the Golgi complex. *Nat Cell Biol.* 1999 Sep;1(5):280-7.). Mientras que no se desea estar limitado por ningún mecanismo específico de acción para el descubrimiento presente, es posible que la actividad de las enzimas PIK4 pueda estar relacionada con la replicación de HCV con base en la localización del complejo de replicación de HCV. Si el complejo de replicación requiere Golgi y membranas ER intactos entonces la perturbación de las enzimas PIK4 y la producción de PtdIns4P podrían probablemente bloquear la formación de un ambiente de replicación competente. También, las enzimas de PIK4 son conocidas por regular el tráfico de las cerimidas y el colesterol a través de los Golgi y las membranas ER y ayudar en la formación de rápidos lipídicos (Toth B, Balla A, Ma H, Knight ZA, Shokat KM, Balla T. Fosfatidylinositol 4-kinase IIIbeta regulates the transport of ceramide between the endoplasmic reticulum and Golgi. *J Biol Chem.* 2006 Nov 24;281(47):36369-77.) Es una posibilidad fuerte que el complejo de replicación de HCV requiera rápidos lipídicos para una actividad específica. Si la anulación de PIK4 también perturba el transporte de colesterol y cerimida, también podría contribuir a la inhibición de la replicación de HCV (Ridsdale A, Denis

- M, Gougeon PY, Ngsee JK, Presley JF, Zha X. Cholesterol is required for efficient endoplasmic reticulum-to-Golgi transport of secretory membrane proteins. *Mol Biol Cell*. 2006 Apr; 17(4): 1593-605.). Finalmente, se ha identificado un cierto número de proteínas que contienen dominios PH específicos PIP (4,5) y la localización de tales proteínas parece ser regulada por las enzimas PIK4. Así el papel de PIK4 también puede incluir el redireccionamiento celular o las proteínas virales a sitios de replicación.
- En conclusión, hemos identificado que PIK4CB y PIK4CA son enzimas humanas de factor de anfitrión que se requieren para la replicación de HCV y que los ARNs que se dirigen a estos genes son objetivos terapéuticos adecuados para tratar HCV y otras infecciones por virus de cadena positiva.
- Los experimentados en la técnica están familiarizados con métodos y composiciones además de los citados específicamente en la presente divulgación lo que les permite practicar esta invención hasta el alcance completo de las reivindicaciones anexas aquí.
- La presente divulgación provee un ácido ribonucleico de cadena doble (ARNds) para inhibir la expresión de la fosfatidilinositol 4-quinasa (PI4K) en una célula, en donde dicho ARNs comprende al menos dos secuencias que son complementarias una con otra y en donde una cadena en sentido comprende una primera secuencia y una cadena antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región complementaria que es sustancialmente complementaria a al menos una parte del ARNm que codifica PI4K, y en donde dicha región de complementariedad es menos de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNs por contacto con una célula que expresa dicho gen PI4K, inhibe la expresión de dicho gen PI4K.
- En particular la presente divulgación provee un ácido ribonucleico de cadena doble, en donde la segunda secuencia comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a al menos parte de un ARNm que codifica fosfatidilinositol 4-quinasa, humana, catalítica, de polipéptido beta (PIK4CB).
- Más particularmente la presente divulgación provee un ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicha primera secuencia y dicha segunda secuencia se seleccionan de entre el grupo consistente de la Tabla 1.
- La presente divulgación provee a dicho ácido ribonucleico de cadena doble en donde dicho ARNs comprende al menos un nucleótido modificado.
- En particular la presente divulgación provee un ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicho nucleótido modificado se escoge del grupo de: un nucleótido modificado 2'-O-metilo, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fósforotioato, y un nucleótido terminal enlazado a un derivado de colesterol o a un grupo de bisdecilamida de ácido dodecanoico.
- La presente divulgación provee dicho ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicho nucleótido modificado es escogido del grupo de: un nucleótido modificado 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido modificado 2'-desoxi, un nucleótido asegurado, un nucleótido abásico, un nucleótido modificado 2'-amino, un nucleótido modificado 2'-alquilo, un nucleótido morfolino, un fosforamidato, y un nucleótido que comprende una base no natural.
- La presente divulgación provee dicho ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicha primera secuencia se selecciona del grupo consistente de la Tabla 1 y dicha segunda secuencia se selecciona del grupo consistente de la Tabla 1.
- La presente divulgación provee dicho ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicha cadena antisentido comprende una secuencia la cual es sustancialmente complementaria a al menos parte de un ARNm que codifica fosfatidilinositol 4 quinasa humana, catalítica, de polipéptido alfa (PIK4CA).
- La presente divulgación provee dicho ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicha primera secuencia y dicha segunda secuencia se seleccionan de entre el grupo consistente de la Tabla 2.
- La presente divulgación provee un ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicho ARNs comprende al menos un nucleótido modificado.
- La presente divulgación provee dicho ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicho nucleótido modificado se escoge del grupo de: un nucleótido modificado 2'-O-metilo, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fósforotioato, y un nucleótido terminal enlazado a un derivado de colesterol o a un grupo de bisdecilamida de ácido dodecanoico.
- La presente divulgación provee dicho ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicho nucleótido modificado se escoge del grupo: un nucleótido modificado 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido modificado 2'-desoxi, un nucleótido asegurado, un nucleótido abásico, un nucleótido modificado 2'-amino, un nucleótido modificado 2'-alquilo, un nucleótido morfolino, un fosforamidato, y un nucleótido que comprende una base no natural.

La presente divulgación provee dicho ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicha primera secuencia seleccionada del grupo consistente de la Tabla 2 y en donde dicha secuencia es seleccionada del grupo consistente de la Tabla 2.

La presente divulgación provee una célula que comprende dicho ARNs.

5 La presente divulgación provee una composición farmacéutica para inhibir la expresión del gen fosfatidilinositol 4-quinasa catalítico, de polipéptido beta (PIK4CB) en un organismo, que comprende un ARNs y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el ARNs comprende al menos dos secuencias que son complementarias una con otra y en donde una cadena en sentido comprende una primera secuencia y una cadena antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad la cual es sustancialmente complementaria a al menos parte del ARNm que codifica PIK4CB, y en donde dicha región de complementariedad es menor de 30 nucleótidos en longitud y en donde dicho ARNs, por contacto con una célula que expresa dicho gen PIK4CB, inhibe la expresión del PIK4CB en al menos 10%.

10 En particular la presente divulgación provee dicha composición farmacéutica, en donde dicha primera secuencia de dicho ARNs se selecciona del grupo consistente de la Tabla 1 y dicha segunda secuencia de dicho ARNs se selecciona del grupo consistente de la Tabla 1.

En particular, la presente divulgación provee dicha composición farmacéutica, en donde dicho ARNs comprende al menos un nucleótido modificado.

20 La presente divulgación provee una composición farmacéutica para inhibir la expresión del gen de fosfatidilinositol 4-quinasa, catalítico, de polipéptido alfa (PIK4CA) en un organismo, que comprende un ARNs y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el ARNs comprende al menos dos secuencias que son complementarias una con otra y en donde una cadena en sentido comprende una primera secuencia y una cadena antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria a al menos una parte de un ARNm que codifica PIK4CA y en donde dicha región de complementariedad es menor de 30 nucleótidos en longitud y en donde dicho ARNs, por contacto con una célula que expresa dicho gen de PIK4CA, inhibe la expresión de PIK4CA en al menos 10%.

En particular, la presente divulgación provee dicha composición farmacéutica en donde dicha primera secuencia de dicho ARNs se selecciona del grupo consistente de la Tabla 2 y dicha secuencia de dicho ARNs se selecciona del grupo consistente de la Tabla 2.

30 En particular la presente divulgación provee dicha composición farmacéutica, en donde dicho ARNs comprende al menos un nucleótido modificado.

La presente divulgación provee un método para inhibir la expresión del gen fosfatidilinositol 4-quinasa, catalítico, de polipéptido beta (PIK4CB) en una célula comprendiendo el método:

35 (a) introducir en la célula un ácido ribonucleico de cadena doble (ARNs), en donde el ARNs comprende al menos dos secuencias que son complementarias una con otra y en donde una cadena en sentido comprende una primera secuencia y una cadena antisentido comprende una segunda secuencia que comprenden una región de complementariedad la cual es sustancialmente complementaria a al menos una parte del ARNm que codifica PIK4CB, y en donde dicha región de complementariedad es menor de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNs, por contacto con una célula que expresa dicho gen de PIK4CB, inhibe la expresión de PIK4CB en al menos 40%; y

40 (b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen PIK4CB, inhibiendo por lo tanto la expresión del gen PIK4CB en la célula.

La presente divulgación provee un método para inhibir la expresión del gen de fosfatidilinositol 4-quinasa, catalítico, de polipéptido beta (PIK4CA) en una célula, comprendiendo el método:

45 (a) introducir en la célula un ácido ribonucleico de cadena doble (ARNs), en donde el ARNs comprende al menos dos secuencias que son complementarias una con otra y en donde una cadena antisentido comprende una secuencia final y una cadena antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad la cual es sustancialmente complementaria a al menos una parte del ARNm que codifica PIK4CA, y en donde dicha región de complementariedad es menor de 30 nucleótidos en longitud y en donde dicho ARNs, por contacto con una célula que expresa dicho gen de PIK4CA, inhibe la expresión de PIK4CA en al menos 40%; y

50 (b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen PIK4CA, inhibiendo por lo tanto la expresión del gen PIK4CA en la célula.

- 5 La presente divulgación provee un método para tratar procesos patológicos mediados por infección con un virus de ARN de cadena positiva que comprende administrar a un paciente que requiere tratamiento, prevención o manejo una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de ARNds, y en donde el ARNds comprende al menos dos secuencias que son complementarias una con otra y en donde una cadena en sentido comprende una primera secuencia y una cadena antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad la cual es sustancialmente complementaria a al menos una parte del ARNm que codifica el fosfatidilinositol 4 –quinasa, catalítico, de polipéptido beta (PIK4CB), y en donde dicha región de complementariedad es menor de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNds, por contacto con una célula que expresa el gen de PIK4CB, inhibe la expresión de PIK4CB.
- 10 La presente divulgación provee dicho método para tratar un proceso patológico mediado por una infección por virus de ARN de cadena positiva, en donde dicho virus de ARN de cadena positiva es seleccionado de entre virus de hepatitis C (HCV), virus del papiloma humano (HPV) y virus del dengue.
- 15 La presente divulgación provee un método para tratar un proceso patológico mediado por infección con un virus de ARN de cadena positiva que comprende administrar a un paciente que requiere tratamiento, prevención o manejo una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ARNds, en donde el ARNds comprende al menos dos secuencias que son complementarias una con otra y en donde una cadena en sentido comprende una primera secuencia y una cadena antisentido comprende una segunda secuencia que comprenden una región de complementariedad la cual es sustancialmente complementaria a al menos una parte del ARNm que codifica la fosfatidilinositol 4-quinasa, catalítica, del polipéptido alfa (PIK4CA), y en donde dicha región de complementariedad es menor de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNds, por contacto con una célula que expresa el gen de PIK4CA, inhibe la expresión de PIK4CA.
- 20 La presente divulgación provee dicho método para tratar un proceso patológico mediado por infección con un virus de ARN de cadena positiva, en donde dicho virus de ARN de cadena positiva se selecciona de entre virus de hepatitis C (HCV), virus del papiloma humano (HPV) y virus del dengue.
- 25 La presente divulgación provee un vector para inhibir la expresión del gen de fosfatidilinositol 4-quinasa, catalítico, de polipéptido beta (PIK4CB), en una célula, comprendiendo dicho vector una secuencia reguladora enlazado operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una cadena de un ARNds, en donde una de las cadenas de dicho ARNds es sustancialmente complementaria a al menos parte de un ARNm que codifica PI4KCB en donde dicho ARNds es menor de 30 pares de bases en longitud y en donde dicho ARNds, por contacto con una célula que expresa el gen de PIK4CB, inhibe la expresión de PIK4CB.
- 30 La presente divulgación provee una célula que comprende dicho vector.
- 35 La presente divulgación provee un vector para inhibir la expresión del gen de fosfatidilinositol 4-quinasa, catalítico, de polipéptido alfa (PIK4CA) en una célula, comprendiendo dicho vector una secuencia reguladora enlazada operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una cadena de un ARNds, en donde una de las cadenas de dicho ARNds es sustancialmente complementaria a al menos parte de un ARNm que codifica PIK4CA y en donde dicho ARNds es menor de 30 pares de bases en longitud y donde dicho ARNds por contacto con una célula que expresa el gen PIK4CA, inhibe la expresión de PIK4CA.
- La presente divulgación provee una célula que comprende dicho vector.
- 40 La presente divulgación provee un ácido ribonucleico de cadena doble (ARNds) para reducir el nivel de expresión del gen de fosfatidilinositol 4-quinasa, catalítico, de polipéptido beta (PIK4CB) en donde dicho ARNds comprende al menos dos secuencias que son complementarias una con otra y en donde dicha cadena en sentido comprende una primera secuencia y una cadena antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad la cual es sustancialmente complementaria a al menos una parte del ARNm que codifica PIK4CB, y en donde dicho ARNds, por contacto con una célula que expresa el gen PIK4CB, reduce el nivel de expresión de PIK4CB.
- 45 La presente divulgación provee dicho ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicho contacto reduce el nivel de expresión de PIK4CB en al menos 40%.
- La presente divulgación provee dicho ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicho contacto se lleva a cabo in vitro a 30 nM o menos.
- 50 La presente divulgación provee una composición farmacéutica para reducir el nivel de expresión de PIK4CB en un organismo, que comprende dicho ARNds y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente divulgación provee un método para tratar una infección con un virus de ARN de cadena positiva que comprende administrar a un paciente que requiere tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho ARNds.

La presente divulgación provee dicho método en donde dicho virus de ARN de cadena positiva se selecciona de entre virus de hepatitis C (HCV), virus de papiloma humano (HPV) y virus del dengue.

5 La presente divulgación provee un ácido ribonucleico de cadena doble (ARNds) para reducir el nivel de expresión del gen de fosfatidilinositol 4-quinasa, catalítico, de polipéptido alfa (PIK4CA) en una célula, en donde dicho ARNds comprende al menos dos secuencias que son complementarias una con otra y en donde una cadena en sentido comprende una primera secuencia y una cadena antisentido comprende una segunda secuencia que comprenden una región de complementariedad la cual es sustancialmente complementaria a al menos parte de un ARNm que codifica PIK4CA, y en donde dicho ARNds, por contacto con una célula que expresa el gen PIK4CA, reduce la expresión del nivel de PIK4CA.

10 La presente divulgación provee dicho ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicho contacto reduce el nivel de expresión de PIK4CA en al menos 40%.

La presente divulgación provee dicho ácido ribonucleico de cadena doble, en donde dicho contacto se lleva a cabo in vitro a 30 nM o menos.

15 La presente divulgación provee una composición farmacéutica para reducir la expresión del nivel de PIK4CA en un organismo, comprendiendo dicho ARNds y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente divulgación provee un método para tratar una infección con un virus de ARN de cadena positiva que comprende administrar a un paciente que requiere de tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho ARNds.

20 La presente divulgación provee un método para tratar una infección por virus de ARN de cadena positiva, en donde dicho virus de ARN de cadena positiva es seleccionado de entre virus de hepatitis C (HCV), virus de papiloma humano (HPV) y virus del dengue.

La presente divulgación provee un ARNds seleccionado de entre los listados en la Tabla 1.

La presente divulgación provee una composición farmacéutica que comprende dicho ARNds.

La presente divulgación provee un ARNds seleccionado de entre los listados en la Tabla 2.

25 La presente divulgación provee una composición farmacéutica que comprende dicho ARNds.

La presente divulgación provee una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de ARNds, en donde al menos un ARNds es seleccionado de entre los listados en la Tabla 1, y al menos un ARNds es seleccionado de entre los ARNds que tienen una cadena antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una región sustancialmente complementaria a al menos una parte del ARNm que codifica un virus de ARN de cadena positiva.

30 La presente divulgación provee una composición farmacéutica, en donde dicho virus de ARN de cadena positiva es seleccionado de entre virus de hepatitis C (HCV), virus del papiloma humano (HPV), y virus del dengue.

La presente divulgación provee una composición farmacéutica, en donde cada uno de los ARNds comprende al menos un nucleótido modificado.

35 La presente divulgación provee una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de ARNds, en donde al menos un ARNds es seleccionado de entre los listados en la Tabla 2, y al menos un ARNds es seleccionado de entre aquellos ARNds que tienen una cadena antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos que tienen una región sustancialmente complementaria a al menos una parte de un ARNm que codifica un virus de ARN de cadena positiva.

La presente divulgación provee dicha composición farmacéutica en donde dicho virus de ARN de cadena positiva es seleccionado de entre virus de hepatitis C (HCV), virus del papiloma humano (HPV) y virus del dengue.

40 La presente divulgación provee dicha composición farmacéutica, en donde cada ARNds comprende al menos un nucleótido modificado.

La presente divulgación provee una composición farmacéutica que comprende a) al menos un ARNds seleccionado de entre los listados en la Tabla 1 y la Tabla 2; y b) una modalidad de administración seleccionada de entre i) un liposoma completamente encapsulado; ii) un complejo lipídico; y iii) un polímero.

La presente divulgación provee dicha composición farmacéutica en donde cada ARNs comprende al menos un nucleótido modificado.

La presente divulgación provee dicha composición farmacéutica que comprende adicionalmente una pluralidad de secuencias de ARNs seleccionadas de entre las listadas en la Tabla 1 y la Tabla 2.

- 5 La presente divulgación provee un método para tratar una infección de HCV que comprende administrar a un paciente que requiere de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de dicha composición farmacéutica.

La presente divulgación provee un método para tratar la infección por un virus de ARN de cadena positiva que comprende administrar a un paciente que requiere de la misma, un compuesto que inhibe selectivamente la actividad de la fosfatidilinositol 4-quinasa (PI4K).

- 10 La presente divulgación provee dicho método para tratar la infección por un virus de ARN de cadena positiva en donde el compuesto es seleccionado de entre ARNs, un ADN antisentido ADN, una ribozima, o un vector de ADN que codifica los anteriores. La presente divulgación provee un método para tratar una infección por un virus de ARN de cadena positiva en donde el compuesto es ARNs.

- 15 La presente divulgación provee un método para tratar una infección por un virus de ARN de cadena positiva en donde el compuesto es un ARNs de la invención.

La presente divulgación provee un método para tratar una infección por un virus de ARN de cadena positiva en donde el compuesto es un ARNs que tiene una SEQ ID NO. seleccionado de entre SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 416.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido ribonucleico de cadena doble, que comprende una primera secuencia de SEQ ID NO 210 y una segunda secuencia de cadena de SEQ ID NO 314.
- 5 2. Una molécula de ácido ribonucleico de cadena doble, que comprende una secuencia de cadena antisentido de SEQ ID NO 314 y una secuencia de cadena en sentido de SEQ ID NO 210.
3. La molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende al menos un nucleótido modificado químicamente.
- 10 4. La molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de la reivindicación 3, en donde dicho nucleótido modificado se escoge del grupo consistente del nucleótido modificado 2'-O-metilo, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fósforotioato; un nucleótido terminal enlazado a un derivado colesteroil o a un grupo bisdecilamida de ácido dodecanoico; un nucleótido modificado 2'-desoxi-2'-fluro; un nucleótido modificado 2'-desoxi; un nucleótido asegurado; un nucleótido abásico; un nucleótido modificado 2'-amino; un nucleótido modificado 2'-alquilo; un nucleótido morfolino; un fosforamidato; y un nucleótido que comprende una base no natural.
- 15 5. La molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la molécula por contacto con una célula que expresa un gen PI4KA, inhibe la expresión de dicho gen.
6. Una célula que comprende una molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
7. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 8. Una composición farmacéutica de la reivindicación 7, que comprende un liposoma completamente encapsulado, un complejo lipídico y/o un polímero.
9. Un método in vitro para inhibir la expresión del gen de PI4KA en una célula, comprendiendo el método las etapas de:
 - a. Introducir en la célula un ácido ribonucleico de cadena doble de las reivindicaciones 1 a 5, y
 - b. Mantener la célula producida en la etapa a durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm en PI4KA, inhibiendo por lo tanto la expresión del gen PI4KA en la célula.
- 25 10. La molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de las reivindicaciones 1 a 5 para uso como un medicamento.
11. Uso de la molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de las reivindicaciones 1 a 5 para la manufactura de un medicamento.
- 30 12. La molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de las reivindicaciones 1 a 5 para uso como un medicamento contra infección por virus de ARN de cadena positiva, en donde el virus de ARN de cadena positiva es el virus de la hepatitis C (HCV).
13. Uso de la molécula de ácido ribonucleico de cadena doble de las reivindicaciones 1 a 5 para la manufactura de un medicamento contra una infección por virus de ARN de cadena positiva, en donde el virus de ARN de cadena positiva es el virus de la hepatitis C, (HCV).

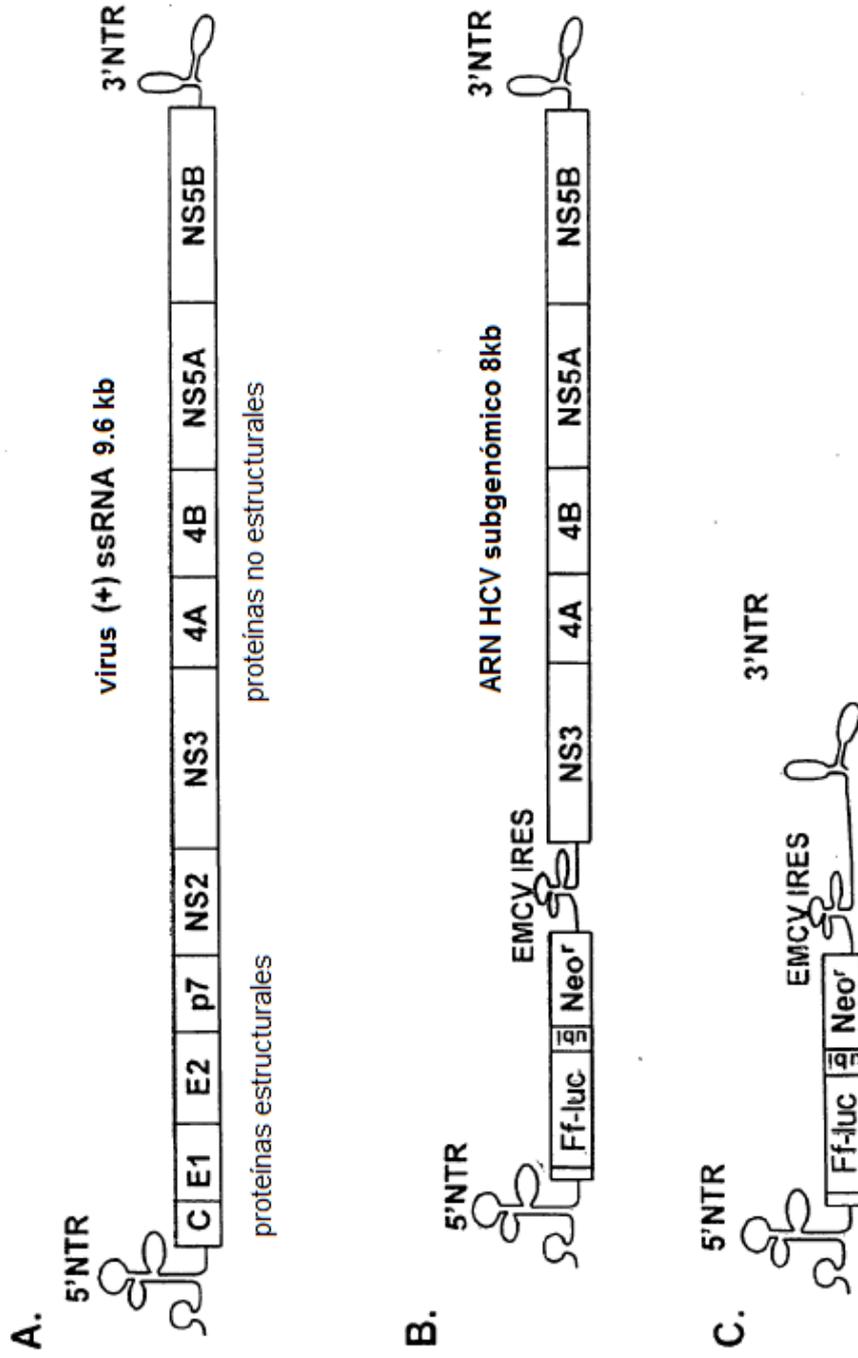


Figura 1

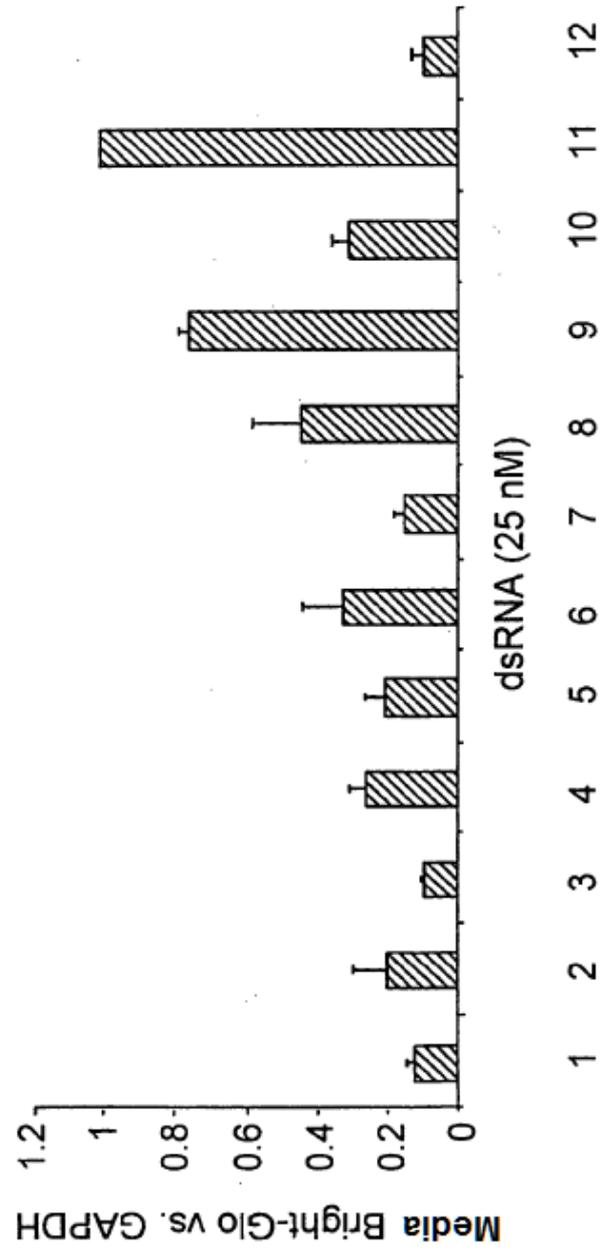


Figura 2

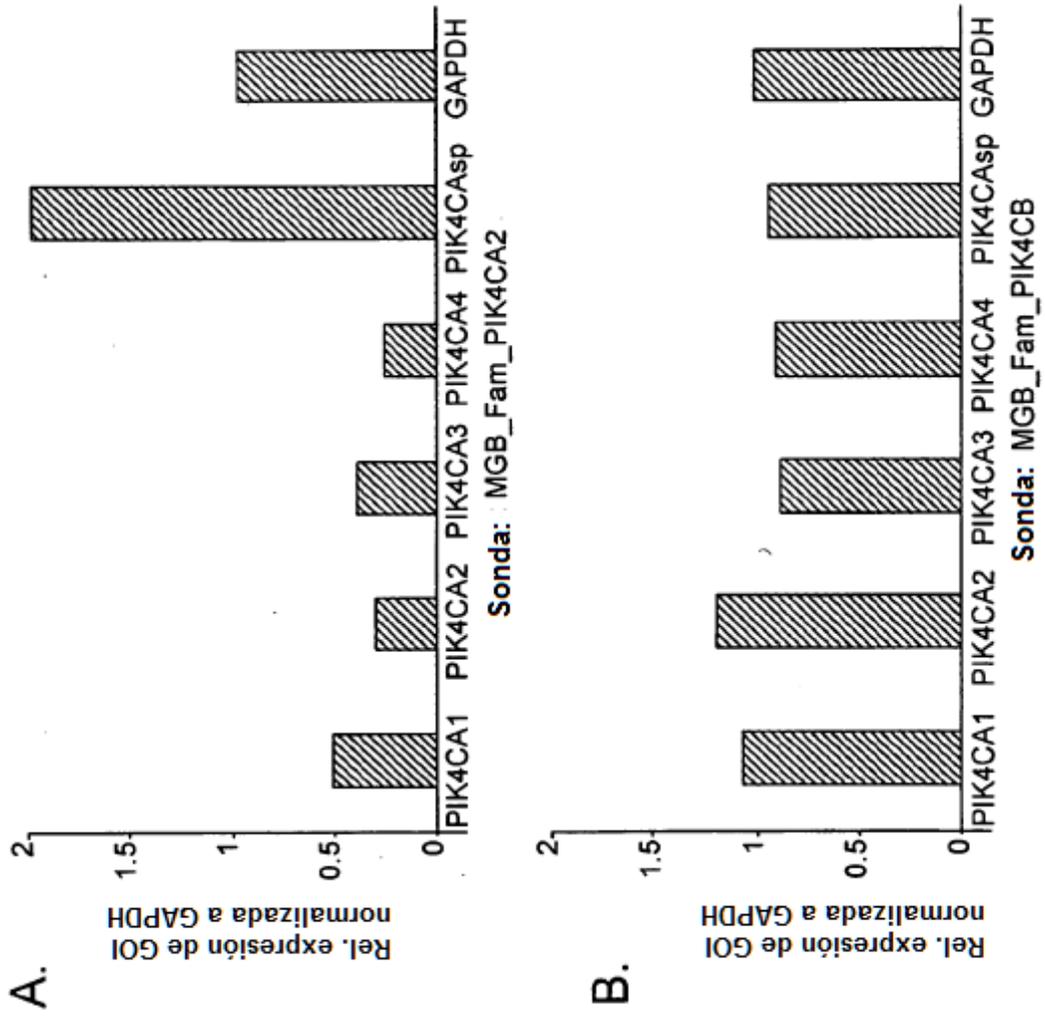


Figura 3

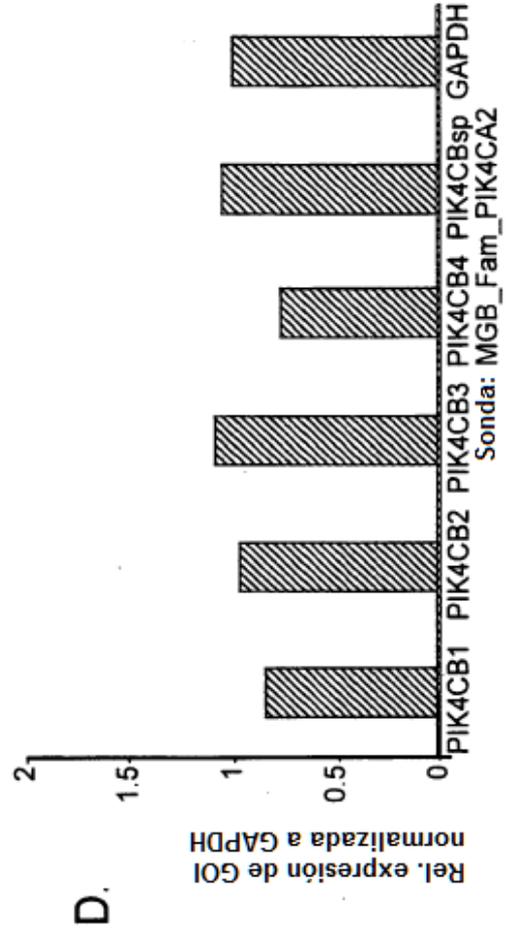
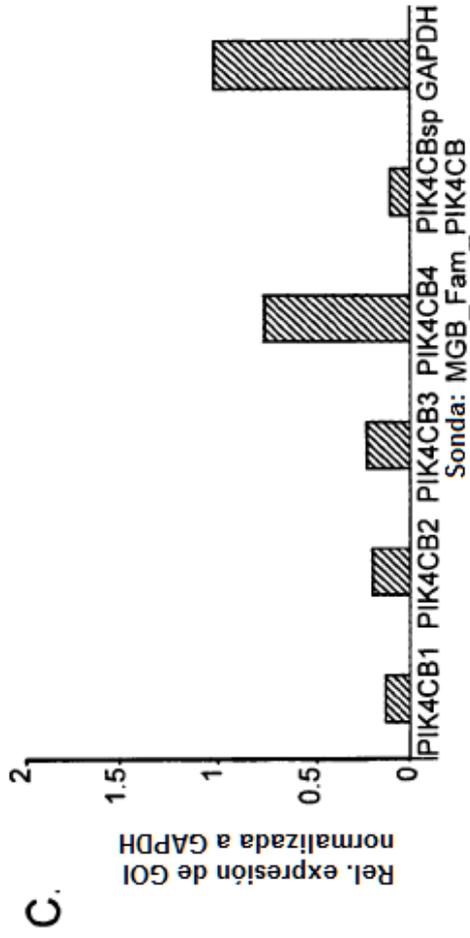


Figura 3 (cont.)

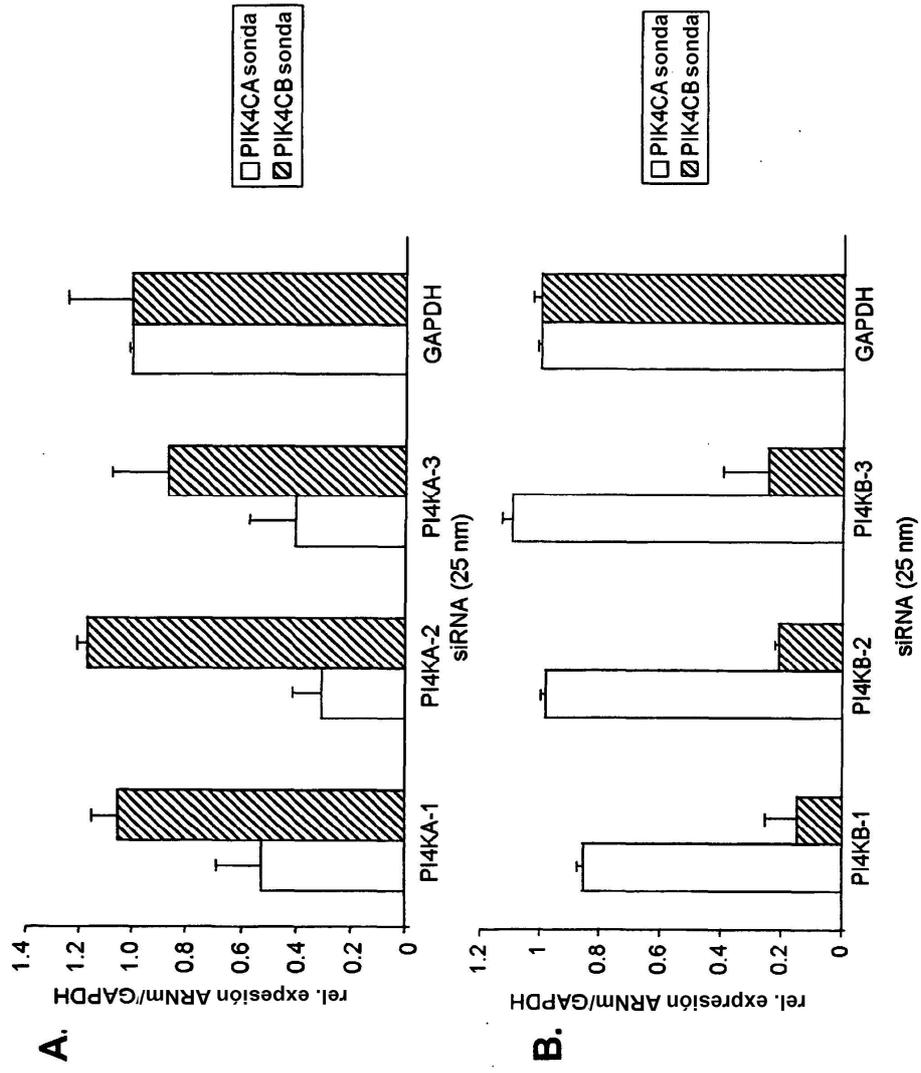
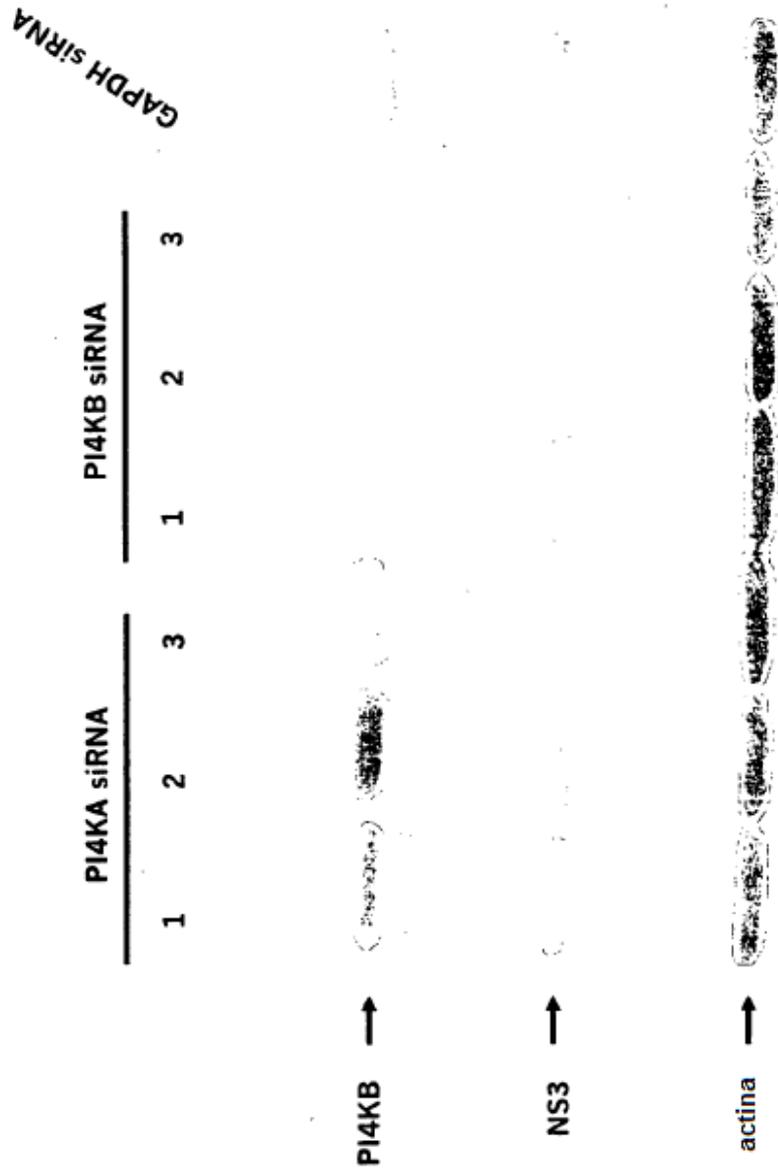


Figura 4

Figura 5



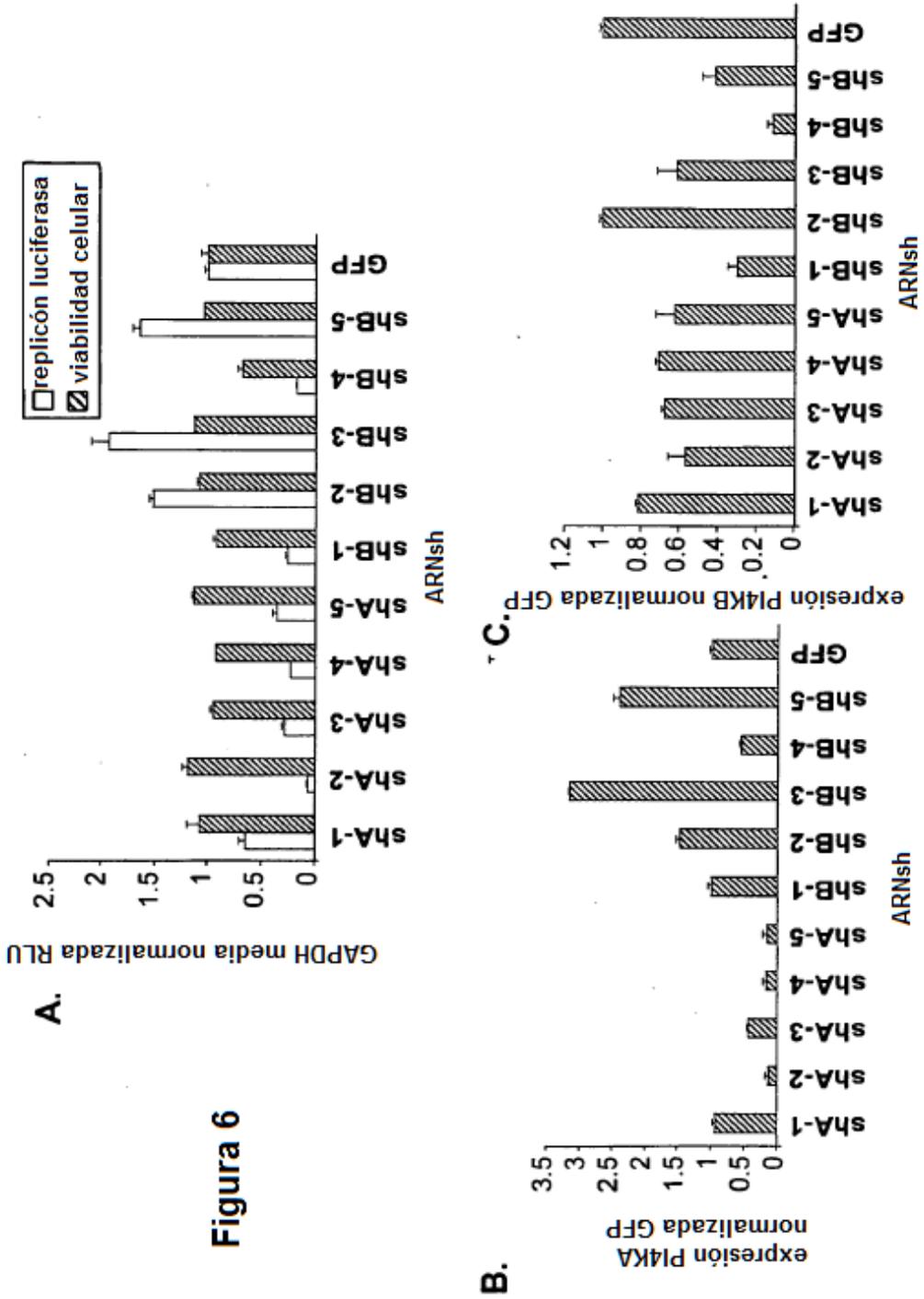


Figura 6

