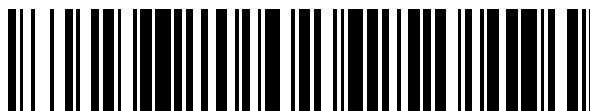


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 584**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2008** **E 10188615 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016** **EP 2319926**

54 Título: **ARNbc para tratamiento de infecciones víricas**

30 Prioridad:

05.07.2007 US 948100 P

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

10.01.2017

73 Titular/es:

**ARROWHEAD RESEARCH CORPORATION
(100.0%)
225 South Lake Avenue, Suite 1050
Pasadena, CA 91101, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 596 584 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

ARNbc para tratamiento de infecciones víricas

La presente invención se refiere al ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) dirigido a la fosfatidilinositol 4-cinasa humana, en particular, a la fosfatidilinositol 4-cinasa humana catalítica, al polipéptido beta (PIK4CB; NM_002651) y/o al fosfatidilinositol 4-cinasa polipéptido alfa humano (PIK4CA; NM_002650) y a su uso (por interferencia del ARN) para tratar procesos patológicos mediados por la infección de virus ARN monocatenario positivo, tales como el virus de la hepatitis C (VHC).

Antecedentes de la invención

Los virus ARN monocatenario positivo de ARN polimerasa dependiente del ARN constituyen una gran superfamilia de virus de muchas subfamilias distintas. Estos virus abarcan tanto el reino vegetal como el animal produciendo patologías que van desde fenotipos leves a enfermedad debilitadora grave. La composición del supergrupo de polimerasas del virus ARN monocatenario positivo es la siguiente. I. Picorna- (VHA, poliomielitis, Coxsackie), noda-, como-, nepo-, poti-, bimo-, sobemovirus y luteovirus (virus amarillo, enano amarillo y de la hoja enrollada). II. Carmo-, tombus-, diantovirus, pestivirus, toga-, eco-, del Dengue, virus de la hepatitis C, flavivirus. III. Tobamo-, tobra-, hordei-, tricoma-, alfa, rubi-, furovirus, virus de la hepatitis E, potex-, carla-, timovirus, y virus de las manchas en las hojas cloróticas del manzano. Los genomas de los virus ARN monocatenario positivo codifican ARN polimerasas dependientes de ARN que es la única proteína vírica que contiene motivos conservados en toda esta clase de virus. Esta conservación es importante ya que esta clase de virus contiene una significativa variabilidad filogenética, se podría predecir que hay muchas maneras en las que los virus infectan células y mantienen la multiplicación estable. Además de las muchas diferencias, todos los virus de esta clase dependen de una sola etapa fundamental de la transcripción del ARN monocatenario positivo dependiente de ARN. Dado que esta etapa es esencial para el ciclo vital vírico este virus utiliza muchas proteínas del anfitrión para iniciar y mantener la actividad dependiente de ARN de la ARN polimerasa. Sin la interacción de los factores del anfitrión los virus serían incapaces de sobrevivir. Por lo tanto, una posible intervención terapéutica para inhibir la infección vírica bloquearía la interacción del virus con el anfitrión. Si los factores del anfitrión son esenciales para el virus, pero no esenciales para que el anfitrión se pueda manipular, entonces podría conseguirse la capacidad de bloquear la infección vírica. Orientación a las proteínas del anfitrión ya se ha demostrado que es un método eficaz para interrumpir la infección vírica y la multiplicación de VIH, VHC, viruela, etc.

La importancia de los virus ARN monocatenario positivo es el impacto sobre la salud humana y la viabilidad. Varios virus ARN monocatenario positivo infectan a seres humanos y en muchos casos conducen a enfermedad debilitadora y/o morbilidad. Varios virus con una carga concreta en la salud humana es el virus del Dengue (fiebre hemorrágica), VHC (hepatopatía crónica, insuficiencia hepática, fibrosis y cáncer) y VHE (insuficiencia hepática fulminante). Las enfermedades del hígado y la sangre producidas por estos virus causan millones de muertes en todo el mundo y cuesta miles de millones de dólares a la industria de atención sanitaria en enfermedades relacionadas con el hígado. La importancia de la búsqueda de terapias para detener la infección vírica es grande y mejoraría la salud humana en todo el mundo.

Como tal, existe una necesidad no satisfecha de tratamiento eficaz de infecciones producidas por VHC y otros virus ARN monocatenario positivo (enumerados anteriormente).

Esta memoria descriptiva también se refiere a moléculas de ARN bicatenario (ARNbc). Se ha demostrado que ARNbc bloquea la expresión génica en un mecanismo regulador muy conservado conocido como interferencia de ARN (ARNi). La patente WO 99/32619 (Fire *et al.*) describe el empleo de un ARNbc de al menos 25 nucleótidos de longitud para inhibir la expresión de genes en *C. elegans*. Se ha demostrado también que el ARNbc degrada el ARN diana en otros organismos, incluidas plantas (véase, por ejemplo, la patente WO 99/53050, Waterhouse *et al.*; y WO 99/61631, Heifetz *et al.*), *Drosophila* (véase, por ejemplo, Yang, D., *et al.*, *Curr. Biol.* (2000) 10: 1191-1200) y mamíferos (véase la patente WO 00/44895, Limmer, y DE 101 00 586.5, Kreutzer *et al.*). Este mecanismo natural se ha convertido en el foco para el desarrollo de una nueva clase de agentes farmacéuticos para el tratamiento de trastornos que son causados por la regulación aberrante o no deseada de un gen.

Las publicaciones PCT WO 2003016572, WO 2003070750, WO 2005028650 y WO 2007001928 describen los esfuerzos previos para desarrollar medicamentos de ARNi basados en ácidos nucleicos para el tratamiento de la enfermedad causada por la infección por VHC. La publicación PCT WO2006074346 describe los esfuerzos previos para el tratamiento de la infección por VRS utilizando medicamentos de ARNi.

A pesar de avances significativos en el campo del ARNi y los avances en el tratamiento de procesos patológicos mediados por la infección vírica, sigue habiendo necesidad de agentes que pueden inhibir la evolución de la infección vírica y que puede tratar enfermedades relacionadas con la infección vírica. La presente invención describe compuestos, composiciones y métodos que cumplen con esta necesidad, y proporcionan otras ventajas también.

Compendio de la invención

La invención proporciona una molécula de ácido ribonucleico bicatenario, que comprende una secuencia SEQ. ID. nº 1 de la primera cadena y una secuencia SEQ. ID. nº 105 de la segunda cadena.

Además, la invención proporciona una molécula de ácido ribonucleico bicatenario, que comprende una secuencia

SEQ. ID. nº 105 de la cadena complementaria y una secuencia SEQ. ID. nº 1 de la cadena transcrita.

La molécula de ácido ribonucleico bicatenario puede comprender al menos un nucleótido modificado químicamente.

El nucleótido modificado puede seleccionarse del grupo que consiste en: un nucleótido modificado con 2'-O-metil; un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato; un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterol o el grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico; un nucleótido modificado con 2'-desoxi-2'-fluoro; un nucleótido modificado con 2'-desoxi; un nucleótido bloqueado; un nucleótido abásico; un nucleótido modificado con 2'-amino; un nucleótido modificado con 2'-alquilo; un nucleótido con morfolino; un fosforamidato; y un nucleótido que comprende una base artificial.

En una realización la molécula tras el contacto con una célula que expresa un gen PI4KB, inhibe la expresión de dicho gen.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que la molécula de ácido ribonucleico bicatenario según las realizaciones de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica puede comprender un liposoma completamente encapsulado, un complejo lipídico y/o un polímero.

15 La invención proporciona también un método *in vitro* para inhibir la expresión del gen PI4KB en una célula, comprendiendo el método las etapas siguientes:

a. Introducir en la célula una molécula de ácido ribonucleico bicatenario según las realizaciones de la invención, y

20 b. Mantener la célula producida en la etapa a durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito del ARNm del gen PIK4B, inhibiendo de este modo la expresión del gen PIK4B en la célula.

Además, la invención proporciona una molécula de ácido ribonucleico bicatenario según las realizaciones de la invención para su uso como medicamento.

La invención proporciona además una molécula de ácido ribonucleico bicatenario según las realizaciones de la invención para su uso como medicamento contra la infección por el virus ARN monocatenario positivo, en donde el virus ARN monocatenario positivo es el virus de la hepatitis C, (VHC).

Además, la invención proporciona el uso de la molécula de ácido ribonucleico bicatenario según las realizaciones de la invención para la fabricación de un medicamento contra la infección por el virus ARN monocatenario positivo, en donde el virus ARN monocatenario positivo es el virus de la hepatitis C, (VHC).

Compendio de la descripción

30 La descripción proporciona composiciones y métodos para tratar la infección por virus ARN monocatenario positivo (tales como, VHC, VPH, del Dengue y de la poliomielitis), al reducir el nivel o actividad del factor fosfatidilinositol 4-cinasa del anfitrión humano, catalítico, polipéptido beta, (PIK4CB; NM_002651), y/o fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítico, polipéptido alfa (PIK4CA; NM_002650) en células donde dichos virus se multiplicarían, tales como las del hígado.

35 Se describe en la presente memoria que la proliferación de los virus ARN monocatenario positivo puede inhibirse empleando ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para hacer imperceptible la expresión del gen PIK4CB y/o PIK4CA de las células anfitrionas humanas, requerido para su proliferación.

La descripción proporciona varias realizaciones, incluyendo, en particular:

40 Un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de nivel o la actividad de fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K) en una célula, en donde dicho ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en donde una cadena transcrita comprende una primera secuencia y una cadena complementaria comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica PI4K, y en donde dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNbc, en contacto con una célula que expresa dicho gen PI4K, inhibe la expresión de dicho gen PIK4. Dicho ARNbc puede tener modificaciones químicas, y puede estar conjugado con otros restos. Además, dicho ARNbc puede proporcionarse en una composición farmacéutica.

45 Un método incorporado es un método para inhibir la expresión del gen fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido beta (PIK4CB), o del gen fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido alfa (PIK4CA), en una célula, método que comprende:

55 (a) introducir en la célula un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), en donde el ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en donde una cadena transcrita comprende una primera secuencia y una cadena complementaria comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica PIK4CB o PIK4CA, y en donde dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud; y

(b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen PIK4CB (o PIK4CA, según se seleccione), inhibiendo con ello la expresión o actividad de PIK4CB (o PIK4CA, según se seleccione) en la célula.

5 Alternativamente, la descripción incorpora un método de tratamiento de procesos patológicos mediados por la infección por virus ARN monocatenario positivo que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento, un ARNbc de la invención. El virus ARN monocatenario positivo puede seleccionarse de entre los virus de la hepatitis C (VHC), virus del papiloma humano (VPH) y virus del Dengue.

Las realizaciones alternativas comprenden un vector para la inhibición de la expresión de PIK4CB o PIK4CA en una célula; y las células que comprenden dichos vectores.

10 Una realización alternativa comprende un método de tratamiento de una infección por VHC que comprende administrar a un paciente necesitado de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un ARNbc de la invención.

Breve descripción de las figuras

15 Figura 1. Estructura de los montajes del VHC. A. Genoma completo del VHC. B. Replicón de VHC subgenómico, utilizado para las células del Clon A (replicón subgenómico). Las proteínas estructurales se sustituyen por un gen de resistencia a la neomicina y un gen informador de luciferasa de luciérnaga aguas abajo de UTR 5'. C. Montaje informador con las proteínas del VHC retiradas, utilizado para las células del clon Ar (células que carecen del replicón subgenómico).

20 Figura 2. Validación del fenotipo de impactos de ARNip. Impactos de ARNip del cinoma a gran escala filtrados y reanalizados. A. Resultados de las pruebas de ARNbc como parejas individuales PIK4CA1-PIK4CA4 (columna 1-4), como PIK4CA Smart Pool (col. 5), como parejas individuales PIK4CB1-PIK4CB4 (col. 6-9) o como PIK4CB Smart Pool (Col. 10). Los resultados se determinan con respecto a GAPDH (referencia; columna 11), ensayo realizó utilizando 25 nM de ARNbc por pocillo usando células Clone A; actividad de Bright-Glo determinada 72 horas después de la transfección. Se utilizó ARNbc dirigido a GAPDH (columna 11) como referencia negativa y ARNbc
25 dirigido a pGL2 (columna 12) fue la referencia positiva.

Figura 3. RT-PCR de PIK4CA y PIK4CB. Se transfectaron células de replicón Huh7 con ARNip durante 72 horas, se aisló el ARNm y el análisis RT-PCR se realizó por Taqman. Los resultados se normalizaron a células transfectadas con GAPDH. A. Transfección de los ARNip PIK4CA, Taq hombre RT-PCR utilizando cebadores PIK4CA. B. Transfección de los ARNip PIK4CA, Taq hombre RT-PCR utilizando cebadores PIK4CB. C. Transfección de los
30 ARNip PIK4CB, Taq hombre RT-PCR utilizando cebadores PIK4CB. D. Transfección de los ARNip PIK4CB, Taq hombre RT-PCR utilizando cebadores PIK4CA. GDI = Gen de interés. PIK4CAsp = PIK4CA Smart Pool; PIK4CBsp = PIK4CB Smart Pool.

Figura 4. A) Expresión de ARNm de PIK4CA (barras claras) o de PIK4CB (barras oscuras) después del tratamiento por el ARNip indicado dirigido a PIK4CA (25 nM). B) Expresión de ARNm de PIK4CA (barras claras) o PIK4CB
35 (barras oscuras) después del tratamiento por el ARNip indicado dirigido a PIK4CB (25 nM).

Figura 5. Resultados de la transferencia Western que demuestra el nivel de expresión proteica de PI4KB, NS3 o actina (como se indica) después del tratamiento de ARNip a PI4KA (col 1 - col 3 corresponden a la tabla 2; PI4KA1; PIK4A2 y PIK4A3, respectivamente); o PI4KB ARNip (col 4 - col 6 corresponden a la tabla 1; PI4KB1; PIK4B2 y PIK4B3, respectivamente). El tratamiento de GAPDH ARNip se muestra como referencia.

40 Figura 6. Secuencias de ARNhc dirigidas a PIK4CA y PIK4CB. A) Resultados del tratamiento de células del clon A con el montaje de ARNhc indicado. Las barras en blanco indican actividad de luciferasa; las barras oscuras indican viabilidad celular. Todos los resultados se compararon para controlar las células tratadas con GAPDH; B) Efecto del tratamiento con ARNhc indicado en la expresión de PI4KA (GFP normalizada); C) Efecto del tratamiento con ARNhc indicado en la expresión de PI4KB (GFP normalizada); D) resultados de la transferencia Western que demuestran el
45 nivel de expresión proteica de PI4KB, NS3 o actina (como se indica) después del tratamiento con ARNhc dirigido a PI4KA (col 1-col 5 corresponden a A1hc-A5hc, respectivamente); o ARNhc dirigido a PI4KB (col 6-col 10 corresponden a B1hc-B5hc, respectivamente). El tratamiento con GFP ARNhc se muestra como referencia, todos los resultados tomados a las 96 horas después del tratamiento con el ARNhc indicado; E) Efecto de la medición por transferencia Western de A2hc y B1hc en la expresión de proteínas, 3 semanas después de la transducción de
50 ARNhc (control de GFP).

Figura 7. Inhibición de la multiplicación del VHC (virus vivo). Dependencia de la dosis de la multiplicación del VHC tras el tratamiento con el ARNip indicado. Las células se tratan antes de la infección por VHC con el ARNip indicado contra PIK4CA o PIK4CB. A) 25 nM (barra gris); 1,5 nM (barra blanca); 0,1 nM (barra oscura). Los resultados están normalizados para la multiplicación del VHC tras el tratamiento con GAPDH ARNip. ARNip del pensamiento de mar es la referencia positiva. B) Expresión de ARNm diana en las células infectadas.

Figura 8. Inhibición de la multiplicación del VHC (virus vivo). Dependencia de la dosis de la multiplicación del VHC tras el tratamiento con el ARNip indicado. Las células se tratan antes de la infección por VHC con el ARNip indicado contra PIK4CA o PIK4CB. A) Efecto en la multiplicación vírica 24 horas después del tratamiento con el ARNip indicado (25 nM). Barras oscuras - luciferasa vírica (actividad); barras claras - viabilidad celular. Los resultados están

normalizados para la multiplicación del VHC tras el tratamiento con GAPDH ARNip del pensamiento de mar es la referencia positiva. B) Dependencia temporal de la multiplicación del VHC después del tratamiento con el ARNip indicado. Barra oscura (primera) - 24 h; barra clara (segunda) - 48 h; barra blanca (tercera) - 72 h; barra gris (cuarta) - 96 h.

5 Descripción detallada

La descripción proporciona una solución al problema de tratamiento de enfermedades relacionadas con infecciones por virus ARN monocatenario positivo (tales como, VHC, VPH, Dengue y poliomielitis), al reducir la concentración del factor anfitrión humano fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido beta (PIK4CB; NM_002651) y/o fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido alfa (PIK4CA; NM_002650) en las células donde dichos virus podrían multiplicarse. Se describe en la presente memoria que la proliferación de los virus ARN monocatenario positivo puede inhibirse empleando ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para silenciar la expresión del gen de células anfitrionas humanas PIK4CB y/o PIK4CA necesario para su proliferación.

Además, se describe en la presente memoria por primera vez que las modificaciones químicas seleccionadas de estos ARNbc son realizaciones muy preferidas que proporcionan toxicidad sorprendentemente reducida, una inmunogenicidad reducida, mejora del comportamiento farmacológico y otras ventajas.

La descripción proporciona ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), así como composiciones, composiciones farmacéuticas y métodos para inhibir la propagación de los virus ARN monocatenario positivo en una célula o mamífero utilizando el ARNbc. La invención también proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de procesos patológicos y enfermedades en un mamífero producidos por infecciones del virus ARN monocatenario positivo utilizando ARNbc.

El ARNbc de la descripción comprende una cadena de ARN (cadena complementaria) que tiene una región que tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente de 19 a 24 nucleótidos de longitud, y es sustancialmente complementaria de al menos parte del producto génico (pre-ARNm o ARNm maduro) transcripto de fosfatidilinositol 4-cinasa humana, catalítica, polipéptido subunidad beta (PIK4CB; NM_002651, y/o fosfatidilinositol 4-cinasa humana, catalítica, polipéptido alfa PIK4CA; NM_002650). El empleo de estos ARNbc permite la degradación selectiva o la inactivación de los ARNm de genes que están implicados en la multiplicación y o el mantenimiento de la infección por ARN monocatenario positivo en los mamíferos. Empleando ensayos basados en células y animales, los presentes inventores han demostrado que dosis muy bajas de estos ARNbc pueden mediar ARNi específica y eficientemente, dando como resultado una inhibición significativa de la multiplicación y la infección. Por lo tanto, los métodos y composiciones de la descripción que comprende estos ARNbc son útiles para el tratamiento de procesos patológicos mediados por la infección por virus ARN monocatenario positivo.

Fosfatidilinositol 4-cinasa humana, catalítica, polipéptido subunidad beta (PIK4CB; NM_002651; también denominado a veces PI4KB; PIK4B; pi4K92; PI4Kbeta; PI4K-BETA; PI4KIIIbeta), y fosfatidilinositol 4-cinasa humana, catalítica, polipéptido alfa (PIK4CA; NM_002650; también denominado a veces PI4KA; PIK4A; pi4K230; FLJ16556; y PI4K-ALFA) son fosfatidilinositol 4-cinasas. Fosfatidilinositol 4-cinasa es conocida alternativamente como PI4K, PI 4-cinasa o PIK4 en la bibliografía. Esta memoria utiliza estos términos indistintamente a menos que el contexto indique una selección específica. Existen cuatro enzimas PI4K en células de mamífero que se clasifican en dos clases. La primera comprende las PI4K tipo III, incluidas PIK4CA y PIK4CB, conservadas desde la levadura al hombre. Los ortólogos de levadura Stt4p y Pik1p, respectivamente, son ambos genes esenciales con función no solapante. Las PI4Ks tipo II, PI4KII α y PI4KII β , distintas de las enzimas de clase III, también tienen un homólogo de levadura, LSB6, que es un gen no esencial. PIK4CB es el gen de mamífero mejor caracterizado que está situado en el aparato de Golgi, funciones en un complejo con el pequeño GTPasa ADP-factor de ribosilación (ARF), y se cree que regulan la secreción del aparato de Golgi a la membrana plasmática. Las enzimas α y β de clase II también se ha demostrado que intervienen en el tráfico de Golgi/trans-Golgi. La isoforma α de clase III parece desempeñar una función en la membrana plasmática y ER pero no el aparato de Golgi.

Además de la localización subcelular de las PI4K es las funciones únicas de las enzimas en el compartimiento respectivo. PIK4CB participa en la producción de grupos PtdIns4P y PtdIns4,5P2, el transporte regulado de ceramida desde ER al aparato de Golgi, lo que conduce a la síntesis de esfingomielina, y está implicada en la integridad estructural del aparato de Golgi al mantener los dominios ricos en PI(4)P lo que permite el acoplamiento del mecanismo de AP-1. La interrupción de PIK4CB produce cambios en la estructura del complejo de Golgi, produce defectos secretores en células polarizadas e inhibe el transporte de proteínas a la membrana plasmática.

Las enzimas PI4K α y beta de clase II y III generan PtdIns 4-fosfato, precursor de varios fosfoinosítidos reguladores. Estos fosfoinosítidos controlan diversos procesos de señalización y tráfico celular mediante la captación de proteínas reguladoras en complejos de señalización organizados. La producción de PtdIns 4-fosfato [PtdIns4P] a partir de PtdIns, primer paso en la formación de PtdIns(4,5)P2 y PtdIns(3,4,5)P3. PtdIns(4,5)P2 es el principal sustrato de las enzimas fosfolipasa C (PLC), produciendo inositol 1,4,5-trifosfato [Ins(1,4,5)P3] y diacilglicerol (DAG) que participan en la de⁺ señalización Ca²⁺. PtdIns(4,5)P2 también controla varios tipos de canal iónico y enzimas, tal como fosfolipasa D (PLD), e interactúa con las proteínas que enlazan membranas para el citoesqueleto 3 y 5 de actina. PtdIns(3,4,5)P3, generados a partir de PtdIns(4,5)P2 por las PtdIns 3-cinasas clase I, regula una variedad de procesos, tales como el metabolismo celular y la vía antiapoptótica a través de la serina/treonina cinasa Akt pero también controla las tirosina cinasas, tales como Btk y factores de cambio de guanina por pequeñas proteínas de

unión a GTP. La producción de estos fosfoinosítidos de señalización se basa tanto en la actividad de sus enzimas sintetizadoras como del suministro de su precursor, por lo tanto, las PtdIns 4-cinasas ejercen una función en la regulación celular.

5 Los virus ARN monocatenario positivo de los cuales dependen PIK4CB o PIK4CA humanos para la multiplicación se cree que comprenden: I. Picorna-(VHA, poliomiélitis, Coxsackie), noda-, como-, nepo-, poti-, bimo-, sobemovirus y luteovirus (amarillos, enano amarillo y virus de la hoja enrollada). II. Carmo-, tombus-, diantovirus, pestivirus, toga-, eco, Dengue, virus de la hepatitis C, flavivirus. III. Tobamo-, tobra-, hordei-, tricorna-, alfa, rubi-, furovirus, virus de la hepatitis E, potex-, carla-, timovirus y virus de las manchas en las hojas cloróticas del manzano.

10 La siguiente descripción detallada describe como preparar y utilizar el ARNbc y las composiciones que contienen ARNbc para inhibir la expresión de virus de cadena positiva de ARN, así como composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades y trastornos causados por la infección por virus ARN monocatenario positivo, p. ej., hepatopatía, insuficiencia hepática, fibrosis, cáncer, neumopatía y sus complicaciones (descritos más adelante). Las composiciones farmacéuticas de la descripción comprenden un ARNbc que tiene una cadena complementaria que comprende una región de complementariedad que tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente de 19 a 15 24 nucleótidos de longitud, y es sustancialmente complementaria de 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 ARNbc, la que se dirige opcionalmente a diferentes segmentos del transcrito de ARN con PIK4CB y/oPIK4CA, en combinación, en una formulación farmacéutica.

20 Por consiguiente, ciertos aspectos proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el ARNbc de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, métodos de uso de las composiciones para inhibir la expresión de PIK4CB, y/o PIK4CA y métodos de uso de las composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades causadas por infección por el virus ARN monocatenario positivo.

Definiciones

25 Por conveniencia, el significado de ciertos términos y frases que se usan en la memoria descriptiva, los ejemplos y reivindicaciones adjuntas, se proporcionan a continuación. Si hay una discrepancia aparente entre el uso de un término en otras partes de esta memoria descriptiva y su definición proporcionada en este apartado, prevalecerá la definición en este apartado.

30 "G", "C", "A" y "U" representan generalmente un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina y uracilo como base, respectivamente. Sin embargo, debe entenderse que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" también puede referirse a un nucleótido modificado, tal como se detalla más adelante, o un resto sustituyente. El experto es consciente de que la guanina, citosina, adenina y uracilo pueden ser sustituidos por otros restos sin alterar sustancialmente las propiedades de emparejamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que lleva dicho resto de sustitución. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende inosina como su base puede pares de bases con nucleótidos que contienen adenina, citosina, o uracilo. Por lo tanto, los nucleótidos que 35 contienen uracilo, guanina o adenina pueden ser sustituidos en las secuencias de nucleótidos de la invención por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. Secuencias que comprenden dichos restos de sustitución son realizaciones de la invención.

40 Tal como se emplea en la presente memoria, "secuencia diana" se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formado durante la transcripción de PIK4CB, incluido ARNm que es un producto de tratamiento del ARN de un producto de transcripción primario.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "cadena que comprende una secuencia" se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que se describe por la secuencia que se refiere a la utilización de la nomenclatura de nucleótidos habitual.

45 Tal como se emplea en la presente memoria, y a menos que se indique lo contrario, el término "complementario", cuando se emplea 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 hibridarse y formar una estructura de doble cadena en determinadas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, tal como debe entender el experto en la materia. Dichas condiciones pueden ser, por ejemplo, condiciones rigurosas, donde las condiciones rigurosas pueden comprender: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, 50°C o 70°C durante 12-16 horas, seguido de lavado. Se pueden aplicar otras condiciones, tales como las condiciones fisiológicamente adecuadas que pueden encontrarse dentro de un organismo. El experto en la técnica será capaz de determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para una prueba de la complementariedad de las dos secuencias según la aplicación final de los nucleótidos hibridados.

55 Esto incluye el emparejamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos con el oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos en toda la longitud de la primera y segunda secuencia de nucleótidos. Dichas secuencias pueden denominarse "totalmente complementarias" entre sí en la presente memoria. Sin embargo, cuando una primera secuencia se conoce como "sustancialmente complementaria" con respecto a una segunda secuencia en la presente memoria, las dos 60 secuencias pueden ser totalmente complementarias, o pueden formar una o más, pero generalmente no más de 4, 3

o 2 pares de bases no coincidentes tras la hibridación, en tanto que conservan la capacidad de hibridarse en las condiciones más relevantes para su aplicación final. Sin embargo, cuando dos oligonucleótidos están diseñados para formar, tras la hibridación, una o más prolongaciones monocatenarias, dichas prolongaciones no se considerarán como mal emparejadas con respecto a la determinación de complementariedad. Por ejemplo, un ARNbc que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en donde el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es totalmente complementaria con el oligonucleótido más corto, sin embargo, puede denominarse "totalmente complementaria" para los propósitos de la invención.

Secuencias "complementarias", como se emplea en la presente memoria, pueden también incluir, o estar formado enteramente por, pares de bases distintas de las de Watson-Crick y/o pares de bases formados a partir de nucleótidos artificiales y modificados, en cuanto a los requisitos anteriores con respecto a su capacidad para hibridarse se hayan cumplido.

La terminología "complementaria", "totalmente complementaria" y "sustancialmente complementaria" en la presente memoria puede emplearse con respecto al emparejamiento de bases entre la cadena transcrita y la cadena complementaria de un ARNbc, o entre la cadena complementaria de un ARNbc y una secuencia diana, como se desprende del contexto de su empleo.

Tal como se emplea en la presente memoria, un polinucleótido que es "sustancialmente complementario de al menos parte de" un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario de una parte contigua del ARNm de interés (p. ej., PIK4CB o PIK4CA). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario de al menos una parte de ARNm PIK4CB si la secuencia es sustancialmente complementaria de una parte ininterrumpida de un ARNm que codifica a PIK4CB. Del mismo modo un polinucleótido es complementario a al menos una parte de ARNm PIK4CA si la secuencia es sustancialmente complementaria de una parte no interrumpida de un ARNm que codifica a PIK4CA.

La expresión "ARN bicatenario" o "ARNbc", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico, que tiene una estructura de doble cadena que comprende dos cadenas de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias, como se definió anteriormente. Las dos cadenas que forman la estructura de doble cadena pueden ser diferentes partes de una molécula de ARN mayor, o pueden ser moléculas de ARN separadas. Cuando las moléculas de ARN están separadas, dicho ARNbc se conocen a menudo en la bibliografía como ARNip ("ARN pequeño de interferencia"). Cuando las dos cadenas forman parte de una molécula mayor, y por lo tanto están conectadas por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de otra cadena respectiva que forma la estructura de doble cadena, la cadena de ARN de conexión se conoce como "bucle en horquilla", "ARN de horquilla corta" o "ARNhc". Cuando las dos cadenas están conectadas por enlace covalente por medios distintos de una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra cadena respectiva que forma la estructura de doble cadena, la estructura de conexión se conoce como "enlazador". Las cadenas de ARN pueden tener el mismo o diferente número de nucleótidos. El número máximo de pares de bases es el número de nucleótidos en la cadena más corta del ARNbc menos algunas prolongaciones que están presentes en la doble cadena. Además de la estructura de doble cadena, un ARNbc puede comprender una o más prolongaciones de nucleótidos. Además, tal como se utiliza en esta memoria, "ARNbc" puede incluir modificaciones químicas a ribonucleótidos, enlaces entre nucleósidos, grupos terminales, cápsulas, y restos conjugados, incluidas modificaciones sustanciales en varios nucleótidos e incluidos todos los tipos de modificaciones descritas en la presente memoria o conocidos en la técnica. Cualquiera de dichas modificaciones, tal como se utiliza en una molécula de tipo ARNip, están comprendidas por "ARNbc" para los fines de esta memoria y las reivindicaciones.

Tal como se emplea en la presente memoria, una "prolongación de nucleótidos" se refiere al nucleótido o nucleótidos desemparejados que sobresalen de la estructura de doble cadena de un ARNbc cuando un extremo 3' de una cadena de ARNbc se prolonga más allá del extremo 5' de la otra cadena, o viceversa. "Romo" o "extremo romo" significa que no hay nucleótidos desemparejados en el extremo del ARNbc, es decir, sin prolongación de nucleótidos. Un ARNbc "con extremos romos" es un ARNbc que es bicatenario en toda su longitud, es decir, sin prolongación de nucleótidos en ambos extremos de la molécula. Para mayor claridad, las cápsulas químicas o restos químicos sin nucleótidos conjugados con el 3' final o 5' final de un ARNip no se consideran en la determinación de si un ARNip tiene una prolongación o es romo.

La expresión "cadena complementaria" se refiere a la cadena de un ARNbc que comprende una región que es sustancialmente complementaria de una secuencia diana. Esta cadena también se conoce como secuencia "guía", y se utiliza en el complejo RISC de funcionamiento para guiar el complejo al ARNm correcto para la escisión. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "región de complementariedad" se refiere a la región en la cadena complementaria que es sustancialmente complementaria de una secuencia, por ejemplo una secuencia diana, como se define en la presente memoria. Cuando la región de complementariedad no es totalmente complementaria de la secuencia diana, los emparejamientos incorrectos son los más tolerados en las regiones terminales y, si están presentes, están generalmente en una región o regiones terminales, p. ej., en 6, 5, 4, 3, o 2 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'. Este empleo de "complementario", porque se refiere a un compuesto de ARN, es diferente en compuestos de ADN complementario, que son un campo diferente aunque relacionado de ácido nucleico terapéutico.

La expresión "cadena transcrita", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a la cadena de un ARNbc

que incluye una región que es sustancialmente complementaria de una región de la cadena complementaria. Esta cadena se conoce también como secuencia "antiguía", porque contiene la misma secuencia de nucleótidos que la secuencia diana y por lo tanto se une específicamente a la secuencia guía.

5 "Introducir en una célula", cuando se refiere a un ARNbc, significa facilitar la captación o absorción en la célula, como lo entienden los expertos en la técnica. La absorción o captación del ARNbc puede ocurrir mediante procesos difusivos sin ayuda o celulares activos, o por los agentes o dispositivos auxiliares. El significado de este término no se limita a las células *in vitro*; un ARNbc también puede ser "introducido en una célula", en donde la célula forma parte de un organismo vivo. En tal caso, la introducción en la célula incluirá la administración al organismo. Por ejemplo, para la administración *in vivo*, ARNbc puede inyectarse en una zona de tejido o administrarse de forma generalizada. En la introducción *in vitro* en una célula incluye métodos conocidos en la técnica tales como electroporación y lipofección.

15 La terminología "silenciamiento" y "inhibir la expresión de", en la medida en que se refieren a PIK4CB o PIK4CA, en la presente memoria se refiere a la supresión al menos parcial de la expresión de PIK4CB o PIK4CA en una célula tratada con ARNbc dirigido a PIK4CB o PIK4CA, tal como se manifiesta por una reducción de la cantidad de ARNm transcrito o disponible en comparación con las células normales (no tratadas). Esta medición puede determinarse comparando las cantidades de ARNm en las células tratadas (que pueden aislarse de una primera célula o grupo de células que han sido tratadas de tal manera que se inhibe la expresión de PIK4CB o PIK4CA), en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idéntica a la primera célula o grupo de células, pero que ha sido tratada o no (células de referencia). El grado de inhibición se expresa normalmente en términos de

20
$$\frac{(\text{ARNm en células de referencia}) - (\text{ARNm en células tratadas})}{(\text{ARNm en células de referencia})} \cdot 100\%$$

Alternativamente, el grado de inhibición puede darse en términos de una reducción de un parámetro que esta funcionalmente relacionado con la transcripción génica, p. ej., la cantidad de polipéptido, o el número de células que presentan un determinado fenotipo, p. ej., la actividad de cinasa relacionada específicamente con PIK4CB o PIK4CA, o la sensibilidad a la infección. En principio, el silenciamiento génico puede determinarse de cualquier célula que expresa el gen de interés, ya sea constitutivamente o por ingeniería genética, y por cualquier ensayo adecuado. Sin embargo, cuando se necesita una referencia con el fin de determinar si un determinado ARNbc inhibe la expresión de la PIK4CB o PIK4CA en un determinado grado y por lo tanto está comprendido por la presente invención, el ensayo proporcionado en los ejemplos siguientes servirán como tal referencia.

30 Por ejemplo, en determinados casos, la expresión del gen PIK4CB o PIK4CA se inhibe, cuando es suprimido por al menos aproximadamente 20%, 25%, 35% o 50% por la administración del ARN bicatenario de la invención. En algunas realizaciones, el gen PIK4CB o PIK4CA es suprimido por al menos aproximadamente 60%, 70% u 80% por la administración del oligonucleótido bicatenario de la invención. En algunas realizaciones, el gen PIK4CB o PIK4CA es suprimido por al menos aproximadamente 85%, 90% o 95% por la administración del oligonucleótido bicatenario de la invención. Los resultados de la figura 2 demuestran que cada ARNbc probado dirigido a PIK4CB (o PIK4CA) es eficaz para reducir el nivel relativo de producto de expresión en el ensayo de replicación de VHC del 10% al 90%. Los resultados de la figura 3 demuestran que cada ARNbc probado dirigido a PIK4CB (o PIK4CA) es eficaz para reducir las cantidades de ARNm PIK4CB (o PIK4CA) en una célula del 10% al 90%.

40 Tal como se emplea en la presente memoria en el contexto de infección por virus ARN monocatenario positivo, los términos "tratar", "tratamiento", y similares, se refieren a alivio o mitigación de procesos patológicos mediados por la infección por virus ARN monocatenario positivo. Dicha descripción incluye el empleo de los agentes terapéuticos de la invención para la profilaxis o prevención de la infección por virus ARN monocatenario positivo, y el alivio de los síntomas o patologías producidos por la infección por virus ARN monocatenario positivo. En el contexto de la presente invención en la medida en que se refiere a cualquiera de las demás condiciones citadas en la presente memoria a continuación (aparte de los procesos patológicos mediados por la infección por virus ARN monocatenario positivo), los términos "tratar", "tratamiento", y similares significan aliviar o mitigar al menos un síntoma asociado a dicha enfermedad, o retrasar o revertir la evolución de dicha enfermedad.

45 Tal como se emplea en la presente memoria, las frases "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad profilácticamente eficaz" se refieren a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento, prevención o gestión de procesos patológicos mediados por la infección por virus ARN monocatenario positivo o un síntoma evidente de procesos patológicos mediados por la infección por el virus ARN monocatenario positivo. Cualquier médico general puede determinar fácilmente la cantidad específica que es terapéuticamente eficaz, y puede variar dependiendo de factores conocidos en la técnica, tales como, p. ej., el tipo de procesos patológicos mediados por la infección por virus ARN monocatenario positivo, la anamnesis del paciente y la edad, la etapa de los procesos patológicos mediados por la infección por virus ARN monocatenario positivo y la administración de otros agentes antipatológicos.

50 Tal como se emplea en en la presente memoria, una "composición farmacéutica" comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un ARNbc y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se emplea en la presente memoria, "cantidad farmacológicamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o simplemente "cantidad eficaz" se refiere a esa cantidad de un ARNbc eficaz para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo deseado. Por ejemplo, si un tratamiento clínico dado se considera eficaz cuando existe al menos una

reducción del 25% en un parámetro medible relacionado con una enfermedad o trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz 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.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico. Dichos vehículos comprenden, pero no se limitan a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y combinaciones de los mismos. La expresión excluye específicamente medio de cultivo celular. Para los medicamentos administrados por vía oral, los vehículos farmacéuticamente aceptables comprenden, pero no se limitan a excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes adecuados comprenden carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio, y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido algínico son agentes disgregantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden comprender almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, será generalmente estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retrasar la absorción en el aparato digestivo.

Tal como se emplea en la presente memoria, una "célula transformada" es una célula en la que se ha introducido un vector de la que puede expresarse una molécula de ARNbc.

Ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc)

En una realización, la invención proporciona moléculas ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para la inhibición de la expresión de PIK4CB y/o PIK4CA, y por lo tanto la inhibición o propagación de la multiplicación del virus del ARN monocatenario positivo, en una célula o mamífero, en donde el ARNbc comprende una cadena complementaria que comprende una región de complementariedad que es complementaria de 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 de 19 a 24 nucleótidos de longitud, y en donde dicho ARN bicatenario, tras entrar en contacto con una célula que expresa dicho gen PIK4CB o PIK4CA, inhibe la expresión de dicho gen o PIK4CB PIK4CA en al menos 10%, 25%, o 40%.

El ARNbc comprende dos cadenas de ARN que son suficientemente complementarias para hibridarse para formar una estructura de doble cadena. Una cadena del ARNbc (la cadena complementaria) comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria, y en general totalmente complementaria, con una secuencia diana, derivada de la secuencia de producto génico del gen PIK4CB o PIK4CA, la otra cadena (cadena transcrita) comprende una región que es complementaria de la cadena complementaria, de manera que las dos cadenas se hibridan y forman una estructura de doble cadena cuando se combinan en condiciones adecuadas. En general, la estructura de doble cadena está comprendida entre 15 y 30, más en general, entre 18 y 25, aún más generalmente entre 19 y 24, y más en general, entre 19 y 21 pares de bases de longitud. Del mismo modo, la región de complementariedad con la secuencia diana está comprendida entre 15 y 30, más en general, entre 18 y 25, aún más generalmente entre 19 y 24, y más en general, entre 19 y 21 nucleótidos de longitud. El ARNbc de la invención puede ser romo en los extremos (p. ej., cuando cada nucleótido en cualquiera de las cadenas tiene un nucleótido adecuado para el emparejamiento de bases en la otra cadena), o puede comprender además uno o más prolongaciones de de nucleótidos de la cadena sencilla, normalmente en el extremo 3'. El ARNbc puede sintetizarse por métodos normalizados conocidos en la técnica como se expone más adelante, p. ej., mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado, tal como están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

En realizaciones específicas, el ARNbc comprende, específica para PIK4CB, una cadena seleccionada de las secuencias transcritas de la tabla 1 y una segunda secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias complementarias de la tabla 1. Agentes alternativos que se dirigen a otra parte en la secuencia diana de PIK4CB, p. ej., ligeramente aguas arriba o aguas abajo de los agentes identificados en la tabla 1, pueden determinarse fácilmente utilizando la secuencia listada en la tabla 1, y el ARNm contiguo o la secuencia genómica encontrada en NCBI nº de ingreso: NM_002651.

En realizaciones específicas, el ARNbc comprende, específica para PIK4CA, una cadena seleccionada de las secuencias transcritas de la tabla 2 y una segunda secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias complementarias de la tabla 2. Agentes alternativos que se dirigen a otra parte de la secuencia diana de PIK4CA, p. ej., ligeramente aguas arriba o aguas abajo de los agentes identificados en la tabla 2, pueden determinarse fácilmente utilizando la secuencia listada en la tabla 2, y el ARNm contiguo o la secuencia genómica encontrada en NCBI nº de ingreso.: NM_002650.

En realizaciones adicionales, el ARNbc comprende al menos una secuencia de doble cadena seleccionada de las secuencias de doble cadena proporcionadas en la tabla 1 o la tabla 2. En otras realizaciones, el agente terapéutico puede comprender dos o más secuencias de doble cadena seleccionadas de la tabla 1 y/o de la tabla 2. En general, cada ARNbc comprende dos cadenas de oligonucleótidos, en donde un oligonucleótido se describe como la cadena transcrita en la tabla y el segundo oligonucleótido se describe como la cadena complementaria en la misma tabla. Cada tabla proporciona un nombre para cada doble cadena ARNbc preferido. Las bases nucleotídicas se indican empleando la notación convencional de nucleótidos.

Tabla 1 - ARNip bicatenario (ARNbc) dirigido a PIK4CB

Nombre de la doble cadena	Secuencia complementaria (Secuencia guía)	SEQ ID nº:	Secuencia transcrita	SEQ ID nº:
PIK4CB1	GGACGUGGGUGAUGCCAUUUUTT	1	AAA AUGGCAUCACCCACGUCCTT	105
PIK4CB2	GGGAUGACCUUCGGCAAGAUUTT	2	AAUCUUGCCGAAGGUCAUCCCTT	106
PIK4CB3	GAGAUCCGUUGCCUAGAUGUUTT	3	AACAUCUAGGCAACGGAUUCCTT	107
PIK4CB4	GCACCGAGAGUAUUGAUAAUUTT	4	AAUUAUCAUACUCUCGGUGCTT	108
PIK4CB5	SMARTpool PIK4B1 - B4		PIK4CB1 - B4	
PIK4CB6	UUAUCAAUACUCUCGGUGCTGTT	5	GCACCGAGAGUAUUGAUAAATT	109
PIK4CB7	UUGUACUCCAGGCUCUUGGATT	6	CAAGGAGCCUGGAGUACAATT	110
PIK4CB8	UUGGACACUGAGGCAUCCGTTT	7	CGGAUGCCUCAGUGUCCAATT	111
PIK4CB9	UAGUCAACCAAGUGUAAUCTGTT	8	GAUUAACAUUGGUUGACUATT	112
PIK4CB10	UUGGGCACAGUGCUGAAGCTGTT	9	GCUUCAGCACUGUGCCCAATT	113
PIK4CB11	AUGGGUAAUACCACAUUCGGGTT	10	CGAAUGUGGUAAUACCCAATT	114
PIK4CB12	AAUCAUGCCACUAUCAGCCGATT	11	GGCUGAUAGUGGCAUGAUUTT	115
PIK4CB13	UCUCGUUUGAAGGCUGUCGGGTT	12	CGACAGCCUCAAACGAGATT	116
PIK4CB14	UACCACAUGAUCCUUCGUTTTT	13	CACGAAGGAUCAUGUGGUATT	117
PIK4CB15	UAAUGCUCUGGCGGCAACGGTTT	14	CGUUGCCGCCAGAGCAUUAATT	118
PIK4CB16	AUCUUGUAUGGCUUGAUCCAATT	15	GGAUCAAGCCAUACAAGAATT	119
PIK4CB17	AUCACAUCCACAAACUCUGTGT	16	CAGAGUUUGUGGAUGUGAATT	120
PIK4CB18	UUCUCCACUUUAGGGUUGCTGTT	17	GCAACCCUAAAGUGGAGAATT	121
PIK4CB19	UGUCACAUGAUGCCGUUGGTGTT	18	CCAACGGCAUCAUGUGACATT	122
PIK4CB20	UGAUAGACCGCAUACUGCCATTT	19	GGCAGUAUGCGGUCUAUCATT	123
PIK4CB21	UUCGAGCGGCAUACAGCCCTTT	20	GGCUGAUUGCCGCUCGGAATT	124
PIK4CB22	UUUCGAAUGGUGCUGGAGCCATT	21	GCUCCAGCACCAUUCGAAATT	125
PIK4CB23	UGUACAUGUUAAGCAACUGGGTT	22	CAGUUGC UUAACAUGUACATT	126
PIK4CB24	UCUACGGACCUCGUACUCCGATT	23	GGAGUACGAGGUCCGUAGATT	127
PIK4CB25	UUCCAUUUCCUUGGGUGGATTT	24	CCACCCAAGGGAAAUGGAATT	128
PIK4CB26	UUCUCAGACAAGGGCCCUCTATT	25	GAGGGCCCUUGUCUGAGAATT	129

Tabla 1 - ARNip bicatenario (ARNbc) dirigido a PIK4CB (continuación)

PIK4CB27	UUGCCGAUCGCCAUCAGGGACTT	26	CCUGAUGGCGAUCGGCAATT	130
PIK4CB28	UGGAUCAUCUAGGCAACGGATTT	27	CCGUUGCCUAGAUGAUCCATT	131
PIK4CB29	UCCCCAAAUGGACUGCAGUTGTT	28	ACUGCAGUCCAUUUGGGAATT	132
PIK4CB30	UCCACUACUGUAUCUCCCATGTT	29	UGGGAGAUACAGUAGUGGATT	133
PIK4CB31	UAGGAAGUAAUCGAGCAAGGATT	30	CUUGCUCGAUUACUCCUATT	134
PIK4CB32	AAGAAUCUCAUUCAAUUUCCATT	31	GAAAUUGAAUGAGAUUCUUTT	135
PIK4CB33	UAGCUUGGUCCCACGGGAGTGTT	32	CUCCCGUGGGACCAAGCUATT	136
PIK4CB34	UUGAACAUUGUCGCCAUCCAGGTT	33	UGGAUGGCGACAUGUUCAATT	137
PIK4CB35	UCAAGUCCUAAGUACCGAGAATT	34	CUCGGUACUAGGACUUGATT	138
PIK4CB36	AUGACUGACAGGAGCCGCCAATT	35	GGCGGCUCUCUGUCAGUCAUTT	139
PIK4CB37	UGUUCAUCCUCUAGUGGCTTT	36	CCACUAAGAGGGAUGAACATT	140
PIK4CB38	UUGGAGUUGAGGACAACAGCCTT	37	CUGUUGUCCUCAACUCCAATT	141
PIK4CB39	AAUAAGAGGAUGGCCUGUGGATT	38	CACAGGCCAUCCUCUUAUUTT	142
PIK4CB40	UGAUCCGCCGUACUUCUCCTTT	39	GAGAAAGUACGGCGGAUCATT	143
PIK4CB41	AAUUCACAUGGCUAGGCCAGTT	40	GGCCUAGCCAUGUGGAAUUTT	144
PIK4CB42	AUCUGACUUAGAGCGCUGGTGTT	41	CCAGCGCUCUAAGUCAGAUUTT	145
PIK4CB43	CUCAGUGGUGUAACUGCCGTGTT	42	CGGCAGUUAACACCACUGAGTT	146
PIK4CB44	UCAGCUAAAAGGCUGACGUCTTT	43	ACGUCAGCCUUUAAGCUGATT	147
PIK4CB45	AAGCCGUCAUAGAGUUUGGTGTT	44	CCAAACUCUAUGACGGCUUTT	148
PIK4CB46	UCCGUGAUGACACUUAGCAGGTT	45	UGCUAAGUGUCAUCACGGATT	149
PIK4CB47	UCGCCUAUGUCAUCCACCGACTT	46	CGGUGGAUGACAUAGGCGATT	150
PIK4CB48	UGGAAGGCCCGCCUUCUCAGTT	47	GAGAAGGGCGGGCCUCCATT	151
PIK4CB49	AACUGGGAGAUGUUGUCACAGTT	48	GUGACAACAUCUCCAGUUTT	152
PIK4CB50	UAGAGACUGCCACGCCUCCATTT	49	GGAGGCGUGGCAGUCUCUATT	153
PIK4CB51	UUGACCACUGGUUCAUUCATGTT	50	UGAUUGAACCAGUGGUCATT	154
PIK4CB52	UUAGGGUUGCUGGCUGUUCGTTT	51	GAACAGCCAGCAACCCUATT	155
PIK4CB53	UCUGUGGUCAGCUAAAAGGCTTT	52	CCUUUAAGCUGACCACAGATT	156
PIK4CB54	AUUAUCAUAUCUCUGGUGCTTT	53	CACCGAGAGUAUUGAUAAUUTT	157
PIK4CB55	UUGGUGAGGUACUGGAAGCCGTT	54	GCUUCCAGUACCUCACCAATT	158
PIK4CB56	UGUAUGGCUUGAUCCAAAGGGTT	55	CUUUGGAUCAAGCCAUACATT	159
PIK4CB57	UUGGAGUUAUACAGGUAUGAATT	56	CAUACCUGUAUAACUCCAATT	160
PIK4CB58	UCGAGCUUCCAAGAAUCUCATTT	57	GAGAUUCUUGGAAGCUCGATT	161
PIK4CB59	AAAGUUAUUGCUCUGGCGGCATT	58	CCGCCAGAGCAUUAACUUTT	162
PIK4CB60	UAUCAGCCGAAAUCACAAGAATT	59	CUUGUGAUUUCGGCUGAUATT	163
PIK4CB61	UUGUCAUAGUUGGGCACAGTGTT	60	CUGUGCCCAACUAUGACAATT	164
PIK4CB62	UCCGUAGCUUGGUUCCACGGGTT	61	CGUGGGACCAAGCUACGGATT	165
PIK4CB63	UGAGGUUUCGAAUGGUGCUGGTT	62	AGCACCAUUCGAAACCUCATT	166
PIK4CB64	UUGUAUGGCUUGAUCCAAAGGTT	63	UUUGGAUCAAGCCAUACAATT	167
PIK4CB65	UAAGUACCGAGAACCUACUCTTT	64	AGUAGGUUCUCGGUACUATT	168
PIK4CB66	UUUCCGAGCGGCAUUCAGCCCTT	65	GCUGAUUGCCGCUCGGAAATT	169
PIK4CB67	UGAGGUACUGGAAGCCGUCATTT	66	GACGGCUUCCAGUACCUCATT	170

Tabla 1 - ARNip bicatenario (ARNbc) dirigido a PIK4CB (continuación)

PIK4CB68	UCUCAGACAAGGGCCCUCUAGTT	67	AGAGGGCCCUUGUCUGAGATT	171
PIK4CB69	UGUAGGCUUGUACUCCAGGCTTT	68	CCUGGAGUACAAGCCUACATT	172
PIK4CB70	UUAUUGCUCUGGCGGCAACGGTT	69	GUUGCCGCCAGAGCAUUAATT	173
PIK4CB71	GAAUUAUCAAUACUCUCGGTGTT	70	CCGAGAGUAUUGAUAAUUCTT	174
PIK4CB72	UCCACAUGGCUAGGCCAGTATT	71	CUGGCCUAGCCAUGUGGAATT	175
PIK4CB73	UGAGGCAUCCGUUCAUACCTCTT	72	GGUAUGAACGGAUGCCUCATT	176
PIK4CB74	UUGCUGGCUGUUCGUUUCAGGTT	73	UGAAACGAACAGCCAGCAATT	177
PIK4CB75	AACAUUGUCGCCAUCCAGGCCGTT	74	GCCUGGAUGGCCGACAUGUUTT	178
PIK4CB76	UGCUCGCGGAGUAGUCAACCAATT	75	GGUUGACUACUCCGGAGCATT	179
PIK4CB77	ACUGGUUCAAUCAUGCCACTATT	76	GUGGCAUGAUUGAACAGUTT	180
PIK4CB78	UAGACCGCAUACUGCCAUCCATT	77	GAUGGCAGUAUGCGGUCUATT	181
PIK4CB79	UGGAGUUGAGGACAACAGCCTTT	78	GCUGUUGUCCUCAACUCCATT	182
PIK4CB80	UAGUUGGGCACAGUGCUGAAGTT	79	UCAGCACUGUGCCCAACUATT	183
PIK4CB81	UCAUACUCUCGGUGCUGGAGTT	80	CCAGCACCGAGAGUAUUGATT	184
PIK4CB82	UACUCCGAAUUCGGUUCUCGGTT	81	GAGAACC GAAUUCGGAGUATT	185
PIK4CB83	UUACCACAUGAUCCUUCGUGTTT	82	ACGAAGGAUCAUGUGGUAATT	186
PIK4CB84	UGGCUAGGCCAGUACCCUCAGTT	83	GAGGGUACUGGCCUAGCCATT	187
PIK4CB85	UUCUACGGACCUCGUACUCCGTT	84	GAGUACGAGGUCCGUAGAATT	188
PIK4CB86	UGACAGGAGCCGCCAAUUGGGTT	85	CAAUUGGCGGCUCUCUGCATT	189
PIK4CB87	UCAGACAAGGGCCCUCUAGGTT	86	CUAGAGGGCCCUUGUCUGATT	190
PIK4CB88	AUUGACCACUGGUUCAAUCAATTT	87	GAUUGAACAGUGGUCAAUTT	191
PIK4CB89	UCCGGAGUAGUCAACCAAGTGTT	88	CUUGGUUGACUACUCCGGATT	192
PIK4CB90	UCAUGGGUAAUACCACAUUCGTT	89	AAUGUGGUAAUACCCAUGATT	193
PIK4CB91	UUCAAUCAUGCCACUAUCAGCTT	90	UGAUAGUGGCAUGAUUGAATT	194
PIK4CB92	UCUAGGCAACGGAUCUCACTGTT	91	GUGAGAUCCGUUGCCUAGATT	195
PIK4CB93	UGAUCUGGGCAGGUGGAUCATTT	92	GAUCCACCUGCCCAGAUCATT	196
PIK4CB94	UAUCAAUACUCUCGGUGCUGGTT	93	AGCACCGAGAGUAUUGAUATT	197
PIK4CB95	AAUGCUCUGGCGGCAACGGTGTT	94	CCGUUGCCGCCAGAGCAUUTT	198
PIK4CB96	UCCACGGGAGUGUCGUUGAGTT	95	CAACGACACUCCGUGGGATT	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	CGAGAACC GAAUUCGGAGUTT	207
PIK4CB105	UCAGGUAGGGAGCCUUGUCCTTT	104	GACAAGGCUCCCUACCUGATT	208

Tabla 2 - ARNip bicatenario (ARNbc) dirigido a PIK4CA

Duplex Name	Antisense Sequence (Guide Sequence)	SEQ ID No.:	Sense Sequence	SEQ ID No.:
PIK4CA1	GAGCAUCUCUCCCUACCUAUUTT	209	AAUAGGUAGGGAGAGAUGCUCTT	313
PIK4CA2	GUGAAGCGAUGUGGAGUUAUUTT	210	AAUAAUCCACAUUCGUUCCACTT	314
PIK4CA3	CCACAGGCCUCUCCUACUUUUTT	211	AAAAGUAGGAGAGGCCUGUGGTT	315
PIK4CA4	GCAGAAUUUGGCCUGUUUUTT	212	AAAACAGGCCAAAUUUCUGCTT	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	AAGGCUUGAUCAACACAUATT	320
PIK4CA10	UUGAACUUGGCCAGAUUUGGTT	217	CAUUCUGGCCAAGUUCAATT	321
PIK4CA11	AUGAUAGCCGACACGUUGGTGTT	218	CCAACGUGUCGGCUAUCUATT	322
PIK4CA12	UUCAGGCACAUCACUAACGGCTT	219	CGUUAGUGAUGUGCCUGAATT	323
PIK4CA13	UUCGGAUGAAGUUGUAGCGGGTT	220	CGCUACAACUUAUCCGAATT	324
PIK4CA14	UUCAAGUUCACUAACUCCACATT	221	UGGAGUUAGUGAACUUGAATT	325
PIK4CA15	UCAUCCUCGGAGUCUGAGCGGTT	222	GCUCAGACUCCGAGGAUGATT	326
PIK4CA16	UUUCUGCUCACCUGUCAUGTGT	223	CAUGACGGUGGAGCAGAAATT	327
PIK4CA17	AGGAAUGUUAGCUCCUCUGTGT	224	CAGAGGAGCUAACAUUCCUTT	328
PIK4CA18	AAGUAGUCAAGGCAGUGGAGTT	225	CCACUGCCUUUGACUACUUTT	329
PIK4CA19	UUCACUUCAGACAGGGCCGACTT	226	CGGCCUUGUCUGAAGUGAATT	330
PIK4CA20	UUGUAGUCGAUGUCCAGCACATT	227	UGCUGGACAUCGACUACAATT	331
PIK4CA21	UUCGUUCCCAAUGGCUUCUGTTT	228	AGAAGCCAUUGGGAACGAATT	332
PIK4CA22	UCGGCGUCGAUGGUGUGCCAGTT	229	GGCACACCAUCGACGCCGATT	333
PIK4CA23	AAAGAGGUCCAGGCCGACCAGTT	230	GGUCGGCCUGGACCUCUUUTT	334
PIK4CA24	UUAGAUCUCCAGUUGGCCACGTT	231	UGGCCAACUGGAGAUCAUATT	335
PIK4CA25	UGUGAUCUCCUCUACCAACTGTT	232	GUUGGUAGAGGAGAUACATT	336
PIK4CA26	UUGGUCAGAGCUGCAGUACTTTT	233	GUACUGCAGCUCUGACCAATT	337
PIK4CA27	UGAUGCUUAUGUCUUCACGCATT	234	CGUGAAGACAUAAAGCAUATT	338
PIK4CA28	AUUUGGAACCACAUCGGCATGTT	235	UGCCGAUGUGGUUCCAAAUTT	339
PIK4CA29	UCCCGGGUCCAACCGAACGAGTT	236	CGUUCGGUUGGACCCGGGATT	340
PIK4CA30	UCUGCUUCCUUUAUCUCAGCATT	237	CUGAGAUAAAGGAAGCAGATT	341
PIK4CA31	AAGUCGAUCCAGAUGUAGUGGTT	238	ACUACAUCUGGAUCGACUUTT	342
PIK4CA32	AAGAGGUCGAUGAUCUGCAGGTT	239	UGCAGAUCAUCGACCUCUUTT	343

Tabla 2 - ARNip bicatenario (ARNbc) dirigido a PIK4CA (continuación)

PIK4CA33	AGAGCCGACAGUUAUGUCCAGTT	240	GGACUAACUGUCGGCUCUTT	344
PIK4CA34	UCCUUGAGUAGGGAACUUUGGTT	241	AAAGUCCCUACUCAAGGATT	345
PIK4CA35	UCCGGCCUGGUCUAGUCCAGTT	242	GGAACUAGACCAGGCCGGATT	346
PIK4CA36	UGUGAUGAGACGCUCGAUCTCTT	243	GAUCGAGCGUCUCAUCACATT	347
PIK4CA37	AAGUAGGAGAGGCCUGUGGTTT	244	CCACAGGCCUCUCUACUUTT	348
PIK4CA38	UCCGGGUGUCCUGAUUAUCTGTT	245	GAUAAUCAGGACACCCGGATT	349
PIK4CA39	GAGAUGGUGACAUGCCGCTGTT	246	GCGGCAUGUCCACCAUCUCTT	350
PIK4CA40	UGCCUGCCAGGAGAUCUUCTGTT	247	GAAGAUCUCCUGGCAGGCATT	351
PIK4CA41	CUUCUCGCGAAGCACAUUGCGTT	248	CAUUGUCUUCGCGAGAAGTT	352
PIK4CA42	UGCACGGCUAGGUAGGGAGGTT	249	CUCCUACCUAGCCGUGCATT	353
PIK4CA43	UCUCCCGCAUGAACUACAGGTTT	250	CUGUAGUUAUGCGGGAGATT	354
PIK4CA44	AGAAAUCAAAUCUCCCGUGGTTT	251	CAGCGGGAGUUUGAUUUCUTT	355
PIK4CA45	UUAUCUGAGAACAUGGCGGTCTT	252	CCGCCAUGUUCUCAGUAUATT	356
PIK4CA46	UUGGGUUGACUUGCUUCCGAGTT	253	CGGAAGCAAGUCAACCCAATT	357
PIK4CA47	UCUUAUCUGAGAACAUGGCGGTT	254	GCCAUGUUCUCAGUAAGATT	358
PIK4CA48	UCUGAGAACAUGGCGGUCCAATT	255	GGACCGCCAUGUUCUCAGATT	359
PIK4CA49	UUGCUUCCGAGGCAGCCAGGTT	256	CUGGCUGCCUCGGAAGCAATT	360
PIK4CA50	UCAAGUUCACUAACUCCACATTT	257	GUGGAGUUAGUGAACUUGATT	361
PIK4CA51	AUCUCCACUUGGUCAGAGCTGTT	258	GCUCUGACCAAGUGGAGAUTT	362
PIK4CA52	AACGAGACGGGUCACUUCGTTTT	259	CGAAGUGACCCGUCUCGUUTT	363
PIK4CA53	UGUGUUGAUCCAGCCUUGGGTTT	260	CCAAGGCUGGAUCAACACATT	364
PIK4CA54	UUCUGCUCCACCGUCAUGUGCTT	261	ACAUGACGGUGGAGCAGAATT	365
PIK4CA55	UGGAGCAUCGGCGUCGAUGGTTT	262	CAUCGACGCCGAUGCUCATT	366
PIK4CA56	UCGAUGUCCAGCACAAUGGCCTT	263	CCAUUGUGCUGGACAUCGATT	367
PIK4CA57	UCGUUCCCAUUGGCUUCUGTGTT	264	CAGAAGCCAUUGGGAACGATT	368
PIK4CA58	UAAUCUCCACAUCGCUUCACCTTT	265	GUGAAGCGAUGUGGAGUUAATT	369
PIK4CA59	UGAUCUCCUCUACCAACUGATTT	266	CAGUUGGUAGAGGAGUUCATT	370
PIK4CA60	UUGGCGAUCUCAAAACCGCUGCTT	267	AGCGGUUUGAGAUCGCCAATT	371

Tabla 2 - ARNip bicatenario (ARNbc) dirigido a PIK4CA (continuación)

PIK4CA61	AUGUGUUGAUCCAGCCUUGGGTT	268	CAAGGCUGGAUCAACACAUTT	372
PIK4CA62	CUGAUGUACUAGAUCCAGTT	269	GGAGAUCAAGUACAUCAGTT	373
PIK4CA63	UGGAGUAGAUCUUCUCGCGAATT	270	CGCGAGAAGAUCUACUCCATT	374
PIK4CA64	UCAGGCACAUCACUAACGGCTTT	271	CCGUUAGUGAUGUGCCUGATT	375
PIK4CA65	UAGGCGGCCAUGCUCGGATGTT	272	UCCGAAGCAUGGCCGCCUATT	376
PIK4CA66	GAUGCUIAUGUCUUCACGCAGTT	273	GCGUGAAGACAUAGCAUCTT	377
PIK4CA67	UCUCCAGUUGGCCACGCUGTTT	274	CAGCGUGGCCAACUGGAGATT	378
PIK4CA68	UGAAGUUGUAGCGGGCCUGCTTT	275	CAGGCCCGCUACAACUUCATT	379
PIK4CA69	UGAGCUCUGGAGCAUCGGCGTTT	276	GCCGAUGCUCAGAGCUCATT	380
PIK4CA70	AAGGAAUGUUAGCUCUCUGTTT	277	AGAGGAGCUAACAUUCUUTT	381
PIK4CA71	UGUUCUUAACCUUGGCAGGCATT	278	CCUGCCAGGUUUAAGAACATT	382
PIK4CA72	AUGUCCAGCACAAUGGCCUCATT	279	AGGCCAUUGUGCUGGACAUTT	383
PIK4CA73	UACAGAAGGAAUGUUAGCUCCTT	280	AGCUAACAUUCUUCUGUATT	384
PIK4CA74	AAGAUCUCCACUUGGUCAGAGTT	281	CUGACCAAGUGGAGAUCUUTT	385
PIK4CA75	UCACUUCGUUCCCAUGGGCTTTT	282	GCCAUUGGGAACGAAGUGATT	386
PIK4CA76	UGAGACGCUCGAUCUCAGUGGTT	283	ACUGAGAUCGAGCGUCUCATT	387
PIK4CA77	UGGCGAUCUCAAAACCGCUGCATT	284	CAGCGGUUUGAGAUCGCCATT	388
PIK4CA78	UGCCAGGUGACCAGGAACUTGTT	285	AGUUCUGGUCACCUGGCATT	389
PIK4CA79	UACUUGAUCUCCAGUUGGCCTT	286	CCAACUGGAGAUCAAGUATT	390
PIK4CA80	CUUUCUGAGAACAUGGCGGTTT	287	CGCCAUGUUCUCAGAUAGTT	391
PIK4CA81	UCCACAUCGCUUCACCUUGAATT	288	CAAGGUGAAGCGAUGUGGATT	392
PIK4CA82	UCGGAUGAAGUUGUAGCGGGCTT	289	CCGCUACAACUUCUCCGATT	393
PIK4CA83	AGUGGAGUAGAUCUUCUCGCGTT	290	CGAGAAGAUCUACUCCACUTT	394
PIK4CA84	CUUCGUUCCCAUGGCUUCTGTT	291	GAAGCCAUUGGGAACGAAGTT	395
PIK4CA85	AAGAGGAUGGCGUCCGGAGGGTT	292	CUCGACGCCAUCCUCUUTT	396
PIK4CA86	GUGGAGUAGAUCUUCUCGCGATT	293	GCGAGAAGAUCUACUCCACTT	397
PIK4CA87	AGACGGGUCACUUCGUUCCCATT	294	GGAACGAAGUGACCCGUCUTT	398
PIK4CA88	AGGAAGUCGAUCCAGAUGUAGTT	295	ACAUCUGGAUCGACUUCUUTT	399
PIK4CA89	UUUGGAACCACAUCGGCAUGCTT	296	AUGCCGAUGUGGUUCCAAATT	400
PIK4CA90	UGAUGAGACGCUCGAUCUCAGTT	297	GAGAUCGAGCGUCUCAUCATT	401
PIK4CA91	CUGUAGGCGGCCAUGCUCGGTT	298	GAAGCAUGGCCGCCUACAGTT	402
PIK4CA92	UCUCAAAACCGCUGCACCAGGATT	299	CUGGUGCAGCGGUUUGAGATT	403
PIK4CA93	AAGGAGCCUGUGAUCUCCUCTTT	300	AGGAGAUACAGGCUCUUTT	404
PIK4CA94	AGCUGAAGUAGUCAAAGGCAGTT	301	GCCUUUGACUACUUCAGCUTT	405
PIK4CA95	AUGAGACGCUCGAUCUCAGTGT	302	CUGAGAUCGAGCGUCUCAUTT	406
PIK4CA96	UUCCTAAUGGCUUCUGUGUTCTT	303	ACACAGAAGCCAUUGGGAATT	407
PIK4CA97	UGUCCAGCACAAUGGCCUCAGTT	304	GAGGCCAUUGUGCUGGACATT	408
PIK4CA98	UGGGUUGACUUGCUCGAGGTT	305	UCGGAAGCAAGUCAACCCATT	409
PIK4CA99	ACUAAUCCACAUCGCUUCCATT	306	GAAGCGAUGUGGAGUUAGUTT	410
PIK4CA100	UGGUCAGAGCUGCAGUACUTGTT	307	AGUACUGCAGCUCUGACCATT	411
PIK4CA101	CCUGAUUUCUUGGAGAUGGTGTT	308	CCAUCUCCAAGAAUCAGGTT	412
PIK4CA102	UAGUCGAUGUCCAGCACAATGTT	309	UUGUGCUGGACAUCGACUATT	413
PIK4CA103	AAGUUGUAGCGGGCCUGCUGGTT	310	AGCAGGCCCGCUACAACUUTT	414
PIK4CA104	UGCACUCAUCCUCGGAGUCTGTT	311	GACUCCGAGGAUGAGUGCATT	415
PIK4CA105	AUCUCCGCAUGAACUACAGGTT	312	UGUAGUUCAUGCGGGAGAUUTT	416

El experto sabe perfectamente que los ARNbc que comprenden una estructura de doble cadena de entre 20 y 23, pero específicamente 21, pares de bases se han reconocido como especialmente eficaces para provocar interferencias en el ARN (Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888). Sin embargo, otros han descubierto que los ARNbc más cortos o más largos también pueden ser eficaces. En las realizaciones descritas anteriormente, en virtud de la naturaleza de las secuencias de oligonucleótidos proporcionadas en la tabla 1 o la tabla 2, los ARNbc de la invención pueden comprender al menos una cadena de una longitud mínima de 21 nt. Cabe esperar razonablemente que los ARNbc más cortos que comprende una de las secuencias de la tabla 1 o la tabla 2 menos sólo unos pocos nucleótidos en uno o ambos extremos pueden ser igualmente eficaz en comparación con los

ARNbc descritos anteriormente. Por lo tanto, la invención contempla los ARNbc 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 la tabla 2 y que difieren en su capacidad para inhibir la expresión del gen PIK4CB o PIK4CA en un ensayo de FACS u otro ensayo como se describe en la presente memoria a continuación en no más de 5, 10, 15, 20, 25 o 30% de inhibición de un ARNbc que comprende la secuencia completa. Además los ARNbc que escinden en la secuencia diana proporcionada en la tabla 1 o la tabla 2 pueden ser construirse fácilmente usando la secuencia de referencia y la secuencia diana proporcionadas.

Además, los agentes de ARNi proporcionados en la tabla 1 o la tabla 2 identifican una zona útil en el ARNm PIK4CB o PIK4CA que es especialmente sensible a la escisión del ARNi. Como tal, la presente invención comprende además agentes de ARNi que los agentes de la presente invención dirigen dentro de la secuencia diana. Tal como se emplea en la presente memoria un segundo agente de ARNi se dice que se dirige 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 de la cadena complementaria del primer agente de ARNi. Dicho segundo agente consistirá generalmente en al menos 15 nucleótidos contiguos de una de las secuencias proporcionadas en la tabla 1 o la tabla 2 acopladas a las secuencias de nucleótidos adicionales tomadas de la región contigua a la secuencia seleccionada en el gen diana. Por ejemplo, los últimos 15 nucleótidos de la SEQ ID n°: 5 combinados con los 6 nucleótidos siguientes del gen PIK4CB producirían un agente de una sola cadena de 21 nucleótidos que está basado en una de las secuencias proporcionadas en la tabla 1. Basándose en esta cadena única, podría generarse fácilmente una cadena transcrita complementaria. Ésta escindiría el ARNm diana en la misma región de sensibilidad como la SEQ ID n° 5 de doble cadena original. Lo mismo se podría hacer para PIK4CA basado en las secuencias que se proporcionan en la tabla 2.

El ARNbc de la invención puede contener uno o más emparejamientos incorrectos con la secuencia diana. En una realización preferida, el ARNbc de la invención no contiene más de 3 emparejamientos incorrectos. Si la cadena complementaria del ARNbc contiene emparejamientos incorrectos con una secuencia diana, es preferible que la zona de emparejamientos incorrectos no esté situada en el centro de la región de complementariedad. Si la cadena complementaria del ARNbc contiene emparejamientos incorrectos con la secuencia diana, es preferible que los emparejamientos incorrectos se restrinjan a 5 nucleótidos de cualquiera de los extremos, por ejemplo 5, 4, 3, 2, o 1 nucleótidos, ya sea del extremo 5' o 3' final de la región de complementariedad. Por ejemplo, para una cadena de ARNbc de 23 nucleótidos que es complementaria de una región del gen diana PIK4CB, el ARNbc en general no contiene ningún emparejamiento incorrecto en los 13 nucleótidos centrales. Los métodos descritos en la invención se pueden utilizar para determinar si un ARNbc que contiene un emparejamiento incorrecto con una secuencia diana es eficaz para reducir la expresión de PIK4CB en una célula. El examen de la eficacia de los ARNbc con emparejamientos incorrectos en la inhibición de la expresión de PIK4CB es importante, especialmente si la región de complementariedad concreta en PIK4CB se sabe que tiene variación de secuencia polimórfica en los seres humanos. El mismo análisis se puede hacer para PIK4CA específico de ARNbc.

En una realización, al menos un extremo del ARNbc tiene un prolongación monocatenaria de 1 a 4 nucleótidos, en general de 1 o 2 nucleótidos. Los ARNbc que tienen al menos un prolongación de nucleótidos tienen propiedades inhibitoras inesperadamente superiores que sus contrapartidas de extremos romos. Por otra parte, la presencia de solamente un prolongación de nucleótidos fortalece la actividad de interferencia del ARNbc, sin afectar toda su estabilidad. Se ha demostrado que el ARNbc que tiene solamente un prolongación es especialmente estable y eficaz *in vivo*, así como en una variedad de células, medios de cultivo celular, sangre y suero. Generalmente, la prolongación monocatenaria se encuentra en el extremo 3'-terminal de la cadena complementaria o, alternativamente, en el extremo 3' terminal de la cadena transcrita. El ARNbc también puede tener un extremo romo, generalmente situado en el extremo 5' de la cadena complementaria. Dichos ARNbc han mejorado la estabilidad y la actividad inhibitora, permitiendo así la administración a dosis bajas, es decir, menos de 5 mg/kg de peso corporal del receptor al día. Generalmente, la cadena complementaria del ARNbc tiene un prolongación de nucleótidos en el extremo 3'. En otra realización, uno o más de los nucleótidos en la prolongación se sustituye por un tiófosfato de nucleósido.

En la tabla 1 y la tabla 2, se muestran pares mal emparejados de cadenas de ARN con dos nucleótidos de ADN con timidina en el extremo 3'. Este motivo T-T se ilustra ya que es un motivo generalmente utilizado que tiende a dar estabilidad u otras propiedades deseables al ARNip. Por lo tanto T-T es una realización adecuada de la invención. No obstante, es bien sabido por los expertos en la técnica que otras disposiciones de nucleótidos, opcionalmente con enlaces internucleosídicos modificados, pueden emplearse modificaciones químicas o cápsulas protectoras en el extremo 3' de una cadena de ARNip. Los expertos en la técnica saben que dichas modificaciones conducen a moléculas equivalentes con mejor funcionalidad debido a que la secuencia diana del ARNm sigue siendo la misma, pero los nucleótidos modificados que sobresalen pueden influir favorablemente en otro comportamiento farmacológico.

En aún otra realización, el ARNbc está modificado químicamente para aumentar la estabilidad o proporcionar otros beneficios terapéuticos. Los ácidos nucleicos de la invención pueden sintetizarse y/o modificarse por métodos bien demostrados en la técnica, tales como los descritos en "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, SL *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE.UU. Las modificaciones químicas pueden incluir, pero no se limitan a modificaciones en 2', modificaciones en otros sitios del azúcar o base de un oligonucleótido, introducción de bases artificiales en la cadena de oligonucleótidos, enlace covalente a un ligando o resto químico y

sustitución de enlaces fosfato entre nucleótidos por enlaces alternativos tales como tiofosfatos. Puede emplearse más de una de dichas modificaciones.

El enlace químico de las dos cadenas de ARNbc separadas puede conseguirse por alguna de una variedad de técnicas bien conocidas, por ejemplo introduciendo enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno; interacciones hidrófobas, interacciones de van der Waals o de apilamiento; por medio de la coordinación metal-ion, o mediante el empleo de análogos de purina. En general, los grupos químicos que pueden emplearse para modificar el ARNbc comprenden, sin limitación, azul de metileno; grupos bifuncionales, generalmente bis-(2-cloroetil) amina; N-acetil-N'-(p-glioxilbenzoil)-cistamina; 4-tiouracilo y psoraleno. En una realización, el enlazador es un enlazador de hexaetilenglicol. En este caso, los ARNbc se producen por síntesis en fase sólida y el enlazador de hexaetilenglicol se incorpora según métodos normalizados (p. ej., Williams, D.J., y K.B. Hall, *Biochem.* (1996) 35:14665-14670). En una realización concreta, el extremo 5' de la cadena complementaria y el extremo 3' de la cadena transcrita se enlazan químicamente mediante un enlazador de hexaetilenglicol. En otra realización, al menos un nucleótido del ARNbc comprende un grupo fosforotioato o fosforoditioato. El enlace químico en los extremos del ARNbc está formado generalmente por enlaces de triple hélice. La tabla 1 y la tabla 2 proporcionan ejemplos de secuencias de ARNbc que podrían modificarse según estas técnicas.

Aún en otra realización, los nucleótidos en una o ambas de las dos cadenas individuales pueden modificarse para evitar o inhibir las actividades de degradación de enzimas celulares, tales como, por ejemplo, sin limitación, determinadas nucleasas. Las técnicas para la inhibición de la actividad de degradación de las enzimas celulares contra los ácidos nucleicos son conocidas en la técnica incluidas, pero no limitadas a, modificaciones de 2'-amino, modificaciones de 2'-amino azúcar, modificaciones de 2'-F azúcar, modificaciones de 2'-F, modificaciones de 2'-alquil azúcar, modificaciones de la cadena principal sin carga, modificaciones de morfolino, modificaciones 2'-O-metilo, y fosforamidato (véase, p. ej., Wagner, *Nat Med.* (1995) 1:1116-8). Por lo tanto, al menos un 2'-hidroxilo de los nucleótidos en un ARNbc se sustituye por un grupo químico, en general por un grupo 2'-amino o un 2'-metilo. Además, al menos un nucleótido puede modificarse para formar un nucleótido bloqueado. Dicho nucleótido bloqueado contiene un puente de metileno que conecta el oxígeno en 2' de la ribosa con el carbono en 4' de la ribosa. Los oligonucleótidos que contienen el nucleótido bloqueado se describen 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 bloqueado en un oligonucleótido mejora la afinidad por las secuencias complementarias y aumenta 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 ARNbc puede mejorar su absorción celular, así como la orientación a un tejido concreto o la absorción por tipos específicos de células. En ciertos casos, un ligando hidrófobo se conjuga con el ARNbc para facilitar la penetración directa de la membrana celular. Alternativamente, el ligando conjugado con el ARNbc es un sustrato para la endocitosis mediada por el receptor. Estas estrategias se han utilizado para facilitar la penetración celular de oligonucleótidos complementarios, así como de agentes de ARNbc. Por ejemplo, el colesterol se ha conjugado con diversos oligonucleótidos complementarios dando lugar a 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 lipófilos que se han conjugado con oligonucleótidos comprenden ácido 1-pireno butírico, 1,3-bis-O-(hexadecil)glicerol y mentol. Un ejemplo de un ligando para endocitosis mediada por receptor es el ácido fólico. El ácido fólico se introduce en la célula por endocitosis mediada por receptor de folato. Los compuestos de ARNbc que llevan ácido fólico sería transportado de manera eficiente dentro de la célula a través de la endocitosis mediada por el receptor de folato. Li y colaboradores informan que la unión de ácido fólico al extremo 3' de un oligonucleótido dio lugar a un aumento de 8 veces en la absorción celular del oligonucleótido. Li, S.; Deshmukh, H.M.; Huang, L. *Pharm. Res.* 1998, 15, 1540. Otros ligandos que han sido conjugados con oligonucleótidos comprenden polietilenglicoles, grupos de hidratos de carbono, agentes de reticulación, conjugados de porfirina y péptidos para administración.

En determinados casos, la conjugación de un ligando catiónico con oligonucleótidos da lugar a una mejor resistencia a las nucleasas. Ejemplos representativos de ligandos catiónicos son propilamonio y dimetilpropilamonio. Curiosamente, se describieron oligonucleótidos complementarios para conservar su gran afinidad de unión a ARNm cuando el ligando catiónico se dispersaba en todo el oligonucleótido. Véase M. Manoharan *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 2002, 12, 103 y referencias en el mismo.

El ARNbc conjugado con el ligando de la invención puede sintetizarse empleando un ARNbc que lleva una funcionalidad reactiva colgante, tal como la proveniente de la unión de una molécula de enlace en el ARNbc. Este oligonucleótido reactivo se puede hacer reaccionar directamente con ligandos disponibles en el comercio, ligandos que se sintetizan que llevan alguno de una variedad de grupos protectores, o ligandos que tienen un resto de enlace unido al mismo. Los métodos de la invención facilitan la síntesis de ARNbc conjugado con el ligando mediante el empleo, en algunas realizaciones preferidas, de monómeros de nucleósido que se han conjugado apropiadamente con ligandos y que puede además estar unidos a un material de soporte sólido. Dichos conjugados de ligando-nucleósido, opcionalmente unidos a un material de soporte sólido, se preparan según algunas realizaciones preferidas de los métodos de la invención por reacción de un ligando de unión a suero seleccionado con un resto de enlace situado en la posición 5' de un nucleósido u oligonucleótido. En determinados casos, un ARNbc que lleva un ligando aralquilo unido al extremo 3' del ARNbc se prepara acoplando en primer lugar por enlace covalente un bloque de construcción de monómeros a un soporte de vidrio de poro controlado mediante un grupo aminoalquilo de cadena larga. A continuación, los nucleótidos se unen por técnicas de síntesis en fase sólida normalizadas al

bloques de construcción de monómeros unido al soporte sólido. El bloque de construcción de monómeros puede ser un nucleósido u otro compuesto orgánico que sea compatible con la síntesis en fase sólida.

El ARNbc empleado en los conjugados de la invención puede ser convenientemente y rutinariamente construido por la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis lo comercializan varios vendedores
5 incluido, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Además o alternativamente, puede emplearse cualquier otro medio para dicha síntesis conocida en la técnica. También se conoce el uso de técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos, tales como los fosfortioatos y derivados alquilados.

Lo dado a conocer respecto a la síntesis de determinados oligonucleótidos modificados puede encontrarse en las siguientes patentes de EE.UU.: Pat. de EE.UU. n° 5.138.045 y n° 5.218.105, preparadas para oligonucleótidos
10 conjugados de poliamina; Pat. de EE.UU. n° 5.212.295, preparada para monómeros para la preparación de oligonucleótidos que tienen enlaces de fósforo quirales; Pat. de EE.UU. n° 5.378.825 y n° 5.541.307, preparadas para oligonucleótidos que tienen ejes centrales modificados; Pat. de EE.UU. n° 5.386.023, preparada para oligonucleótidos con cadena principal modificada y la preparación de los mismos mediante acoplamiento reductivo; Pat. de EE.UU. n° 5.457.191, preparada para bases nucleotídicas modificadas basadas en el sistema de anillos de
15 3-deazapurina y los métodos de síntesis de las mismas; Pat. de EE.UU. n° 5.459.255, preparada para bases nucleotídicas modificadas basadas en purinas sustituidas en N-2; Pat. de EE.UU. n° 5.521.302, preparada para procedimientos para la preparación de oligonucleótidos que tienen enlaces de fósforo quirales; Pat. de EE.UU. n° 5.539.082, preparada para ácidos péptido nucleicos; Pat. de EE.UU. n° 5.554.746, preparada para oligonucleótidos que tienen cadenas principales de β -lactama; Pat. de EE.UU. n° 5.571.902, preparada para métodos y materiales
20 para la síntesis de oligonucleótidos; Pat. de EE.UU. n° 5.578.718, preparada para nucleósidos que tienen grupos alquiltio, en donde dichos grupos pueden emplearse como enlazadores a otros restos unidos en cualquiera de una variedad de posiciones del nucleósido; Pat. de EE.UU. n° 5.587.361 y 5.599.797, preparada para oligonucleótidos que tienen enlaces fosfortioato de alta pureza quiral; Pat. de EE.UU. n° 5.506.351, preparada para procedimientos para la preparación de 2'-O-alquil guanosina y compuestos relacionados, incluidos los compuestos de 2,6-
25 diaminopurina; Pat. de EE.UU. n° 5.587.469, preparada para oligonucleótidos que tienen purinas sustituidas en N-2; Pat. de EE.UU. n° 5.587.470, preparada para oligonucleótidos que tienen 3-deazapurinas; Pat. de EE.UU. n° 5.223.168, y Pat. de EE.UU. n° 5.608.046, preparadas ambas para análogos des 4'-desmetil nucleósido conjugados; Pat. de EE.UU. n° 5.602.240 y n° 5.610.289, preparadas para los análogos de oligonucleótidos de cadena principal modificada; Pat. de EE.UU. n° 6.262.241 y n° 5.459.255, preparada para, entre otros, los métodos de síntesis de 2'-
30 fluoro-oligonucleótidos. Otras modificaciones favorables se exponen en la Pat. de EE.UU. n° 6.670.486, las publicaciones PCT n° WO2003082255 y n° WO2005021749.

En el ARNbc conjugado del ligando y la molécula de ligando que lleva nucleósidos unidos específicos de la secuencia de la invención, los oligonucleótidos y oligonucleósidos se pueden ensamblar en un sintetizador de ADN
35 adecuado utilizando los nucleótidos típicos o precursores de nucleósidos, o precursores de conjugados de nucleótidos o nucleósidos que ya llevan el resto de enlace, ligando-nucleótido o precursores de nucleósido-conjugado que ya llevan la molécula de ligando, o bloques de construcción que llevan ligandos no nucleosídicos.

Al utilizar precursores de conjugados de nucleótidos que ya llevan un resto con enlace, la síntesis de los nucleósidos unidos específicos de secuencia generalmente se completa, y la molécula de ligando a continuación se hace reaccionar con el resto con enlace para formar el oligonucleótido conjugado del ligando. Los conjugados de
40 oligonucleótidos que llevan una variedad de moléculas, tales como los esteroides, vitaminas, lípidos y moléculas indicadoras, se han descrito previamente (véase Manoharan *et al.*, Solicitud PCT WO 93/07883). En una realización preferida, los oligonucleótidos o nucleósidos unidos de la invención se sintetizan mediante un sintetizador automático usando fosforamiditas derivadas de conjugados de ligando-nucleósido además de las fosforamiditas normales y fosforamiditas anormales que están disponibles en el mercado y se utilizan habitualmente en la síntesis
45 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 proporcionar propiedades terapéuticas potenciadas al oligonucleótido, tales como la cinética de hibridación potenciada. Además, los oligonucleótidos que contienen
50 cadenas principales de fosfortioato han potenciado la estabilidad de la nucleasa. Por lo tanto, los nucleósidos funcionalizados unidos de la invención se pueden aumentar para que incluyan una cualquiera o ambas cadenas principales de fosfortioato o un grupo 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-aminoalquilo, 2'-O-alilo, 2'-o-metoxietoxi o 2'-desoxi-2'-fluoro. Un listado resumen de algunas de las modificaciones de oligonucleótidos conocidos en la técnica se encuentra en, por ejemplo, la publicación PCT WO 200370918.

En algunas realizaciones, las secuencias de nucleósidos funcionalizados 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
55 de éster activo de un ligando seleccionado. Los derivados de ésteres activos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los ésteres activos representativos comprenden ésteres de N-hidrosuccinimida, ésteres tetrafluorofenólicos, ésteres pentafluorofenólicos y ésteres pentaclorofenólicos. La reacción del grupo amino y el éster activo produce un oligonucleótido en el que el ligando seleccionado se une a la posición 5' a través de un
60 grupo enlazador. El grupo amino en el extremo 5' puede prepararse utilizando un reactivo C6 modificador de 5'-amino. En una realización, las moléculas de ligando se pueden conjugar con oligonucleótidos en la posición 5' mediante el uso de una ligando-nucleósido fosforamidita en donde el ligando está unido al grupo 5'-hidroxi directa o

indirectamente mediante un enlazador. Dichas ligando-nucleósido fosforamiditas se utilizan normalmente al final de un procedimiento de síntesis automatizada para proporcionar un oligonucleótido conjugado con el ligando que lleva el ligando en el extremo 5'.

Ejemplos de enlaces o ejes principales entre nucleósidos modificados comprenden, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquilfosfonatos incluidos 3'-alquilen-fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluidos 3'-amino-fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres, y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos con enlaces 2'-5' de éstos, y los que tienen invertida la polaridad en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósido están unidos 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Patentes representativas de Estados Unidos relacionadas con la preparación de los enlaces anteriores que contienen átomos de fósforo comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. n° 3.687.808; n° 4.469.863; n° 4.476.301; n° 5.023.243; n° 5.177.196; n° 5.188.897; n° 5.264.423; n° 5.276.019; n° 5.278.302; n° 5.286.717; n° 5.321.131; n° 5.399.676; n° 5.405.939; n° 5.453.496; n° 5.455.233; n° 5.466.677; n° 5.476.925; n° 5.519.126; n° 5.536.821; n° 5.541.306; n° 5.550.111; n° 5.563.253; n° 5.571.799; n° 5.587.361; n° 5.625.050 y n° 5.697.248.

Ejemplos de enlaces o cadenas principales entre nucleósidos modificados que no comprenden un átomo de fósforo en el mismo (es decir, oligonucleósidos) tienen cadenas principales que están formadas por alquilo de cadena corta o enlaces cicloalquilo entre azúcares, enlaces heteroátomo y alquilo mixto o enlaces cicloalquilo entre azúcares, o uno o más enlaces heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta entre azúcares. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte de la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metilen-formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilnimino y metilhidrazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otros que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂ mezclados. Como se ha indicado en la tabla 1 y la tabla 2, puede añadirse un par dT-dT en el extremo 3' de una de las dos (o ambas) cadena(s) del ARNbc. El par dT-dT añadido en estas situaciones no es por lo general complementario con la secuencia diana. Estos pares dT-dT, que pueden contener enlaces fosforotioato (azufre) internucleósidos, se añaden para mejorar la estabilidad.

Patentes representativas de Estados Unidos relacionadas con la preparación de los oligonucleósidos anteriores comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU n° 5.034.506; n° 5.166.315; n° 5.185.444; n° 5.214.134; n° 5.216.141; n° 5.235.033; n° 5.264.562; n° 5.264.564; n° 5.405.938; n° 5.434.257; n° 5.466.677; n° 5.470.967; n° 5.489.677; n° 5.541.307; n° 5.561.225; n° 5.596.086; n° 5.602.240; n° 5.610.289; n° 5.608.046; n° 5.610.289; n° 5.618.704; n° 5.623.070; n° 5.663.312; n° 5.633.360; n° 5.677.437 y n° 5.677.439.

En ciertos casos, el oligonucleótido puede ser modificado por un grupo no de ligando. Un número de moléculas no de ligando se han conjugado con oligonucleótidos a fin de potenciar la actividad, la distribución celular o la absorción celular del oligonucleótido, y los procedimientos para realizar dichas conjugaciones están disponibles en la bibliografía científica. Dichos restos no de ligando han incluido restos 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, p. ej., 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 tiocolésterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), una cadena alifática, p. ej., dodecandiol o restos de 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, p. ej., di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18: 3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), o ácido adamantano acético (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), un resto de palmitilo (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), o un resto de octadecilamina o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Las patentes representativas de Estados Unidos que dan a conocer la preparación de dichos conjugados de oligonucleótidos se han enumerado anteriormente. Los protocolos típicos de conjugación implican la síntesis de oligonucleótidos que llevan un enlazador amino en una o más posiciones de la secuencia. El grupo amino se hace reaccionar a continuación con la molécula que está siendo conjugada empleando reactivos apropiados de acoplamiento o activación. La reacción de conjugación se puede realizar ya sea con el oligonucleótido todavía unido al soporte sólido o después de la escisión del oligonucleótido en fase de solución. La purificación del conjugado de oligonucleótido por HPLC normalmente da el conjugado puro. El empleo de un conjugado de colesterol se prefiere especialmente ya que dicho resto tal puede aumentar la orientación a las células hepáticas que son un sitio principal de infección por virus ARN monocatenario positivo (tal como VHC).

La presente descripción describe una amplia variedad de realizaciones de ARNbc que son útiles para silenciar la expresión de PIK4CB y por lo tanto para evitar la propagación de virus ARN monocatenario positivo y para tratar los trastornos relacionados. Si bien el diseño del agente terapéutico específico puede tomar una variedad de formas, determinadas características funcionales distinguirán las combinaciones preferidas de ARNbc de otras combinaciones de ARNbc. En especial, se probarán características tales como una buena estabilidad en el suero, alta potencia, falta de respuesta inmunitaria inducida y buen comportamiento como medicamento, todo medible por

los expertos en la técnica, para identificar el ARNbc preferido de la invención. En algunas situaciones, no todos estos aspectos funcionales estarán presentes en la combinación del ARNbc preferido. Pero los expertos en la técnica pueden optimizar estas y otras variables para seleccionar compuestos preferidos de la invención.

- 5 Los inventores conocen patrones de modificaciones químicas que tienden a proporcionar cualidades farmacológicas, inmunológicas y por último terapéuticas significativamente mejoradas. Se observa que estos patrones mejoran el ARNip independientemente de la secuencia diana seleccionada. La tabla 3 presenta los patrones de modificaciones químicas preferidas para su uso con el ARNbc de doble cadena presentado en la tabla 1 o la tabla 2. Estos patrones no son mutuamente excluyentes.

Tabla 3 - Modificaciones químicas preferidas de ARNip

Serie de modificación química	Cambios realizados en la cadena transcrita (5'-3')	Cambios realizados en la cadena complementaria (5'-3')
1	-dTsdT 3'	-dTsdT 3'
2	dtsdt 3', 2'OMe@allPy	dtsdt 3', 2'OMe@uA, cA
3	dtsdt 3', 2'OMe@all Py	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

10 s = enlace fosforotioato

dT = desoxirribotimidina

2'OMe = modificación 2'-O-metil de ARN

Py = nucleótido de pirimidina

Chol = colesterol. "exo" se refiere al enlace 3' final; "endo" significa que el enlace es en un nucleósido interno.

- 15 uA o cA = indica a una secuencia AU o CA de ARN, la U o C recibe la modificación indicada. Lo mismo se aplica a uG y uU.

Agentes de ARNi codificados por vectores

- 20 El ARNbc de la invención también puede expresarse en vectores víricos recombinados intracelularmente *in vivo*. Los vectores víricos recombinados de la invención comprenden secuencias que codifican el ARNbc de la invención y cualquier activador adecuado para la expresión de las secuencias de ARNbc. Los activadores adecuados incluyen, por ejemplo, las secuencias del activador ARN pol III U6 o H1 y el activador de citomegalovirus. La selección de otros activadores adecuados está dentro de la experiencia en la técnica. Los vectores víricos recombinados de la invención también pueden comprender activadores inducibles o regulables para la expresión del ARNbc en un tejido
- 25 concreto o en un medio intracelular concreto. El empleo de vectores víricos recombinados para administrar ARNbc de la invención a células *in vivo* se expone con más detalle a continuación.

El ARNbc de la invención se puede expresar en un vector vírico recombinado, ya sea como dos moléculas de ARN complementarias separadas, o como una sola molécula de ARN con dos regiones complementarias.

- 30 Se puede utilizar cualquier vector vírico capaz de aceptar las secuencias de codificación para que la(s) molécula(s) de ARNbc se exprese(n), por ejemplo, vectores derivados de adenovirus (AV); virus adenoasociado (AAV); retrovirus (p. ej., lentivirus (LV), rbdovirus, virus de leucemia murina); virus del herpes y similares. El tropismo de los vectores víricos puede modificarse seudotipando los vectores con proteínas de la envoltura o de otros antígenos de superficie de otros virus, o sustituyendo diferentes proteínas de la cápside vírica, según proceda.

- 35 Por ejemplo, los vectores lentivíricos de la invención pueden seudotiparse con proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV), la rabia, el Ébola, el Mokola y similares. Los vectores AAV de la invención pueden construirse para diferentes células diana modificando genéticamente los vectores para expresar diferentes serotipos de proteínas de la 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 la cápside de serotipo 2 en el vector AAV 2/2 puede ser sustituido por un gen de la cápside de serotipo 5 para producir un vector AAV 2/5. Las técnicas para construir vectores de AAV
- 40 que expresan diferentes serotipos de proteínas de la cápside se encuentran dentro de la experiencia en la técnica; véase, p. ej., Rabinowitz J.E. *et al.* (2002), *J. Virol.* 76:791-801.

La selección de vectores víricos recombinados adecuados para su uso en la invención, los métodos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar el ARNbc en el vector y los métodos de administración del vector vírico a las células de interés están dentro de la experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Dornburg R. (1995), *Gene Therap.* 2: 301-310; Eglitis M.A. (1988), *Biotechniques* 6: 608-614; Miller A.D. (1990), *Hum. Gen. Therap.* 1: 5-14; 5 Anderson W.F. (1998), *Nature* 392: 25-30; y Rubinson D.A. *et al.*, *Nat. Genet.* 33: 401-406.

Los vectores víricos preferidos son los derivados de AV y AAV. En una realización especialmente preferida, el ARNbc de la invención se expresa como dos moléculas de ARN una sola cadena separadas y complementarios en un vector AAV recombinado que comprende, por ejemplo, ya sea los activadores de ARN U6 o H1, o el activador de citomegalovirus (CMV).

10 Un vector AV adecuado para expresar el ARNbc de la invención, un método para construir el vector AV recombinado, y un método para administrar el vector a las células diana, se describen en Xia H. *et al.* (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010.

Vectores AAV adecuados para expresar el ARNbc de la invención, métodos para construir el vector AV recombinado y métodos para administrar los vectores a las células diana se describen en Samulski R. *et al.* (1987), *J. Virol.* 61: 15 3096 -3101; Fisher K.J. *et al.* (1996), *J. Virol.*, 70: 520-532; Samulski R. *et al.* (1989), *J. Virol.* 63:3822-3826; Pat. de EE.UU. n° 5.252.479; Pat. de EE.UU. n° 5.139.941; Solicitud de Patente Internacional n° WO 94/13788; y Solicitud de Patente Internacional n° WO 93/24641.

Composiciones farmacéuticas que comprenden ARNbc

20 En una realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el ARNbc descrito en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención comprende una combinación de los ARNbc y otro ingrediente principio activo. La composición farmacéutica que comprende la combinación de ARNbc y el ingrediente principio activo es útil para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con los procesos patológicos mediados por la infección por virus ARN monocatenario positivo.

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención se administran en dosis suficientes para inhibir la expresión o actividad del gen PIK4CB o PIK4CA. Los presentes inventores han determinado que las composiciones que comprenden el ARNbc de la invención se pueden administrar a dosis sorprendentemente bajas. Una dosis de 5 mg de ARNbc por kilogramo de peso corporal del receptor al día es suficiente para inhibir o suprimir del gen PIK4CB o PIK4CA.

30 En general, una dosis adecuada de cada ARNbc en la combinación estará comprendida en el intervalo de 0,01 a 5,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor al día, generalmente en el intervalo de 1 microgramo a 1 mg por kilogramo de peso corporal al día. La composición farmacéutica se puede administrar una vez al día, o el ARNbc puede administrarse en dos, tres o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día o incluso usando infusión o administración continua en forma de una formulación de liberación controlada. En ese caso, el ARNbc contenido 35 en cada subdosis debe ser igualmente más pequeño para conseguir la dosis diaria total. La dosis individual también se puede componer para su administración durante varios días, p. ej., empleando una formulación de liberación mantenida convencional que proporciona la liberación mantenida del ARNbc durante un período de varios días. En esta realización, la unidad de dosificación contiene un múltiplo correspondiente de la dosis diaria.

40 El experto en la técnica valorará que determinados factores pueden influir en la dosis y el tiempo requerido para tratar eficazmente a un paciente, entre ellos pero no limitados a la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del paciente, y a otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un paciente con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos. Pueden hacerse estimaciones de las dosis eficaces y las vidas medias *in vivo* para cada uno de los ARNbc abarcados por la invención utilizando metodologías convencionales o sobre la base de pruebas *in vivo* utilizando un modelo animal apropiado, como se describe en otra parte en la presente 45 memoria.

Los inventores reconocen que por varias razones, puede ser deseable para tratar la infección por el virus ARN monocatenario positivo con una combinación de dos o más ARNbc. Se selecciona un ARNbc de entre el ARNbc de la invención, y otro ARNbc se selecciona de entre los ARNbc que se sabe que se dirigen al propio virus ARN monocatenario positivo. El ARNbc que se dirige al VHC o al VPH u otros virus ARN monocatenario positivo pueden 50 identificarse a partir de publicaciones de la técnica anterior. Una composición farmacéutica de la invención que comprende más de un tipo de ARNbc cabría esperar que contenga dosis de cada ARNbc tal como se describe en la presente memoria.

Pueden proporcionarse combinaciones de ARNbc juntas en una única composición farmacéutica de formulación individual. Alternativamente, la combinación de ARNbc puede proporcionarse en formas farmacéuticas separadas, 55 en cuyo caso se pueden administrar al mismo tiempo o en momentos diferentes, y posiblemente por diferentes medios. Por consiguiente, la invención contempla composiciones farmacéuticas que comprenden las combinaciones deseadas de ARNbc de la invención; y también contempla composiciones farmacéuticas de ARNbc solo que están destinados a ser proporcionados como parte de una politerapia. En este último caso, la politerapia de la invención es de ese modo un método de administración en lugar de una composición de materia.

Los avances en la genética del ratón han generado una serie de modelos de ratón para el estudio de varias enfermedades humanas, tales como los procesos patológicos mediados por la infección por VHC. Dichos modelos se utilizan para los ensayos *in vivo* de ARNbc, así como para la determinación de una dosis terapéuticamente eficaz, y combinaciones preferidas de ARNbc.

- 5 Puede utilizarse cualquier método para administrar un ARNbc de la presente invención a un mamífero que contiene células infectadas con VHC. Por ejemplo, la administración puede ser tópica (p. ej., vaginal, transdérmica, etc); oral; o parenteral (p. ej., por inyección subcutánea, intraventricular, intramuscular, o intraperitoneal, o por goteo intravenoso). La administración puede ser rápida (p. ej., por inyección), o puede ocurrir durante un período (p. ej., por infusión lenta o administración de formulaciones de liberación lenta).
- 10 Para administración tópica, el ARNbc puede formularse en composiciones tales como soluciones acuosas estériles y no estériles, soluciones no acuosas en disolventes corrientes tales como alcoholes, o soluciones en bases de aceites líquidos o sólidos. Dichas soluciones también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Las composiciones para administración tópica pueden formularse en forma de parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Los geles y cremas se pueden formular usando polímeros y permeabilizadores conocidos en la técnica.

Para administración parenteral, intratecal o intraventricular, una molécula de ARNbc puede formularse en composiciones tales como soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados (p. ej., potenciadores de penetración, compuestos portadores y otros vehículos farmacéuticamente aceptables).

- 20 Además, las moléculas de ARNbc de la invención se pueden administrar a un mamífero que contiene células infectadas por virus ARN monocatenario positivo empleando métodos no víricos, tales como medios biológicos o abiológicos como se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.271.359. La administración abiológica puede conseguirse por varios métodos incluidos, sin limitación, (1) cargar liposomas con una molécula de ácido ARNbc proporcionada en la presente memoria; (2) formar un complejo de una molécula de ARNbc con lípidos o liposomas para formar complejos de ácido nucleico-lípido o de ácido nucleico-liposoma; o (3) proporcionar un sistema de administración terapéutico basado en polímeros nanopartículas o nanoemulsiones. Estas técnicas generalmente son bien conocidas en la técnica en otros contextos. Sigue una breve descripción.

El complejo de liposomas o lípidos puede estar compuesto de lípidos catiónicos y neutros comúnmente utilizados para transfectar células *in vitro*. Los lípidos catiónicos pueden formar complejos (p. ej., asociar cargas) con ácidos nucleicos con carga negativa para formar liposomas. Ejemplos de liposomas catiónicos comprenden, sin limitación, lipofectina, lipofectamina, lipofectace, y DOTAP. Los procedimientos para formar liposomas son bien conocidos en la técnica. Las composiciones de liposomas se pueden formar, por ejemplo, a partir de fosfatidilcolina, dimiristoil fosfatidilcolina, dipalmitoil fosfatidilcolina, dimiristoil fosfatidilglicerol o dioleoil fosfatidiletanolamina. En el mercado están disponibles numerosos agentes lipófilos, incluida la Lipofectina™ (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Calif.) y Effectene™ (Qiagen, Valencia, Calif.). Además, los métodos de administración general pueden optimizarse utilizando lípidos catiónicos disponibles en el mercado, tales como DDAB o DOTAP, cada uno de los cuales puede mezclarse 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 dosis estará totalmente encapsulada en el liposoma, tal como en la SNALP descrita en Morrissey *et al.* *Nat Biotechnol.* Agosto de 2005; 23(8): 1002-7. Epub 24 de julio de 2005. Véase también Wheeler, J.J. *et al.* 1999. *Gene Ther.* 6, 271-281. En otras realizaciones, pueden utilizarse policationes tales como polietilenimina para conseguir la administración *in vivo* y *ex vivo* (Boletta *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.* 7: 1728 (1996)). Información adicional sobre el uso de liposomas para administrar ácidos nucleicos se puede encontrar en la patente de EE.UU. n° 6.271.359, Publicación PCT WO 96/40964 y Morrissey, D. *et al.* 2005. *Nat. Biotechnol.* 23 (8): 1002-7.

- 45 La administración biológica puede realizarse por varios métodos incluidos, sin limitación, el empleo de vectores víricos. Por ejemplo, pueden emplearse vectores víricos (p. ej., adenovirus y vectores de virus del herpes) para administrar moléculas de ARNbc a células de la piel y células del cuello uterino. Pueden utilizarse técnicas de biología molecular habituales para introducir uno o más de los ARNbc proporcionados en la presente memoria en uno de los muchos vectores víricos diferentes previamente desarrolladas para administrar ácido nucleico a las células. Estos vectores víricos resultantes se pueden emplear para administrar uno o más ARNbc a las células, por ejemplo, por infección.

Los ARNbc de la presente invención pueden formularse en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" (denominado también en la presente memoria "excipiente") es un disolvente, agente de suspensión farmacéuticamente aceptable o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte.

- 55 Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos o sólidos, y pueden seleccionarse de la forma prevista en mente de administración a fin de proporcionar el volumen, consistencia y otras propiedades deseadas de transporte y químicas pertinentes. Los vehículos farmacéuticamente aceptables típicos comprenden, a modo de ejemplo y no de limitación: agua; solución salina; agentes aglutinantes (p. ej., polividona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (p. ej., lactosa y otros azúcares, gelatina o sulfato de calcio); lubricantes (p. ej., almidón, polietilenglicol o acetato de sodio); disgregantes (p. ej., almidón o almidón glicolato de sodio); y agentes humectantes (p. ej., lauril sulfato de sodio).

Además, los ARNbc que se dirigen a la expresión del gen PIK4CB pueden formularse en composiciones que contienen ARNbc mezclado, encapsulado, conjugado, o de otro modo asociado a moléculas (incluidos agentes terapéuticos de molécula pequeña), estructuras moleculares o mezclas de ácidos nucleicos. Por ejemplo, una composición que contiene uno o más agentes de ARNbc de la invención puede contener otros agentes terapéuticos
 5 tales como fármacos antiinflamatorios (p. ej., fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides) y fármacos antivíricos (p. ej., ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir).

La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos ordinarios en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la DL₅₀ (dosis letal para el 50% de la población) y la DE₅₀ (dosis terapéuticamente eficaz para el 50% de la población). La relación de dosis entre los
 10 efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren los compuestos que presentan altos índices terapéuticos.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de composiciones de la invención se encuentra generalmente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna
 15 toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración del compuesto en el plasma
 20 circulante o, cuando proceda, del producto de polipéptido de una secuencia diana (p. ej., consiguiendo una concentración disminuida del polipéptido) que comprende el IC₅₀ (es decir, el concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición media máxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Dicha información puede utilizarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en el plasma se pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Además de su administración individualmente o en gran número, como se expuso anteriormente, los ARNbc de la invención pueden administrarse en combinación con otros conocidos agentes eficaces en el tratamiento de procesos
 25 patológicos mediados por la infección por VHC. En cualquier caso, el médico administrador puede ajustar la cantidad y el momento de administración de ARNbc sobre la base de los resultados observados utilizando medidas habituales de eficacia conocidas en la técnica o descritas en la presente memoria.

Las combinaciones de ARNbc pueden probarse *in vitro* e *in vivo* utilizando los mismos métodos empleados para la identificación de un solo ARNbc preferido. Dichas combinaciones pueden seleccionarse en base a una base puramente bioinformática. Alternativamente, dichas combinaciones pueden seleccionarse en base a evaluaciones *in vitro* o *in vivo* a lo largo de las líneas de las que se describen en la presente memoria para cada uno de los agentes de ARNbc. Un ensayo preferido para probar combinaciones de ARNbc es el ensayo expuesto en los ejemplos a continuación.

35 Métodos para tratar enfermedades causadas por infección por el virus ARN monocatenario positivo

Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden emplearse para tratar enfermedades y afecciones causadas por la infección por virus ARN monocatenario positivo (por ejemplo, VHC), que pueden ser el resultado de infecciones clínicas o subclínicas.

En general, el método de tratamiento de la infección por virus ARN monocatenario positivo comprende administrar a un paciente que lo necesita, un compuesto que inhibe selectivamente la actividad de la fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K). Dichos compuestos pueden seleccionarse de entre moléculas pequeñas, ARNbc, un ADN complementario de ADN, una ribozima o un vector de ADN que codifica a los anteriores. Los agentes de molécula pequeña que son selectivos para PIK4CB y/o PIK4CA en el hígado serían de considerable interés con fines terapéuticos en el tratamiento de infecciones por virus ARN monocatenario positivo.

45 Dichas enfermedades y afecciones, se denominan a veces en la presente memoria "procesos patológicos mediados por la infección por virus ARN monocatenario positivo". La principal consecuencia hepatológica de la infección por VHC es la cirrosis y sus complicaciones, incluidas la hemorragia, la insuficiencia hepática y el carcinoma hepatocelular. La fibrosis es el resultado de la inflamación crónica que causa la deposición de componentes de la matriz extracelular que distorsionan la estructura hepática y el bloqueo de la microcirculación y la función hepática. A medida que avanza la cirrosis y el tejido fibrótico se acumula, la actividad necroinflamatoria grave prosigue y comienza la esteatosis. La esteatosis conduce a patologías extrahepáticas como la diabetes, la desnutrición proteica, la hipertensión, las toxinas celulares, la obesidad y la anoxia. A medida que la fibrosis y la esteatosis se agravan el hígado fallará tarde o temprano y requerirá un trasplante de hígado.

50 En esta memoria descriptiva, un "método de tratamiento" pretende hacer referencia a los métodos que tratan, evitan, son profilácticos contra, o reducen el significado de (a un nivel objetivo o subjetivo) uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que está indicada por la frase.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende normalmente cualquier experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se
 60 pueden emplear en la puesta en práctica o ensayos de la invención, se describen a continuación métodos y

materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente memoria los controlará, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser restrictivos.

Ejemplos

Ejemplo 1 Síntesis de ARNbc

5 Procedencia de los reactivos

Cuando la procedencia de un reactivo no está específicamente dada en la presente memoria, dicho reactivo puede obtenerse de cualquier proveedor de reactivos para biología molecular en un patrón de calidad/pureza para su aplicación en biología molecular.

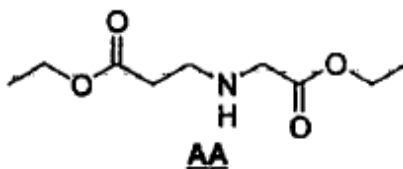
Síntesis de ARNip

- 10 Se produjeron ARN monocatenarios por síntesis en fase sólida a escala de 1 μ mol utilizando un sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Alemania) y vidrio de poro controlado (VPC, 500 Å, Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania) como soporte sólido. Se generaron ARN y ARN que contiene 2'-O-metil nucleótidos por síntesis en fase sólida empleando las fosforamiditas y 2'-O-metil fosforamiditas correspondientes, respectivamente (Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania). Estos bloques de construcción
- 15 se incorporaron en sitios seleccionados dentro de la secuencia de la cadena de oligorribonucleótido empleando química de nucleósido fosforamidita normal tal como la descrita en Current protocols in nucleic acids chemistry, Beaucage, S.L. *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE.UU. Se introdujeron enlaces de fosforotioato por sustitución de la solución oxidante de yodo con una solución del reactivo de Beaucage (Chruachem Ltd., Glasgow, Reino Unido) en acetonitrilo (1%). Se adquirieron otros reactivos auxiliares en Mallinckrodt Baker
- 20 (Griesheim, Alemania).

- La desprotección y purificación de los oligorribonucleótidos en bruto por HPLC de intercambio aniónico se llevaron a cabo según procedimientos establecidos. Los rendimientos y las concentraciones se determinaron 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, Unterschleißheim, Alemania). Se generó ARN bicatenario mezclando una solución
- 25 equimolar de cadenas complementarias en tampón de hibridación (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8; cloruro de sodio 100 mM), se calentó en un baño de agua a 85-90°C durante 3 minutos y se enfrió a temperatura ambiente durante un período de 3-4 horas. La solución de ARN hibridado se almacenó a -20°C hasta su uso.

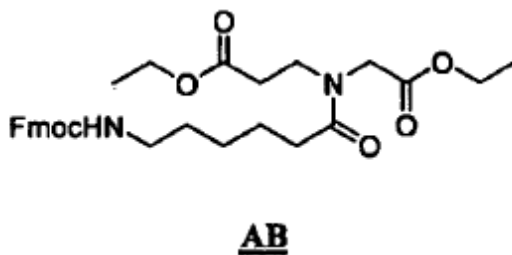
- Para la síntesis de los ARNip conjugados con 3'-colesterol (en adelante denominado -Chol-3'), para la síntesis de ARN se utilizó un soporte sólido apropiadamente modificado. El soporte sólido modificado se preparó de la forma
- 30 siguiente:

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



- Se añadió una solución acuosa 4,7 M de hidróxido sódico (50 ml) a una solución agitada, enfriada con hielo de hidrócloruro de glicinato de etilo (32,19 g, 0,23 moles) en agua (50 ml). A continuación, se añadió acrilato de etilo
- 35 (23,1 g, 0,23 moles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta completar la reacción y se comprobó por TLC. Después de 19 h la solución se repartió con diclorometano (3 x 100 ml). La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó. El residuo se destiló para dar AA (28,8 g, 61%).

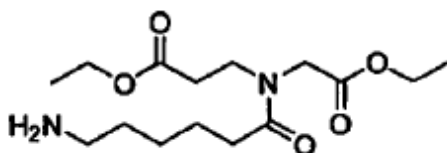
Éster etílico del ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil-amino)hexanoil]amino}-propiónico **AB**



- 40 Se disolvió ácido Fmoc-6-amino-hexanoico (9,12 g, 25,83 mmol) en diclorometano (50 ml) y se enfrió con hielo. Se

añadió diisopropilcarbodiimida (3,25 g, 3,99 ml, 25,83 mmol) a la solución a 0°C. A continuación, se siguió añadiendo dietil-azabutane-1,4-dicarboxilato (5 g, 24,6 mmol) y dimetilamino piridina (0,305 g, 2,5 mmol). La solución se llevó a temperatura ambiente y se agitó durante 6 h más. La finalización de la reacción se comprobó por TLC. La mezcla de reacción se concentró a vacío y se añadió acetato de etilo para precipitar diisopropilurea. Se filtró la suspensión. El filtrado se lavó con ácido clorhídrico acuoso al 5%, bicarbonato de sodio al 5% y agua. La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio y se concentró para dar el producto en bruto que se purificó por cromatografía en columna (50% de EtOAc/hexanos) para dar 11,87 g (88%) de AB.

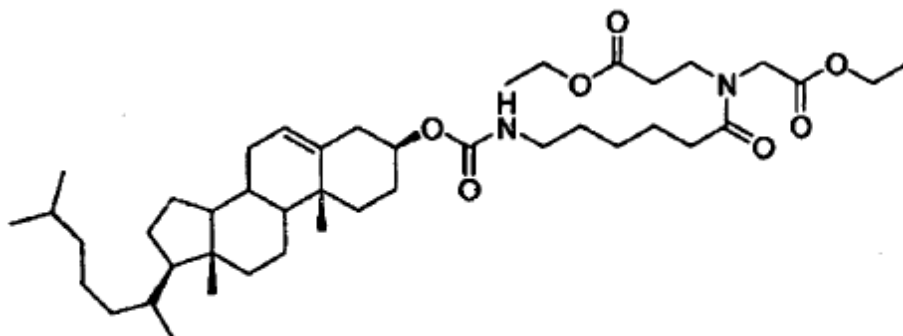
Éster etílico del ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]propiónico **AC**



AC

Se disolvió éster etílico del ácido 3-[etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)hexanoil]amino]propiónico **AB** (11,5 g, 21,3 mmol) en 20% de piperidina en dimetilformamida a 0°C. La solución se continuó agitando durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró a vacío, se añadió agua al residuo y se extrajo el producto con acetato de etilo. El producto en bruto se purificó por conversión en su sal hidrocioruro.

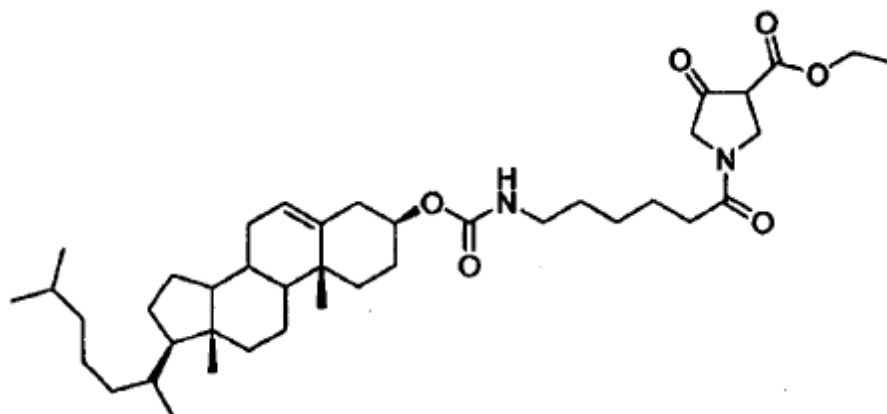
Éster etílico del ácido 3-[(6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]hexanoil]etoxi-carbonilmetil-amino]propiónico **AD**



AD

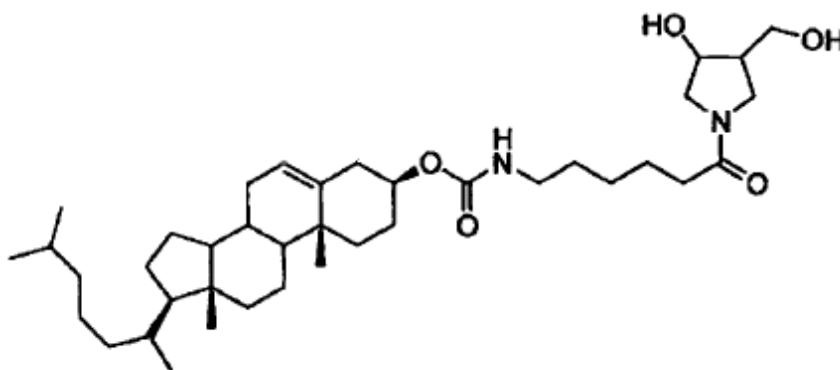
La sal hidrocioruro del éster etílico del ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]propiónico **AC** (4,7 g, 14,8 mmol) se puso en suspensión en diclorometano. La suspensión se enfrió a 0°C en hielo. A la suspensión se añadió diisopropiletilamina (3,87 g, 5,2 ml, 30 mmol). A la solución resultante se añadió cloroformiato de coleslerilo (6,675 g, 14,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y se lavó con ácido clorhídrico al 10%. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida (10,3 g, 92%).

Éster etílico del 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-pirrolidina-3-carboxílico **AE**

**AE**

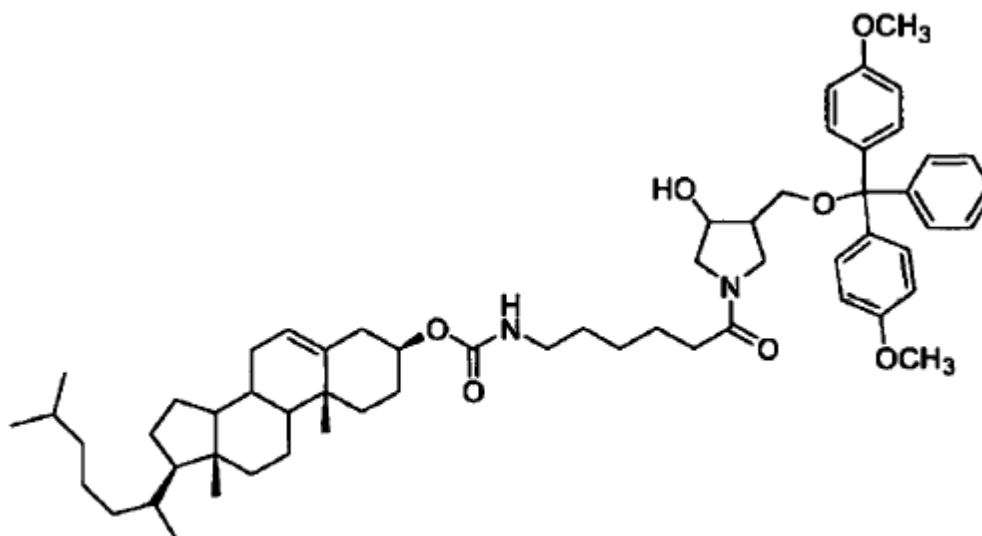
Se puso en suspensión t-butoxido potásico (1,1 g, 9,8 mmol) en 30 ml de tolueno anhidro. La mezcla se enfrió a 0°C en hielo y se añadieron lentamente 5 g (6,6 mmol) del diéster AD con agitación en 20 minutos. La temperatura se mantuvo por debajo de 5°C durante la adición. Se continuó la agitación durante 30 minutos a 0°C y se añadió 1 ml de ácido acético glacial, seguido inmediatamente de 4 g de NaH₂PO₄·H₂O en 40 ml de agua. La mezcla resultante se extrajo dos veces con 100 ml de diclorometano cada una y los extractos orgánicos combinados se lavaron dos veces cada uno con 10 ml de tampón de fosfato, se secaron y se evaporaron a sequedad. El residuo se disolvió en 60 ml de tolueno, se enfrió a 0°C y se extrajo con tres porciones de 50 ml de tampón carbonato de pH 9,5 frío. Los extractos acuosos se ajustaron a pH 3 con ácido fosfórico, y se extrajeron con cinco porciones de 40 ml de cloroformo que se combinaron, se secaron y se evaporaron a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna usando 25% de acetato de etilo/hexano para dar 1,9 g de b-cetoéster (39%).

Éster 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-ilico del ácido [6-(3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidin-1-il)-6-oxo-hexil]carbámico y **AF**

**AF**

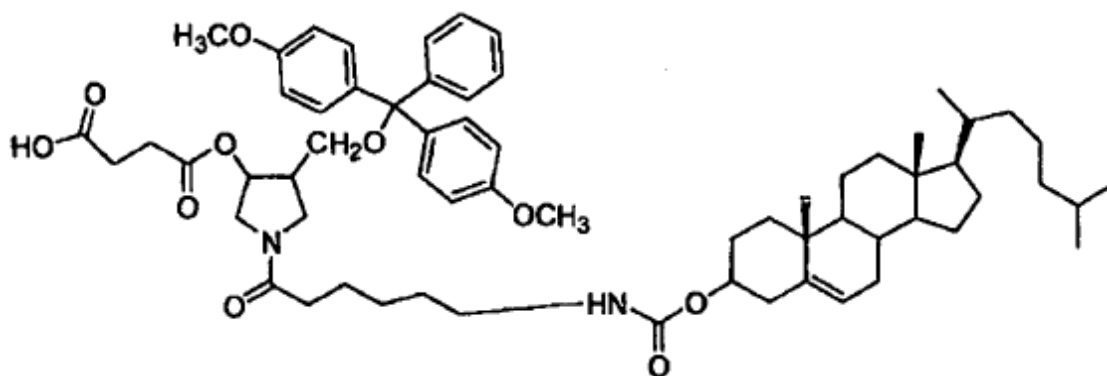
Se añadió metanol (2 ml) gota a gota durante un período de 1 h a una mezcla a reflujo de b-cetoéster AE (1,5 g, 2,2 mmol) y borohidruro de sodio (0,226 g, 6 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml). Se continuó agitando a temperatura de reflujo durante 1 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió HCl 1 N (12,5 ml), la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 × 40 ml). La capa de acetato de etilo combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a vacío para dar el producto que se purificó por cromatografía en columna (10% de MeOH/CHCl₃) (89%).

Éster 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-ilico del ácido (6-{3-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-4-hidroxi-pirrolidin-1-il}-6-oxo-hexil)carbámico **AG**

**AG**

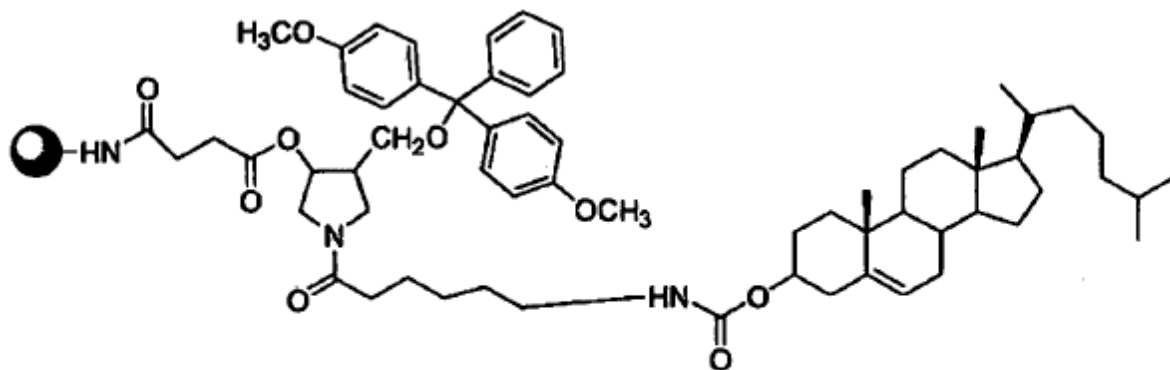
El diol de AF (1,25 g 1,994 mmol) se secó por evaporación con piridina (2 × 5 ml) al vacío. Se añadieron con agitación piridina anhidra (10 ml) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,724 g, 2,13 mmol). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se enfrió añadiendo metanol. La mezcla de reacción se concentró a vacío y al residuo se añadió diclorometano (50 ml). La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio acuoso 1 M. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. La piridina residual se eliminó por evaporación con tolueno. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (2% de MeOH/cloroformo, R_f = 0,5 en 5% de MeOH/CHCl₃) (1,75 g, 95%).

Éster 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-iloxicarbonilamino] hexanoil]pirrolidin-3-il) éster de ácido succínico **AH**

**AH**

Se mezcló el compuesto AG (1,0 g, 1,05 mmol) con anhídrido succínico (0,150 g, 1,5 mmol) y DMAP (0,073 g, 0,6 mmol) y se secó a vacío a 40°C durante la noche. La mezcla se disolvió en dicloroetano anhidro (3 ml), se añadió trietilamina (0,318 g, 0,440 ml, 3,15 mmol) y la solución se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 16 h. Se diluyó a continuación con diclorometano (40 ml) y se lavó con ácido cítrico acuoso enfriado con hielo (5% en peso, 30 ml) y agua (2 × 20 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad. El residuo se utilizó como tal para la etapa siguiente.

VPC modificado con colesterol AI



AI

Se disolvió succinato de AH (0,254 g, 0,242 mmol) en una mezcla de diclorometano/acetonitrilo (3:2, 3 ml). A esta solución se añadieron sucesivamente DMAP (0,0296 g, 0,242 mmol) en acetonitrilo (1,25 ml), 2,2'-ditio-bis(5-nitropiridina) (0,075 g, 0,242 mmol) en acetonitrilo/dicloroetano (3:1, 1,25 ml). A la solución resultante se añadió
 5 trifenilfosfina (0,064 g, 0,242 mmol) en acetonitrilo (0,6 ml). La mezcla de reacción se volvió de color naranja brillante. La solución se agitó brevemente usando un agitador con movimiento de muñeca (5 minutos). Se añadió alquilo amina de cadena larga-VPC (LCAA-VPC) (1,5 g, 61 mM). La suspensión se agitó durante 2 h. El VPC se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó con acetonitrilo, diclorometano y éter sucesivamente. Los grupos amino sin reaccionar se enmascararon utilizando anhídrido acético/piridina. Se midió la carga conseguida del VPC tomando
 10 la medición en el UV (37 mM/g).

La síntesis de los ARNip que llevan un grupo bisdecilamida del ácido 5'-12-dodecanoico (denominado en la presente memoria "5'-C32-") o un grupo derivado de 5'-colesterilo (denominado en la presente memoria "5'-Chol-") se llevó a cabo como se describe en la patente WO 2004/065601, excepto que, para el derivado de colesterilo, la etapa de oxidación se llevó a cabo usando el reactivo de Beaucage con el fin de introducir un enlace fosforotioato en el
 15 extremo 5' del oligómero de ácido nucleico.

Ejemplo 2: Vectores de expresión de ARNbc

En otro aspecto de la invención, las moléculas de ARN bicatenario que modulan la actividad de la expresión PIK4CB o la actividad de la expresión de PIK4CA se expresan en unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (véase, p. ej., Couture, A, *et al.*, *TIG* (1996), 12:5-10; Skillern, A., *et al.*, Publicación internacional PCT nº WO 00/22113, Conrad, publicación Internacional PCT nº WO 00/22114, y Conrad, patente de EE.UU. nº 6.054.299)..
 20 Estos transgenes se pueden introducir como una construcción lineal, un plásmido circular o un vector vírico, que puede incorporarse y heredarse como un transgén integrado en el genoma del anfitrión. El transgén también puede construirse para permitir que sea heredado como plásmido extracromosómico (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

25 Las cadenas individuales de un ARNbc se pueden transcribir por activadores en dos vectores de expresión separados y cotransfectados en una célula diana. Alternativamente, cada cadena individual del ARNbc puede ser transcrita por activadores ambos de los cuales están situados en el mismo plásmido de expresión. En una realización preferida, un ARNbc se expresa como una repetición invertida unidos por una secuencia de polinucleótido enlazador tal que el ARNbc tiene una estructura de tallo y bucle.

30 Los vectores de expresión de ARNbc recombinados son generalmente plásmidos de ADN o vectores víricos. ARNbc que expresa vectores víricos puede construirse sobre la base de, pero sin limitarse a, virus adenoasociado (para un examen, véase Muzyczka, *et al.*, *Curr. Topics Micro. Immunol.* (1992) 158:97-129)); adenovirus (véase, por ejemplo, Berkner, *et al.*, *BioTechniques* (1998) 6:616), Rosenfeld *et al.* (1991, *Science* 252: 431-434), y Rosenfeld *et al.* (1992), *Cell* 68:143-155)); o alfavirus, así como otros conocidos en la técnica. Se han empleado retrovirus para
 35 introducir una variedad de genes en muchos tipos de células diferentes, incluidas las células epiteliales, *in vitro* e/o *in vivo* (véase, por ejemplo, Eglitis, *et al.*, *Science* (1985) 230:1395-1398; Danos y 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* 87:6141-6145; 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.*,
 40 1992, *Proc. Natl. 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; Pat de EE.UU. nº 4.868.116; patente de 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). Pueden producirse vectores retrovíricos recombinados capaces de transducir y expresar genes insertados en el genoma de una célula transfectando el genoma retrovírico

recombinado en estirpes celulares de empaquetamiento adecuadas 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). Se pueden utilizar vectores adenoviricos recombinados para infectar una amplia variedad de células y tejidos en anfitriones sensibles (p. ej., rata, hámster, perro y chimpancé) (Hsu *et al.*, 1992, *J. Infectious Disease*, 166:769), y también tienen la ventaja de no necesitar células mitóticamente activas para la infección.

El activador que dirige la expresión de ARNbc, ya sea en un plásmido de ADN o en un vector vírico de la invención puede ser una ARN polimerasa I eucariota (p. ej. activador de ARN ribosómico), ARN polimerasa II (p. ej., activador precoz de CMV o activador de la actina o activador UI de ARNpn) o generalmente activador de ARN polimerasa III (p. ej., U6 ARNpn o activado 7SKr de ARN) o un activador procariótico, por ejemplo el activador T7, siempre que el plásmido de expresión también codifique la T7 ARN polimerasa necesaria para la transcripción de un activador T7. El activador puede también la expresión del transgén directa al páncreas (véase, p. ej., la secuencia reguladora de insulina para el páncreas (Bucchini *et al.*, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2511-2515)).

Además, la expresión del transgén puede regularse con precisión, por ejemplo, utilizando una secuencia reguladora inducible y sistemas de expresión tal como una secuencia reguladora que es sensible a determinados reguladores fisiológicos, p. ej., concentraciones de glucosa circulante u hormonas (Docherty *et al.*, 1994, *FASEB J.* 8:20-24). Dichos sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión del transgén en células o en mamíferos incluyen la regulación por ecdisona, por estrógeno, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización e isopropil-beta-D1-tiogalactopiranosido (EPTG). Un experto en la técnica sería capaz de seleccionar la secuencia reguladora/activadora apropiada en base al uso previsto del transgén de ARNbc.

Generalmente, los vectores recombinados capaces de expresar moléculas de ARNbc se administran como se describe en la presente memoria, y persisten en células diana. Alternativamente, pueden utilizarse vectores víricos que proporcionan la expresión temporal de moléculas de ARNbc. Dichos vectores se pueden administrar repetidamente según sea necesario. Una vez expresados, los ARNbc se unen al ARN diana y modulan su función o expresión. La administración de vectores que expresan ARNbc puede ser general, tal como por administración intravenosa o intramuscular, por administración a las células diana explantadas del paciente seguido de reintroducción en el paciente, o por cualquier otro medio que permita la introducción en una célula diana deseada.

ADN plasmídicos de expresión ARNbc se transfectaron normalmente en células diana como un complejo con portadores de lípidos catiónicos (p. ej. Oligofectamina) o portadores a base de lípidos no catiónicos (p. ej. Transit-TKO™). La invención contempla también múltiples transfecciones de lípidos para reducciones mediadas por ARNbc dirigidas a diferentes regiones del gen PIK4CB durante un período de una semana o más. La introducción lograda de los vectores de la invención en células anfitrionas puede verificarse usando diversos métodos conocidos. Por ejemplo, la transfección transitoria puede señalarse con un indicador, tal como un marcador fluorescente, como por ejemplo la proteína fluorescente verde (GFP). La transfección estable de células *ex vivo* se puede asegurar utilizando marcadores que proporcionan células transfectadas con resistencia a factores ambientales específicos (p. ej., antibióticos y fármacos), tal como resistencia a la higromicina B.

Las moléculas de ARNbc específicas para PIK4CB y PIK4CA también se pueden insertar en vectores y usarse como vectores de terapia génica para pacientes humanos. Los vectores de terapia génica pueden administrarse a un paciente, por ejemplo, por inyección intravenosa, administración local (véase la patente de EE.UU. n° 5.328.470) o por inyección estereotáctica (véase, p. ej., Chen *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057). El preparado farmacéutico del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está embebido el vehículo de administración de genes. Alternativamente, cuando el vector de administración de genes completo puede producirse intacto a partir de células recombinadas, p. ej., vectores retroviricos, el preparado farmacéutico puede incluir una o más células que producen el sistema de administración de genes.

Ejemplo 3: Identificación de PIK4CB y PIK4CA como objetivos de anfitrión esenciales para infecciones por VHC

Se utilizó un sistema de administración de ARNip basado en la transfección a gran escala para identificar los objetivos PI4KCB y PI4KCA. Este sistema se ha descrito anteriormente (Borawski J., Lindeman A., Buxton F., Labow M., Gaither L.A. Optimization procedure for small interfering RNA transferring in a 384-well format. *J. Biomol. Screen.* junio de 2007; 12(4):546- 59. Epub 13 de abril de 2007).

En el presente caso, el sistema empleó un sistema de replicón subgenómico del VHC diseñado para identificar proteínas del anfitrión esenciales para la multiplicación del VHC. Una estirpe celular del replicón subgenómico Huh7 (como la descrita por Lohmann, V., *et al.* (1999) *Science* 285:110) se identificó utilizando un cinoma (es decir, las cinasas conocidas de la biblioteca de ARNip del genoma humano (Dharmacon (Boulder CO)). El sistema de replicón subgenómico del VHC permite estudiar *in vitro* e *in vivo* la multiplicación de VHC utilizando células humanas de hepatoma (Huh7) transformadas de forma estable con el genoma del VHC modificado que carece de proteínas estructurales. El replicón subgenómico del VHC contiene las proteínas no estructurales en *cis* con un informador de luciferasa bajo un marcador de selección de neomicina. Este montaje se diseñó para la medición estable *in vitro* de los contenidos de ARN del replicón de VHC y la actividad del replicón. El objetivo de este estudio fue utilizar la tecnología de detección de ARNip como herramienta para identificar nuevas proteínas del anfitrión que inhiben el replicón de VHC subgenómico en células Huh7.

Con este fin, se detectó un conjunto de 779 Smart Pools de ARNip dirigidos al cinoma y se descubrieron y

verificaron nuevos reguladores del replicón de VHC. (Smart Pool se refiere a la mezcla de 4 ARNip individuales en concentraciones equimolares antes de añadir la mezcla a las células). Se identificaron los ARNip a PIK4CB (fosfatidilinositol 4-cinasa, polipéptido beta catalítico) o PIK4CA ((fosfatidilinositol 4-cinasa, polipéptido alfa catalítico), que inhibían la acumulación de luciferasa del replicón vírico con alta potencia. Estos datos demuestran que esta proteína celular se puede utilizar como diana farmacológica para la inhibición de la multiplicación del VHC.

La construcción de la estirpe celular del replicón subgenómico Huh7 (denominado también en la presente memoria células del clon A) se basa en el genoma del VHC. El genoma del VHC completo se ilustra en Figura 1A. El genoma de 9,6 kb es un virus ARN monocatenario positivo con cuatro proteínas estructurales y seis no estructurales. Una característica destacada del replicón es los UTR en 5' y 3' que se requieren para la actividad eficiente del replicón. Este virus puede multiplicarse *in vitro* pero crea virus infeccioso, lo que requiere la formación y e instalaciones especiales (Thomson B.J., Finch R.G. Hepatitis C virus infection. *Clin. Microbiol. Infect.* febrero de 2005; 11 (2):86-94). Por tanto, el virus infeccioso se alteró para crear un genoma vírico mínimo capaz de multiplicación *in vitro* sin el inconveniente de la creación de partículas infecciosas. El montaje se muestra en la Fig. 1B, el replicón subgenómico del VHC que se usa para crear las células del clon A (Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 2 de julio de 1999; 285(5424):110-3). Este virus se optimizó en gran medida para capturar la actividad del replicón de VHC *in vitro*, en células de hígado humano. No se pueden crear partículas víricas infecciosas, pero pueden automultiplicarse en el citoplasma, lo que es susceptible para estudios de cultivo celular, así como para la detección de alto rendimiento. Las proteínas estructurales se han sustituido por un gen con resistencia a la neomicina y un informador de luciferasa de luciérnaga para medir la actividad del replicón. El montaje Clon Ar se compone de la misma cadena principal que el virus subgenómico pero las proteínas estructurales se han eliminado (Fig. 1C). Esta estirpe celular se utilizó para probar si los ARNip podrían inhibir de forma no específica la actividad o expresión de luciferasa.

Smart pools de ARNip dirigidos a 779 cinasas relacionadas filogenéticamente se transfectaron en células del clon A (replicón subgenómico del VHC). Un ARNip bicatenario dirigido contra pGL2 luciferasa se utilizó como referencia positiva para inhibir la actividad de la luciferasa. Las células se transfectaron durante 72 horas y se midió la actividad de luciferasa empleando el ensayo de luciferasa Bright-Glo (Borowski J., Lindeman A., Buxton F., Labow M., Gaither L.A. Optimization procedure for small interfering RNA transfection in a 384-well format. *J. Biomol. Screen.* Junio 2007; 12(4):546-59. Epub 13 de abril 2007).

Se encontraron varios ARNip que eran potentes inhibidores de la actividad de luciferasa, incluidos los grupos que se dirigen a PIK4CB (NM_002651) y PIK4CA (NM_002650).

Ejemplo 4: Confirmación y medición de la actividad de PIK4CB y PIK4CA ARNip

La confirmación de impactos de ARNip en un tamiz se consiguió con una serie de etapas que incluyó el análisis de múltiples ARNips específicos de genes independientes, así como correlacionando los ARNip fenotípicamente activos con eficiencia de reducción de ARNm. Para confirmar en primer lugar la especificidad de los impactos de ARNip, se probaron múltiples ARNip independientes de secuencias tanto para la capacidad de inhibir la actividad de la luciferasa como la incapacidad para afectar la viabilidad celular. Los impactos de ARNip se ensayaron también en las células del clon Ar (similar al Clon A pero que carece de proteínas estructurales como en figura 1c) para confirmar que los ARNips se dirigían específicamente a las proteínas del replicón y que no inhibían la actividad (o expresión) de la luciferasa de una manera independiente del replicón.

La siguiente etapa fue la validación del fenotipo y de RT-PCR. Cuatro ARNip independientes para PIK4CB y cuatro ARNip independientes para PIK4CA se analizaron para determinar su capacidad para reducir la actividad del replicón, los efectos sobre la viabilidad celular y la capacidad para reducir los niveles de ARNm del gen diana.

Los ARNip empleados en este ejemplo fueron los expuestos en la tabla 1 y la tabla 2.

La figura 2 demuestra los resultados de ARNbc dirigido a PIK4CB y PIK4CA en el ensayo del clon A. Los resultados de las pruebas del ARNbc como PIK4CA1-PIK4CA4 de doble cadena individuales (columnas 1-4) como PIK4CA Smart Pool (col. 5), como PIK4CB1-PIK4CB4 de doble cadena individuales (col. 6-9) o como un PIK4CB Smart Pool (col. 10). Las células se transfectaron durante 72 horas y se midió la actividad de luciferasa utilizando el ensayo de luciferasa Bright-Glo (Borowski J., Lindeman A., Buxton F., Labow M., Gaither L.A. Optimization procedure for small interfering RNA transfection in a 384-well format. *J. Biomol. Screen.* Junio 2007; 12(4):546-59. Epub 13 de abril 2007). Los resultados se miden con respecto a GAPDH (referencia; columna 11), ensayo realizó utilizando 25 nM de ARNbc por pocillo utilizando células de Clon A; la actividad Bright-Glo se midió a las 72 horas después de la transfección. ARNbc dirigido a GAPDH (columna 11) se utilizó como referencia negativa y ARNbc dirigido a pGL2 (columna 12) fue la referencia positiva.

Los resultados en la Fig. 2 demuestran que con respecto a GAPDH, ARNbc dirigido a PIK4CB o PIK4CA puede reducir la expresión del replicón de VHC (medida por la expresión de luciferasa) en las células del Clon A en al menos el 20% y hasta aproximadamente 90%. Se identifican una variedad de actividades intermedias. Datos adicionales confirman que el ARNbc de este ensayo no obstaculizan la viabilidad celular ni tampoco demuestran efectos inespecíficos significativos sobre las células en el ensayo del Clon Ar (datos no mostrados).

Las figuras 3A y 3B confirman que los ARNbc dirigidos a PIK4CA son específicos para PIK4CA y no para PIK4CB; las figuras 3C y 3D confirman que los ARNbc dirigidos a PIK4CB son específicos para PIK4CB y no para PIK4CA.

Los resultados para la figura 3 se generaron utilizando PCR en tiempo real. En este método, se agruparon dos pocillos transfectados con ARNip y se aisló el ARNm utilizando el kit RNeasy96 (Qiagen nº 74182). Los preparados fueron DNAsa I tratada dos veces durante 15 minutos cada una. Se generó ADNc usando el kit High Capacity ADNc Archive (Applied Biosystems nº 4,322,171), y el ARN se cebó utilizando Oligo dT25 (Sigma Genosys).

- 5 Tampón de PCR (Roche nº 1699105) se enriqueció con MgCl₂ (Ambion nº 9530g) de la siguiente manera; 10 × tampón en 10 µl, MgCl₂ 1 M en 0,55 µl, oligo dT25 50 uM, dNTP 100 mM en 4 µl, RNasin en 1 µl, Multiscribe 50 U/µl en 5 µl, agua en 12,45 µl y ARN en 66 µl para un volumen total de 100 µl. El ADNc se cuantificó usando cebadores internos, PIK4CA (NM_002650)

directo: GCCCTGTCTGAAGTGAAGGT, SEQ ID nº: 417

- 10 inverso: CTTTTGCAGCACTCTGCATC, SEQ ID nº: 418

En 1662: cruzar intrón 3006 pb en 1690 a 1774 invertido: cruzar intrón 3006 pb en 1690;

PIK4CB se midió usando cebadores diseñados en la propia empresa contra PIK4CB (NM_002651)

directo: ATGGACAAGGTGGTGCAGAT SEQ ID nº: 419

inverso: CCTCAGTCATGCTCATGTGG SEQ ID nº: 420

- 15 En 2334 a 2452: cruzar intrón 981 pb en 2374; (Sigma Genosys) usando Sybr verde en un Applied Biosystems 7900HT (Applied Biosystems nº 4329001). En la figura 3, la etiqueta "sp" se refiere al término SMARTpool. Se refiere a mezclar 4 ARNip individuales en concentraciones equimolares antes de añadir la mezcla a las células. En un Smart Pool, se añaden 4 ARNip individuales a concentraciones relativas más bajas (es decir, una concentración equimolar de 50 nM sería una concentración de 12,5 nM para cada ARNip en el SMART pool).
- 20 Otra confirmación de los objetivos se consiguió utilizando otra serie de tres doble cadenas contra PIK4CA (NM_02650, Dharmacon nº D-006776) y PIK4CB (NM_002651, Dharmacon nº D-006777). El ARNip se emplea como se indica en la tabla 1 y la tabla 2.

- Cada ARNip se volvió a poner en suspensión en tampón ARNip (Dharmacon, nº B-002000-UB-015) a una concentración de la solución madre de 20 µM. 2,5 µl de cada solución madre se diluyeron en 197,5 µl de Opti-Mem en una placa de PCR de 96 pocillos (ABgene, nº AB-1000) para preparar un sello de operación 250 nM. 0,20 µl de reactivo de transfección Dharmafect1 (Dharmacon, nº T2001-03) diluido en 10 µl de Opti-Mem se añadieron a cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos (Costar, nº 3917). 10 µl de cada sello de ARNip se añadieron a la placa de 96 pocillos que contiene Dharmafect1 y se incubaron durante 20 minutos para permitir que se formen los complejos. Después de la incubación, se añadieron 6000 células de replicón subgenómico Huh7 VHC en 80 µl de medio analítico por pocillo. Las células se incubaron durante 72 horas y se hicieron los ensayos de actividad de luciferasa y viabilidad celular (como se describió anteriormente en la figura 2).
- 30

- En la figura 4 cada uno de los ARNip se validó utilizando el ensayo de expresión génica Taqman (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante. Se transfectaron ARNip en células de replicón subgenómico Huh7 VHC en formato de 96 pocillos como se describió anteriormente. Se aisló el ARNm usando el kit RNeasy96 (Qiagen, nº 74182). Los ARNm de pocillos duplicados se agruparon y se generó ADNc usando el Sprint Powerscript Preprimed 96 Plate Oligo (dT) (Clontech Laboratories, nº 639557). El ADNc se cuantificó utilizando sondas y cebadores Taqman premezclados de Applied Biosystems, PIK4CA (NM_002650, Applied Biosystems nº Hs01021073_m1), PIK4CB (NM_002651, Applied Biosystems nº Hs00356327_m1) en formato de 384 pocillos. Se añadieron 4,8 µl de ADNc por pocillo a una placa de PCR de 384 pocillos (Applied Biosystems, nº 4309849). 0,6 µl de la sonda Taqman para el gen de interés (GDI), 0,6 µl de sonda de control de β-actina (Applied Biosystems, nº 4310881E) y 6 µl 2 × PCR Master Mix (Applied Biosystems, nº 4304437) se añadieron al ADNc por pocillo. La reacción se realizó en un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7900HT (Applied Biosystems, nº 4329001).
- 35
- 40

- En la Fig. 4A se transfectaron células con los ARNip a PI4KA y se midió el ARNm usando ambas sondas RTPCR Taqman PI4KA y PI4KB. En la Fig. 4B se transfectaron células con los ARNip de PI4KB y se midió el ARNm usando ambas sondas RTPCR Taqman PI4KA y PI4KB. Como se ha demostrado en la figura los ARNip reducen sus dianas designadas y no interaccionan ni inhiben el otro transcrito ARNm de PI4K o la referencia (GAPDH).
- 45

Ejemplo 5: Inhibición de la expresión de proteínas del anfitrión y víricas

- En la figura 5 se realizaron lisados de células enteras a partir de células de replicón subgenómico Huh7 VHC transfectadas con ARNip o células indiferenciadas solas. Los ARNip empleados para los resultados en la figura 5 son los mencionados en la tabla 1 y la tabla 2.
- 50

- Se lisaron células en tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Boston Bioproducts, nº BP-115) que contiene un comprimido inhibidor de la mezcla de proteasas (Roche, nº 04693116001) por 10 ml de tampón de lisis. Los lisados se analizaron cuantitativamente usando el análisis de proteínas BCA (Pierce Biotechnology, nº 23227) según las instrucciones del fabricante. Se cargaron cantidades iguales de lisado en un gel de Tris-HCl al 15% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA., nº 345-0019) y se introdujeron a 200 V durante 1 hora. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, nº 162-0232) durante 1 hora a 100V. La membrana se bloqueó en
- 55

5% de leche (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA., nº 162-0232), TBS-0,1% de Tween (Bio-Rad Laboratories, nº 170-6435, nº 161-0787), durante 1 hora. Las transferencias se sondaron con un anticuerpo monoclonal de ratón contra PIK4CB (BD Biosciences, nº 611817) o un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína NS3 del VHC (ViroStat, nº 1828) y un anticuerpo monoclonal de ratón para β -actina (Sigma, St. Louis, MO., nº A-5441), como control de carga, diluido en tampón de bloqueo 1:1000 durante 1 hora (los anticuerpos contra PIK4CA no estaban disponibles). Después de tres lavados sucesivos con TBS-0,1% de Tween (TBST), se añadió durante 1 hora anticuerpo secundario conjugado con HRP para IgG de ratón (Sigma, nº A4416), diluido en tampón de bloqueo 1:5000. La membrana se lavó tres veces en TBST y se visualizaron bandas inmunorreactivas usando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto (Pierce, nº 34096). No había ningún anticuerpo PI4KA disponible así sólo se detectó la proteína PI4KB en la figura 5.

Los resultados en la figura 5 demuestran que los ARNip a PI4KA no tuvieron efecto sobre los niveles de proteína de PI4KB, mientras que los ARNip de PI4KB eliminan la proteína PI4KB en las células Huh7. Cada ARNip analizado también presentaba una reducción medible en la producción de la proteína NS3 (vírica) con relación a la referencia, lo que confirma la actividad directa en la capacidad de multiplicación vírica. La reducción de los niveles de ARNm utilizando estos ARNip se correlacionó con la reducción de proteínas lo que sugiere que estas proteínas humanas se necesitan para la multiplicación del VHC.

Ejemplo 6: Confirmación usando ARN de horquilla corta (ARNhc)

En la figura 6 ARN de horquilla corta (ARNhc) dirigidos a PIK4CA (NM_002650) y PIK4CB (NM_002651), se ordenaron como 5 ARNhc Sigma MISIÓN™ individuales. Los ARNhc dirigidos a CD3 δ (NM_000732), CD28 (NM_006139), CD29 (NM_033666) y GFP (U76561) se utilizaron como referencias negativas para inhibir la multiplicación del VHC (sólo se muestran los datos de GFP). Todas las secuencias ARNhc se construyeron como en la biblioteca humana MISIÓN™ TRC-Hs 1.0. (Humana) (Moffat J. et al., A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouses genes Applied to análisis 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).

Las secuencias ARNhc eran secuencias distintas e independientes de los ARNips descritos en los experimentos anteriormente mencionados. La tabla 4 expone las secuencias de ADN correspondientes a la cadena de ARN expresada.

Tabla 4

ARNhc	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID nº
ShA-1	CCGGGCTGCACAAATACTACATGAACTCGAGTTCATGTAGTATTTGTGCAGCTTTTT	421
ShA-2	CCGGGCGTCTCATCACATGGTACAACCTCGAGTTGTACCATGTGATGAGACGCTTTTT	422
ShA-3	CCGGGCCAGGTTAAGAACACAGAACCTCGAGTTCCTGTGTTCTTAAACCTGGCTTTTT	423
ShA-4	CCGGCCAGTTCATCTGGAACATGAACTCGAGTTCATGTTCCAGATGAACTGGTTTTT	424
ShA-5	CCGGCAAGCTCTTGAAGCACAGGTTCTCGAGAACCTGTGCTTCAAGAGCTTGTTTTT	425
ShB-1	CCGGCCAGTTGCTTAACATGTACATCTCGAGATGTACATGTTAAGCAACTGGTTTTT	426
ShB-2	CCGGCCGAGAGTATTGATAATTCATCTCGAGATGAATTATCAATACTCTCGGTTTTT	427
ShB-3	CCGGCCATACAAGATTCTTGTGATTCCTCGAGAATCACAAGAATCTTGTATGGTTTTT	428
ShB-4	CCGGCGACATGTTCAACTACTATAACTCGAGTTATAGTAGTTGAACATGTCGTTTTT	429
ShB-5	CCGGTCTCGGTACTTAGGACTTGATCTCGAGATCAAGTCCTAAGTACCGAGATTTTT	430

Para analizar el ARNhc, 6000 células Huh7 de replicón subgenómico de VHC se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Al día siguiente, el medio se sustituyó por medio de transducción que contenía medio de análisis con 8 μ g/ml de concentración final de polibreno (Sigma H9268) y HEPES (Invitrogen, nº 15630080) 10 mM de concentración final. Se añadió 1 μ l de virus ARNhc por pocillo y se centrifugaron las células a 2100 rpm durante 90 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron durante 24 horas y se seleccionaron añadiendo puomicina (Sigma, nº P9620) a 2 μ g/ml de concentración final. Las células se incubaron a continuación durante un mínimo de 72 horas y se analizó el fenotipo, analizado por Western y RT-PCR o se propagó para estudios de reducción a largo plazo. En la figura 6A la expresión del replicón de VHC se mide por la actividad de luciferasa y se normaliza a células transducidas con GAPDH ARNhc. Se midieron niveles de ARNm a PI4KA y PI4KB en las células Huh7 después de la transducción de ARNhc utilizando una sonda PI4KA de Taqman (figura 6B) o la sonda PI4KB Taqman (Figura 6C) para RTPCR. Se determinaron las concentraciones de proteína PI4KB y de proteína NS3 usando métodos de transferencia Western similares a los del Ejemplo 5. Las concentraciones de proteína se midieron después de la transducción de ARNhc durante 96 horas (Figura 6D) y durante 3 semanas (Figura 6E).

Los resultados en la figura 6A demuestran que ARNhc dirigido a los ARNhc a PI4KA o PI4KB puede reducir la actividad de replicón de VHC medida por la actividad de luciferasa y normalizada a células transducidas con ARNhc

de GAPDH. La figura 6B muestra los niveles relativos de ARNm a PI4KA después del tratamiento. El ARNhc dirigido a PI4KA demuestra reducción sustancial, mientras que sólo uno de los que se dirigen a PI4KB tenían un efecto sobre las concentraciones de PI4KA (quizás debido al gran número de copias y una baja reactividad cruzada con PI4KA). La figura 6C demuestra que el ARNhc dirigido a PI4KA no tuvo ningún efecto sobre las concentraciones de ARNm de PI4KB, mientras que la mayor parte del ARNhc que se dirige a PI4KB tenía una reducción significativa de PI4KB. La figura 6D muestra que a las 96 horas después del tratamiento, ARNhc dirigido a PI4KA o PI4KB logra reducir la producción de proteínas víricas NS3 (y que ARNhc a PI4KA no reduce las concentraciones de proteína PI4KB). Los resultados de la figura 6E demuestran que la reducción de la producción de la proteína vírica puede persistir durante al menos 3 semanas. En conclusión, existía una clara correlación entre la reducción de ARNm a PI4KA y las concentraciones de proteína NS3 lo que indica que la carga vírica en la célula estaba inhibida. Hubo una clara correlación entre ARNm de PI4KB y la reducción de proteínas y las concentraciones de proteína NS3 lo que indica que la carga vírica en la célula estaba inhibida.

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

En este ejemplo, la inhibición eficaz de la multiplicación del VHC se consigue tratando las células antes de la infección por VHC con ARNip contra PIK4CA o PIK4CB (Fig. 7) o tratando las células después de la infección por VHC (Figura 8). Este ejemplo también demuestra la dependencia de la dosis de la reducción del ARNm.

Para este experimento, los ARNip contra PIK4CA y PIK4CB (según lo señalado en la tabla 1 y tabla 2) se volvieron a poner en suspensión en tampón de ARNip (Dharmacon, nº B-002000-UB-015) a una concentración de la solución madre de 20 µM. 3 µl de cada solución madre se diluyeron en 197 µl de Opti-Mem en una placa de PCR de 96 pocillos (ABgene, nº AB-1000) para preparar un sello de trabajo 300 nM. Los ARNip se diluyeron en Opti-Mem (Invitrogen Cat nº 51985-034) como 10 × soluciones madre y se añadieron para completar medios de cultivo celulares a una concentración final de 25 nM, 1,5 nM y 0,1 nM. 0,20 µl de reactivo de transfección Dharmafect1 (Dharmacon, nº T2001-03) diluido en 10 µl de Opti-Mem se añadieron a cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos (Costar, nº 3917). Se añadieron 10 µl de cada sello de ARNip a la placa de 96 pocillos que contiene la Dharmafect1 y se incubaron durante 20 minutos para permitir que los complejos se formaran. Después de la incubación, se añadieron 10.000 células Huh7.5 por pocillo en 100 µl del medio de análisis. Las células se incubaron durante 24 horas y a continuación se infectaron con el virus de genotipo 2 del VHC infeccioso JFH-1 que contiene un informador de *Renilla*. Se utilizó un ARNip contra *Renilla* como referencia positiva para inhibir la luciferasa de *Renilla*. Los ARNip se transfectaron antes de la infección con virus vivo (Figura 7A) o después de la infección vírica (Fig. 8A) lo que demuestra que los ARNip podrían bloquear tanto la absorción como la multiplicación del virus VHC. Se recogieron sobrenadantes víricos en un transcurso de tiempo para medir virus vivo segregado de las células, medidos en porcentaje de reinfección de células indiferenciadas (Fig. 8B). El porcentaje de reducción del ARNm en las células Huh7 se determinó por RT-PCR (Fig. 7B).

Se ha utilizado un tamiz de ARNip de replicón de VHC Huh7 que identificó varios factores del anfitrión nuevos necesarios para la actividad óptima de luciferasa impulsada por el replicón. Este tamiz se utilizó para confirmar los hallazgos. Este tamiz no mide directamente la multiplicación vírica, se supone que el número de copias del replicón del virus determina directamente los niveles de expresión de luciferasa. Los experimentos ilustrados en la figura 7 y la figura 8 indican que los ARNip activos descritos en la presente memoria de hecho dan lugar a la reducción de la producción de ARN vírico.

En un tamiz de cinoma smart pool, PIK4CB y PIK4CA se han identificado como factores del anfitrión esencial para el VHC y otra multiplicación del virus ARN monocatenario positivo. Múltiples ARNip independientes dirigidos al gen podrían reducir significativamente los niveles de luciferasa mientras que no tiene efecto sobre la viabilidad celular en las células de replicón. Los ARNip que redujeron los niveles de luciferasa también inhibieron los niveles de ARNm de los genes diana respectivos. Por lo tanto, se puede concluir que los ARNip utilizados en este estudio están en la diana y modulan significativamente la multiplicación del VHC a través de la reducción de sus genes diana celulares.

Sin desear estar ligado a ningún mecanismo de acción concreto para explicar los resultados de los autores, es evidente que la importancia de estos hallazgos es múltiple. Se requieren enzimas PIK4 para la producción de PtdIns4P en ER y los compartimientos del aparato de Golgi. la producción de PtdIns4P es necesaria para mantener la integridad del aparato de Golgi, las vesículas del brote del aparato de Golgi y de las membranas de ER, y modular la producción de Ins(1,4,5)P₃, una molécula de señalización esencial a través del Ins(4,5)P₂ intermedio (Godi A., Pertile P., Meyers R., Marra P., Di Tullio G., Iurisci C., Luini A., Corda D., De Matteis M.A. ARF media la captación de PtdIns-4-OH cinasa-beta y estimula la síntesis de PtdIns(4,5)P₂ en el complejo de Golgi. *Nat. Cell Biol.* septiembre de 1999; 1(5):280-7). Aunque sin desear estar ligado a ningún mecanismo de acción específico para el descubrimiento en la presente memoria, es posible que la actividad de enzimas PIK4 pudiera estar relacionada con la multiplicación del VHC en base a la ubicación del complejo de multiplicación del VHC. Si el complejo de multiplicación requiere el Golgi y las membranas de ER intactos entonces la destrucción de las enzimas PIK4, y la producción PtdIns4P, probablemente bloquearía la formación de un entorno de multiplicación competente. Además, se sabe que las enzimas PIK4 para regular el tráfico de cerimida y el colesterol a través de las membranas del aparato de Golgi y ER y ayudan en la formación de balsas lipídicas (Toth B., Balla A., Ma H., Knight Z.A., Shokat K.M., Balla T. Phosphatidylinositol 4-kinase IIIbeta regulates the transport of ceramide between the endoplasmic reticulum and Golgi. *J. Biol. Chem.* 24 nov. 2006; 281(47):36369-77). Hay muchas posibilidades de que el complejo de multiplicación del VHC requiera balsas de lípidos para una actividad eficaz. Si la reducción de PIK4 también

perturba el transporte de colesterol y cerimida, también podría contribuir a la inhibición de la multiplicación del VHC (Ridsdale A., Denis M., Gougeon P.Y., Ngsee J.K., Presley J.F., Zha X. Cholesterol is required for efficient endoplasmic reticulum-to-Golgi transport of secretory membrane proteins. *Mol. Biol. Cell* abril de 2006; 17(4):1593-605) Por último, se ha identificado una serie de proteínas que contienen dominios PH específicos de PIP(4,5) y la localización de dichas proteínas parece estar regulada por enzimas PIK4. Por lo tanto, la función de PIK4 también puede incluir la reorientación de las proteínas celulares o víricas a sitios de multiplicación.

En conclusión, los autores han identificado que PIK4CB y PIK4CA son enzimas del factor de anfitriones humanos que se necesitan para la multiplicación del VHC, y que los ARNbc que dirigen estos genes son dianas terapéuticas adecuadas para el tratamiento de infecciones por VHC y otros virus cadena positiva.

- 10 Los expertos en la técnica están familiarizados con los métodos y composiciones, además de las expuestas específicamente en la presente descripción lo que les permitirá poner en práctica esta invención en todo el ámbito de las reivindicaciones anexas a continuación.

15 La presente descripción proporciona un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K) en una célula, en donde dicho ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en donde una cadena transcrita comprende una primera secuencia y una cadena complementaria comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica PI4K, y en donde dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa dicho gen PI4K, inhibe la expresión de dicho gen PI4K.

- 20 En particular la presente descripción proporciona un ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicha segunda secuencia comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica fosfatidilinositol 4-cinasa humana, catalítica, polipéptido beta (PIK4CB).

Más particularmente la presente descripción proporciona un ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicha primera secuencia y dicha segunda secuencia se seleccionan de entre el grupo consistente en la tabla 1.

- 25 La presente descripción proporciona dicho ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicho ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado.

30 En particular la presente descripción proporciona un ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicho nucleótido modificado se selecciona del grupo siguiente: un nucleótido modificado con 2'-O-metilo, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato; un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterilo o el grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico.

35 La presente descripción proporciona dicho ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicho nucleótido modificado se selecciona del grupo siguiente: un nucleótido modificado con 2'-desoxi-2'-fluro; un nucleótido modificado con 2'-desoxi; un nucleótido bloqueado; un nucleótido abásico; un nucleótido modificado con 2'-amino; un nucleótido modificado con 2'-alquilo; un nucleótido con morfolino; un fosforamidato; y un nucleótido que comprende una base artificial.

La presente descripción proporciona dicho ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicha primera secuencia se selecciona del grupo consistente en la tabla 1 y dicha segunda secuencia se selecciona del grupo consistente en la tabla 1.

- 40 La presente descripción proporciona dicho ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicha cadena complementaria comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica fosfatidilinositol 4-cinasa humana, catalítica, polipéptido alfa (PIK4CA).

La presente descripción proporciona dicho ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicha primera secuencia y dicha segunda secuencia se seleccionan de entre el grupo consistente en la tabla 2.

- 45 La presente descripción proporciona dicho ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicho ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado.

La presente descripción proporciona dicho ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicho nucleótido modificado se selecciona del grupo siguiente: un nucleótido modificado con 2'-O-metilo, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato; un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterilo o el grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico.

- 50 La presente descripción proporciona dicho ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicho nucleótido modificado se selecciona del grupo siguiente: un nucleótido modificado con 2'-desoxi-2'-fluro; un nucleótido modificado con 2'-desoxi; un nucleótido bloqueado; un nucleótido abásico; un nucleótido modificado con 2'-amino; un nucleótido modificado con 2'-alquilo; un nucleótido con morfolino; un fosforamidato; y un nucleótido que comprende una base artificial.

- 55 La presente descripción proporciona dicho ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicha primera secuencia se selecciona del grupo consistente en la tabla 2 y dicha segunda secuencia se selecciona del grupo consistente en la tabla 2.

La presente descripción proporciona una célula que comprende dicho ARNbc.

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión del gen fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido beta (PIK4CB) en un organismo, que comprende un ARNbc y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en donde una cadena transcrita comprende una primera secuencia y una cadena complementaria comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica PIK4CB, y en donde dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa dicho gen, inhibe la expresión de PIK4CB en al menos el 10%.

- 5
- 10 En particular la presente descripción proporciona dicha composición farmacéutica, en donde dicha primera secuencia de dicho ARNbc se selecciona del grupo consistente en la tabla 1 y dicha segunda secuencia de dicho ARNbc se selecciona del grupo consistente en la tabla 1.

En particular la presente descripción proporciona dicha composición farmacéutica, en donde dicho ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado.

- 15 La presente descripción proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión del gen fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido alfa (PIK4CA) en un organismo, que comprende un ARNbc y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en donde una cadena transcrita comprende una primera secuencia y una cadena complementaria comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica PIK4CA, y en donde dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa dicho gen, inhibe la expresión de PIK4CA en al menos el 10%.
- 20

- En particular la presente descripción proporciona dicha composición farmacéutica, en donde dicha primera secuencia de dicho ARNbc se selecciona del grupo consistente en la tabla 2 y dicha segunda secuencia de dicho ARNbc se selecciona del grupo consistente en la tabla 2.
- 25

En particular la presente descripción proporciona dicha composición farmacéutica, en donde dicho ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado.

- La presente descripción proporciona un método para inhibir la expresión del gen fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido beta (PIK4CB) en una célula, método que comprende:
- 30

- (a) introducir en la célula un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), en donde el ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en donde una cadena transcrita comprende una primera secuencia y una cadena complementaria comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica PIK4CB, y en donde dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa dicho gen PIK4CB, inhibe la expresión de PIK4CB al menos en el 40%; y
- 35

(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 con ello la expresión del gen PIK4CB en la célula.

- La presente descripción proporciona un método para inhibir la expresión del gen fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido alfa (PIK4CA) en una célula, método que comprende:
- 40

- (a) introducir en la célula un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), en donde el ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en donde una cadena transcrita comprende una primera secuencia y una cadena complementaria comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica PIK4CA, y en donde dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa dicho gen PIK4CA, inhibe la expresión de PIK4CA al menos en el 40%; y
- 45

(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 con ello la expresión del gen PIK4CA en la célula.

- 50 La presente descripción proporciona un método de tratamiento de un proceso patológico mediado por la infección por virus ARN monocatenario positivo que comprende administrar a un paciente necesitado de dicho tratamiento, prevención o atención una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un ARNbc, en donde el ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en donde una cadena transcrita comprende una primera secuencia y una cadena complementaria comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica la fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido beta (PIK4CB), y en donde dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa el gen PIK4CB, inhibe la expresión de PIK4CB.
- 55

La presente descripción proporciona un método de tratamiento de un proceso patológico mediado por la infección por virus ARN monocatenario positivo, en donde dicho virus ARN monocatenario positivo se selecciona de entre el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del papiloma humano (VPH) y el virus del Dengue.

- 5 La presente descripción proporciona un método de tratamiento de un proceso patológico mediado por la infección por virus ARN monocatenario positivo que comprende administrar a un paciente necesitado de dicho tratamiento, prevención o atención una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un ARNbc, en donde el ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en donde una cadena transcrita comprende una primera secuencia y una cadena complementaria comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un
- 10 ARNm que codifica la fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido alfa (PIK4CA), y en donde dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa el gen PIK4CA, inhibe la expresión de PIK4CA.

- 15 La presente descripción proporciona un método de tratamiento de un proceso patológico mediado por la infección por virus ARN monocatenario positivo, en donde dicho virus ARN monocatenario positivo se selecciona de entre el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del papiloma humano (VPH) y el virus del Dengue.

- 20 La presente descripción proporciona un vector para inhibir la expresión del gen fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido beta (PIK4CB) en una célula, comprendiendo dicho vector una secuencia reguladora operativamente unida a la secuencia nucleotídica que codifica al menos una cadena de un ARNbc, en donde una de las cadenas de dicho ARNbc es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica la PIK4CB y en donde dicho ARNbc tiene menos de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa el gen PIK4CB, inhibe la expresión de PIK4CB.

La presente descripción proporciona una célula que comprende dicho vector.

- 25 La presente descripción proporciona un vector para inhibir la expresión del gen fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido alfa (PIK4CA) en una célula, comprendiendo dicho vector una secuencia reguladora operativamente unida a la secuencia nucleotídica que codifica al menos una cadena de un ARNbc, en donde una de las cadenas de dicho ARNbc es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica PIK4Ca y en donde dicho ARNbc tiene menos de 30 nucleótidos de longitud y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa el gen PIK4CA, inhibe la expresión de PIK4CA.

La presente descripción proporciona una célula que comprende dicho vector.

- 30 La presente descripción proporciona un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para reducir el nivel de expresión del gen fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido beta (PIK4CB) en una célula, en donde dicho ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en donde una cadena transcrita comprende una primera secuencia y una cadena complementaria comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica
- 35 PIK4CB, y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa el gen PIK4CB, reduce el nivel de expresión de PIK4CB.

La presente descripción proporciona dicho ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicho contacto reduce el nivel de expresión de PIK4CB al menos en el 40%.

- 40 La presente descripción proporciona dicho ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicho contacto se realiza *in vitro* a 30 nM o menos.

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica para reducir el nivel de expresión de PIK4CB en un organismo, que comprende dicho ARNbc y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 45 La presente descripción proporciona un método de tratamiento de una infección por virus ARN monocatenario positivo que comprende administrar a un paciente necesitado de dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho ARNbc.

La presente descripción proporciona dicho método en donde dicho virus ARN monocatenario positivo se selecciona de entre el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del papiloma humano (VPH) y el virus del Dengue.

- 50 La presente descripción proporciona un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para reducir el nivel de expresión del gen fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido alfa (PIK4CA) en una célula, en donde dicho ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en donde una cadena transcrita comprende una primera secuencia y una cadena complementaria comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica PIK4CA, y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa el gen PIK4CA, reduce el nivel de expresión de PIK4CA.

- 55 La presente descripción proporciona dicho ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicho contacto reduce el nivel de expresión de PIK4CA al menos en el 40%.

La presente descripción proporciona dicho ácido ribonucleico bicatenario, en donde dicho contacto se realiza *in vitro*

a 30 nM o menos.

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica para reducir el nivel de expresión de PIK4CA en un organismo, que comprende dicho ARNbc y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 La presente descripción proporciona un método de tratamiento de una infección por virus ARN monocatenario positivo que comprende administrar a un paciente necesitado de dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho ARNbc.

La presente descripción proporciona un método de tratamiento de una infección por virus ARN monocatenario positivo, en donde dicho virus ARN monocatenario positivo se selecciona de entre el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del papiloma humano (VPH) y el virus del Dengue.

10 La presente descripción proporciona un ARNbc seleccionados entre los de la lista de la tabla 1.

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende dicho ARNbc.

La presente descripción proporciona un ARNbc seleccionados entre los de la lista de la tabla 2.

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende dicho ARNbc.

15 La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un gran número de ARNbc, en donde al menos un ARNbc se selecciona de entre los de la lista de la tabla 1, y al menos un ARNbc se selecciona de entre los ARNbc que tienen una cadena complementaria que comprende una secuencia nucleotídica que tiene una región sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica un virus ARN monocatenario positivo.

20 La presente descripción proporciona dicha composición farmacéutica, en donde dicho virus ARN monocatenario positivo se selecciona de entre el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del papiloma humano (VPH) y el virus del Dengue.

La presente descripción proporciona dicha composición farmacéutica, en donde dicho virus ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado.

25 La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un gran número de ARNbc, en donde al menos un ARNbc se selecciona de entre los de la lista de la tabla 2, y al menos un ARNbc se selecciona de entre los ARNbc que tienen una cadena complementaria que comprende una secuencia nucleotídica que tiene una región sustancialmente complementaria de al menos una parte de un ARNm que codifica un virus ARN monocatenario positivo.

30 La presente descripción proporciona dicha composición farmacéutica, en donde dicho virus ARN monocatenario positivo se selecciona de entre el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del papiloma humano (VPH) y el virus del Dengue.

La presente descripción proporciona dicha composición farmacéutica, en donde cada ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado.

35 La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende a) al menos un ARNbc seleccionado de entre los de la lista de 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 descripción proporciona dicha composición farmacéutica, en donde cada ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado.

40 La presente descripción proporciona dicha composición farmacéutica que comprende un gran número de secuencias de ARNbc seleccionadas de entre los de la lista de la tabla 1 y la tabla 2.

La presente descripción proporciona un método de tratamiento de una infección por VHC que comprende administrar a un paciente necesitado de dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición farmacéutica.

45 La presente descripción proporciona un método de tratamiento de una infección por un virus ARN monocatenario positivo que comprende administrar a un paciente necesitado del mismo, un compuesto que inhibe selectivamente la actividad de la fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K).

La presente descripción proporciona un método de tratamiento de una infección por un virus ARN monocatenario positivo, en donde el compuesto se selecciona de entre ARNbc, un ADN complementario de ADN, un ribozima o un vector de ADN que codifica los anteriores.

50 La presente descripción proporciona un método de tratamiento de una infección por un virus ARN monocatenario positivo, en donde el compuesto es un ARNbc.

La presente descripción proporciona un método de tratamiento de una infección por un virus ARN monocatenario positivo, en donde el compuesto es un ARNbc de la invención.

La presente descripción proporciona un método de tratamiento de una infección por un virus ARN monocatenario positivo, en donde el compuesto es un ARNbc que tiene una SEC. ID. nº seleccionada de entre la SEC. ID. nº 1 a la SEC. ID. nº 416.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido ribonucleico bicatenario, que comprende una secuencia SEQ. ID. nº 1 de la primera cadena y una secuencia SEQ. ID. nº 105 de la segunda cadena.
2. Una molécula de ácido ribonucleico bicatenario, que comprende una secuencia SEQ. ID. nº 105 de la cadena complementaria y una secuencia SEQ. ID. nº 1 de la cadena transcrita.
3. La molécula de ácido ribonucleico bicatenario de la reivindicación 1 o 2, que comprende al menos un nucleótido modificado químicamente.
4. La molécula de ácido ribonucleico bicatenario de la reivindicación 3, en donde dicho nucleótido se selecciona del grupo que consiste en: un nucleótido modificado con 2'-O-metilo; un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato; un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterilo o el grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico; un nucleótido modificado con 2'-desoxi-2'-fluoro; un nucleótido modificado con 2'-desoxi; un nucleótido bloqueado; un nucleótido abásico; un nucleótido modificado con 2'-amino; un nucleótido modificado con 2'-alquilo; un nucleótido con morfolino; un fosforamidato; y un nucleótido que comprende una base artificial.
5. La molécula de ácido ribonucleico bicatenario de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la molécula tras el contacto con una célula que expresa un gen PI4KB, inhibe la expresión de dicho gen.
6. Una célula que comprende la molécula de ácido ribonucleico bicatenario de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
7. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido ribonucleico bicatenario de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, que comprende un liposoma totalmente encapsulado, un complejo lipídico y/o un polímero.
9. Método *in vitro* para inhibir la expresión del gen PI4KB en una célula, comprendiendo el método las etapas siguientes:
 - a. Introducir en la célula una molécula de ácido ribonucleico bicatenario 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 del ARNm del gen PIK4B, inhibiendo de este modo la expresión del gen PIK4B en la célula.
10. La molécula de ácido ribonucleico bicatenario de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como medicamento.
11. Utilización de la molécula de ácido ribonucleico bicatenario de las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de un medicamento.
12. La molécula de ácido ribonucleico bicatenario de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como medicamento contra la infección por el virus ARN monocatenario positivo, en donde el virus ARN monocatenario positivo es el virus de la hepatitis C (VHC).
13. Utilización de la molécula de ácido ribonucleico bicatenario de las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de un medicamento contra la infección por el virus ARN monocatenario positivo, en donde el virus ARN monocatenario positivo es el virus de la hepatitis C (VHC).

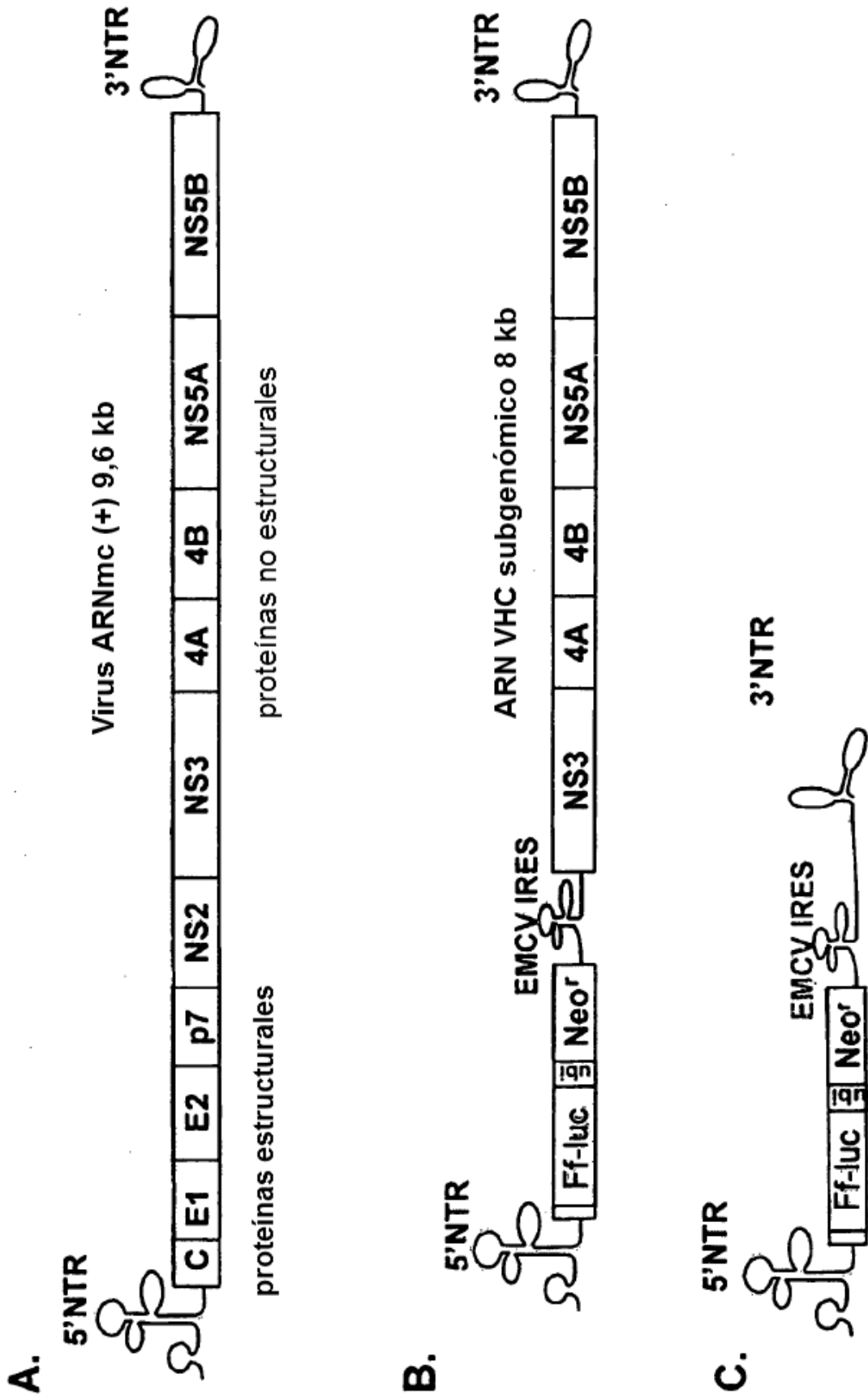


Figura 1

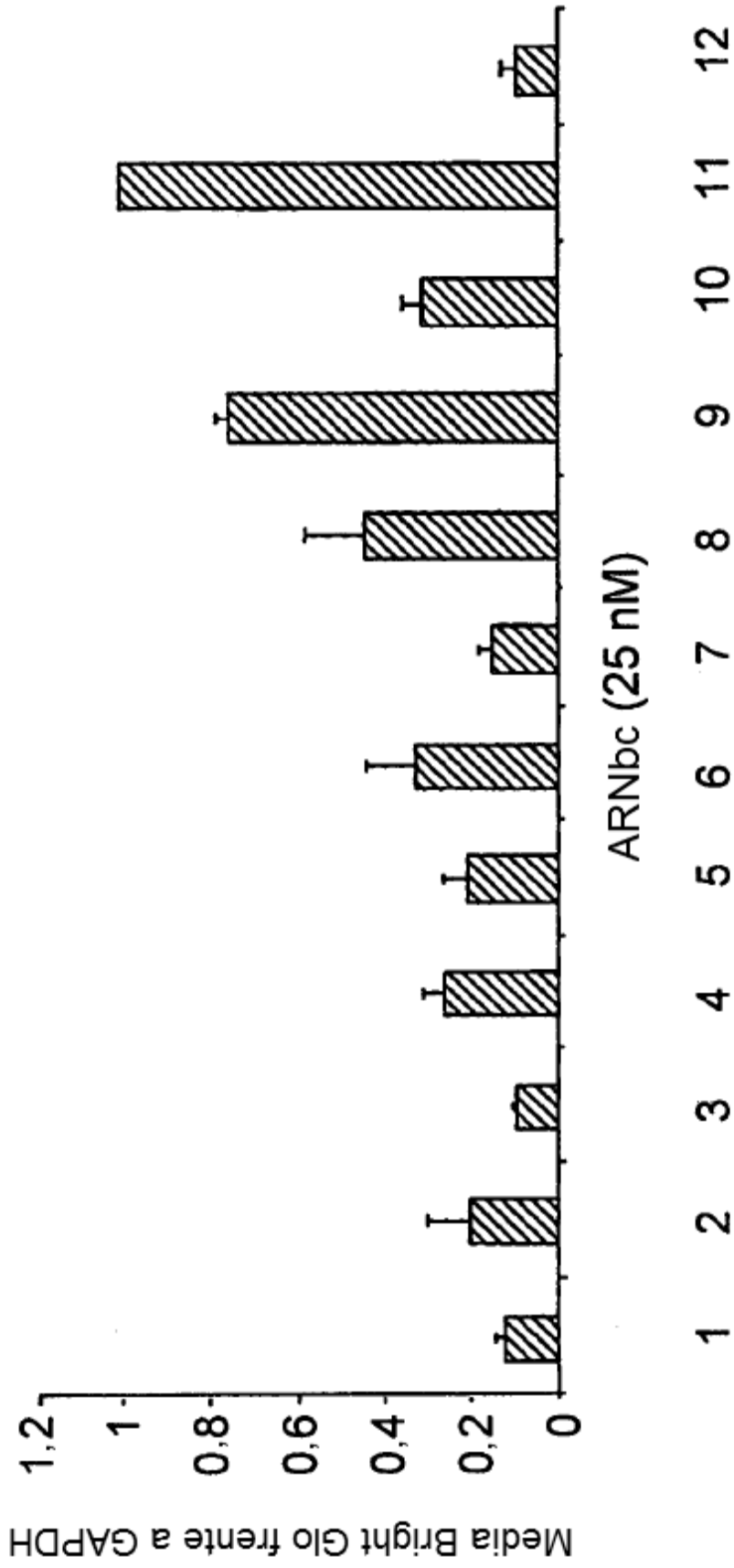


Figura 2

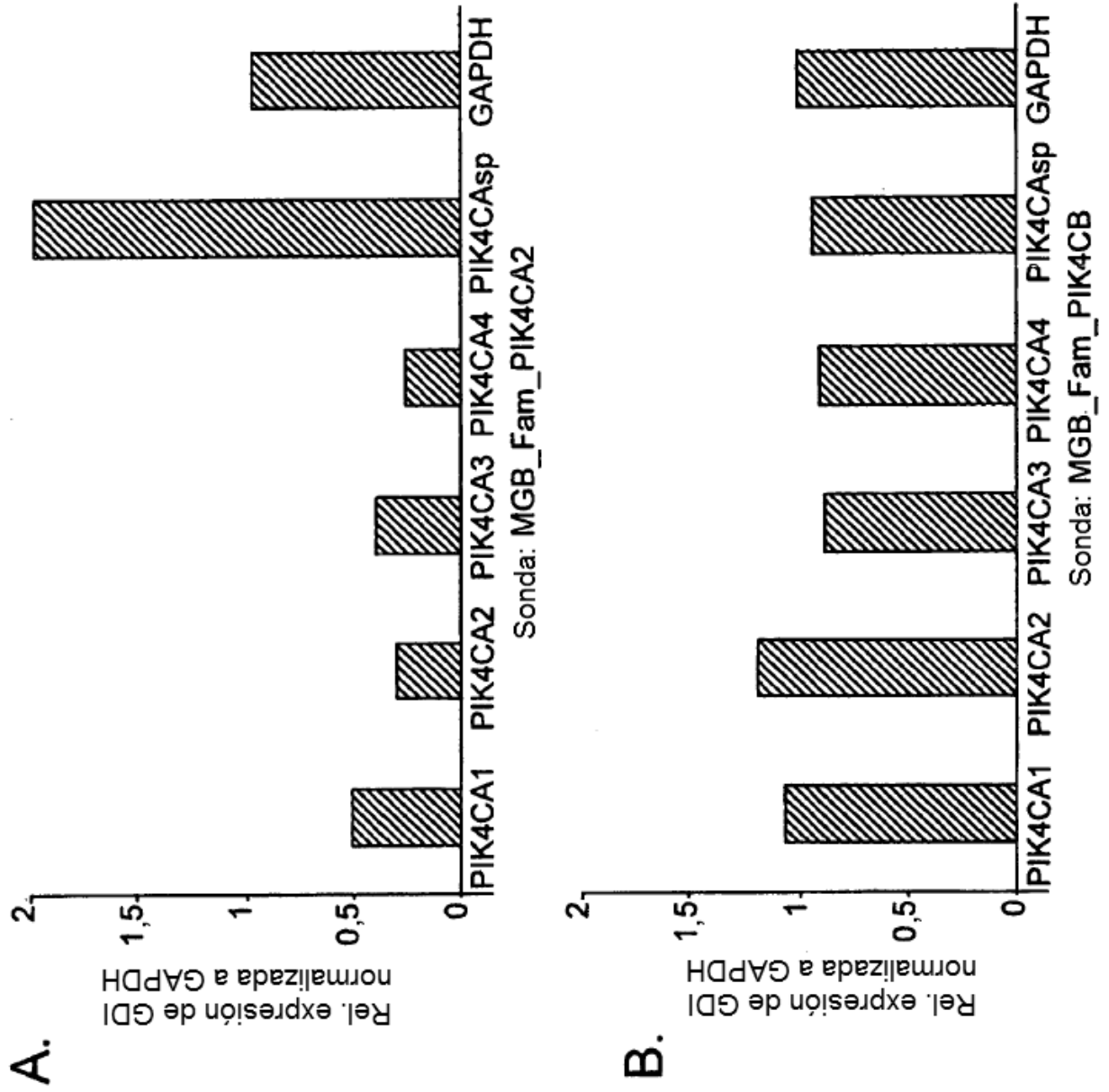
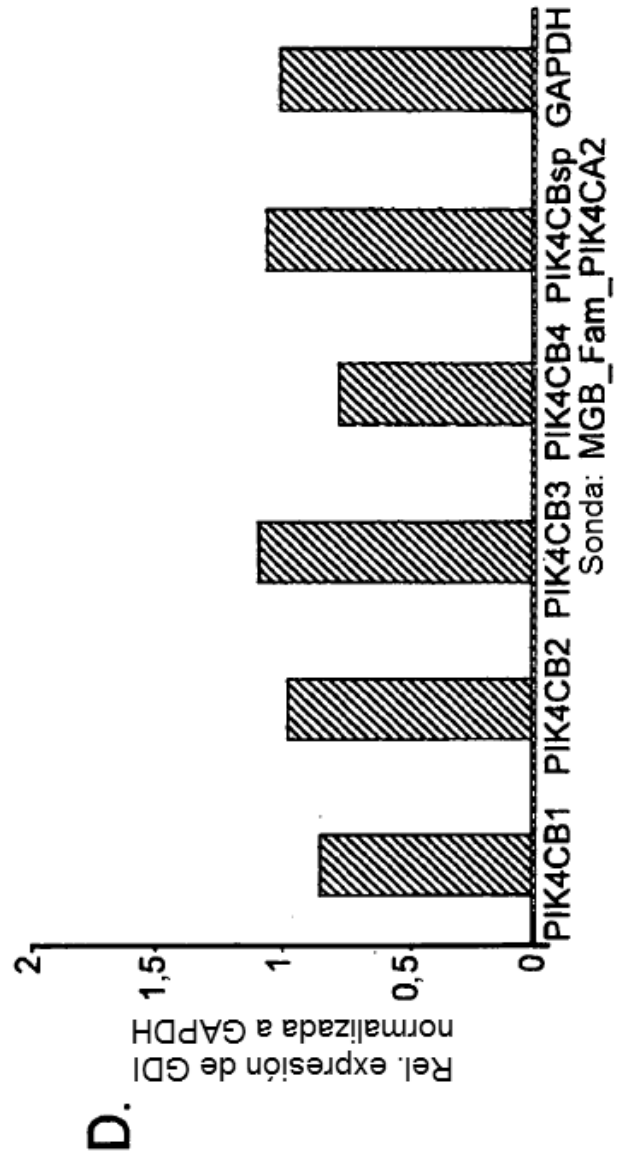


Figura 3



Figura 3 (cont.)



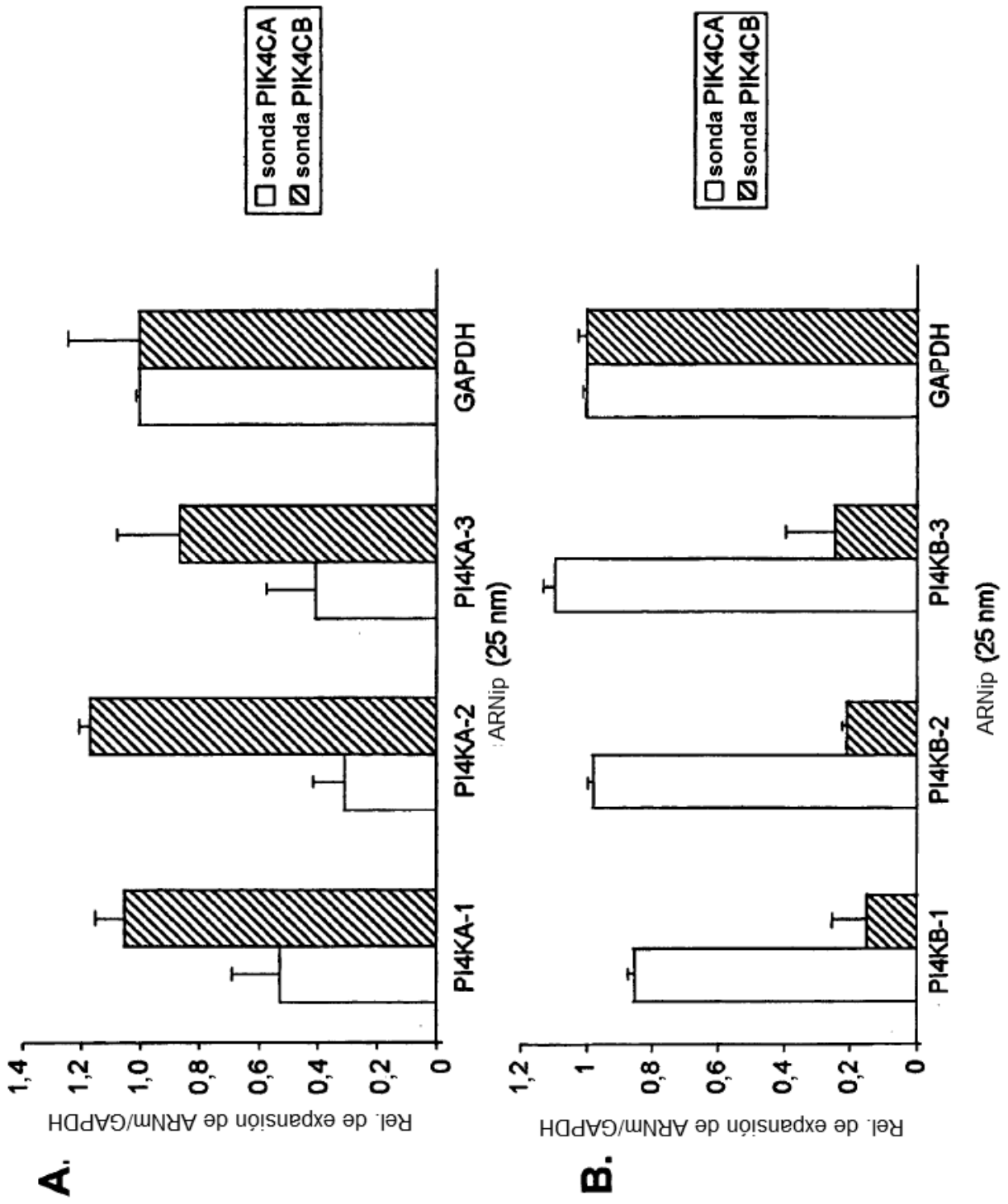
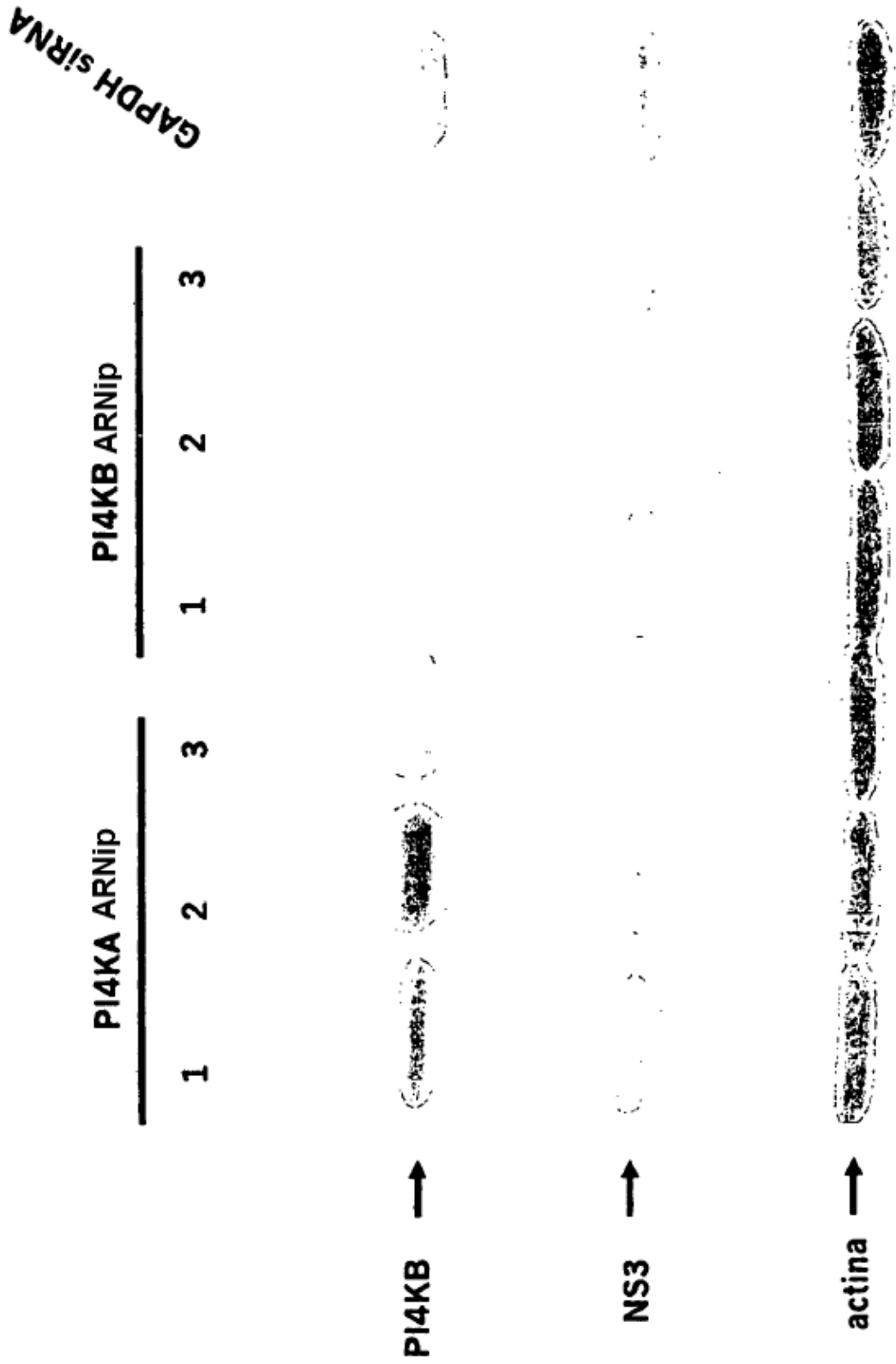


Figura 4

Figura 5



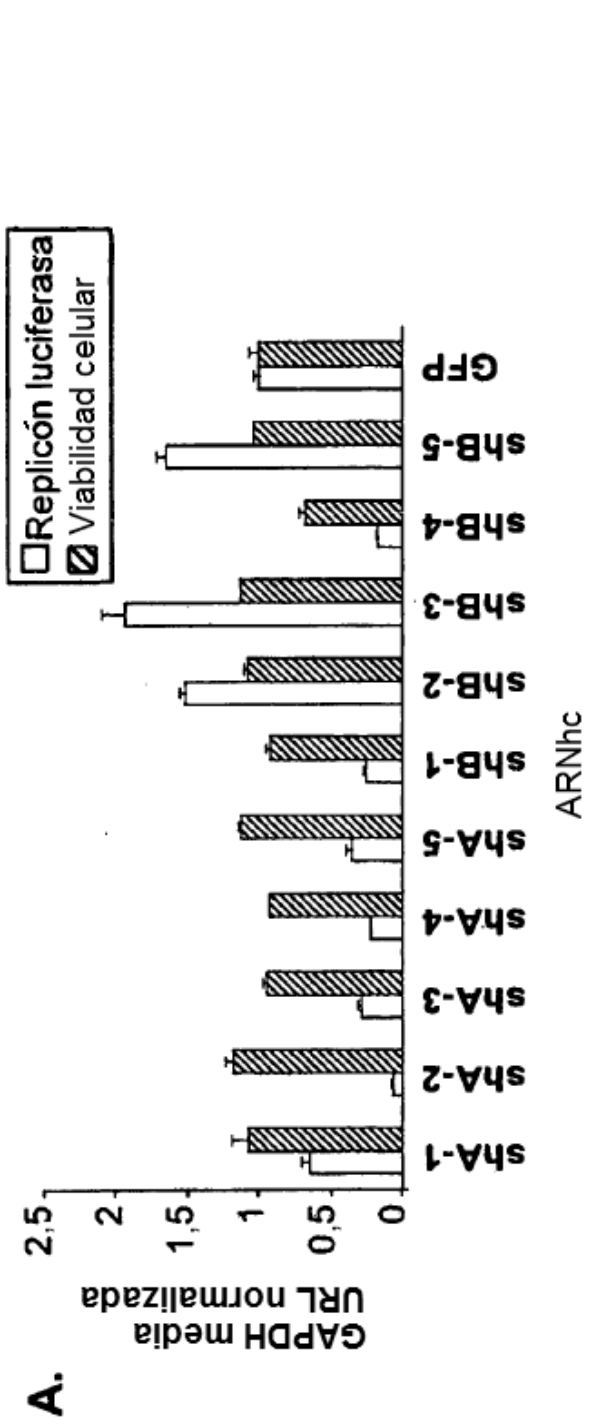


Figura 6



Figura 6

