

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 818**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2013 PCT/KR2013/004463**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13176477**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2013 E 13794539 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2853597**

54 Título: **Molécula de ácido nucleico inductora de interferencias de arn capaz de penetrar en las células y uso de la misma**

30 Prioridad:

**22.05.2012 KR 20120053950**

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

**17.06.2019**

73 Titular/es:

**OLIX PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
Room 1305, Star Valley 99, Digital-ro 9-gi,  
Geumcheon-gu  
Seoul 153-777, KR**

72 Inventor/es:

**HONG, SUN WOO**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 716 818 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

Molécula de ácido nucleico inductora de interferencias de arn capaz de penetrar en las células y uso de la misma

## 5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a una nueva molécula de ácido nucleico inductora de interferencias de ARN (ARNi) que tiene capacidad de penetración celular y al uso de la misma, y más en particular, a una nueva molécula de ácido nucleico bicatenario inductora de ARNi, que tiene una sustitución de la cadena principal de fosfato de al menos un  
10 nucleótido con fosforotioato o fosforditioato, y tiene un compuesto lipófilo conjugado con el mismo, y por lo tanto tiene una alta eficiencia de silenciamiento del gen diana a la vez que tiene la capacidad de penetrar en las células sin necesidad de un vehículo de suministro intracelular separado, y un procedimiento para silenciar un gen diana usando la molécula de ácido nucleico.

## 15 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

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

Un siRNA que induce esta interferencia de ARN es un ARN bicatenario corto (19-21 pb) capaz de inhibir la expresión de un gen diana de una manera específica de la secuencia, y actualmente está recibiendo atención como agente  
25 terapéutico contra varias enfermedades, que incluyen cáncer difícil de tratar, infecciones víricas y enfermedades hereditarias, gracias a su alta eficiencia y especificidad de diana. Para el desarrollo de agentes terapéuticos efectivos basados en un siRNA, se deben resolver varios problemas asociados con la estabilidad, la eficiencia de silenciamiento, las respuestas inmunitarias, los efectos distintos a los deseados y similares, y entre ellos, la administración in vivo efectiva se considera la más difícil de conseguir. Un siRNA no puede atravesar la membrana celular, ya que tiene una  
30 alta carga negativa debido a su cadena principal de fosfato. Además, debido a su pequeño tamaño, el siRNA se elimina rápidamente de la sangre y, por lo tanto, es difícil administrar el siRNA en una cantidad suficiente para inducir ARNi en un área diana.

En el caso de la administración in vitro, se han desarrollado muchos procedimientos de administración de alta eficiencia  
35 que usan lípidos catiónicos y polímeros catiónicos (Sioud M, Sorensen DR Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312:1220-1225). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la administración in vivo de siRNA es difícil de lograr con una alta eficiencia, a diferencia de la administración in vitro, y la eficiencia de la administración de siRNA disminuye debido a sus interacciones con varias proteínas in vivo (Bolcato-Bellemin AL, Bonnet ME, Creusat G, y col. , Sticky overhangs enhance siRNA-mediated gene silencing.  
40 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104:16050-16055). Además, los siRNA se acumulan de forma importante en un órgano específico como el hígado o el pulmón, que no es un área enferma, dependiendo de la composición de los vehículos de administración, lo que induce toxicidad.

Mientras tanto, el factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF/CCN2) se conoce como una proteína matricelular  
45 que desempeña un papel importante en la diferenciación, el crecimiento, la migración, la producción de ECM, la adhesión y similares de las células. En el caso de trastornos fibróticos crónicos que inducen fibrosis en varios órganos para causar daño en los órganos, se encontró que el CTGF está sobreexpresado en tejidos en los que se producen trastornos fibróticos. Además, la relación entre CTGF y fibrosis en la piel ha sido relativamente bien estudiada. Además, se observó que la expresión de CTGF en una piel normal se inhibía hasta el nivel basal, pero aumentó  
50 temporalmente cuando la piel estaba lesionada. Por el contrario, en el caso de la esclerosis queiloide o localizada, se observó que la sobreexpresión de CTGF se mantuvo incluso después de la cicatrización, y cuando se inhibió la expresión de CTGF usando una cadena antisentido o similar, se inhibió la fibrosis y la producción de queiloide, lo que sugiere que CTGF desempeña un papel importante en la fibrosis y la producción de queiloide (Sisco M, Kryger ZB, O'Shaughnessy KD, y col. Antisense inhibition of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mRNA limits  
55 hypertrophic scarring without affecting wound healing in vivo. *Wound Repair Regen* 2008; 16:661-673. DOI: WRR416 [pii]). Patológicamente, se sabe que una molécula de CTGF de longitud completa está implicada en una afección donde se encuentran presentes la hiperproliferación de las células del tejido conectivo y el depósito excesivo de matriz extracelular. Además, se sabe que CTGF está implicado también en condiciones asociadas con la migración y proliferación de células endoteliales y la angiogénesis. Los ejemplos de enfermedades y trastornos asociados con  
60 dichas afecciones incluyen fibrosis, cáncer y enfermedades y trastornos relacionados de la piel y los órganos

principales, por ejemplo, esclerosis sistémica, angiogénesis, aterosclerosis, nefropatía diabética e hipertensión renal. Además, se sabe que el CTGF es útil para la cicatrización de heridas, la reparación del tejido conjuntivo y la reparación del hueso y el cartílago. En tales términos, el CTGF se describió como un inductor de trastornos de la formación de hueso, tejido o cartílago, tales como osteoporosis, artrosis u osteocondritis, artritis, trastorno esquelético, cicatriz hipertrófica, quemadura, hipertrofia hemangiectásica o cicatrización sólida (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. nº 5. 837. 258).

Por consiguiente, los autores de la presente invención han realizado grandes esfuerzos para proporcionar una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi novedosa que pueda administrarse eficazmente in vitro e in vivo y tenga capacidad de penetración celular, y como resultado, han encontrado que, cuando la cadena principal de fosfato de al menos un nucleótido en una molécula de ácido nucleico bicatenario inductor de ARNi se sustituye por fosforotioato y se conjuga un compuesto lipófilo con la molécula de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico muestra una alta eficiencia de silenciamiento del gen diana incluso in vivo sin necesidad de un vehículo de administración intracelular separado y, al mismo tiempo, tiene una alta capacidad de penetración celular, completando así la presente invención.

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

[Bibliografía de la técnica anterior]

[Documentos de patente]

Documento de Patente 1: Patente de EE. UU. nº 5. 837. 258

Documento de Patente 2: el documento WO 2007/022470 describe procedimientos y composiciones para el tratamiento de enfermedades neurológicas, en particular procedimientos de administración de agentes de ARNi a células neurales para el tratamiento de enfermedades neurológicas;

Documento de Patente 3: el documento EP2631291 se refiere a moléculas de ácidos nucleicos inductoras de ARNi que tienen una estructura que comprende una primera cadena que tiene una longitud de 24-121 nt y comprende una región complementaria a un ácido nucleico diana, y una segunda cadena que tiene una longitud de 13 a 21 nt y tiene una región que se une de manera complementaria a la región de la primera cadena, que es complementaria al ácido nucleico diana, de manera que la molécula de ácido nucleico inhibe la expresión de un gen diana;

Documento de Patente 4: el documento WO 2012/053741 describe moléculas de ácido nucleico que inducen interferencia de ARN. Se describe que las moléculas tienen un primer soporte de 24-121 nt de longitud provisto de una región parcial complementaria a un ácido nucleico diana, y una segunda cadena de 13-21 nt de longitud provista de una región que forma un enlace complementario con la región parcial complementaria al ácido nucleico diana de la primera cadena;

Documento de Patente 5: el documento US 2011/0237648 A1 describe construcciones de ARNi con características de captación celular y de tejido mejoradas y procedimientos de uso de estos compuestos en aplicaciones dérmicas.

[Documentos no relacionados con patentes]

Documento No Relacionado con Patentes 1: Sioud M, Sorensen DR Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312:1220-1225

Documento no relacionado con patentes 2: Bolcato-Bellemin AL, Bonnet ME, Creusat G, et al. Sticky overhangs enhance siRNA-mediated gene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104:16050-16055

Documento no relacionado con patentes 3: Sisco M, Kryger ZB, O'Shaughnessy KD, et al. Antisense inhibition of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mRNA limits hypertrophic scarring without affecting wound healing in vivo. *Wound Repair Regen* 2008; 16:661-673. DOI:WRR416 [pii]

Documento no relacionado con patentes 4: Chang C, et al. Structural Diversity Repertoire of Gene Silencing Small Interfering RNAs. *Nucleic Acid Therapeutics*, 2011; 21(3):125-131. Este documento describe que el siRNA se puede usar como un activador de ARNi para evitar respuestas de interferón inespecíficas inducidas por dsRNA largos. También se mencionan reglas estrictas de diseño estructural de siRNA para lograr un silenciamiento génico óptimo, que incluye la presencia de un saliente en 3', una longitud dúplex fija y simetría estructural.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi novedosa que tenga capacidad de penetración celular, que pueda administrarse de manera efectiva in vitro e in vivo, y el uso de la

misma.

Para lograr el objetivo anterior, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario inductora de ARNi que tiene capacidad de penetración celular y que comprende al menos un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, que comprende:

una primera cadena que tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 154 y que comprende al menos un enlace de fosforotioato o fosforoditioato; y  
 una segunda cadena que tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 153 y que comprende al menos un enlace de fosforotioato o fosforoditioato y que comprende además un resto de colesterol unido de forma covalente a su extremo 3',  
 donde la segunda cadena se une a la primera cadena de manera que la primera cadena tiene una región bicatenaria a la que se une la segunda cadena y una región monocatenaria a la que no se une la segunda cadena, y donde el extremo 5' de la primera cadena y el extremo 3' de la segunda cadena forman un extremo romo.

En una realización, la primera cadena comprende de 4 a 17 enlaces de fosforotioato o fosforoditioato.

En una realización adicional, la segunda cadena comprende de 1 a 16 enlaces de fosforotioato o fosforoditioato.

En otra realización, al menos uno de los nucleótidos de la región monocatenaria en la primera cadena comprende un análogo de base en volumen.

La presente invención también proporciona una composición de silenciamiento génico que contiene la molécula de ácido nucleico anterior.

La presente invención también proporciona un procedimiento para silenciar un gen diana en una célula, comprendiendo el procedimiento la introducción de la molécula de ácido nucleico anterior en la célula.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado al factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), conteniendo la composición la molécula de ácido nucleico anterior que se dirige a un ARNm que codifica CTGF.

En una realización, la enfermedad o trastorno asociado a CTGF se selecciona de entre el grupo que consiste en queloide, fibrosis renal, paquidermatosis, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, artritis, hipertensión, insuficiencia renal, trastorno relacionado con la vasculogénesis, dermatofibrosis y trastorno del sistema cardiovascular.

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

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un gráfico que muestra las eficiencias de silenciamiento génico de las estructuras de siRNA, asiRNA y lasiRNA para 24 secuencias que se dirigen a los CTGF que se muestran en las Tablas 1 a 3.

La FIG. 2 representa micrografías de fluorescencia que muestran el aumento en la eficiencia de captación intracelular de lasiRNA por modificación de colesterol.

La FIG. 3 muestra las estructuras de lasiRNA modificadas con colesterol y PS de acuerdo con la presente invención.

Subrayado: modificación de OMe; \*: modificación de PS, Chol: colesterol; Cy3: Cy3.

La FIG. 4 representa micrografías de fluorescencia que muestran el aumento en la eficiencia de captación intracelular de chol-lasiRNA por modificación de fosforotioato (PS).

La FIG. 5 es un diagrama gráfico que muestra una comparación entre los efectos de silenciamiento génico de chol-lasiRNA de acuerdo con la variación de los números en las modificaciones de fosforotioato (PS). Cada gráfica representa la media  $\pm$  DT de tres experimentos repetidos.

La FIG. 6 muestra la estructura de un chol-lasiRNA-PS7 que se dirige a MyD88. Subrayado: modificación de OMe, \*: modificación de PS, y Chol: colesterol.

La FIG. 7 es un diagrama gráfico que muestra una comparación entre las eficiencias de silenciamiento génico de una variedad de lasiRNA que penetran en las células (cp-lasiRNA). El CTGF o MyD88 entre paréntesis representa un gen que está dirigido por cp-lasiRNA.

La FIG. 8 es un diagrama gráfico que muestra las eficiencias de silenciamiento génico de las moléculas de ácido nucleico de la invención que tienen diversas modificaciones de compuestos lipófilos, es decir, modificaciones hidrófobas.

La FIG. 9 es un diagrama gráfico que muestra la eficiencia de silenciamiento génico de la molécula de ácido nucleico de la invención de acuerdo con las longitudes de la cadena antisentido.

La FIG. 10 muestra la estructura de una modificación de PS2.

La FIG. 11 es un diagrama gráfico que muestra las eficiencias de silenciamiento génico de las moléculas de ácido nucleico de la invención que tienen modificaciones de la cadena principal de fosfato.

La FIG. 12 es un diagrama gráfico que muestra las eficiencias de silenciamiento del gen diana in vivo de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

La FIG. 13 es un diagrama gráfico que muestra la eficiencia de silenciamiento del gen diana in vivo de la molécula de ácido nucleico de la invención en función de la concentración de la misma.

La FIG. 14 es un diagrama gráfico que muestra la eficiencia de silenciamiento del gen diana de la molécula de ácido nucleico de la invención en función de la duración.

10

## MEJOR MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entienden normalmente los expertos en la materia a los que se dirige la presente invención. En general, la nomenclatura usada en la presente memoria es bien conocida y se usa comúnmente en la técnica.

15

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

Tal como se usa en la presente memoria, el término "ARNi" (interferencia de ARN) se refiere a un mecanismo por el cual un ARN bicatenario (dsRNA) que consiste en una cadena que tiene una secuencia complementaria al ARNm de un gen diana y una cadena que tiene una secuencia complementaria a la misma se introduce en células o similares para inducir la degradación del ARNm del gen diana e inhibir así la expresión del gen diana.

20

Tal como se usa en la presente memoria, el término "siRNA" (ARN de interferencia pequeño) se refiere a un ARN bicatenario (dsRNA) corto que actúa como mediador en el silenciamiento génico eficaz de una manera específica de la secuencia.

25

Tal como se usa en la presente memoria, el término "cadena antisentido" se refiere a un polinucleótido que es complementario sustancialmente o al 100% con un ácido nucleico diana de interés. Por ejemplo, una cadena antisentido puede ser complementaria, en su totalidad o en parte, a una molécula de ARNm (ARN mensajero), una secuencia de ARN que no es ARNm (por ejemplo, microARN, piwiARN, ARNt, ARNr y hnRNA) o una secuencia de ADN que es codificante o no codificante. Los términos "cadena antisentido" y "cadena guía" se usan en la presente memoria de forma indistinta.

30

El término "cadena con sentido" se refiere a un polinucleótido que tiene la misma secuencia de nucleótidos, en su totalidad o en parte, que un ácido nucleico diana, donde el polinucleótido es idéntico, total o parcialmente, a una molécula de ARNm (ARN mensajero), una secuencia de ARN que no es ARNm (p. ej. , microARN, piwiARN, ARNt, ARNr y hnRNA) o una secuencia de ADN codificante o no codificante.

35

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

40

45

En un aspecto, la presente invención se dirige a una molécula de ácido nucleico bicatenario inductora de ARNi que tiene capacidad de penetración celular y que comprende al menos un nucleótido modificado con 2'-O-alkilo, que comprende:

50

una primera cadena que tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 154 y que comprende al menos un enlace de fosforotioato o fosforoditioato; y

una segunda cadena que tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 153 y que comprende al menos un enlace de fosforotioato o fosforoditioato y que comprende además un resto de colesterol unido de forma covalente a su extremo 3',

55

donde la segunda cadena se une a la primera cadena de manera que la primera cadena tiene una región bicatenaria a la que se une la segunda cadena y una región monocatenaria a la que no se une la segunda cadena, y donde el extremo 5' de la primera cadena y el extremo 3' de la segunda cadena forman un extremo romo.

60

En la presente memoria, la primera cadena corresponde a una cadena antisentido de siRNA, y la segunda cadena corresponde a una cadena con sentido de siRNA.

5 En un ejemplo de la presente invención, la molécula de ácido nucleico que tiene la estructura descrita anteriormente se construyó para tener cada una de las 24 secuencias dirigidas a CTGF, y como resultado, se encontró que las moléculas de ácido nucleico construidas generalmente tenían altas eficiencias de silenciamiento génico en comparación con los siRNA convencionales. En la presente invención, una molécula de ácido nucleico bicatenario inductora de ARNi que tiene una región monocatenaria larga que no forma un enlace complementario con la segunda cadena, es decir, un siRNA que tiene una cadena antisentido larga, se ha denominado "lasiRNA".

10 El lasiRNA es una estructura novedosa inductora de ARNi asimétrica que tiene una longitud bicatenaria corta y una alta eficiencia de silenciamiento génico, en comparación con el siRNA convencional. Además, debido a la función de la cadena antisentido que tiene una larga estructura saliente, el lasiRNA tiene una mayor eficiencia de silenciamiento génico que siRNA o asiRNA, y por lo tanto sustituirá a las estructuras convencionales para desarrollar agentes terapéuticos. Además, se caracteriza porque tiene una larga longitud de saliente en comparación con otras estructuras, y mantiene una alta actividad incluso cuando el saliente se modifica de varias maneras. En virtud de estas características, pueden introducirse libremente relativamente muchas modificaciones químicas en el lasiRNA, y por lo tanto se pueden agregar varias funciones al lasiRNA.

20 En la presente invención, la región de la primera cadena, que es complementaria al ácido nucleico diana, tiene preferentemente una longitud de 19-21 nt. Por lo tanto, la primera cadena comprende una región monocatenaria que no se une a la segunda cadena. En la presente memoria se describe adicionalmente que la primera cadena puede comprender además, en la región monocatenaria, un oligonucleótido de ácido nucleico seleccionado de entre el grupo que consiste en ADN antisentido, ARN antisentido, ribozima y ADNzima.

25 También se describe que la región monocatenaria de la primera cadena, que no se une de manera complementaria a la segunda cadena, puede unirse directamente o mediante un enlazador a la región que se une de manera complementaria a la segunda cadena. En la presente memoria, el enlazador puede ser un enlazador químico. Los ejemplos del enlazador químico incluyen, pero no se limitan a, un resto de ácido nucleico, PNA (un resto de PNA), un resto peptídico, un enlace disulfuro o un resto de polietilenglicol.

35 Por otra parte, en la presente invención, la primera cadena puede comprender además, en la región monocatenaria, una secuencia que es complementaria o no complementaria al ácido nucleico diana. Cuando la primera cadena comprende la secuencia complementaria, la secuencia complementaria puede estar situada consecutivamente desde la región de doble cadena de la molécula de ácido nucleico de la presente invención, es decir, la región de siRNA, que es complementaria del ácido nucleico diana. Alternativamente, la secuencia complementaria también puede estar situada separada de la región bicatenaria. Del mismo modo, la secuencia a la que se dirige el siRNA puede estar situada consecutivamente o situada alejada de las demás. Además, en el caso en el que la región monocatenaria de la primera cadena tenga la secuencia de siRNA, que es complementaria al gen diana, cuando la secuencia contenida en la región monocatenaria es un ADN antisentido o un ARN antisentido, la secuencia tiene al menos aproximadamente el 70-80%, más preferentemente al menos aproximadamente el 80-90%, e más preferentemente todavía al menos el 95-99% de complementariedad con la secuencia del gen diana seleccionado por el siRNA. También se describe que la región monocatenaria puede tener una longitud de 5 a 100 nt. Si la longitud de la región monocatenaria es inferior a 5 nt, el efecto de aumentar la eficiencia con la que se inhibe la expresión génica será insignificante, y si la longitud es superior a 100 nt, la eficiencia con la que se sintetiza una molécula de ARN será reducida. También se describe que la región monocatenaria puede tener una longitud de 9-100 nt o una longitud de 45 50 nt o menor o que la región monocatenaria puede tener una longitud de 10-15 nt.

50 En la presente invención, al menos uno de los nucleótidos de la región monocatenaria en la primera cadena puede comprender un análogo de base en volumen. Cuando una secuencia extendida comprende un análogo de base en volumen tal como un derivado de desoxiadenosina que tiene un grupo fenilo, una cadena de ARNm que se une de manera complementaria a la secuencia extendida se escinde en la ubicación del análogo de base en volumen. Cualquier análogo de base en volumen que induzca esta escisión puede usarse sin limitación en la presente invención.

55 En la presente invención, en el caso de una estructura nucleica obtenida extendiendo la cadena antisentido de siRNA de una manera complementaria a una secuencia de ARNm diana, se predijo que el extremo 5' de la estructura nucleica funcionará como el mecanismo de ARNi, mientras que el extremo 3' de la estructura nucleica funcionará como un mecanismo antisentido o guiará el siRNA del extremo 5' al ARNm objetivo. Cuando la secuencia del extremo 3' antisentido, que es complementaria al ARNm, es ADN, puede inducir la escisión del ARNm dependiente de la ARNasa H. Además, se predijo que cuando al menos uno de los nucleótidos de la región monocatenaria del extremo 3' 60

antisentido comprende un análogo de base en volumen o la región monocatenaria se une al ARNm para formar una estructura abultada, podría inducirse la escisión.

La publicación abierta a consulta por el público de la patente coreana nº 10-2009-0065880 describe una estructura de siRNA que es una molécula de siRNA que consiste en una cadena antisentido de 19-21 nt y una cadena con sentido de 13-16 nt, donde el extremo 5' de la cadena antisentido es un extremo romo. Esta estructura de siRNA inhibe la expresión génica con alta eficiencia sin causar efectos fuera del objetivo por parte de la cadena con sentido de siRNA o inhibiendo otros mecanismos de ARNi. Cuando la estructura de la presente invención se aplica a este siRNA, los efectos distintos a los deseados pueden minimizarse, mientras que puede obtenerse el efecto descrito anteriormente del oligonucleótido de ácidos nucleicos contenido en la región monocatenaria de la primera cadena. Tal como se usa en la presente memoria, el término "efectos distintos a los deseados" se refiere a cualquier caso en el que la cadena con sentido del siRNA provoca la degradación inesperada de otros ARNm o el silenciamiento de los genes correspondientes, y la cadena antisentido del siRNA se empareja con dianas no deseadas para provocar la degradación de otros ARNm o el silenciamiento de los genes correspondientes, incluso aunque el siRNA se use originalmente para inducir la degradación del ARNm que tiene una secuencia complementaria a la cadena antisentido para obtener el efecto de inhibir la expresión génica del ARNm.

En un ejemplo de la presente invención, se mostró que, cuando se realizaban modificaciones de colesterol y modificaciones de PS, las modificaciones de colesterol aumentaban la capacidad de penetración celular del lasiRNA, pero cuando no se introducía un número suficiente de modificaciones de fosforotioato (PS), el uso de colesterol en solitario no fue suficiente para inducir de forma efectiva el silenciamiento del gen diana sin un sistema de administración intracelular separado. En la presente memoria, se mostró que la introducción de modificaciones de PS aumentó la capacidad de penetración celular en proporción al número de modificaciones de PS introducidas, y cuando el número de modificaciones de PS fue demasiado elevado, el lasiRNA no indujo silenciamiento génico mediado por ARNi. Por esta razón, el número óptimo de modificaciones de PS se estableció comparando la eficiencia de silenciamiento génico después de la incubación con células. Específicamente, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede caracterizarse porque la cadena principal de fosfato de la primera cadena comprende de 4 a 17 nucleótidos sustituidos con fosforotioato.

En este documento, la cadena principal de fosfato de los nucleótidos en la primera cadena de la molécula de ácido nucleico puede estar sustituida por fosforotioato, y las cadenas principales de fosfato de los nucleótidos en una región de la primera cadena, que excluye una región complementaria a un ácido nucleico diana, pueden estar sustituidas por fosforotioato. Aquí, la cadena principal de fosfato de 4 a 17 nucleótidos, en la primera cadena, puede estar sustituida por fosforotioato. Además, la cadena principal de fosfato de 1 a 16 nucleótidos, en la segunda cadena, puede estar sustituida por fosforotioato.

En otro ejemplo de la presente invención, se podría ver que el uso de la modificación de PS2 (fosforoditioato) tal como se muestra en la FIG. 10 en lugar de la modificación de PS dio como resultado un aumento en la eficiencia de silenciamiento génico de la molécula de ácido nucleico de la invención en comparación con las estructuras de siRNA convencionales, a pesar de que mostró una eficiencia de silenciamiento génico reducida en comparación con la modificación de PS. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se puede caracterizar porque la cadena principal de fosfato de al menos un nucleótido está sustituida por fosforoditioato. Preferentemente, la cadena principal de fosfato de 4 a 17 nucleótidos en la primera cadena, puede estar sustituida por fosforoditioato. Alternativamente, la cadena principal de fosfato de 1 a 16 nucleótidos, en la segunda cadena, puede estar sustituida por fosforoditioato.

El compuesto lipófilo que se usa en la presente invención da como resultado una modificación hidrófoba, y puede ser colesterol. Además, el compuesto lipófilo, tal como el colesterol, puede conjugarse con el extremo 3' de la segunda cadena de la molécula de ácido nucleico.

El ácido nucleico diana, sin limitarse a él, podría ser ARNm (ARN mensajero), microARN, piRNA (ARN que interacciona con piwi), secuencia de ADN codificante o secuencia de ADN no codificante o similares.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede ser una molécula sintetizada de acuerdo con un procedimiento general, pero no se limita a la misma. En otras palabras, en la presente invención, la molécula de siRNA puede sintetizarse por medios químicos o enzimáticos. La molécula de siRNA de la presente invención se puede obtener a partir de genes presentes en la naturaleza mediante técnicas recombinantes estándar. En este caso, la molécula de siRNA puede ser sustancialmente complementaria en el nivel de la secuencia de nucleótidos con al menos una parte del ARNm del gen diana, cuya expresión se va a modificar.

Por consiguiente, la molécula de ácido nucleico de la presente invención puede comprender una modificación química. La modificación química se puede obtener sustituyendo el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de al menos un nucleótido, incluido en la molécula de ácido nucleico, por un grupo -O-alquilo. Además, en la presente memoria se describe que el grupo hidroxilo puede estar sustituido por uno cualquiera de -Br, -Cl, -R, -R'OR, -SH, -SR, -N<sub>3</sub> y -CN (R = alquilo, arilo o alquilenos). En la presente memoria también se describe que la modificación química se puede obtener reemplazando la cadena principal de fosfato de al menos un nucleótido, incluido en la molécula de ácido nucleico, por uno cualquiera de la forma de alquilfosfonato, la forma de fosfoamidato y la forma de boranofosfato. También se describe que la modificación química puede obtenerse sustituyendo al menos un nucleótido incluido en la molécula de ácido nucleico por uno cualquiera de LNA (ácido nucleico bloqueado), UNA (ácido nucleico desbloqueado), morfolino y PNA (ácido nucleico peptídico). Además, la modificación química se puede obtener uniendo la molécula de ácido nucleico a una o más seleccionadas de entre el grupo que consiste en lípidos, péptidos que penetran en las células y ligandos de direccionamiento celular.

Además, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede usarse eficientemente para la administración *in vitro* e *in vivo* junto con diversos vehículos de administración, tales como liposomas, polímeros catiónicos, anticuerpos, aptámeros o nanopartículas, y procedimientos de administración conocidos para suministrar de manera efectiva oligonucleótidos en las células.

Mientras tanto, en un ejemplo de la presente invención, se demostró que, cuando la molécula de ácido nucleico de la presente invención, disuelta en una solución tal como PBS, se inyectaba sin usar un vehículo de administración separado, mostraba una alta eficiencia de silenciamiento génico del 90% o más en un área diana *in vivo*, lo que sugiere que la molécula de ácido nucleico de la presente invención se puede desarrollar directamente en un fármaco inyectable sin necesidad de un procedimiento de formulación separado.

Los ejemplos de la presente invención proponen que la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de acuerdo con la presente invención muestra un efecto de silenciamiento del gen diana. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se dirige a una composición de silenciamiento génico que contiene una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi. En la presente memoria, la molécula de ácido nucleico puede estar contenida en forma de un complejo de ácido nucleico que comprende un vehículo de suministro celular unido al mismo.

En un ejemplo de la presente invención, se encontró que, cuando la estructura de ácido nucleico de la presente invención se aplicaba a un siRNA que se dirige al gen diana CTGF, la eficiencia con la que se inhibe la expresión del gen diana podría aumentarse significativamente, y la capacidad de penetración celular de la misma también podría mantenerse durante un largo período de tiempo. Por lo tanto, será evidente para los expertos en la materia que, incluso cuando se proporcionan moléculas de ácido nucleico dirigidas a otros genes diana de acuerdo con la presente invención, se pueden obtener los mismos resultados.

Mientras tanto, la composición para inhibir la expresión génica de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse en forma de un kit para inhibir la expresión génica. El kit para inhibir la expresión génica puede adoptar la forma de botellas, recipientes, sobres, envolturas, tubos, ampollas y similares, que pueden formarse en parte o en su totalidad a partir de plástico, vidrio, papel, papel de aluminio, cera y similares. El contenedor puede estar equipado con una tapa total o parcialmente desmontable que inicialmente puede formar parte del contenedor o fijarse al contenedor por medios mecánicos, adhesivos u otros. El contenedor también puede estar equipado con un tapón, que permite el acceso al contenido con la aguja de una jeringa. El kit puede comprender un envase exterior que puede incluir instrucciones sobre el uso de los componentes.

En otro aspecto más, la presente invención se dirige a un procedimiento para inhibir la expresión de un gen diana en una célula *in vitro* usando la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi anterior. Es decir, la presente invención está dirigida a un procedimiento para inhibir la expresión de un gen diana en una célula *in vitro*, que comprende una etapa de introducción de la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi anterior en una célula.

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

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

La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención no está necesariamente limitada a un siRNA sintético y también puede aplicarse ventajosamente a siRNA o shRNA, que se expresa en células usando un vector de expresión o similar. En otras palabras, la molécula de ácido nucleico de la presente invención puede expresarse en células para inhibir la expresión del gen diana. Se describe además un procedimiento para inhibir la expresión de

un gen diana en una célula, comprendiendo el procedimiento una etapa de expresión de la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi anterior en la célula.

5 Mientras tanto, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede dirigirse a un ARNm que codifica un factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF). En un ejemplo de la presente invención, se encontró que la expresión de CTGF se inhibía a través de la introducción de la molécula de ácido nucleico que tiene la estructura de acuerdo con la presente invención en la célula. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno asociado al factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), conteniendo la composición la molécula de ácido nucleico anterior que se dirige a un ARNm codificante de CTGF.

15 Además, la molécula de ácido nucleico de la presente invención puede desarrollarse en agentes terapéuticos contra enfermedades localizadas, y puede usarse junto con varios anticuerpos específicos de células, aptámeros, ligandos o similares conocidos, y por lo tanto puede desarrollarse en agentes terapéuticos para la regulación de genes, que muestran efectos de silenciamiento génico solo en un área deseada.

20 La composición anticancerosa de la presente invención se puede proporcionar como una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi sola o en combinación con al menos un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. La molécula de ácido nucleico puede estar contenida en la composición farmacéutica en una cantidad farmacéuticamente efectiva de acuerdo con una enfermedad y con la gravedad de la misma, la edad, el peso, el estado de salud y el sexo del paciente, la vía de administración y el período de tratamiento.

25 Tal como se usa en la presente memoria, el término "composición farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición que es fisiológicamente aceptable y no causa trastornos gástricos, reacciones alérgicas tales como trastornos gastrointestinales o vértigo, o reacciones similares, cuando se administra a seres humanos. Los ejemplos de dicho vehículo, excipiente o diluyente pueden incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, estearato de magnesio y aceites minerales.

30 La composición farmacéutica puede contener adicionalmente cargas, agentes antiagregantes, lubricantes, agentes humectantes, perfumes, emulsionantes y conservantes. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse usando un procedimiento bien conocido en la técnica, de manera que pueda proporcionar la liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración a mamíferos. La formulación puede estar en forma de soluciones de inyección estériles, etc.

## EJEMPLOS

40 A continuación, la presente invención se describirá en mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos. Para un experto en la materia será evidente que estos ejemplos tienen solo fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención. Además, para los expertos en la materia será evidente que pueden realizarse diversas modificaciones y variaciones sin apartarse del alcance técnico de la presente invención basándose en esta ilustración.

45 Ejemplo 1: Cribado de moléculas de ácido nucleico bicatenario inductoras de ARNi dirigidas a CTGF

Antes de la introducción de diversas modificaciones químicas para estructuras de autosuministro efectivas, para asegurar moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios inductoras de ARNi altamente eficientes dirigidas a CTGF, se diseñaron 50 secuencias dirigidas a CTGF, seguido de cribado.

50 Para comparar la eficiencia de silenciamiento génico de CTGF entre lasiRNA y las estructuras inductoras de ARNi convencionales, se sintetizaron las estructuras siRNA, asiRNA y lasiRNA que tienen las secuencias de nucleótidos mostradas en las Tablas 1 a 3 mostradas a continuación. Las tablas 1 a 3 muestran 24 secuencias de nucleótidos para cada una de las estructuras siRNA, asiRNA y lasiRNA que se dirigen a CTGF (mayúsculas: ARN; minúsculas: ADN). Para probar el efecto de silenciamiento del ARNm de CTGF de cada una de las estructuras que tienen las secuencias de nucleótidos, cada una de las estructuras se transfectó en células HaCaT (ATCC) a una concentración de 10 nM, y a continuación se midieron los niveles de expresión del ARNm de CTGF en las células mediante PCR en tiempo real.

60

ES 2 716 818 T3

Tabla 1

Nº	Nombre siRNA	SEQ	Secuencia (5' → 3')	
Nº1	siRNA	1	sentido	GCGAGGAGUGGGUGUGUGAtt
		2	antisentido	UCCUCGCAGCAUUUCCCGGtt
	asiRNA	3	sentido	AGGAGUGGGUGUGUGA
		4	antisentido	UCCUCGCAGCAUUUCCCGGtt
	lasiRNA	5	sentido	AGGAGUGGGUGUGUGA
		6	antisentido	UCACACACCCACUCCUCGCAGCAUUUCCCGG
Nº2	siRNA	7	sentido	AGACCUGUGGGAUGGGCAUtt
		8	antisentido	CAGGUCUUGGAACAGGCGCtt
	asiRNA	9	sentido	CCUGUGGGAUGGGCAU
		10	antisentido	CAGGUCUUGGAACAGGCGCtt
	lasiRNA	11	sentido	CCUGUGGGAUGGGCAU
		12	antisentido	AUGCCCAUCCACAGGUCUUGGAACAGGCGC
Nº3	siRNA	13	sentido	ACAGGAAGAUGUACGGAGAtt
		14	antisentido	UUCCUGUAGUACAGCGAUUtt
	asiRNA	15	sentido	GGAAGAUGUACGGAGA
		16	antisentido	UUCCUGUAGUACAGCGAUUtt
	lasiRNA	17	sentido	GGAAGAUGUACGGAGA
		18	antisentido	UCUCCGUACAUCUCCUGUAGUACAGCGAUU
Nº4	siRNA	19	sentido	GCACCAGCAUGAAGACAUAtt
		20	antisentido	UAUGUCUUCAUGCUGGUGCtt
	asiRNA	21	sentido	CCAGCAUGAAGACAUA
		22	antisentido	UAUGUCUUCAUGCUGGUGCtt
	lasiRNA	23	sentido	CCAGCAUGAAGACAUA
		24	antisentido	UAUGUCUUCAUGCUGGUCCAGCCAGAAAGCU
Nº5	siRNA	25	sentido	GAAGACAUACCGAGCUAAAtt
		26	antisentido	UUUAGCUCGGUAUGUCUUCtt
	asiRNA	27	sentido	GACAUACCGAGCUAAA
		28	antisentido	UUUAGCUCGGUAUGUCUUCtt
	lasiRNA	29	sentido	GACAUACCGAGCUAAA
		30	antisentido	UUUAGCUCGGUAUGUCUUCAUGCUGGUGCAG
Nº6	siRNA	31	sentido	GCUAAAUUCUGUGGAGUAUtt
		32	antisentido	AUACUCCACAGAAUUUAGCtt
	asiRNA	33	sentido	AAAUUCUGUGGAGUAU
		34	antisentido	AUACUCCACAGAAUUUAGCtt
			35	sentido

ES 2 716 818 T3

	lasiRNA	36	antisentido	AUACUCCACAGAAUUUAGCUCGGUAUGUCUU
Nº7	siRNA	37	sentido	GCGAGGUCAUGAAGAAGAAtt
		38	antisentido	UUGUUCUUCAUGACCUCGctt
	asiRNA	39	sentido	AGGUCAUGAAGAAGAA
		40	antisentido	UUGUUCUUCAUGACCUCGctt
	lasiRNA	41	sentido	AGGUCAUGAAGAAGAA
		42	antisentido	UUGUUCUUCAUGACCUCGCCGUCAGGGCACU
Nº8	siRNA	43	sentido	UGGAAGAGAACAUAAGAAtt
		44	antisentido	UUCUUAUGUUCUCUCCAtt
	asiRNA	45	sentido	AAGAGAACAUAAGAA
		46	antisentido	UUCUUAUGUUCUCUCCAtt
	lasiRNA	47	sentido	AAGAGAACAUAAGAA
		48	antisentido	UUCUUAUGUUCUCUCCAGGUCAGCUUCGC
(Mayúsculas: ARN; minúsculas: ADN)				

Tabla 2

Nº	Nombre siRNA	Secuencia (5' → 3')	
Nº9	siRNA	(49) sentido	CGGCUUACCGACUGGAAGAtt
		(50) antisentido	UCUCCAGUCGGUAAGCCGtt
	asiRNA	(51) sentido	CUUACCGACUGGAAGA
		(52) antisentido	UCUCCAGUCGGUAAGCCGtt
	lasiRNA	(53) sentido	CUUACCGACUGGAAGA
		(54) antisentido	UCUCCAGUCGGUAAGCCGCGAGGGCAGGCC
Nº10	siRNA	(55) sentido	GCAUGAAGCCAGAGAGUGAtt
		(56) antisentido	UCACUCUCUGGCUUCAUGCtt
	asiRNA	(57) sentido	UGAAGCCAGAGAGUGA
		(58) antisentido	UCACUCUCUGGCUUCAUGCtt
	lasiRNA	(59) sentido	UGAAGCCAGAGAGUGA
		(60) antisentido	UCACUCUCUGGCUUCAUGCCCAUGUCUCCGU
Nº11	siRNA	(61) sentido	CACCAUAGGUAGAAUGUAAtt
		(62) antisentido	UUACAUUCUACCUAUGGUGtt
	asiRNA	(63) sentido	CAUAGGUAGAAUGUAA
		(64) antisentido	UUACAUUCUACCUAUGGUGtt
	lasiRNA	(65) sentido	CAUAGGUAGAAUGUAA
		(66) antisentido	UUACAUUCUACCUAUGGUGUUCAGAAAUUGA
	siRNA	(67) sentido	CCUGCAGGCUAGAGAAGCAtt
		(68) antisentido	UGCUUCUCUAGCCUGCAGGtt

ES 2 716 818 T3

Nº12	asiRNA	(69) sentido	GCAGGCUAGAGAAGCA
		(70) antisentido	UGCUUCUCUAGCCUGCAGGtt
	lasiRNA	(71) sentido	GCAGGCUAGAGAAGCA
		(72) antisentido	UGCUUCUCUAGCCUGCAGGAGGCGUUGUCAU
Nº13	siRNA	(73) sentido	CCAGAGAGUGAGAGACAUUtt
		(74) antisentido	AAUGUCUCUCACUCUCUGGtt
	asiRNA	(75) sentido	GAGAGUGAGAGACAUU
		(76) antisentido	AAUGUCUCUCACUCUCUGGtt
	lasiRNA	(77) sentido	GAGAGUGAGAGACAUU
		(78) antisentido	AAUGUCUCUCACUCUCUGGCCUUCAUGCCAUG
Nº14	siRNA	(79) sentido	GCGAAGCUGACCUGGAAGAtt
		(80) antisentido	UCUUCCAGGUCAGCUUCGctt
	asiRNA	(81) sentido	AAGCUGACCUGGAAGA
		(82) antisentido	UCUUCCAGGUCAGCUUCGctt
	lasiRNA	(83) sentido	AAGCUGACCUGGAAGA
		(84) antisentido	UCUUCCAGGUCAGCUUCGCAAGGCCUGACCA
Nº15	siRNA	(85) sentido	CCGGAGACAAUGACAUCUUtt
		(86) antisentido	AAGAUGUCAUUGUCUCCGGtt
	asiRNA	(87) sentido	GAGACAAUGACAUCUU
		(88) antisentido	AAGAUGUCAUUGUCUCCGGtt
lasiRNA	(89) sentido	GAGACAAUGACAUCUU	
	(90) antisentido	AAGAUGUCAUUGUCUCCGGGACAGUUGUAAU	
Nº16	siRNA	(91) sentido	UCUUUGAAUCGCUGUACUAtt
		(92) antisentido	UAGUACAGCGAUUCAAAAGAtt
	asiRNA	(93) sentido	UUGAAUCGCUGUACUA
		(94) antisentido	UAGUACAGCGAUUCAAAAGAtt
	lasiRNA	(95) sentido	UUGAAUCGCUGUACUA
		(96) antisentido	UAGUACAGCGAUUCAAGAUGUCAUUGUCUC
(Mayúsculas: ARN; minúsculas: ADN)			

Tabla 3

Nº	Nombre siRNA	SEQ ID NO	Secuencia (5' → 3')	
Nº17	siRNA	97	sentido	UUGCAGCUGACCUGGAAtt
		98	antisentido	UUCAGGUCAGCUUCGCAAtt
	asiRNA	99	sentido	CGAAGCUGACCUGGAA
		100	antisentido	UUCAGGUCAGCUUCGCAAtt
		101	sentido	CGAAGCUGACCUGGAA

ES 2 716 818 T3

	lasiRNA	102	antisentido	UCCAGGUCAGCUUCGCAAGGCCUGACCAUG
Nº18	siRNA	103	sentido	CAACUAUGAUUAGAGCCAAtt
		104	antisentido	UUGGCUCUAAUCAUAGUUGtt
	asiRNA	105	sentido	CUAUGAUUAGAGCCAA
		106	antisentido	UUGGCUCUAAUCAUAGUUGtt
	lasiRNA	107	sentido	CUAUGAUUAGAGCCAA
		108	antisentido	UUGGCUCUAAUCAUAGUUGGGUCUGGGCCAA
Nº19	siRNA	109	sentido	GUACCAGUGCACGUGCCUGtt
		110	antisentido	CAGGCACGUGCACUGGUACtt
	asiRNA	111	sentido	CCAGUGCACGUGCCUG
		112	antisentido	CAGGCACGUGCACUGGUACtt
	lasiRNA	113	sentido	CCAGUGCACGUGCCUG
		114	antisentido	CAGGCACGUGCACUGGUACUUGCAGCUGCUC
Nº20	siRNA	115	sentido	AGUGCAUCCGUACUCCCAAtt
		116	antisentido	UUGGGAGUACGGAUGCACUtt
	asiRNA	117	sentido	GCAUCCGUACUCCCAA
	lasiRNA	118	antisentido	UUGGGAGUACGGAUGCACUtt
		119	sentido	GCAUCCGUACUCCCAA
		120	antisentido	UUGGGAGUACGGAUGCACUUUUUGCCCUUCU
Nº21	siRNA	121	sentido	CAUGAUGUUCAUCAAGACtt
		122	antisentido	GGUCUUGAUGAACAUCAUGtt
	asiRNA	123	sentido	GAUGUUCAUCAAGACC
		124	antisentido	GGUCUUGAUGAACAUCAUGtt
	lasiRNA	125	sentido	GAUGUUCAUCAAGACC
		126	antisentido	GGUCUUGAUGAACAUCAUGUUCUUCUUCAUG
Nº22	siRNA	127	sentido	CCAUGACCGCCGCCAGUAUtt
		128	antisentido	AUACUGGCGGCGGUCAUGGtt
	asiRNA	129	sentido	UGACCGCCGCCAGUAU
		130	antisentido	AUACUGGCGGCGGUCAUGGtt
	lasiRNA	131	sentido	UGACCGCCGCCAGUAU
		132	antisentido	AUACUGGCGGCGGUCAUGGUUGGCACUGCGG
Nº23	siRNA	133	sentido	GAACAUUAAGAAGGGCAAAtt
		134	antisentido	UUUGCCCUUCUUAUGUUCtt
	asiRNA	135	sentido	CAUUAAGAAGGGCAAA
		136	antisentido	UUUGCCCUUCUUAUGUUCtt
			137	sentido

	lasiRNA	138	antisentido	UUUGCCCUUCUUA AUGUUCUCU UCCAGGUCA
Nº24	siRNA	139	sentido	GGAAGACACGUUUGGCCAtt
		140	antisentido	UGGGCCAAACGUGUCUUCctt
	asiRNA	141	sentido	AGACACGUUUGGCCCA
		142	antisentido	UGGGCCAAACGUGUCUUCctt
	lasiRNA	143	sentido	AGACACGUUUGGCCCA
		144	antisentido	UGGGCCAAACGUGUCU UCCAGUCGGUAAGCC
(Mayúsculas: ARN; minúsculas: ADN)				

Específicamente, las células HaCat se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco) (suplementado con suero bovino fetal al 10% (Gibco) y 100 µg/g/ml de penicilina/estreptomycin) en una placa de Petri de 100 mm. Inmediatamente antes de la transfección, se sembraron  $8 \times 10^4$  células HacaT en una placa de 12 pocillos. Mientras tanto, cada uno de los siRNA, asiRNA y lasiRNA se diluyó en 1X de tampón dúplex siRNA (Biosesang Co. , Ltd. ) a una concentración adecuada, y se incubó a 90°C durante 2 min y a 37°C durante 1 hora. Los siRNA hibridados se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y a continuación se tiñeron con EtBr durante 5 minutos, y las bandas se visualizaron mediante un transiluminador UV. Los siRNA se transfectaron en las células de acuerdo con el manual proporcionado en Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y, después de 24 horas, se midieron los niveles de ARNm en las células.

Específicamente, después de la transfección, se extrajo el ARN total usando el reactivo de lisis Isol-RNA (5PRIME), y se usaron 500 ng del ARN para la síntesis de ADNc. El ADNc se sintetizó usando un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo proporcionado en el kit. El ADNc sintetizado se diluyó y a continuación se sometió a PCR cuantitativa en tiempo real usando un sistema de PCR en tiempo real (Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo proporcionado en el sistema. El gen diana se analizó usando una mezcla maestra de PCR verde SYBR de potencia (Applied Biosystems) con cebadores específicos del gen. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores usados en el experimento son las siguientes:

- 20 GAPDH-directo 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3' (SEQ ID NO: 145)
- GAPDH-inverso 5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3' (SEQ ID NO:146)
- CTGF-directo 5'-CAA GGG CCT CTT CTG TGA CT-3' (SEQ ID NO: 147)
- CTGF-inverso 5'-ACG TGC ACT GGT ACT TGC AG-3' (SEQ ID Nº:148)

La FIG. 1 muestra los resultados de la selección de 24 secuencias de nucleótidos. Tal como se muestra en la presente memoria, en 14 secuencias de entre un total de 24 secuencias de nucleótidos, los lasiRNA mostraron un aumento de la actividad en comparación con los siRNA (los lasiRNA mostraron un aumento en la eficiencia de silenciamiento génico del 20% o más en comparación con el siRNA), y en 5 secuencias, los siRNA mostraron una alta eficiencia de silenciamiento génico en comparación con los lasiRNA, lo que sugiere que los lasiRNA muestran generalmente una alta eficiencia de silenciamiento génico en comparación con los siRNA convencionales.

En particular, se midió la CI50 de los siRNA y lasiRNA que muestran una eficiencia de silenciamiento génico del 90% o más, y como resultado, se demostró que los lasiRNA que tienen secuencias de nucleótidos de los números 9 y 16 tenían la CI50 más baja. Entre ellos, la secuencia de nucleótidos del Nº 9 se seleccionó como un candidato final para los experimentos de modificación y autosuministro. La información sobre la secuencia de nucleótidos del Nº 9 se muestra en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4: Molécula de ácidos nucleicos bicatenarios inductores de ARNi

Nº	Nombre siRNA	Secuencia (5' -> 3')		Listado de secuencias
	siRNA	sentido	CGGCUUACCGACUGGAAGAtt	149
Nº9		antisentido	UCUUCAGUCGGUAAGCCGtt	150
		asiRNA	sentido	CUUACCGACUGGAAGA
		antisentido	UCUUCAGUCGGUAAGCCGtt	152

lasiRNA	sentido	CUUACCGACUGGAAGA	153
	antisens	UCUUCAGUCGUAAGCCGCGAGGGCAGGCC	154
(Mayúsculas: ARN; minúsculas: ADN)			

**Ejemplo 2: Preparación de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y medición de la eficiencia de absorción intracelular de la misma.**

5 2-1: Efecto de la modificación del colesterol.

Para examinar el efecto de la modificación del colesterol en el suministro de lasiRNA, el extremo 5' de la cadena con sentido de lasiRNA, es decir, la segunda cadena, se marcó con cy3, y a continuación se observó la diferencia en la captación de lasiRNA entre la presencia y la ausencia de colesterol mediante un microscopio de fluorescencia.

10 Específicamente, la estructura de lasiRNA o chol-lasiRNA marcada con cy3 se incubó en células HeLa a una concentración de 1  $\mu$ M durante 3 horas, y a continuación se midió el grado de administración intracelular de las mismas mediante observación con un microscopio de fluorescencia.

Específicamente, las células HeLa (ATCC) se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco)  
15 (suplementado con suero bovino fetal al 10% (Gibco) y 100  $\mu$ g/g/ml de penicilina/estreptomicina) en una placa de Petri de 100 mm.

Cada uno de los lasiRNA modificados con colesterol se diluyó en medio de administración de siRNA de cadena única Accell (Thermo scientific) a una concentración adecuada, y la cadena sencilla modificada con colesterol se incubó a  
20 90°C durante 20-30 segundos antes de la hibridación. La cadena con sentido y la cadena antisentido se mezclaron entre sí, y luego se incubaron a 90°C durante 30 segundos y a 37°C durante 1 hora, seguido de recocido. Los siRNA hibridados se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y a continuación se tiñeron con EtBr durante 5 minutos, y las bandas se visualizaron mediante un transiluminador UV.

25 Para un ensayo de incubación, se sembraron 2 x 10<sup>5</sup> células HeLa en una placa de fondo de vidrio (SPL) de cobertura 24 horas antes del tratamiento con lasiRNA. Después de la eliminación de los medios de cultivo de la placa preparada, las células se lavaron dos veces con 2 ml de 1X DPBS. Se añadió siRNA, se diluyó en 100  $\mu$ l de medio de administración de siRNA de Accell (Thermo scientific) precalentado en un baño de agua a 37°C y se incubó en las células. Después de 3 horas, se retiró el medio Accell y las células se lavaron dos veces con 1X DPBS y a continuación  
30 se incubaron con 1  $\mu$ g/ml de Hoechst 33343 (Sigma) en Opti-MEM (gibco) a 37°C durante 10 minutos para teñir el núcleo. Después de retirar el Hoechst, las células se lavaron dos veces con 1X DPBS, a continuación se agregaron al medio Opti-MEM y se observaron con un microscopio de fluorescencia (Microscope - Olympus IX81, software - MetaMorph).

35 Como se puede ver en la FIG. 2, cuando se examinó la eficiencia de captación intracelular de lasiRNA modificados con colesterol, y como resultado, se pudo apreciar que se observó poca o ninguna fluorescencia de cy3 en las células en ausencia de colesterol, pero lasiRNA-chol obtenida conjugando colesterol con lasiRNA mostró una fluorescencia muy fuerte.

40 Esto sugiere que la administración intracelular de la estructura de lasiRNA se incrementó por la modificación del colesterol.

2-2: Efecto de la modificación de PS

45 Además, para examinar si la introducción directa de la modificación de fosforotioato (PS) en lasiRNA aumenta la eficiencia de captación del lasiRNA, se introdujo la modificación de PS en el saliente 3' de la cadena antisentido (es decir, la primera cadena) de chol-lasiRNA, y se evaluó el cambio en la eficiencia de captación del chol-lasiRNA por modificación de PS. Cada una de las estructuras de chol-lasiRNA-PS (N) marcadas con cy3 se incubó en células HeLa a una concentración de 1  $\mu$ M durante 3 horas, y luego se compararon los grados de administración intracelular de las  
50 estructuras mediante observación con un microscopio de fluorescencia. Para una comparación precisa entre las capacidades de penetración de células entre las estructuras, se estableció la condición en la que chol-lasiRNA-PS0 muestra la fluorescencia más baja, después de lo cual se compararon las intensidades de fluorescencia de otras estructuras.

55 Específicamente, tal como se muestra en la FIG. 3, 0, 4, 7, 12 o 17 PS se introdujeron modificaciones en el extremo

3' de la cadena antisentido de la estructura de Chol-lasiRNA, que a continuación se incubó o se transfectó en células HeLa. A continuación, como se describe en el Ejemplo 2-1, la diferencia en la eficiencia de suministro por el número de modificaciones de PS se observó con un microscopio de fluorescencia. En la FIG. 3, el subrayado y el color rojo representan la modificación de OMe, \*representa la modificación de PS, Chol representa el colesterol y Cy3 representa el colorante fluorescente Cy3.

Como resultado, tal como se muestra en la FIG. 4, en el caso de chol-lasiRNA-PS0 sin modificación de PS, se observó poca o ninguna fluorescencia en las células HeLa, y chol-lasiRNA-PS0 mostró una baja eficiencia de captación en comparación con otras muestras.

Además, se observó que la fluorescencia se hacía más brillante a medida que aumentaba el número de modificaciones de PS en la cadena antisentido (es decir, la primera cadena) de lasiRNA, y entre todas las muestras, chol-lasiRNA-PS12 y chol-lasiRNA-PS17 que tenían 12 y 17 modificaciones de PS, respectivamente, mostraron la fluorescencia más brillante, lo que indica que la cantidad de lasiRNA internalizado aumentó con un incremento en el número de modificaciones de PS en chol-lasiRNA.

### **Ejemplo 3: Medición de la eficiencia de silenciamiento de CTGF**

Los resultados del experimento de internalización llevado a cabo usando lasiRNA etiquetados con Cy3 en el Ejemplo 2 indicaron que la introducción directa de las modificaciones de colesterol y PS en la estructura del lasiRNA permite que el lasiRNA se suministre de manera efectiva en las células sin necesidad de un vehículo de suministro o un reactivo adicional. Sin embargo, se sabe que cuando se introducen varias modificaciones químicas en el siRNA, la actividad del siRNA disminuye un tanto, o la actividad del siRNA disminuye rápidamente dependiendo del tipo de modificación. Por lo tanto, para examinar el efecto de cada modificación sobre la actividad del lasiRNA, se transfectaron varias estructuras de lasiRNA en células HeLa, y a continuación se midió un cambio en la expresión de ARNm de CTGF en las células para determinar el efecto de cada una de las modificaciones sobre la eficiencia de silenciamiento génico de lasiRNA.

Para examinar el efecto de la modificación de PS en la eficiencia de silenciamiento génico de lasiRNA, se transfectaron diversas estructuras de lasiRNA [chol-lasiRNA-PS(N)] modificadas por PS en células HeLa, y a continuación se midieron los niveles de expresión del gen CTGF en las células. Específicamente, cada una de las estructuras de chol-lasiRNA-PS(N) se transfectó en células HeLa a una concentración de 10 nM, y después de 48 horas, se midieron los niveles de expresión de ARNm de CTGF en las células mediante PCR en tiempo real.

Posteriormente, 24 horas antes del experimento, se sembraron  $2,5 \times 10^4$  células HeLa en una placa de 24 pocillos. A continuación, cada uno de los lasiRNA se transfectó usando Lipofectamine 2000 de acuerdo con el protocolo que se proporciona en el mismo. A continuación, las células se cultivaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% durante 48 horas y después se midió el nivel de expresión del ARNm en las células de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

Como resultado, como se muestra en la FIG. 5, la eficiencia de silenciamiento génico de los lasiRNA mostró una tendencia a disminuir a medida que aumentaba el número de modificaciones de PS en la cadena antisentido, y cuando se introdujeron 12 o más modificaciones de PS en la cadena antisentido, se observó una ligera disminución en la actividad de silenciamiento. Además, se demostró que chol-lasiRNA-PS17 con 17 modificaciones de PS introducidas en la cadena antisentido mostró una eficiencia de silenciamiento génico significativamente baja, y por lo tanto mostró poco o ningún efecto de silenciamiento en CTGF, lo que sugiere que el número de modificaciones de PS en la cadena antisentido es preferentemente 17 o menos, y que 17 o más modificaciones de PS no son adecuadas para el autosuministro del lasiRNA. Cada gráfica de la FIG. 5 representa la media  $\pm$  DT de tres experimentos repetidos.

Además, un aumento en el número de modificaciones de PS conduce a un aumento en la eficiencia de autosuministro de chol-lasiRNA, pero tiene la desventaja de que reduce la actividad de silenciamiento del lasiRNA. Con el fin de establecer la estructura de modificación óptima que permita la inducción del silenciamiento sin necesidad de un vehículo, se incubaron con células HeLa las estructuras de col-lasiRNA-PS (N) que tenían un número variable de modificaciones de PS, y a continuación se midieron los niveles de ARNm de CTGF de las células para comparar las eficiencias de silenciamiento génico de las estructuras. En la presente memoria, las células se trataron con 0,1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M y 1  $\mu$ M de cada uno de los lasiRNA y también se usó como control chol-lasiRNA-PS7 (Figura 6: rojo: modificación de OMe; \*: modificación de PS; Chol: colesterol) dirigido a MyD88. Específicamente, las células HeLa se incubaron con estructuras de chol-lasiRNA-PS (N) dirigidas a CTGF o MyD88 durante 48 horas, y a continuación se midieron los niveles de expresión de ARNm de CTGF en las células mediante PCR en tiempo real.

Como resultado, como se puede ver en la FIG. 7, chol-lasiRNA-PS4 mostró un efecto de silenciamiento génico de solo aproximadamente el 55% incluso a la concentración más alta (1  $\mu$ M), y chol-lasiRNA-PS7 y chol-lasiRNA-PS12 mostraron un efecto de silenciamiento de CTGF de aproximadamente el 95% o más a 1  $\mu$ M. Para una comparación más precisa de la eficiencia de silenciamiento génico, cada una de las estructuras se incubó a concentraciones más bajas, y a continuación se midió el nivel de ARNm de CTGF, y los resultados de la medición indicaron que PS12 silenciaba con la máxima eficiencia el gen CTGF incluso a bajas concentraciones. Además, se observó que chol-lasiRNA-PS17 tenía un efecto de silenciamiento génico de aproximadamente el 50%, incluso cuando se incubaba a una concentración alta (1  $\mu$ M), como cuando se transfectó, lo que sugiere que se requiere para optimizar el número de modificaciones de PS adecuadas para aumentar la actividad de suministro y silenciamiento, en lugar de introducir un número demasiado grande de modificaciones de PS. Además, chol-lasiRNA-PS7 de direccionamiento a MyD88 no mostró eficiencia de silenciamiento de CTGF, lo que indica que el silenciamiento génico por las estructuras de cp-lasiRNA se produce de una manera específica de la secuencia.

#### 15 **Ejemplo 4: Medición de las eficiencias de captación intracelular resultantes de modificaciones con otros compuestos lipófilos**

Con el fin de examinar los efectos de las modificaciones lipófilas (modificaciones hidrófobas) distintas de la modificación del colesterol, se prepararon estructuras de cp-lasiRNA (lasiRNA que penetra en las células) de acuerdo con la presente invención, que se dirigen al gen de survivina, usando las siguientes secuencias. En la presente memoria, cp-lasiRNA-1 tiene colesterol conjugado con el mismo, cp-lasiRNA-2 se ha conjugado con tocoferol en lugar de colesterol y cp-lasiRNA-3 tiene ácido esteárico conjugado en el extremo 5' de la cadena con sentido en lugar de colesterol.

<cp-lasiRNA (survivina) 31 meros>

25 cp-lasiRNA (survivina) Antisentido 31nt: 5' UGAAA AUGUUGAUCUCCUUUCCUAAGA\*C\*A\*T\*T3' (SEQ ID NO: 169)  
 cp-lasiRNA (survivina) Sentido: 5' GAGAUCAACAUUUU\*C\*A\*colesterol. 3' (SEQ ID NO: 170)  
 Subrayado: modificación de OMe; \*: PS: enlace de fosforotioato.

30 Cada uno de cp-lasiRNA-1, cp-lasiRNA-2 y cp-lasiRNA-3 se incubó en células A549 (ATCC) a una concentración de 300 mM durante 24 horas de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, y a continuación se midieron los niveles de expresión de ARNm de survivina en las células mediante PCR en tiempo real. La FIG. 8 muestra la media  $\pm$  DS de dos experimentos repetidos para cada una de las estructuras cp-lasiRNA.

35 Específicamente, después de la transfección, se extrajo el ARN total usando el reactivo de lisis Isol-ARN (5PRIME), y se usaron 500 ng del ARN para la síntesis de ADNc. El ADNc se sintetizó usando un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo proporcionado en el kit. El ADNc sintetizado se diluyó y a continuación se sometió a PCR cuantitativa en tiempo real usando un sistema de PCR en tiempo real (Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo proporcionado en el sistema. El gen diana se analizó usando una mezcla maestra de PCR verde SYBR de potencia (Applied Biosystems) con cebadores específicos del gen. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores usados en el experimento son las siguientes:

Survivina

45 Directo 5'-GCA CCA CTT CCA GGG TTT AT-3' (SEQ ID NO: 172)  
 Inverso 5'-CTC TGG TGC CAC TTT CAA GA-3' (SEQ ID NO: 173)

50 Como resultado, como se puede ver en la FIG. 8, las modificaciones hidrófobas distintas de la modificación del colesterol permitieron silenciar el gen diana con alta eficiencia. Además, el estearilo mostró una alta eficiencia de silenciamiento génico, aunque se conjugó con el extremo 5' de la cadena con sentido, lo que sugiere que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede lograr el efecto deseado incluso cuando un compuesto lipófilo (modificación hidrófoba) se conjuga en varias posiciones de la molécula de ácido nucleico.

#### 55 **Ejemplo 5: Examen de la eficiencia de silenciamiento de genes diana de acuerdo con la longitud de la cadena antisentido**

Para examinar la eficiencia de silenciamiento del gen diana de la molécula de ácido nucleico de la invención de acuerdo con la longitud de su primera cadena, se combinó cada una de las cadenas antisentido de 31 nt y antisentido de 21 nt con una segunda cadena de 16 nt (cadena con sentido) para preparar cp-lasiRNA, y a continuación las células A549 fueron tratadas con cada uno de los cp-lasiRNA.

<cp-lasiRNA (survivina) 31 meros>

cp-lasiRNA (survivina) Antisentido 31nt: 5' UGAAAAUGUUGAUCUCCUUUCCUAAGA\*C\*A\*T\*T 3' (SEQ ID NO: 169)

5 cp-lasiRNA (survivina) Sentido: 5' GAGAUCAACAUUUU\*C\*A\*colecsterol. 3' (SEQIDNO:170)

<cp-lasiRNA (survivina) 21meros>

cp-lasiRNA (survivina) Antisentido 21nt: 5'UGAAAAUGUUGAUCUCCU\*U\*U\*C\*C 3' (SEQIDNO:171)

cp-lasiRNA (survivina) Sentido: 5' GAGAUCAACAUUUU\*C\*A\*colecsterol. 3' (SEQIDNO:170)

Subrayado: modificación de OMe; \*: PS (enlace de fosforotioato).

10

<cp-lasiRNA (CTGF) 31 meros>

cp-lasiRNA (CTGF) Antisentido 31nt: 5' UCUUCCAGUCGGUAAGCCGCGAGGGCA\*G\*G\*C\*C 3' (SEQ ID NO:174)

Sentido cp-lasiRNA (CTGF): 5' CTTACCGACTGGAA\*G\*A\* chol. 3' (SEQ ID NO:175)

15

<cp-lasiRNA (CTGF) 21 meros>

cp-lasiRNA (CTGF) Antisentido 21nt: 5' UCUUCCAGUCGGUAAGC\*C\*G\*C\*G 3' (SEQ ID NO:176)

Sentido cp-lasiRNA (CTGF): 5' CTTACCGACTGGAA\*G\*A\* chol. 3' (SEQ ID NO:175)

20

Subrayado:modificación de OMe; \*: PS (enlace de fosforotioato).

Específicamente, cada una de las moléculas de ácido nucleico se transfectó en células A549 (ATCC) de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1 o se incubó en células A549 durante 24 horas de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2. A continuación, se midieron los niveles de expresión del ARNm del gen diana en las células mediante PCR en tiempo real. La FIG. 9 muestra la media  $\pm$  DT de dos experimentos repetidos para cada una de las moléculas de ácido nucleico. Específicamente, la FIG. 9A muestra la eficiencia de silenciamiento génico de un cp-lasiRNA dirigido a CTGF que tiene una cadena antisentido de 21 meros; la FIG. 9B muestra la eficiencia de silenciamiento génico de un cp-lasiRNA dirigido a CTGF que tiene una cadena antisentido de 31 meros; la FIG. 9C muestra la eficiencia de silenciamiento génico de un cp-lasiRNA dirigido a survivina que tiene una cadena antisentido de 21 meros; y la FIG. 9D muestra la eficiencia de silenciamiento génico de un cp-lasiRNA dirigido a survivina que tiene una cadena antisentido de 31 meros. La eficiencia de silenciamiento de CTGF se midió usando los cebadores descritos en el Ejemplo 1, y la eficiencia de silenciamiento superviviente se midió usando los cebadores descritos en el Ejemplo 4.

Tal como se muestra en la FIG. 9, cuando se transfectó o incubó el cp-lasiRNA dirigido a CTGF, su eficiencia de silenciamiento del gen objetivo fue mayor en el caso de la cadena antisentido de 31 nt que en el caso de la cadena antisentido de 21 nt (FIG. 9A y 9B). Del mismo modo, cuando se incubó el cp-lasiRNA dirigido superviviente, la eficiencia de silenciamiento del gen objetivo del mismo fue mayor en el caso de la cadena antisentido de 31 nt. Por lo tanto, puede verse que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede diseñarse de manera que tenga una cadena antisentido (es decir, la primera cadena) que tiene longitudes variables de 19 nt a 31 nt, y se puede usar para silenciar efectivamente un gen diana, pero puede silenciar más eficientemente un gen diana cuando tiene una cadena antisentido de 31 nt, comparado con cuando tiene una cadena antisentido de 21 nt.

#### **Ejemplo 6: Examen del efecto de la modificación de PS2**

45 El efecto de la modificación de la cadena principal de fosfato de al menos un nucleótido en la molécula de ácido nucleico con fosforoditioato (PS2; que tiene una estructura mostrada en la Figura 10) en lugar de fosforotioato se examinó del modo siguiente.

Específicamente, cada uno de los siguientes cp-lasiRNA (survivina) y el siguiente cp-lasiRNA (survivina)-PS2, obtenido introduciendo la modificación de PS2 en lugar de la modificación de PS en el cp-lasiRNA (survivina), se transfectó en o se incubó con células A549 durante 24 horas de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 o 2. A continuación, se midieron los niveles de expresión de los genes de survivina en las células por PCR en tiempo real de la misma manera que se describe en el Ejemplo 4.

Cada gráfica en la FIG. 11 representa la media  $\pm$  DT de dos experimentos repetidos para cada una de las estructuras de cp-lasiRNA (survivina).

55

< cp-lasiRNA (survivina) 31 meros>

cp-lasiRNA (survivina) Antisentido 31nt: 5' UGAAAAUGUUGAUCUCCUUUCCUAAGA\*C\*A\*T\*T 3' (SEQ ID NO: 169)

60 cp-lasiRNA (survivina) Sentido: 5' GAGAUCAACAUUUU\*C\*A\*colecsterol. 3' (SEQ ID NO: 170)

Subrayado:Modificación de OMe, \*: PS (enlace de fosforotioato o enlace fosforoditioato)

Como resultado, como se puede ver en la FIG. 11, no se observó un aumento en el efecto de silenciamiento del gen por modificación de azufre adicional (PS2), y la estructura de cp-lasiRNA que tiene la modificación de PS2 mostró una eficiencia reducida de silenciamiento génico en comparación con el cp-lasiRNA convencional.

**Ejemplo 7: Medición de la eficiencia de silenciamiento del gen diana in vivo del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención**

10 En el desarrollo actual de agentes terapéuticos basados en tecnología de ARNi, es más difícil el desarrollo de una tecnología de suministro de ARN in vivo efectiva. Muchas tecnologías de administración desarrolladas hasta la fecha muestran una alta eficiencia de administración in vitro, pero tienen el problema de que, cuando se aplican in vivo, la eficiencia de las mismas disminuye significativamente. Por lo tanto, para examinar si la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención tiene un alto efecto de silenciamiento génico incluso in vivo, se inyectó cp-lasiRNA  
15 solo en la piel de ratas sin usar un vehículo de suministro separado, y se midió el efecto de silenciamiento del gen diana del mismo.

Específicamente, se disolvió siRNA (CTGF), cp-lasiRNA (CTGF) o cp-lasiRNA (Scrambled) en 100 µl de PBS a las concentraciones mostradas en la FIG. 12, y se inyectó cada una de las soluciones por vía intradérmica en la piel de  
20 rata, y después de 24 horas, se recogió el tejido de la piel y se midió la expresión del gen diana. Específicamente, se anestesiaron ratas SD (Orient Bio Inc. ) mediante inyección intraperitoneal con Zoletil y solución de Rompun, y a continuación se afeitó el lomo de las ratas. Se dibujó un círculo que tenía un radio de 5 mm en la parte de la piel afeitada y a continuación se inyectaron por vía intradérmica 100 µm de PBS, siRNA o cp-lasiRNA en la parte central del círculo con una jeringa de insulina (BD, 31G). Después de la inyección, se tomó tejido de la piel con un punzón de  
25 biopsia de 8 mm en la fecha indicada y se analizó la expresión del gen. Los ácidos nucleicos usados son los siguientes.

cp-lasiRNA (CTGF) Rata antisentido: 5'-UCUUCAGUCGGUAAGGCAGCUAGGGCA\*G\*G\*G\*C -3' (SEQ ID NO: 177)

Rata sentido cp-lasiRNA (CTGF): 5'-CCTACCGACTGGAA\*G\*A\*colesterol. 3' (SEQ ID NO: 178)

Subrayado:modificación de OMe; \*: PS (enlace de fosforotioato).

30

Se usaron los siguientes como siRNA:

siRNA (CTGF) antisentido: 5'- CUGCCUACCGACUGGAAGATT -3' (SEQ ID NO: 179)

sentido de siRNA (CTGF): 5'- CUGCCUACCGACUGGAAGATT -3' (SEQ ID NO: 180)

35 Subrayado:modificación de OMe

En la presente memoria, el ARN se extrajo usando un minikit de tejido fibroso RNeasy (Qiagen), y se usó 1 µg de ARN para la síntesis de ADNc. El ADNc se sintetizó usando un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo provisto en el mismo. El ADNc sintetizado se diluyó y a continuación se sometió a PCR cuantitativa en tiempo real usando un sistema de PCR en tiempo real (Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo proporcionado en el sistema. El gen diana se analizó usando una mezcla maestra de PCR verde SYBR de potencia (Applied Biosystems) con cebadores específicos del gen. A continuación se muestran las secuencias de nucleótidos de los cebadores usados en el experimento: Cada gráfica de la FIG. 12 representa la media ± DT de tres experimentos repetidos.

45

CTGF-Rata

Directo 5'-GGC TCG CAT AGT TG-3' (SEQ ID NO: 181)

Inverso 5'-CGG GAA ATG CTG TGA GGA GT-3' (SEQ ID NO:182)

50

Se disolvió siRNA (CTGF), cp-lasiRNA (CTGF) o cp-lasiRNA (Scrambled) en 100 µl de PBS a las concentraciones indicadas, y se inyectó cada una de las soluciones por vía intradérmica en la piel de rata, y después de 24 horas, se recogió el tejido de la piel y se midió la expresión del gen diana. Cada gráfica de la FIG. 12 representa la media ± DT de tres experimentos repetidos.

55

Como resultado, como se puede ver en la FIG. 12, la expresión de CTGF en el grupo tratado con cp-lasiRNA (CTGF) disminuyó en un 80-90% o más en comparación con la del grupo tratado con PBS, cp-lasiRNA (Scrambled) o siRNA (CTGF), lo que sugiere que cp-lasiRNA puede silenciar de manera altamente eficiente el gen diana incluso in vivo.

60 Además, para examinar la eficiencia de silenciamiento génico in vivo de Cp-lasiRNA, se inyectó cp-lasiRNA en ratas

a una concentración que oscila entre 100 µg/inyección y 0,1 µg/inyección de la misma manera que se ha descrito anteriormente, y a continuación se midió la expresión del gen diana.

5 Como resultado, tal como se muestra en la FIG. 13, cp-lasiRNA (CTGF) mostró una eficiencia de silenciamiento del gen diana del 70% o más, incluso a una concentración baja de aproximadamente 0,3 µg/inyección, y tenía un valor de CI50 de aproximadamente 0,21 µg/inyección. Cada gráfica de la FIG. 13 representa la media ± DT de tres experimentos repetidos.

10 Adicionalmente, se inyectó cp-lasiRNA (CTGF) de la misma manera que se describió anteriormente, y después el día 1, el día 2, el día 3 y el día 6, se analizó el tejido para medir la expresión del gen. Se inyectó cp-lasiRNA (CTGF) por vía intradérmica, después de lo cual se recogió el tejido en la fecha indicada, y se analizó la expresión de CTGF en el mismo mediante PCR en tiempo real.

15 Como resultado, tal como se muestra en la FIG. 14, se encontró que cp-lasiRNA (CTGF) silenciaba el gen diana durante al menos 5 días. Cada gráfica de la FIG. 14 representa la media ± DT de tres experimentos repetidos.

### APLICABILIDAD INDUSTRIAL

20 Tal como se describió anteriormente, la estructura de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención tiene tanto modificación de colesterol como modificación de fosforotioato introducidas en la misma, y por lo tanto tiene una alta eficiencia de silenciamiento génico a la vez que tiene la capacidad de penetrar en células sin necesidad de un vehículo de suministro intracelular separado. Por lo tanto, se puede administrar en un área diana real en una cantidad suficiente para la inducción de ARNi, y por lo tanto se puede superar el problema de administración in vivo que se produce en la técnica anterior. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede sustituir  
25 eficazmente a las moléculas de siRNA convencionales para tratar el cáncer o las infecciones víricas.

El alcance sustancial de la presente invención se definirá mediante las reivindicaciones adjuntas.

30 <110> BMT, Inc.

<120> Moléculas de ácido nucleico que inducen la interferencia del ARN con la capacidad de penetración celular y su uso

35 <130> PP-B1231

<150> KR 10-2012-0053950

<151> 2012-05-22

40 <160> 182

<170> KopatentIn 2. 0

<210> 1

<211> 21

45 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena antisentido de CTGF siRNA n°12

50

<220>

<223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>

55 <221> misc\_feature

<222> (1). . (19)

<223> ribonucleótidos

<220>

60 <221> misc\_feature

<222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 1  
 5 gcgaggagug ggugugugat t 21

<210> 2  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº1

15 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 2  
 30 uccucgcagc auuucccggt t 21

<210> 3  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº1

<400> 3  
 40 aggagugggu guguga 16

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 1

50 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (20). . (21)

<223> desoxirribonucleótidos

<400> 4  
 uccucgcagc auuuccggt t 21

5 <210> 5  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 1

<400> 5  
 15 aggagugggu guguga 16

<210> 6  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 1

25 <400> 6  
 ucacacacc acuccucgca gcuuucccg g 31

<210> 7  
 <211> 21  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº2

35 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 40 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<220>  
 45 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<400> 7  
 50 agaccugugg gaugggcaut t 21

<210> 8  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº2

60 <220>

<223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 8  
 caggucuugg aacaggcgct t 21  
 15

<210> 9  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 20

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 2

<400> 9  
 25 ccugugggau gggcau 16

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 2

35 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 10  
 caggucuugg aacaggcgct t 21  
 50

<210> 11  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 55

<220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 2

<400> 11  
 60 ccugugggau gggcau 16

<210> 12  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 2  
  
 10 <400> 12  
 augcccaucc cacaggucuu ggaacaggcg c 31  
  
 <210> 13  
 <211> 21  
 15 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº3  
 20  
 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
  
 <220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
  
 <400> 13  
 35 acaggaagau guacggagat t 21  
  
 <210> 14  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº3  
  
 45 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 50 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
  
 <400> 14  
 60 uuccuguagu acagcgaut t 21

<210> 15  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cadena con sentido del asiARN nº. 3  
  
 <400> 15  
 10 ggaagagua cggaga 16  
  
 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 3  
  
 20 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
  
 <400> 16  
 uuccuguagu acagcgau t 21  
 35  
 <210> 17  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 3  
  
 <400> 17  
 45 ggaagagua cggaga 16  
  
 <210> 18  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 3  
  
 55 <400> 18  
 ucuccguaca ucuuccugua guacagcgau u 31  
  
 <210> 19  
 <211> 21  
 60 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº4 cadena con sentido del siRNA CTGF nº 4

5 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 19  
 20 gcaccagcau gaagacauat t 21

<210> 20  
 <211> 21  
 <212> ARN

25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº4

30 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 20  
 45 uaugucuuca ugcuggugct t 21

<210> 21  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº4 cadena con sentido del asiRNA CTGF nº4

<400> 21  
 55 ccagcaugaa gacaua 16

<210> 22  
 <211> 21  
 <212> ARN

60 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 4

5 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 22  
 uaugucuca ugcuggugct t 21  
 20  
 <210> 23  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 4

<400> 23  
 30 ccagcaugaa gacaua 16  
 <210> 24  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 4

40 <400> 24  
 uaugucuca ugcuggucca gccagaaagc u 31  
 <210> 25  
 <211> 21  
 45 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 5

50 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 55 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 60 <221> misc\_feature

<222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 25  
 5 gaagacauac cgagcuaaat t 21

<210> 26  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº5

15 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 26  
 30 uuuagcucgg uaugucuuct t 21

<210> 27  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº5

<400> 27  
 40 gacauaccga gcuaaa 16

<210> 28  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 5

50 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (20). . (21)

<223> desoxirribonucleótidos

<400> 28  
 uuuagcucgg uaugucuuct t 21  
 5 <210> 29  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 5

<400> 29  
 15 gacauaccga gcuaaa 16

<210> 30  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 5

<400> 30  
 uuuagcucgg uaugucuuca ugcuggugca g 31  
 25 <210> 31  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 6

<220>  
 35 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 40 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 45 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 31  
 gcuaaaucu guggaguaut t 21  
 50 <210> 32  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº6

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
 60

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 10  
 <400> 32  
 auacuccaca gaauuuagct t 21  
 <210> 33  
 15 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº6  
 <400> 33  
 aaauucugug gaguau 16  
 25 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 6  
 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
 35  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 45  
 <400> 34  
 auacuccaca gaauuuagct t 21  
 <210> 35  
 50 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 55 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 6  
 <400> 35  
 aaauucugug gaguau 16  
 60 <210> 36

<211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 6

<400> 36  
 auacuccaca gaauuuagcu cgguaugucu u 31

10 <210> 37  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 37  
 30 gcgagguc au gaagaagaat t 21

<210> 38  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº7

40 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 50 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 38  
 uuguucuca ugaccugct t 21

55 <210> 39  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60

<220>  
 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº7

<400> 39  
 5 aggucaugaa gaagaa 16

<210> 40  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 7

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

25 <400> 40  
 uuguucuca ugaccugct t 21

<210> 41  
 30 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 35 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 7

<400> 41  
 aggucaugaa gaagaa 16

40 <210> 42  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 7

<400> 42  
 uuguucuca ugaccugcc gucagggcac u 31

50 <210> 43  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 8

<220>  
 60 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 5 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 10 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 43  
 uggagagaa cauaagaat t 21

15 <210> 44  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº8

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

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

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

35 <400> 44  
 uucuaaagu ucucuccat t 21

<210> 45  
 40 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 45 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº8

<400> 45  
 aagagaacau uaagaa 16

50 <210> 46  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 8

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

60

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 10  
 <400> 46  
 uucuuaaugu ucucuccat t 21  
 <210> 47  
 15 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 8  
 <400> 47  
 aagagaacau uaagaa 16  
 25 <210> 48  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 8  
 <400> 48  
 uucuuaaugu ucucuccag gucagcuucg c 31  
 35 <210> 49  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 9  
 <220>  
 45 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 50 <223> ribonucleótidos  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 55 <223> desoxirribonucleótidos  
 <400> 49  
 cggcuuaccg acuggaagat t 21  
 60 <210> 50

<211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº9

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

20 <400> 50  
 ucuuccaguc gguaagccgt t 21

<210> 51

25 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº9

<400> 51  
 cuuaccgacu ggaaga 16

35 <210> 52  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 9

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

55 <400> 52  
 ucuuccaguc gguaagccgt t 21

<210> 53

60 <211> 16

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 9  
  
 <400> 53  
 cuuaccgacu ggaaga 16  
  
 10 <210> 54  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 9  
  
 <400> 54  
 ucuuccaguc gguaagccgc gagggcaggc c 31  
 20  
 <210> 55  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 10  
  
 <220>  
 30 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 35 <223> ribonucleótidos  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 40 <223> desoxirribonucleótidos  
  
 <400> 55  
 gcaugaagcc agagagugat t 21  
  
 45 <210> 56  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº10  
  
 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
 55  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
 60

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 5  
 <400> 56  
 ucacucucug gcuucaugct t 21  
  
 <210> 57  
 10 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 15 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº10  
  
 <400> 57  
 ugaagccaga gaguga 16  
  
 20 <210> 58  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 10  
  
 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
 35  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 40  
 <400> 58  
 ucacucucug gcuucaugct t 21  
  
 <210> 59  
 45 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 50 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 10  
  
 <400> 59  
 ugaagccaga gaguga 16  
  
 55 <210> 60  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 60 <220>

<223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 10

<400> 60  
 ucacucucug gcucaugcc caugucuccg u 31

5 <210> 61  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 10

<220>

15 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

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

20 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)

25 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 61  
 caccauaggu agaauguaat t 21

30 <210> 62  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº10

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

50 <400> 62  
 uuacauucia ccuauggugt t 21

<210> 63

55 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº10

60

<400> 63  
 cauagguaga auguaa 16

<210> 64  
 5 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 10

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

25 <400> 64  
 uuacauucua ccuauggugt t 21

<210> 65  
 <211> 16  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 10

35 <400> 65  
 cauagguaga auguaa 16

<210> 66  
 40 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 45 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 10

<400> 66  
 uuacauucua ccuauggugu ucagaaaug a 31

50 <210> 67  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (1). . (19)

<223> ribonucleótidos  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 <400> 67  
 ccugcaggcu agagaagcat t 21  
 10 <210> 68  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº11  
 <220>  
 20 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
 <220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 11  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 <400> 68  
 ugcucucua gccugcaggt t 21  
 35 <210> 69  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº11  
 <400> 69  
 45 gcaggcuaga gaagca 16  
 <210> 70  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 11  
 55 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (1). . (19)

<223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 70  
 10 ugcuucucua gccugcaggt t 21

<210> 71  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 11

<400> 71  
 20 gcaggcuaga gaagca 16

<210> 72  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 11

30 <400> 72  
 ugcuucucua gccugcagga ggccguuguca u 31

<210> 73  
 <211> 21  
 35 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 13

40 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 45 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 50 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 73  
 55 ccagagagug agagacauut t 21

<210> 74  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 60 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº13

5 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 74  
 aaugucucuc acucucuggt t 21  
 20

<210> 75  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº13

<400> 75  
 30 gagagugaga gacauu 16

<210> 76  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 13

40 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 50 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 76  
 aaugucucuc acucucuggt t 21  
 55

<210> 77  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60

<220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 13

<400> 77  
 5 gagagugaga gacauu 16

<210> 78  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 13

15 <400> 78  
 aaugucucuc acucucuggc uucaugccau g 31

<210> 79  
 <211> 21  
 20 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 14

25 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 35 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 79  
 40 gcgaagcuga ccuggaagat t 21

<210> 80  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº14

50 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (20). . (21)

<223> desoxirribonucleótidos

<400> 80  
 ucuuccaggu cagcuucgct t 21  
 5 <210> 81  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº14

<400> 81  
 15 aagcugaccu ggaaga 16  
 <210> 82  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 14

25 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 82  
 ucuuccaggu cagcuucgct t 21  
 40 <210> 83  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 14

<400> 83  
 50 aagcugaccu ggaaga 16  
 <210> 84  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 14

60 <400> 84

ucuuccaggu cagcuucgca aggccugacc a 31

<210> 85  
 <211> 21  
 5 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 15

10 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 85  
 25 ccggagacaa ugacaucuut t 21

<210> 86  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº15

35 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 86  
 aagaugau ugucuccgt t 21

50 <210> 87  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº15

<400> 87  
 60 gagacaauga caucuu 16

<210> 88  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 15  
 10 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
  
 <400> 88  
 aagaugaucu ugucuccggt t 21  
 25  
 <210> 89  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 15  
  
 <400> 89  
 35 gagacaauga caucuu 16  
  
 <210> 90  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 15  
 45 <400> 90  
 aagaugaucu ugucuccggg acaguuguaa u 31  
  
 <210> 91  
 <211> 21  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 16  
 55  
 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
  
 <220>  
 60 <221> misc\_feature

<222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 5 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 91  
 10 ucuuugaauc gcuguacuat t 21

<210> 92  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº16

20 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

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

<220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 92  
 35 uaguacagcg auucaaagat t 21

<210> 93  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 40

<220>  
 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº16

<400> 93  
 45 uugaaucgcu guacua 16

<210> 94  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 16

55 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (1). . (19)

<223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 94  
 uaguacagcg auucaaagat t 21  
 10

<210> 95  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 15

<220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 16

<400> 95  
 20 uugaaucgcu guacua 16

<210> 96  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 16

30 <400> 96  
 uaguacagcg auucaaagau gucauugucu c 31

<210> 97  
 <211> 21  
 35 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
 40

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
 45

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 50

<400> 97  
 uugcgaagcu gaccuggaat t 21

<223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 17  
 55 <210> 98  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº17

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

15 <400> 98  
 uuccagguca gcuucgcaat t 21

<210> 99

20 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº17

<400> 99  
 cgaagcugac cuggaa 16

30 <210> 100  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 17

35 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>

40 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>

45 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 100  
 50 uuccagguca gcuucgcaat t 21

<210> 101  
 <211> 16  
 <212> ARN

55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 17

60 <400> 101

cgaagcugac cuggaa 16

<210> 102  
 <211> 31  
 5 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 17

10 <400> 102  
 uuccagguca gcuucgcaag gccugaccou g 31

<210> 103  
 15 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 18

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

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

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

35 <400> 103  
 caacuaugau uagagccaat t 21

<210> 104  
 <211> 21  
 40 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº18

45 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 50 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 55 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 104  
 60 uggcucuaa ucuauguug t 21

<210> 105  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº18  
  
 10 <400> 105  
 cuaugauuag agccaa 16  
  
 <210> 106  
 <211> 21  
 15 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 18  
 20  
 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
  
 <400> 106  
 uuggcucuaa ucauaguugt t 21  
 35  
 <210> 107  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 18  
  
 <400> 107  
 45 cuaugauuag agccaa 16  
  
 <210> 108  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 18  
  
 55 <400> 108  
 uuggcucuaa ucauaguugg gucugggcca a 31  
  
 <210> 109  
 <211> 21  
 60 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 19

5 <220>  
<223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
10 <221> misc\_feature  
<222> (1). . (19)  
<223> ribonucleótidos

<220>  
15 <221> misc\_feature  
<222> (20). . (21)  
<223> desoxirribonucleótidos

<400> 109  
20 guaccagugc acgugccugt t 21

<210> 110  
<211> 21  
<212> ARN

25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº19

30 <220>  
<223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
<221> misc\_feature  
35 <222> (1). . (19)  
<223> ribonucleótidos

<220>  
<221> misc\_feature  
40 <222> (20). . (21)  
<223> desoxirribonucleótidos

<400> 110  
45 caggcagug cacugguact t 21

<210> 111  
<211> 16  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº19

<400> 111  
55 ccagugcacg ugccug 16

<210> 112  
<211> 21  
<212> ARN

60 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 19

5 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 112  
 caggcagcug cacugguact t 21  
 20  
 <210> 113  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 19

<400> 113  
 ccagugcacg ugccug 16

30 <210> 114  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 19

<400> 114  
 caggcagcug cacugguacu ugcagcugcu c 31  
 40  
 <210> 115  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

45  
 <220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 20

<220>  
 50 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 55 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 60 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 115  
 agugcauccg uacucccaat t 21

5 <210> 116  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº20

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

25 <400> 116  
 uugggaguac ggaugcacut t 21

<210> 117

30 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 35 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº20

<400> 117  
 gcauccguac ucccaa 16

40 <210> 118  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 20

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

60

<400> 118  
 uugggaguac ggaugcacut t 21

<210> 119  
 5 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 20

<400> 119  
 gcauccguac ucccaa 16

15 <210> 120  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 20

<400> 120  
 uugggaguac ggaugcacuu uuugcccuuc u 31

25 <210> 121  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 21

<220>  
 35 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

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

40 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)

45 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 121  
 caugauguuc aucaagacct t 21

50 <210> 122  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº21

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

60

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 10  
 <400> 122  
 ggucuugaug aacaucaugt t 21  
 <210> 123  
 15 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº21  
 <400> 123  
 gauguucauc aagacc 16  
 25 <210> 124  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 21  
 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
 35  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> ribonucleótidos  
 45  
 <400> 124  
 ggucuugaug aacaucaugt t 21  
 <210> 125  
 50 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 55 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 21  
 <400> 125  
 gauguucauc aagacc 16  
 60 <210> 126

<211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 21

<400> 126  
 ggucuugaug aacaugaugu ucuucucau g 31

10 <210> 127  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 127  
 30 ccaugaccgc cgccagaut t 21

<210> 128  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº22

40 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 50 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 128  
 auacuggcgg cggucauggt t 21

55 <210> 129  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60

<220>  
 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº22

<400> 129  
 5 ugaccgccgc caguau 16

<210> 130  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 22

15 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 130  
 auacuggcgg cggucauggt t 21  
 30

<210> 131  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 35

<220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 22

<400> 131  
 40 ugaccgccgc caguau 16

<210> 132  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 22

50 <400> 132  
 auacuggcgg cggucauggu uggcacugcg g 31

<210> 133  
 <211> 21  
 55 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 23  
 60

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 5 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 133  
 15 gaacauuaag aaggcaaat t 21

<210> 134  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº23

25 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 134  
 40 uuugcccuuc uaauguuct t 21

<210> 135  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº23

<400> 135  
 50 cauuagaag ggcaaa 16

<210> 136  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 23

60 <220>

<223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 10 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 136  
 uuugcccuuc uaauguuct t 21

15 <210> 137  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 23

<400> 137  
 cauaaagaag ggcaaa 16

25 <210> 138  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 23

<400> 138  
 35 uuugcccuuc uaauguucu cuuccagguc a 31

<210> 139  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena con sentido del siRNA CTGF nº. 24

45 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 50 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

<220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 139  
 ggaagacacg uuuggccat t 21

60

<210> 140  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF siRNA nº24  
  
 <220>  
 10 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) . . (19)  
 15 <223> ribonucleótidos  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20) . . (21)  
 20 <223> desoxirribonucleótidos  
  
 <400> 140  
 uggcceaac gugucuuct t 21  
  
 25 <210> 141  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> cadena con sentido del asiRNA CTGF nº24  
  
 <400> 141  
 agacacguuu ggcca 16  
 35  
 <210> 142  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> cadena antisentido de CTGF asiRNA nº 24  
  
 <220>  
 45 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) . . (19)  
 50 <223> ribonucleótidos  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20) . . (21)  
 55 <223> desoxirribonucleótidos  
  
 <400> 142  
 uggcceaac gugucuuct t 21  
  
 60 <210> 143

<211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

5 <223> cadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 24

<400> 143  
 agacacguuu ggccca 16

10 <210> 144  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> anticadena con sentido del lasiRNA CTGF nº 24

<400> 144  
 ugggcaaac gugucuucca gucgguaagc c 31

20 <210> 145  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> cebador hacia delante

<400> 145  
 30 gagtcaacgg atttgctgt 20

<210> 146  
 <211> 20  
 <212> DNA

35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador reverso

<400> 146  
 40 gacaagcttc ccgttctcag 20

<210> 147  
 <211> 20

45 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador hacia delante CTGF

50 <400> 147  
 caagggcctc ttctgtgact 20

<210> 148  
 55 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 60 <223> cebador reverso CTGF

<400> 148  
 gacaagcttc ccgttctcag 20

5 <210> 149  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cadena con sentido del siARN

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

25 <400> 149  
 cggcuuaccg acuggaagat t 21

<210> 150  
 30 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 35 <223> cadena antisentido del siARN

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

50 <400> 150  
 ucuuccaguc gguaagccgt t 21

<210> 151  
 <211> 16  
 55 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena con sentido de asiARN

60

<400> 151  
 cuuaccgacu ggaaga 16

<210> 152  
 5 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> cadena antisentido de asiARN

<220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> ribonucleótidos

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

25 <400> 152  
 ucuuccaguc gguaagccgt t 21

<210> 153  
 <211> 16  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena con sentido de lasiARN

35 <400> 153  
 cuuaccgacu ggaaga 16

<210> 154  
 40 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 45 <223> cadena antisentido de lasiARN

<400> 154  
 ucuuccaguc gguaagccgc gagggcaggc c 31

50 <210> 155  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> cadena con sentido de Chol-lasiARN-PS(0)

<400> 155  
 60 cuuaccgacu ggaaga 16

<210> 156  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> cadena antisentido de Chol-lasiARN-PS(0)  
  
 <400> 156  
 10 ucuuccaguc gguaagccgc gagggcaggc c 31  
  
 <210> 157  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cadena con sentido de Chol-lasiARN-PS(4)  
 20 <400> 157  
 cuuaccgacu ggaaga 16  
  
 <210> 158  
 <211> 31  
 25 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cadena antisentido de Chol-lasiARN-PS(4)  
 30 <400> 158  
 ucuuccaguc gguaagccgc gagggcaggc c 31  
  
 <210> 159  
 35 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 40 <223> cadena con sentido de Chol-lasiARN-PS(7)  
  
 <400> 159  
 cuuaccgacu ggaaga 16  
  
 45 <210> 160  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> cadena antisentido de Chol-lasiARN-PS(7)  
  
 <400> 160  
 ucuuccaguc gguaagccgc gagggcaggc c 31  
 55 <210> 161  
  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 60 <213> Secuencia artificial

# ES 2 716 818 T3

<220>  
<223> cadena con sentido de Chol-lasiARN-PS(12)

5 <400> 161  
cuuaccgacu ggaaga 16

<210> 162  
<211> 31  
10 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena antisentido de Chol-lasiARN-PS(12)

15 <400> 162  
ucuuccaguc gguaagccgc gagggcaggc c 31

<210> 163  
20 <211> 16  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> cadena con sentido de Chol-lasiARN-PS(17)

<400> 163  
cuuaccgacu ggaaga 16

30 <210> 164  
<211> 31  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> cadena antisentido de Chol-lasiARN-PS(17)

<400> 164  
ucuuccaguc gguaagccgc gagggcaggc c 31

40 <210> 165  
<211> 16  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> cadena con sentido de Chol-lasiARN-PS(7)-cy3

<400> 165  
50 cuuaccgacu ggaaga 16

<210> 166  
<211> 31  
<212> ARN  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena antisentido de Chol-lasiARN-PS(7)-cy3

60 <400> 166

ucuuccaguc gguaagccgc gagggcaggc c 31  
 <210> 167  
 <211> 16  
 5 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cadena con sentido de Chol-lasiARN-PS(7)  
 10  
 <400> 167  
 ccagaccaa uuugca 16  
 <210> 168  
 15 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> cadena antisentido de Chol-lasiARN-PS(7)  
 <400> 168  
 ugcauuug gucuggaagu cacauccuu g 31  
 25 <210> 169  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> cadena antisentido de cp-lasiARN (survivin)  
 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN  
 35  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) . . (19)  
 <223> ribonucleótidos  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20) . . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos  
 45  
 <400> 169  
 ugaaauguu gaucuccuuu ccuaagacat t 31  
 <210> 170  
 50 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 55 <223> cadena con sentido de cp-lasiARN (survivin)  
 <400> 170  
 gagaucaaca uuuuca 16  
 60 <210> 171

<211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> cadena antisentido de cp-lasiARN (survivin)  
 <400> 171  
 ugaaaauguu gaucuccuuu c 21  
 10 <210> 172  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 172  
 20 gcaccacttc cagggttat 20  
 <210> 173  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 30 <400> 173  
 ctctggtgcc acttcaaga 20  
 <210> 174  
 <211> 31  
 35 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cp-lasiARN (CTGF) antisentido 31nt  
 40 <400> 174  
 ucuuccaguc gguagccgc gagggcaggc c 31  
 <210> 175  
 45 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> cp-lasiARN (CTGF) con sentido  
 <400> 175  
 cttaccgact ggaaga 16  
 55 <210> 176  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>

<223> cp-lasiARN (CTGF) antisentido 21nt

<400> 176  
 ucuuccaguc gguagccgc g 21

5 <210> 177  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cp-lasiARN (CTGF) Antisentido Rat

<400> 177  
 15 ucuuccaguc gguagccgc uagggcaggg c 31

<210> 178  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cp-lasiARN (CTGF) Con sentido Rat

25 <400> 178  
 cctaccgact ggaaga 16

<210> 179  
 <211> 21  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> siARN (CTGF) antisentido

35 <220>  
 <223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>  
 40 <221> misc\_feature  
 <222> (1). . (19)  
 <223> rionucleotides

<220>  
 45 <221> misc\_feature  
 <222> (20). . (21)  
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 179  
 50 cugccuaccg acuggaagat t 21

<210> 180  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> siARN (CTGF) con sentido

60 <220>

<223> Molécula combinada de ARN/ADN

<220>

<221> misc\_feature

5 <222> (1).. (19)

<223> ribonucleótidos

<220>

<221> misc\_feature

10 <222> (20).. (21)

<223> desoxirribonucleótidos

<400> 180

cugccuaccg acuggaagat t 21

15

<210> 181

<211> 17

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> cebador

<400> 181

25 ggctcgcatc atagttg 17

<210> 182

<211> 20

<212> DNA

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

35 <400> 182

cgggaaatgc tgtgaggagt 20

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de ácido nucleico bicatenario inductora de ARNi que tiene capacidad de penetración celular y que comprende al menos un nucleótido modificado con 2'-O-alkilo, que comprende:
- 5 una primera cadena que tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:154 y que comprende al menos un enlace de fosforotioato o fosforoditioato; y una segunda cadena que tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:153 y que comprende al menos un enlace de fosforotioato o fosforoditioato y que comprende además un resto de
- 10 colesterol unido covalentemente a su extremo 3'; donde la segunda cadena se une a la primera cadena de tal manera que la primera cadena tiene una región bicatenaria a la que se une la segunda cadena y una región monocatenaria a la que la segunda cadena no se une, y donde el extremo 5' de la primera la cadena y el extremo 3' de la segunda cadena forman un extremo romo.
- 15 2. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, donde la primera cadena comprende de 4 a 17 enlaces de fosforotioato o fosforoditioato.
3. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, donde la segunda cadena comprende de 1 a 16 enlaces de fosforotioato o fosforoditioato.
- 20 4. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, donde al menos uno de los nucleótidos de la región monocatenaria en la primera cadena comprende un análogo de base en volumen.
5. Una composición de silenciamiento génico que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo
- 25 con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un procedimiento para silenciar un gen diana en una célula in vitro, comprendiendo el procedimiento la introducción de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 7. Una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado al factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), comprendiendo la composición la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, donde la enfermedad o trastorno
- 35 asociado a CTGF se selecciona de entre el grupo que consiste en queiloide, fibrosis renal, paquidermatosis, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, artritis, hipertensión, insuficiencia renal, trastorno relacionado con la vasculogénesis, dermatofibrosis y trastorno del sistema cardiovascular.

FIG. 1

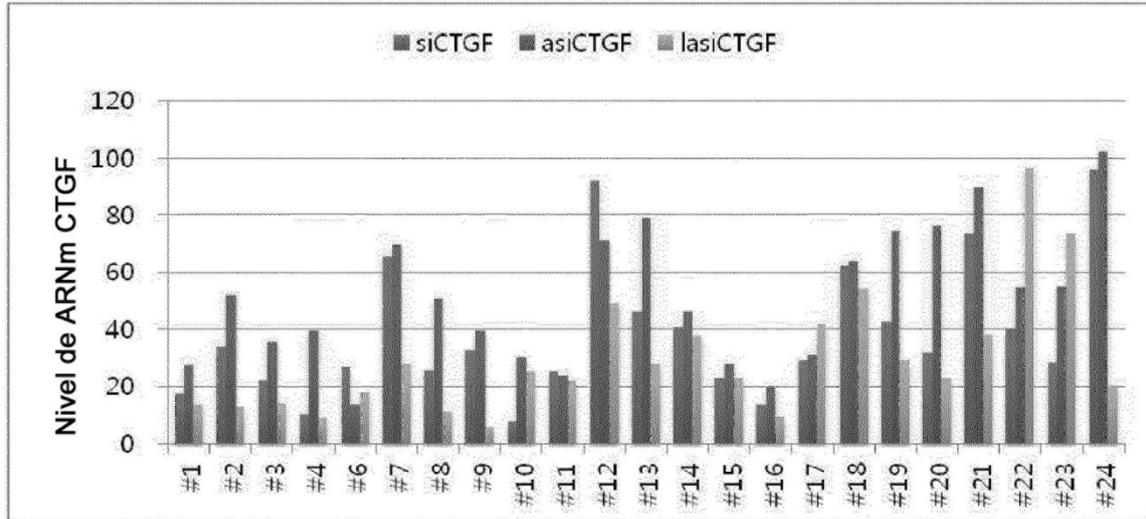


FIG. 2

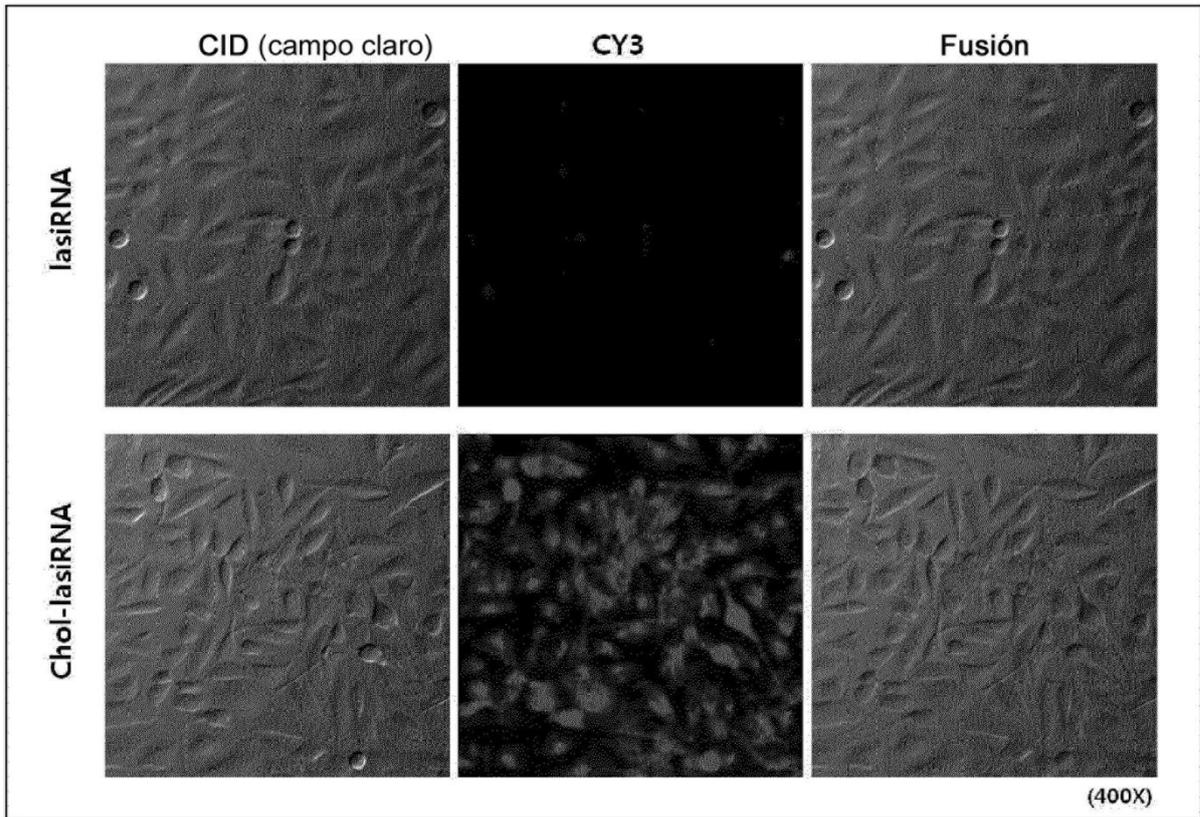


FIG. 3

Nº	NOMBRE siRNA	SEQ ID NO	Secuencia (5'→3')
Nº9	Chol-lasi-PS(0)	155	CUUACCGACUGGAA*G*A*Chol
		156	UCUUC CAGUCGGUAAGCCCGGAGGCCAGGCC
	Chol-lasi-PS(4)	157	CUUACCGACUGGAA*G*A*Chol
		158	UCUUC CAGUCGGUAAGCCCGGAGGCCA*G*G*C*C
	Chol-lasi-PS(7)	159	CUUACCGACUGGAA*G*A*Chol
		160	UCUUC CAGUCGGUAAGCCCGGAGG*G*C*A*G*G*C*C
	Chol-lasi-PS(12)	161	CUUACCGACUGGAA*G*A*Chol
		162	UCUUC CAGUCGGUAAGCCG*C*G*A*G*G*G*C*A*G*G*C*C
	Chol-lasi-PS(17)	163	CUUACCGACUGGAA*G*A*Chol
		164	UCUUC CAGUCGGUA*A*G*C*C*G*C*G*A*G*G*G*C*A*G*G*C*C
	Chol-lasi-PS(7)-cy3	165	Cy3*CUUACCGACUGGAA*G*A*Chol
		166	UCUUC CAGUCGGUAAGCCCGGAGG*G*C*A*G*G*C*C

FIG. 4

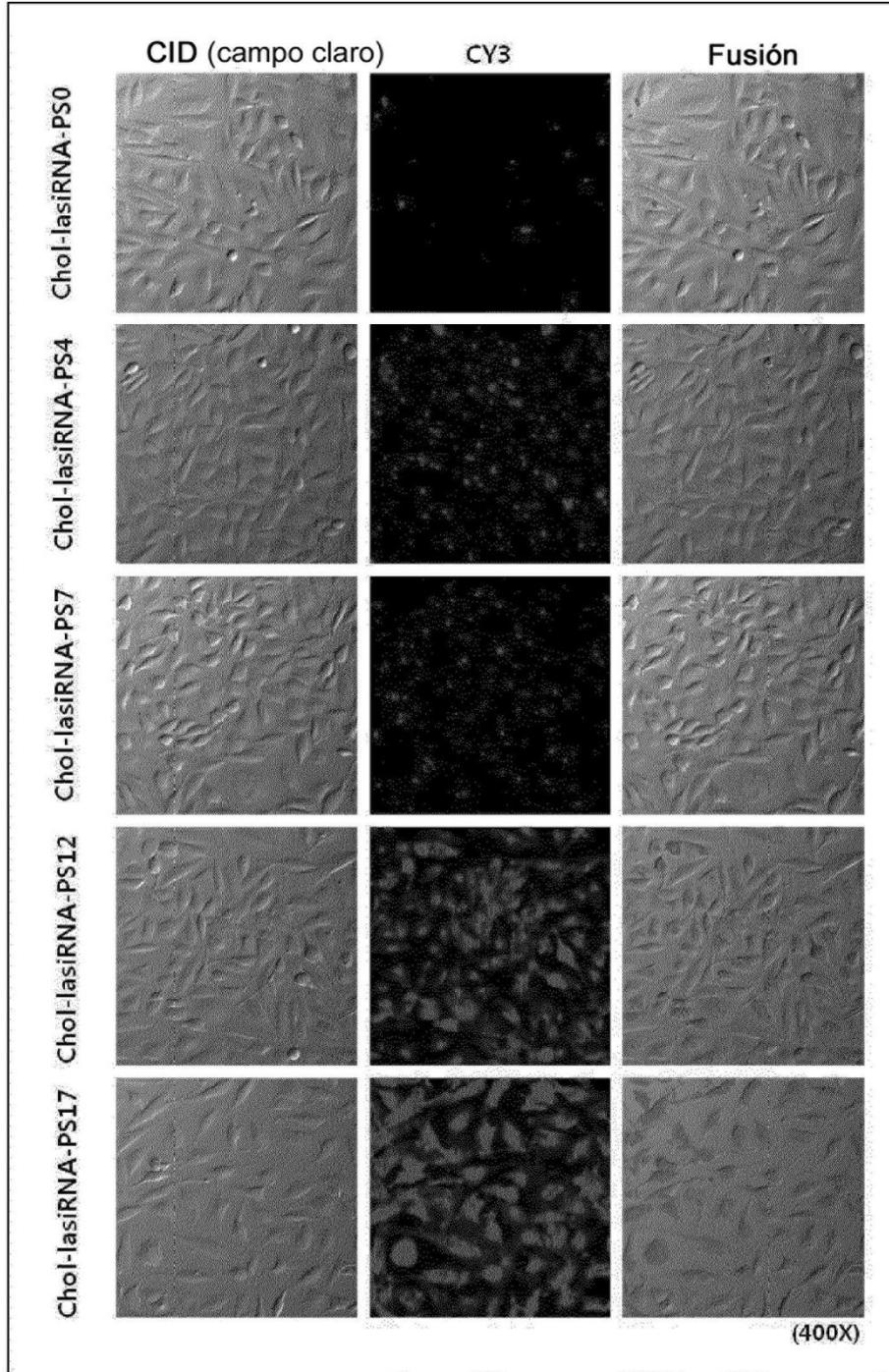


FIG. 5

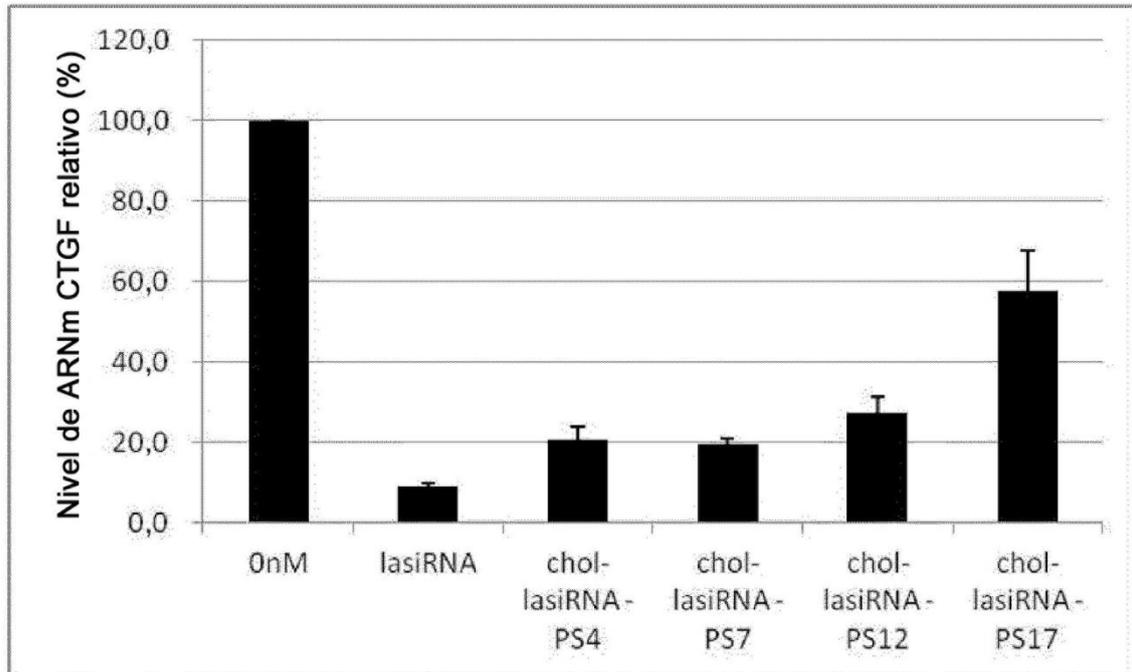


FIG. 6

N°	NOMBRE siRNA	SEQ ID NO	sentido	Secuencia (5' → 3')
MyD88	Chol-lasiRNA-PS(7)	167	sentido	CCAGACCCAAUUUG* <u>C</u> *A*Chol
		168	antisentido	UGCAAUUUGGUCUGGAAGUCACA* <u>U</u> *U* <u>C</u> *C*U*U*G

FIG. 7

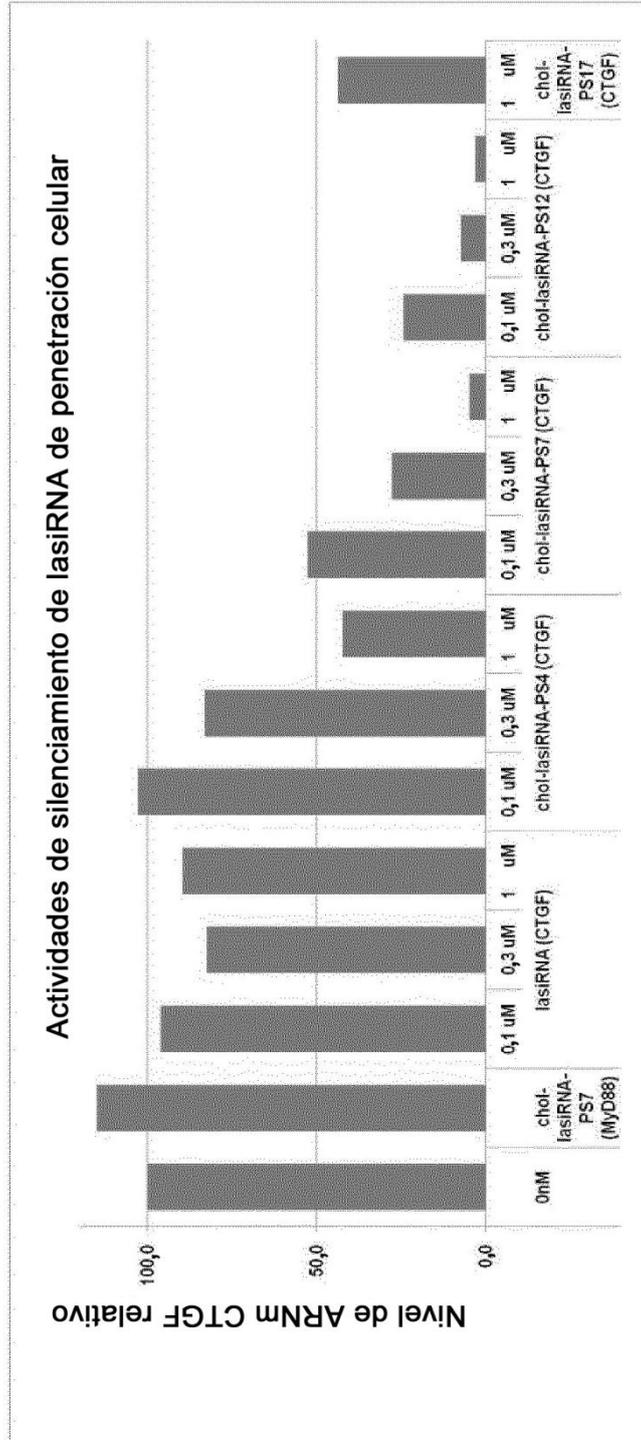


FIG. 8

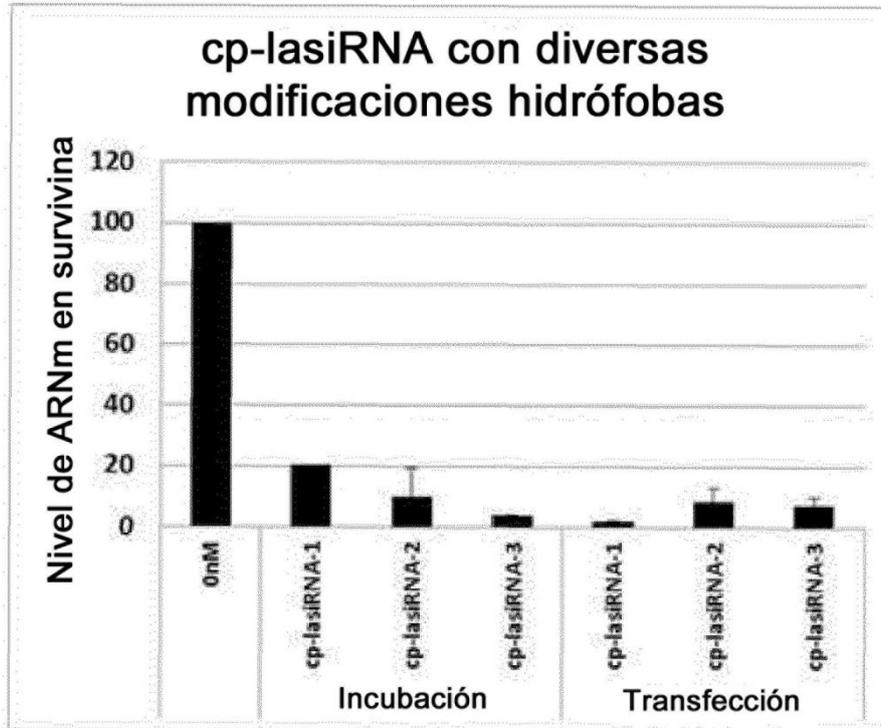


FIG. 9

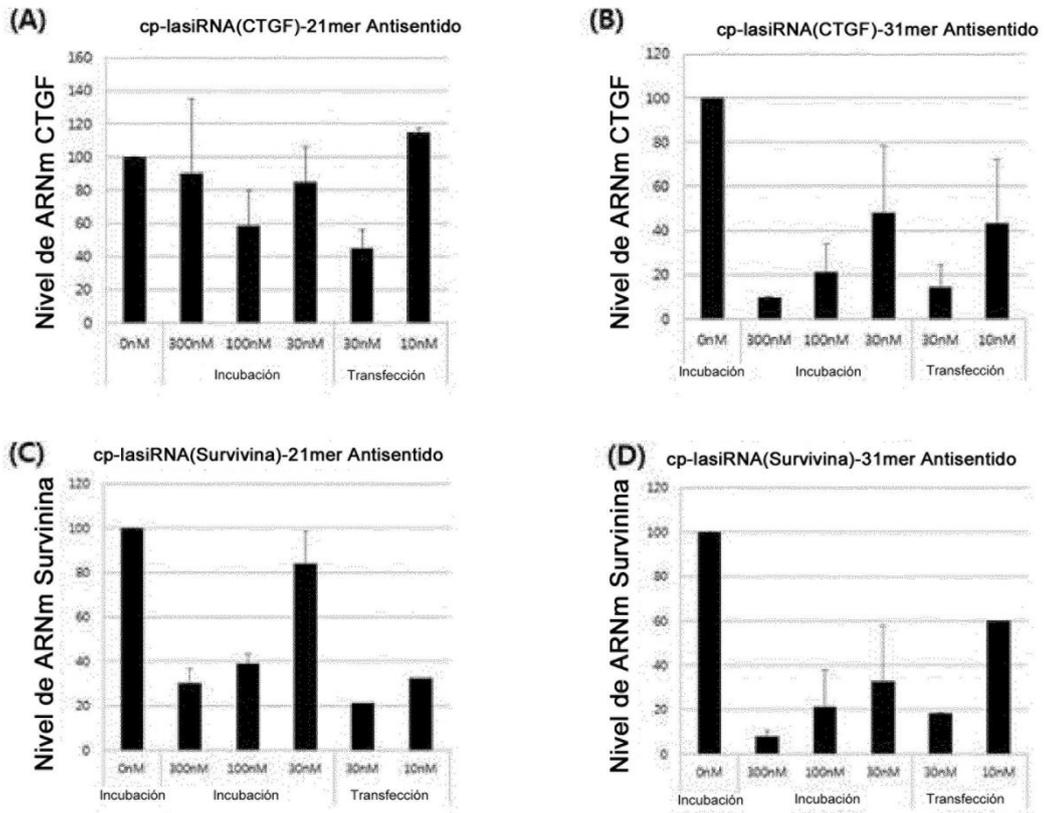


FIG. 10

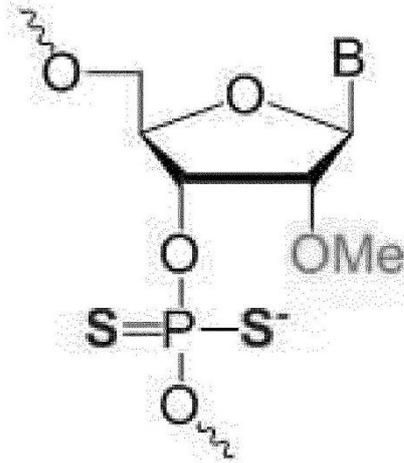


FIG. 11

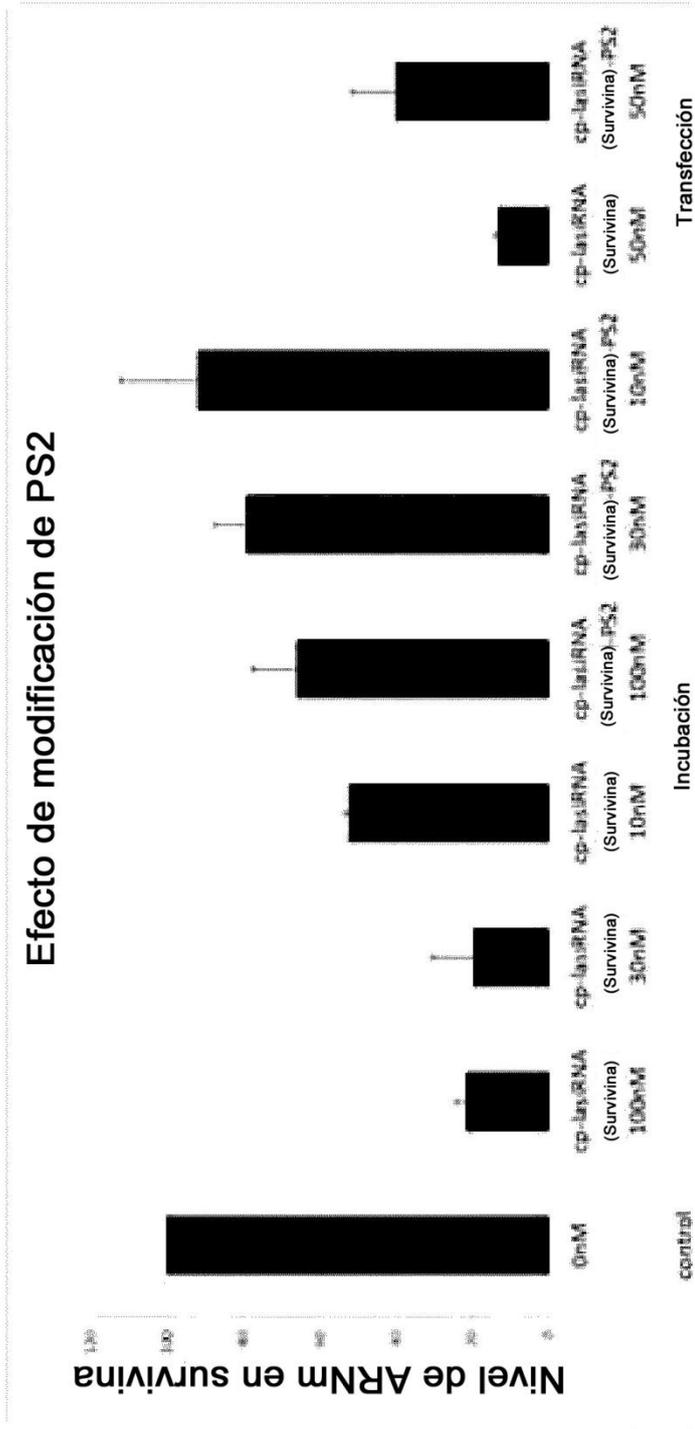


FIG. 12

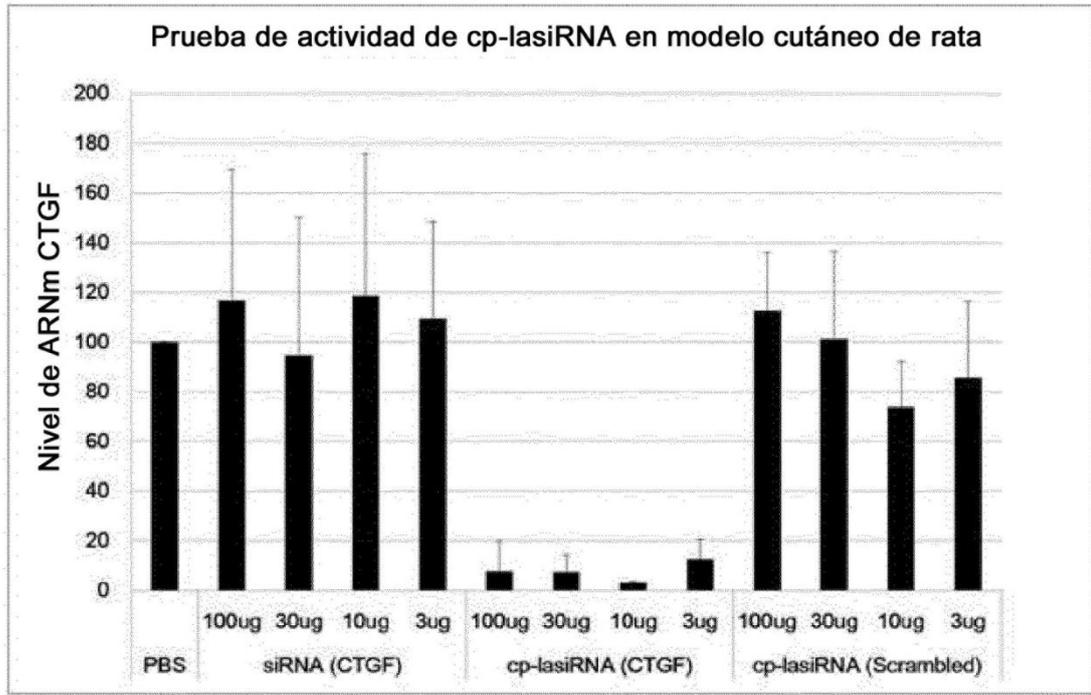


FIG. 13

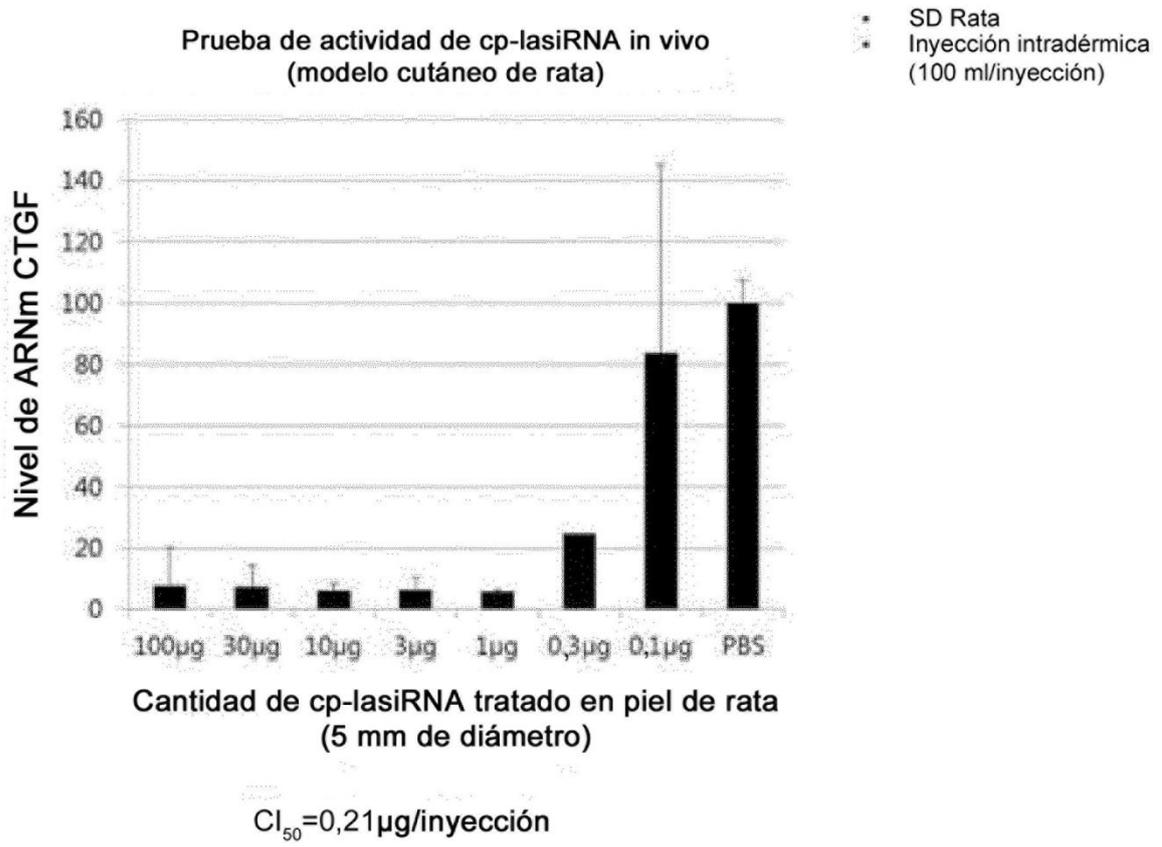


FIG. 14

