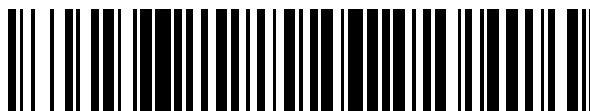


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 135**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2011 PCT/JP2011/073628**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12050181**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2011 E 11832611 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2628798**

54 Título: **Agente profiláctico o terapéutico para la fibrosis**

30 Prioridad:

14.10.2010 JP 2010231946

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

18.07.2019

73 Titular/es:

**MIE UNIVERSITY (50.0%)
1577, Kurimamachiya-cho Tsu-shi
Mie 514-8507, JP y
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GABAZZA, ESTEBAN C.;
KOBAYASHI, TETSU;
TOYOBUKU, HIDEKAZU;
FUKUDA, AYAKO y
HASEGAWA, TETSUYA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 720 135 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

Agente profiláctico o terapéutico para la fibrosis

5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a un agente terapéutico para la fibrosis. Específicamente, la presente invención se refiere a un ARN de interferencia pequeño (ARNip) que se dirige a un gen que codifica el factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1 y un producto farmacéutico que contiene el ARNip.

10

[Técnica antecedente]

La fibrosis pulmonar se refiere a un síntoma en el cual los tejidos pulmonares se vuelven fibróticos debido a la acumulación de exceso de colágeno y otra matriz extracelular. Dentro de una clasificación de fibrosis pulmonar, la fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad crónica intratable, que tiene un pronóstico desfavorable con una mediana de tiempo de supervivencia promedio de tres años y una tasa de supervivencia a cinco años del 20 al 40%. Para el tratamiento de la fibrosis pulmonar, se utilizan fármacos esteroides e inmunosupresores; sin embargo, actualmente no se dispone de una terapia eficaz que pueda mejorar el pronóstico y, en consecuencia, se exige el desarrollo de un nuevo fármaco terapéutico.

15

20

Recientemente, se ha revelado que hay muchas enfermedades cuyo inicio se atribuye a un gen, y también se informa que muchos genes están involucrados en la fibrosis pulmonar (Documentos de Patente 1 a 4, Documentos de no Patente 1 a 6). Como el principal factor asociado con la fibrosis pulmonar, se informa de TGF- β 1 (Documentos de Patente 1 y 2, Documentos de no Patente 2 a 6), Smad3 (Documento de no Patente 1), MCP-1 (Documento de Patente 3), y similares.

25

Al mismo tiempo, un ácido nucleico, en particular, el ARNip induce la degradación del ARNm de un gen que tiene una secuencia idéntica o casi idéntica a una secuencia específica presente en una célula, inhibiendo, de este modo, la expresión de un gen diana (ARN de interferencia). Por consiguiente, la función de inhibir la expresión del gen diana debido a la interferencia por ARN es útil para la mejora o el tratamiento de los síntomas de la enfermedad inducidos por la expresión anormal de un gen o un grupo de genes específicos. En cuanto a los genes asociados con la fibrosis pulmonar, también, hay informes de que se intentó la inhibición de la expresión de esos genes con ARNip (Documentos de Patente 1 a 4, Documentos de No Patente 1 a 6).

30

35

Sin embargo, las tecnologías informadas hasta la fecha solo han mostrado el efecto inhibitorio de una secuencia de ARNip en un gen asociado a la enfermedad en animales experimentales (ratones y ratas), mientras que no han mostrado suficientemente los efectos de manera específica en genes humanos. Además, con respecto al efecto inhibitorio del ARNip, mientras se muestran los efectos del ARNip a concentraciones de 200 nM (Documento de no Patente 1) y de 20 a 500 nM (Documento de no Patente 5), no se demuestra una molécula de ácido nucleico capaz de inhibir la expresión de un gen asociado a la fibrosis pulmonar de manera eficaz a una concentración baja.

40

Hasta la fecha, se han informado varias decenas de ARNip dirigidos al gen TGF- β 1 (Documentos de Patente 1 y 5 a 7 y Documento de no Patente 7). Sin embargo, teniendo en cuenta que el gen TGF- β 1 de longitud completa consiste en 2346 bases (número de Acceso de GenBank NM_000660.3) y existen innumerables combinaciones posibles para seleccionar una secuencia de aproximadamente 20 meros del gen de longitud completa, no es fácil diseñar una molécula de ARNbc o ARNip capaz de inhibir de manera más eficaz la expresión del gen a partir de las combinaciones.

45

[Documentos de la Técnica Relacionados]

50

[Documentos de Patentes]

[Documento de Patente 1] WO2007/109097
 [Documento de Patente 2] WO2003/035083
 [Documento de Patente 3] JP-A-2007-119396
 [Documento de Patente 4] JP-A-2009-516517
 [Documento de Patente 5] WO2009/061417
 [Documento de Patente 6] WO2008/109548
 [Documento de Patente 7] WO2007/79224

55

60

[Documentos de no Patente]

[Documento de No Patente 1], Wang Z, Gao Z, Shi Y, Sun Y, Lin Z, Jiang H, Hou T, Wang Q, Yuan X, Zhu X, Wu H, Jin Y, J Plast Reconstr Aesthet Surg, 1193-1199, 60, 2007
 [Documento de No Patente 2] Hwang M, Kim HJ, Noh HJ, Chang YC, Chae YM, Kim KH, Jeon JP, Lee TS, Oh HK, Lee YS, Park KK, Exp Mol Pathol, 48-54, 81,2006

65

[Documento de No Patente 3] Takabatake Y, Isaka Y, Mizui M, Kawachi H, Shimizu F, Ito T, Hori M, Imai E, Gene Ther, 965-973, 12, 2005

[Documento de no Patente 4] Xu W, Wang LW, Shi JZ, Gong ZJ, Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 300-308, 8, 2009

[Documento de no Patente 5] Liu Xj, Ruan CM, Gong XF, Li XZ, Wang HL, Wang MW, Yin JQ, Biotechnol Lett, 1609-1615, 27, 2005

[Documento de no Patente 6] Jutaro Fukumoto, Saiko Suetsugu, Chika Harada, Tomonobu Kawaguchi, Naoki Hamada, Takashige Maeyama, Kazuyoshi Kuwano y Yoichi Nakanishi, The Journal of The Japanese Respiratory Society, 185, 46, 2008

[Documento de no Patente 7] Tai-Cheng Lai et al., Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology, 28(2), 109-119, 2009

[Sumario de la Invención]

[Problemas a resolver por la invención]

La presente invención se refiere a la provisión de ARNip eficaz para el tratamiento de fibrosis y un producto farmacéutico que contiene el ARNip.

[Medios para solucionar el problema]

Los presentes inventores han llevado a cabo una investigación intensiva para resolver el problema mencionado anteriormente. Como resultado, han descubierto que el ARNip específico que se dirige al gen TGF- β 1 humano puede inhibir eficazmente la expresión de TGF- β 1 en células humanas y, además, mejorar los síntomas de la fibrosis pulmonar en los pulmones de un modelo de ratón de fibrosis pulmonar sin inducir la reacción de interferón.

Es decir, la presente invención se refiere a los siguientes 1) a 13).

1) Un ARNip que tiene una longitud total de 21 a 23 nucleótidos, que se selecciona de los siguientes (a) a (o):

(a) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 2 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 3;

(e) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 10 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 11;

(h) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 16 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 17;

(i) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 18 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 19;

(j) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 20 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 21;

(k) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 22 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 23;

(l) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 24 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 25;

(n) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 28 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 29; y

(o) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 30 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 31.

2) El ARNip de acuerdo con el apartado 1) mencionado anteriormente, donde se convierten en ADN de 1 a 10 nucleótidos consecutivos que excluyen un nucleótido saliente del extremo 3' de la cadena en sentido del ARNip.

3) El ARNip de acuerdo con los apartados 1) o 2) mencionados anteriormente, donde se convierten en ADN de 1 a 10 nucleótidos consecutivos del extremo 5' de la cadena antisentido del ARNip.

4) El ARNip de acuerdo con los apartados 1) a 3) mencionados anteriormente, donde se convierten en ADN de 1 a 10 nucleótidos consecutivos excluyendo un nucleótido saliente del extremo 3' de la cadena en sentido del ARNip y se convierte en ADN de 1 a 10 nucleótidos consecutivos del extremo 5' de la cadena antisentido del ARNip.

5) El ARNip de acuerdo con los apartados 1) a 4) mencionados anteriormente, donde el extremo 5' de la cadena antisentido está monofosforilado o monotiofosforilado.

6) El ARNip de acuerdo con los apartados 1) a 5) mencionados anteriormente, donde un nucleótido es un análogo de nucleótido que tiene un azúcar, base, y/o fosfato modificado químicamente.

7) Una composición farmacéutica que contiene el ARNip de acuerdo con cualquiera de los apartados 1 a 6) mencionados anteriormente.

8) Un inhibidor de la expresión del gen TGF- β 1 que contiene el ARNip de acuerdo con cualquiera de los apartados 1) a 6) mencionados anteriormente como principio activo.

9) Un agente preventivo o terapéutico para la fibrosis que contiene el ARNip de acuerdo con cualquiera de los apartados 1) a 6) mencionados anteriormente como ingrediente activo.

10) Un agente preventivo o terapéutico para la fibrosis pulmonar o el cáncer de pulmón que contiene el ARNip de acuerdo con cualquiera de los apartados 1) a 6) mencionados anteriormente como ingrediente activo.

11) El uso del ARNip de acuerdo con los apartados 1) a 6) mencionados anteriormente para la producción de un agente preventivo o terapéutico para la fibrosis o de un agente preventivo o terapéutico para la fibrosis pulmonar o cáncer de pulmón.

12) El ARNip de acuerdo con los apartados 1) a 6) mencionados anteriormente para su uso en la prevención o el tratamiento de la fibrosis.

13) El ARNip de acuerdo con los apartados 1) a 6) mencionados anteriormente para su uso en la prevención o tratamiento de la fibrosis pulmonar o cáncer de pulmón.

[Efectos de la invención]

Debido a que el ARNip de la presente invención puede suprimir o inhibir eficazmente la expresión de TGF- β 1 a una baja concentración, es útil como producto farmacéutico para prevenir o tratar la fibrosis.

[Breve descripción de los dibujos]

La FIG. 1 es un gráfico que muestra la tasa de inhibición de la expresión del ARNm de TGF- β 1 por el ARNip;

La FIG. 2 es un gráfico que muestra la tasa de inhibición de la expresión del ARNm de TGF- β 1 por el ARNip quimérico;

La FIG. 3 es un gráfico que muestra la tasa de inhibición de la expresión del ARNm de TGF- β 1 por el ARNip quimérico unido a fosfato o tiofosfato;

La FIG. 4 es un gráfico que muestra la tasa de inhibición de la expresión de TGF- β 1 en un modelo de fibrosis pulmonar; y

La FIG. 5 es una imagen microscópica óptica de secciones de tejido pulmonar (tinción con H.E. y tinción con tricrómico de Masson) (aumento: 5x).

[Modos de Llevar a Cabo la Invención]

La secuencia dirigida por el ARNip de la presente invención consiste en 21 a 23 bases consecutivas seleccionadas de (a) a (o) como se define anteriormente, preferentemente 21 bases.

La secuencia de bases de la SEQ ID NO: 1 representa la secuencia de bases del ARNm de TGF- β 1, y esta información de la secuencia se registra en GenBank con el número de acceso de GenBank NM_000660.3.

El ARNip de la presente invención se forma por hibridación de una cadena antisentido, que tiene una secuencia complementaria a la secuencia diana mencionada anteriormente del ARNm de TGF- β 1, y una cadena en sentido, que tiene una secuencia complementaria a esta cadena antisentido. El ARNip de la presente invención tiene una actividad de escisión sobre el ARNm de TGF- β 1 (es decir, acción de interferencia por ARN) y una capacidad para inhibir la traducción de este ARNm, concretamente, una capacidad para inhibir la expresión del gen TGF- β 1.

Con respecto a la longitud del nucleótido del ARNip de la presente invención, las longitudes de la cadena en sentido y de la cadena antisentido pueden ser iguales o diferentes, y el ARNip de longitud completa consiste en 21 a 23 nucleótidos.

Además, ambos extremos de las cadenas en sentido y antisentido pueden ser extremos romos o el extremo 3' de cada cadena puede tener un saliente (es decir, un extremo cohesivo). En este caso, el "extremo romo" se refiere a una configuración en la cual, en la región terminal del ARN bicatenario, la región terminal de la cadena en sentido y la región terminal correspondiente de la cadena antisentido se emparejan sin formar un tramo monocatenario. Además, el "saliente", también llamado un extremo colgante, se refiere a una configuración en la que el ARN bicatenario no puede formar una doble cadena en la región terminal de la cadena en sentido o la región terminal correspondiente de la cadena antisentido debido a la falta de un base de emparejamiento, generando un tramo monocatenario (extremo cohesivo).

En cuanto al número de bases en la porción final cohesiva, consiste en 1 a 10 nucleótidos, preferentemente de 1 a 4 nucleótidos, y más preferentemente de 1 a 2 nucleótidos. El ARNm de TGF- β 1 (es decir, acción de interferencia por ARN) y una capacidad para inhibir la traducción de este ARNm, concretamente, una capacidad para inhibir la expresión del gen TGF- β 1.

Con respecto a la longitud del nucleótido del ARNip de la presente invención, las longitudes de la cadena en sentido y de la cadena antisentido pueden ser iguales o diferentes, y el ARNip de longitud completa consiste en 30 o menos nucleótidos, preferentemente 25 o menos nucleótidos, más preferentemente 23 o menos nucleótidos o 21 nucleótidos.

Además, ambos extremos de las cadenas en sentido y antisentido pueden ser extremos romos o el extremo 3' de cada cadena puede tener un saliente (es decir, un extremo cohesivo). En este caso, el "extremo romo" se refiere a

una configuración en la cual, en la región terminal del ARN bicatenario, la región terminal de la cadena en sentido y la región terminal correspondiente de la cadena antisentido se emparejan sin formar un tramo monocatenario. Además, el "saliente", también llamado un extremo colgante, se refiere a una configuración en la que el ARN bicatenario no puede formar una doble cadena en la región terminal de la cadena en sentido o la región terminal correspondiente de la cadena antisentido debido a la falta de un base de emparejamiento, generando un tramo monocatenario (extremo cohesivo).

En cuanto al número de bases en la porción final cohesiva, consiste en 1 a 10 nucleótidos, preferentemente de 1 a 4 nucleótidos, y más preferentemente de 1 a 2 nucleótidos. Debe observarse que no hay asociación en la longitud del extremo cohesivo entre las dos cadenas, y que cada una de las dos cadenas puede tener una longitud diferente. El nucleótido en la porción del extremo cohesivo puede ser ARN o ADN, y aunque es preferentemente una base complementaria al ARNm de TGF- β 1 diana, puede ser una base no complementaria siempre que el ARNip de la presente invención conserve la capacidad de interferencia por ARN anteriormente mencionada.

El ARNip de la presente invención puede ser un ARN bicatenario compuesto de dos cadenas separadas. Además de eso, también puede ser un ARN monocatenario que forma un ARN bicatenario a través de la formación de una estructura de tallo-lazo. Es decir, el ARNip de la presente invención también incluye el ARN que forma un bucle compuesto de 2 a 4 nucleótidos en el extremo 5' de la cadena en sentido y en el extremo 3' de la cadena antisentido y el ARN que forma un bucle compuesto de 2 a 4 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena en sentido y en el extremo 5' de la cadena antisentido. Además, también incluye ARN que forma bucles compuestos de 2 a 4 nucleótidos en el extremo 5' de la cadena en sentido y en el extremo 3' de la cadena antisentido, así como en el extremo 3' de la cadena en sentido y en el extremo 5' de la cadena antisentido.

El ARNip de la presente invención y la secuencia diana son preferentemente idénticos; sin embargo, pueden ser sustancialmente idénticos, es decir, tener secuencias homólogas, siempre que el ARNip pueda inducir la interferencia por ARN mencionada anteriormente. Específicamente, siempre que la secuencia de la cadena antisentido del ARNip de la presente invención hibride con la secuencia diana, pueden estar presentes uno o varios desapareamientos (por ejemplo, dos, tres y cuatro). Es decir, El ARNip de la presente invención incluye ARNip que tiene una secuencia modificada con la sustitución, adición o delección de una o varias bases en relación con la secuencia diana y capaz de inducir interferencia por ARN, o ARNip que tiene el 85% o más, preferentemente el 90% o más, preferentemente el 95% o más, y más preferentemente el 98% o más de identidad de secuencia con la secuencia diana y capaz de inducir interferencia por ARN.

Debe observarse que las condiciones de hibridación utilizadas en el presente documento se refieren a, cuando se usa el ARNip de la presente invención como un producto farmacéutico, administrándolo al cuerpo vivo, las condiciones en el cuerpo vivo, y cuando se usa el ARNip de la presente invención como un reactivo *in vitro*, condiciones moderada o altamente rigurosas. Los ejemplos de tales condiciones incluyen condiciones de hibridación de NaCl 400 mM, PIPES 40 mM, pH 6,4, EDTA 1 mM y un tiempo de hibridación de 12 a 160 horas a 50 °C a 70 °C. Estas condiciones son bien conocidas por los expertos en la materia y se describen por Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EEUU, 1989).

Asimismo, la identidad de la secuencia puede calcularse mediante el método de Lipman-Pearson (Science, 227, 1435, (1985)), etc., y, por ejemplo, se calcula utilizando el programa de homología de búsqueda del software de procesamiento de información genética Genetyx-Win (Ver.5.1.1; Software Development Co., Ltd.) con la configuración del tamaño de la Unidad para comparar (ktup) en 2.

Asimismo, el ARNip de la presente invención incluye ARNip en el que los nucleótidos de la cadena en sentido o de la cadena antisentido se convierten completamente en ADN (ARNip híbrido) y ARNip en el que los nucleótidos de la cadena en sentido y/o antisentido se convierten parcialmente en ADN (ARNip quimérico), siempre que el ARNip pueda inducir la interferencia por ARN mencionada anteriormente.

En el presente documento, la conversión de nucleótidos de ARN en ADN significa la conversión de AMP en dAMP, GMP en dGMP, CMP en dCMP y UMP en dTMP.

Como el ARNip híbrido, se prefiere aquel en el que los nucleótidos de la cadena en sentido se conviertan en ADN. Los ejemplos del ARNip quimérico incluyen uno en el que los nucleótidos en el lado cadena abajo (es decir, el lado terminal 3' de la cadena en sentido y el lado terminal 5' de la cadena antisentido) se convierten parcialmente en ADN. Ejemplos específicos del mismo incluyen uno en el que los nucleótidos en el lado terminal 3' de la cadena en sentido y en el lado terminal 5' de la cadena antisentido se convierten ambos en ADN y uno en el que los nucleótidos de cualquiera del lado terminal 3' de la cadena en sentido o del lado terminal 5' de la cadena antisentido se convierten en ADN. Asimismo, la longitud del nucleótido a convertir es preferentemente cualquier longitud equivalente a 1/2 de la molécula de ARN o más corta, por ejemplo, de 1 a 13 nucleótidos, preferentemente de 1 a 10 nucleótidos desde el extremo. Desde los puntos de vista del efecto de interferencia por ARN, y la estabilidad, seguridad, etc. de la molécula de ARN, los ejemplos de ARNip quimérico favorable incluyen uno en el que cada una de las dos cadenas tenga una longitud de nucleótido de 19 a 23, y de 1 a 10, preferentemente de 1 a 8, y más preferentemente de 1 a 6, excluyendo un(unos) nucleótido(s) saliente(s) del extremo 3' de la cadena en sentido y de

1 a 10, preferentemente de 1 a 8, y más preferentemente de 1 a 6 nucleótidos del extremo 5' de la cadena antisentido se conviertan consecutivamente en ADN en un número arbitrario (véase [Tabla 2] que se muestra a continuación). Asimismo, en este caso, es más preferente que los números de ADN convertido en la cadena en sentido (excluyendo un(unos) nucleótido(s) saliente(s) y en la cadena antisentido sean los mismos.

5 Asimismo, el ARNip de la presente invención puede ser uno en el que el nucleótido (es decir, ribonucleótido y desoxirribonucleótido) es un análogo de nucleótido que tiene un azúcar, base y/o fosfato químicamente modificado, siempre que el ARNip pueda inducir la interferencia por ARN mencionada anteriormente. Ejemplos del análogo de nucleótido que tiene una base modificada incluyen uridina o citidina modificada en la posición 5 (por ejemplo, 5-propiniluridina, 5-propinilcitidina, 5-metilcitidina, 5-metiluridina, 5-(2-amino)propiluridina, 5-halocitidina, 5-halouridina y 5-metiloxiuridina); adenosina o guanosina modificada en la posición 8 (por ejemplo, 8-bromoguanosina); deazanucléotido (por ejemplo, 7-deaza-adenosina); y nucleótido O y N-alquilado (por ejemplo, N6-metiladenosina).

15 Asimismo, ejemplos del análogo de nucleótido que tiene un azúcar modificado incluyen un análogo de azúcar modificado en la posición 2', en el que 2'-OH del ribonucleótido se reemplaza por H, OR, R, un átomo de halógeno, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, CN (donde, R representa un grupo alquilo, alqueno o alquino que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y similares, un análogo fosforilado en el extremo 5' o un análogo monotiofosforilado en el extremo 5', en el que el grupo OH 5' terminal está monofosforilado o monotiofosforilado.

20 Ejemplos del análogo de nucleótido que tiene un fosfato modificado incluyen uno en el que un grupo fosfoéster que une ribonucleótidos adyacentes se reemplaza por un grupo fosfotioato.

25 Asimismo, aparte de los análogos de nucleótidos mencionados anteriormente, el ARNip de la presente invención puede tener un sustituyente o molécula funcional específicos unidos a, al menos, uno de los nucleótidos del primero al sexto desde el extremo 5' o el extremo 3' de la cadena en sentido (extremo 5', extremo 3', o una base o azúcar internos diferente al terminal) directamente o por medio de un enlazador, y el sustituyente o molécula funcional se une preferentemente a, al menos, uno de los nucleótidos del primero al sexto, preferentemente del primero al cuarto del extremo 5' de la cadena en sentido.

30 En este caso, ejemplos del sustituyente incluyen un grupo amino; un grupo mercapto; un grupo nitro; un grupo alquilo que tiene 1 a 40 átomos de carbono (preferentemente 2 a 20, más preferentemente 4 a 12); un grupo aminoalquilo que tiene 1 a 40 átomos de carbono (preferentemente 2 a 20, más preferentemente 4 a 12); un grupo tioalquilo que tiene 1 a 40 átomos de carbono (preferentemente 2 a 20, más preferentemente 4 a 12); un grupo alcoxilo que tiene 1 a 40 átomos de carbono (preferentemente 2 a 20, más preferentemente 4 a 12); un grupo aminoalcoxilo que tiene 1 a 40 átomos de carbono (preferentemente 2 a 20, más preferentemente 4 a 12); un grupo tioalcoxilo que tiene 1 a 40 átomos de carbono (preferentemente 2 a 20, más preferentemente 4 a 12); un grupo amino mono o dialquilo que tiene 1 a 40 átomos de carbono (preferentemente 2 a 20, más preferentemente 4 a 12); un grupo alquiltio que tiene 1 a 40 átomos de carbono (preferentemente 2 a 20, más preferentemente 4 a 12); un grupo óxido de polietileno que tiene 2 a 40 átomos de carbono (preferentemente 2 a 20, más preferentemente 4 a 12); un grupo óxido de polipropileno que tiene 3 a 39 átomos de carbono (preferentemente 3 a 21, más preferentemente 3 a 12). El efecto de la interferencia por ARN puede mejorarse notablemente uniendo estos sustituyentes.

45 Ejemplos de la molécula funcional incluyen azúcar, proteína, péptido, aminoácido, ADN, ARN (incluyendo ARNt), aptámeros, nucleótidos modificados, materiales orgánicos e inorgánicos de bajo peso molecular, colesterol, dendrímeros, lípidos, y materiales poliméricos. Mediante la adición de estas moléculas funcionales, el ARNip de la presente invención puede lograr un excelente efecto de interferencia por ARN y un efecto beneficioso atribuido a las moléculas funcionales.

50 Ejemplos del azúcar mencionado anteriormente incluyen monosacáridos tales como glucosa, galactosa, glucosamina y galactosamina, y oligosacáridos o polisacáridos formados por una combinación arbitraria de estos monosacáridos.

55 Como la proteína mencionada anteriormente, se pueden usar proteínas presentes en el cuerpo vivo, proteínas que tienen acciones farmacológicas, proteínas que tienen acciones de reconocimiento molecular y similares, y los ejemplos de estas proteínas incluyen la proteína importina-β, avidina y anticuerpos.

Ejemplos específicos del ADN mencionado anteriormente incluyen ADN de 5 a 50 bases de longitud, preferentemente de 5 a 25 bases de longitud.

60 Ejemplos del péptido mencionado anteriormente incluyen el péptido octa-arginina R8, una secuencia de péptido señal de localización nuclear (como el antígeno Tat de VIH-1 y SV40T), un péptido señal de exportación nuclear (como Rev de VIH-1 y MAPKK) y un péptido de fusión de membrana. Ejemplos del nucleótido modificado mencionado anteriormente incluyen uno que tiene un esqueleto de fosfato modificado tal como el ADN/ARN fosfotioato o boranofosfato; un nucleótido modificado en 2' tal como el ARN 2'-OME modificado y el ARN 2'-F modificado; un nucleótido modificado en el que las moléculas de azúcar están entrecruzadas, como ANB (es decir,

ácido nucleico bloqueado) y ANE (es decir, ácidos nucleicos con puente 2'-O,4'-C-etileno); y un nucleótido modificado que tiene un esqueleto básico diferente, como el ANP (es decir, ácido nucleico peptídico) y morfolino nucleótido (véanse los documentos WO2008/140126 y WO2009/123185).

- 5 Ejemplos de los materiales orgánicos e inorgánicos de bajo peso molecular mencionados anteriormente incluyen materiales fluorescentes como Cy3 y Cy5; biotina; punto cuántico; y partículas finas de oro. Ejemplos de los dendrímeros mencionados anteriormente incluyen dendrímero de poli(amidoamina). Ejemplos de los lípidos mencionados anteriormente incluyen, además del ácido linoleico, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), etc., lípidos bicatenarios que tienen dos grupos hidrófobos como se describe en el documento WO2009/123185. Los
10 ejemplos de los materiales poliméricos mencionados anteriormente incluyen polietilenglicol y polietilenimina.

En este caso, el grupo que tiene una molécula funcional puede ser el resto de molécula funcional per se, o un resto de molécula funcional al que está unido uno de los grupos funcionales de un enlazador bifuncional. Es decir, en el primer caso, la molécula funcional está unida directamente a una cierta parte del ARN de cadena en sentido antes
15 mencionado, y en el último caso, la molécula funcional está unida a una cierta parte del ARN de cadena en sentido mencionado anteriormente a través de un enlazador bifuncional. En el presente documento, no se impone ninguna limitación particular sobre el enlazador bifuncional siempre que sea un enlazador que tenga dos grupos funcionales y, por ejemplo, se puede usar 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo, ácido N-4-maleimidobutírico, S-(2-piridilditio) cisteamina, yodoacetoxisuccinimida, N-(4-maleimidobutiriloxi) succinimida, ácido N- [5- (3'-
20 maleimidopropilamido)-1-carboxipentil] iminodiacético, ácido N- (5-aminopentil)-iminodiacético, y similares.

Aunque no se impone ninguna limitación particular en el sitio de unión en el ARN de cadena en sentido mencionado anteriormente para un sustituyente, una molécula funcional o un enlazador que conecta el sustituyente o la molécula funcional, preferentemente están unidos de tal manera que sustituyen un átomo de hidrógeno que constituye un grupo hidroxilo en el resto fosfato de un cierto nucleótido en el ARN de cadena en sentido.
25

El ARNip de la presente invención se ejemplifica específicamente por el ARN de doble cadena que contiene las secuencias en sentido y las secuencias antisentido de (a), (e), (h), (i), (j), (k), (l), (n) y (o), a continuación, el resto son ejemplos comparativos.
30

[Tabla 1]

N.º de ARNip	Posiciones de las bases del sitio diana	Sentido (5'→3')	SEQ ID NO	Antisentido (5'→3')	SEQ ID NO
(a)	1285-1305	CCGAGAAGCGGUACCUAACC	2	UUCAGGUACCGCUUCUCGGAG	3
(b)	1298-1318	CCUGAACCCGUGUUCUCUCC	4	AGAGCAACACGGGUUCAGGUA	5
(c)	1398-1418	CCUGGGGAUACCUACGCAACC	6	UUGCUAGAGGUUACGCCAGGAA	7
(d)	1434-1454	GCGACUCGCCAGAGUGGUUUAU	8	AACCACUCUGGCGAGUCGUCG	9
(e)	1435-1455	CGACUCGCCAGAGUGGUUAUC	10	UAACCACUCUGGCGAGUCGCU	11
(f)	1436-1456	GACUCGCCAGAGUGGUUAUCU	12	AUAACCACUCUGGCGAGUCGC	13
(g)	1438-1458	CUCGCCAGAGUGGUUAUCUUU	14	AGAUAAACCACUCUGGCGAGUC	15
(h)	1440-1460	CGCCAGAGUGGUUAUCUUUUG	16	AAAGAUAAACCACUCUGGCGAG	17
(i)	1441-1461	GCCAGAGUGGUUAUCUUUUGA	18	AAAAGAUAAACCACUCUGGCGA	19
(j)	1443-1463	CAGAGUGGUUAUCUUUUGAUG	20	UCAAAAAGAUAAACCACUCUGGC	21
(k)	1548-1568	GGGAUAAACACACUGCAAGUGG	22	ACUUGCAGUGUGUUUAUCCUCUG	23
(l)	1557-1577	CACUGCAAGUGGACAUCAACG	24	UUGAUGUCCACUUGCAGUGUG	25
(s)	1557-1579	CACACUGCAAGUGGACAUCAACG	54	CGUUUGAUGUCCACUUGCAGUGUG	55
(m)	1608-1628	CCACCAUUC AUGGCAUGAACCC	26	UUCAUGCCCAUGAAUGGUGGCC	27
(n)	1700-1720	GCCUUGGACACCAACUAUUGC	28	AAUAGUUUGUGUCCAGGGCUC	29
(o)	1706-1726	GACACCAACUAUUGCUUCAGC	30	UGAAGCAAUAGUUUGGUGUCCA	31
(P)	1778-1798	GACCUCGGCUGGAAGUGGAUC	32	UCCACUUCCAGCCCGAGGUCCU	33
(q)	1806-1826	CCAAGGGCUACCAUGCCAAUCU	34	UUGGCAUGGUAGCCCUUUGGGC	35
(r)	1887-1907	CCCUGUACAACCCAGCAUAACC	36	UUUUGUCUGGUUUGUACAGGGCC	37

Asimismo, los ejemplos preferidos del ARNip quimérico incluyen uno en el que se convierten consecutivamente en ADN de 1 a 8 nucleótidos del extremo 3' de la cadena en sentido y de 1 a 6 nucleótidos del extremo 5' de la cadena antisentido en un número arbitrario. Ejemplos de los ARNip quiméricos preferidos obtenidos usando el ARNip (I) mencionado anteriormente son los siguientes.

5

[Tabla 2]

N.º de ARNip	Sentido (5'→3')	SEQ ID NO	Antisentido (5'→3')	SEQ ID NO
(I-C8a)	CACUGCAAGUGGACatca <u>acg</u>	38	ttgatgUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	39
(I-C7)	CACUGCAAGUGGACatca <u>acg</u>	40	ttgatGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	41
(I-C6)	CACUGCAAGUGGACAtca <u>acg</u>	42	ttgaUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	43
(I-C5)	CACUGCAAGUGGACAUca <u>acg</u>	44	ttgAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	45
(I-C4a)	CACUGCAAGUGGACAUCa <u>acg</u>	46	ttGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	47
(I-C3)	CACUGCAAGUGGACAUCA <u>acg</u>	48	tUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	49
(I-C2)	CACUGCAAGUGGACAUCA <u>acg</u>	50	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
(I-C1)	CACUGCAAGUGGACAUAAC <u>cg</u>	51	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
(I-C4b)	CACUGCAAGUGGACAUCa <u>acg</u>	46	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>tg</u>	56

En la tabla, las letras mayúsculas, las letras minúsculas y los subrayados indican las posiciones de ARN, ADN y saliente, respectivamente.

10

Aunque no se impone ninguna limitación particular sobre el método de producción del ARNip de la presente invención, se puede sintetizar mediante un método de producción conocido, por ejemplo, síntesis química y síntesis transcripcional *in vitro* usando promotores y ARN polimerasas.

15

La síntesis química se puede realizar mediante un sintetizador de ácidos nucleicos, utilizando una resina de amidita que contiene moléculas de ácidos nucleicos, que son el elemento constituyente del ARNip, como materia prima.

La síntesis transcripcional se puede realizar por transcripción *in vitro*, lo que permite la síntesis de ARN bicatenario recortando el ARN de horquilla.

20

El ARNip de la presente invención obtenido de este modo, puede inhibir eficazmente la expresión de TGF-β1 en células derivadas del epitelio alveolar humano a nivel de ARNm, y además, muestra un efecto mejorador sobre los síntomas de fibrosis pulmonar en los pulmones de un modelo de ratón de fibrosis pulmonar sin inducir la reacción de interferón, como se demostrará más adelante en los Ejemplos.

25

Por consiguiente, el ARNip de la presente invención y un vector de expresión capaz de expresar el ARNip en sujetos a los que se administra el vector son útiles como un producto farmacéutico para la administración a un ser humano o animal (composición farmacéutica). Específicamente, un producto farmacéutico para la inhibición de la expresión del gen TGF-β1, un producto farmacéutico para prevenir o tratar una enfermedad atribuible a la sobreexpresión de TGF-β1, como la fibrosis, concretamente, un agente preventivo o terapéutico para la fibrosis.

30

En este caso, existe una variedad de enfermedades que conducen a la formación de fibrillas en los pulmones, tal como neumonía intersticial, fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), enfermedad inflamatoria pulmonar, infección pulmonar, neumonitis por radiación, neumonía intersticial inducida por fármacos y neumonía intersticial asociada a la enfermedad del colágeno; sin embargo, entre las neumonías intersticiales idiopáticas (PII) de causa no identificada, se prefiere particularmente la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Como enfermedad clínicopatológica, las PII incluyen fibrosis pulmonar idiopática (FPI), neumonía intersticial inespecífica (NSIP), neumonía organizada criptogénica (COP/BOOP), neumonía intersticial aguda (AIP), neumonía intersticial descamativa (DIP), neumonía intersticial asociada a bronquiolitis respiratoria (RB-ILD), neumonía intersticial linfocítica (LIP), y similares.

35

Además, hay informes de que TGF-β1 promueve el cáncer, en particular la invasión y la metástasis del adenocarcinoma de pulmón (Mol Cell Biochem (2011) 355: 309-314, Cancer Genomics Proteomics 2010, 7, 217), TGF-β1 se sobreexpresa en sitios de lesión tisular normal después de la terapia contra el cáncer y la lesión tisular normal se puede prevenir al dirigir la vía TGF-β1 (The oncologist 2010; 15: 350-359), etc. Por consiguiente, el ARNip de la presente invención y un vector de expresión capaz de expresar el ARNip en sujetos a los que se administra el vector son útiles como un producto farmacéutico para prevenir o tratar cáncer, en particular el cáncer de pulmón.

45

Cuando se usa el ARNip de la presente invención como un producto farmacéutico, aunque se puede usar como es, también se puede permitir que forme un complejo con dextrina o cicloamilosa altamente ramificada. En este caso, la dextrina cíclica altamente ramificada se refiere a glucano con un grado de polimerización de 50 a 5000 que tiene un

50

resto de estructura cíclica ramificada interior y un resto de estructura ramificada exterior, que se produce al permitir que las enzimas ramificadoras actúen sobre la amilopectina. En este caso, el resto de estructura cíclica ramificada interior se refiere a un resto de estructura cíclica formado por un enlace α -1,4-glucósido y un enlace α -1,6-glucósido, y el resto de estructura ramificada exterior se refiere a un resto de estructura no cíclica unido al resto de estructura cíclica ramificada interior. Ejemplos de realizaciones preferidas de la dextrina cíclica altamente ramificada incluyen una en la que el grado de polimerización del resto de estructura cíclica ramificada interior del glucano mencionado anteriormente es de 10 a 100, una en la que el grado de polimerización del resto de estructura ramificada exterior del glucano mencionado anteriormente es 40 o superior, y una en la que un grado promedio de polimerización de cada cadena unitaria del resto de estructura ramificada exterior mencionado anteriormente es de 10 a 20. Asimismo, la dextrina cíclica altamente ramificada está disponible comercialmente, y esos productos comerciales también se pueden usar para la presente invención.

La cicloamilosa es un α -1,4-glucano cíclico, en el que las unidades de glucosa están unidas por un enlace α -1,4, y tiene un espacio tridimensional, hueco profundo, dentro de la estructura helicoidal. Aunque no se impone ninguna limitación particular sobre el grado de polimerización de la glucosa en cicloamilosa utilizada para la presente invención, por ejemplo, este es de 10 a 500, preferentemente de 10 a 100, y más preferentemente de 22 a 50. La cicloamilosa se puede preparar a partir de glucosa utilizando enzimas tal como la amilomaltasa. Asimismo, la cicloamilosa está disponible comercialmente, y esos productos comerciales también se pueden usar para la presente invención (véase el documento WO2009/61003).

El ARNip de la presente invención se puede preparar como una composición farmacéutica usando uno o más transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables mediante un método ordinario. La composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía de administración, tal como administración pulmonar, administración nasal, administración oral, administración rectal e inyección, y la administración puede ser sistémica o local. La forma de dosificación de la composición farmacéutica puede ser cualquier forma adecuada para uso de acuerdo con una vía de administración, tal como un líquido, una suspensión, una emulsión, un comprimido, una pastilla, un microgránulo, una cápsula, un polvo, una preparación de liberación sostenida, un supositorio, un aerosol y una pulverización.

Por ejemplo, en administración nasal, el principio activo se disuelve en un disolvente apropiado (tal como solución salina fisiológica y alcohol) y la solución resultante se inyecta o añade gota a gota a la nariz, por donde se puede suministrar el principio activo. Como alternativa, en la administración pulmonar o administración nasal, el principio activo se pulveriza con un aerosol de un paquete presurizado o un nebulizador usando un propelente apropiado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases apropiados, por lo que el principio activo se puede suministrar convenientemente. Cuando se usa un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede fijarse proporcionando una válvula para que se suministre una cantidad medida. Además, el principio activo también se puede administrar como un inhalante en polvo.

En el caso de las inyecciones, por ejemplo, el principio activo puede formularse como una solución para administración parenteral que se administrará mediante una inyección en bolo o una infusión continua (es decir, administración intravenosa o intramuscular), y se formula preferentemente como un tampón fisiológicamente compatible como la solución de Hanks, la solución de Ringer y solución salina fisiológica. Esta solución puede contener agentes medicinales que se permiten añadir, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el principio activo se puede preparar como un polvo para que se reconstruya con un diluyente apropiado, tal como agua esterilizada que no contiene sustancias termogénicas antes de su uso. Puede proporcionarse una preparación para inyección como, por ejemplo, una forma de dosificación unitaria en una ampolla o un recipiente de dosis múltiples con conservantes.

Para la administración oral, el agente terapéutico de la presente invención puede estar en forma de, por ejemplo, un comprimido, un gránulo, un polvo, una emulsión, una cápsula, un jarabe, una suspensión acuosa o aceitosa o un elixir. En el caso de un comprimido o una píldora, la composición se puede recubrir para retrasar la dispersión y la absorción en el tracto gastrointestinal para que se obtenga una acción de larga duración.

Aunque no se impone ninguna limitación al transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable, ejemplos de los mismos incluyen líquidos (tal como agua, aceite, solución salina fisiológica, una solución acuosa de dextrosa y etanol) y sólidos (tal como goma arábica, gelatina, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, talco, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, queratina, sílice coloidal, leche desnatada en polvo y glicerol). Asimismo, el agente terapéutico de la presente invención puede contener un agente apropiado que se añade a las composiciones farmacéuticas ordinarias, tal como un adyuvante, un antiséptico, un estabilizante, un agente espesante, un lubricante, un colorante, un agente humectante, un emulsionante y un tampón de pH.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener el ARNip de la presente invención en una cantidad de 0,001 a 50% en masa, preferentemente de 0,01 a 10% en masa, y más preferentemente de 0,1 a 1% en masa.

Aunque la dosis de la composición farmacéutica de la presente invención no está particularmente limitada siempre que se aplique la cantidad eficaz, por ejemplo, es preferentemente de 0,0001 a 100 mg, y más preferentemente de 0,002 a 1 mg por kg de peso corporal.

- 5 Para la composición de reticulación de la presente invención, en lugar del ARNip de la presente invención, también se puede usar un vector de expresión capaz de expresar el ARNip en un sujeto al que se administra el vector.

10 En este caso, el vector de expresión se puede construir, por ejemplo, insertando ADN capaz de codificar el ARNip de la presente invención en un vector apropiado utilizado para terapia génica, tal como un vector de adenovirus, un vector de virus adenoasociado (AAV), o un vector de lentivirus.

[Ejemplos]

- 15 A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá con mayor detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, el alcance técnico de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo 1 Producción de ARNip

- 20 Se diseñaron las moléculas de ARNip que se dirigen al gen TGF- β 1 como se muestra en la Tabla 3 a continuación y se sintetizó cada oligonucleótido de ARNip químicamente. Los oligonucleótidos resultantes se purificaron por HPLC antes de su uso. Los números de ARNip (b), (c), (d), (f), (g), (m), (p), (q), (r) y (s) son Ejemplos comparativos.

[Tabla 3]

N.º de ARNip	Posiciones de las bases del sitio diana	Sentido (5'→3')	Antisentido (5'→3')	SEQ ID NO	SEQ ID NO
(a)	1285-1305	CCGAGAAGCGGUACCUUGAACC	UUACAGGUACCGCUUCUCGGAG	2	3
(b)	1298-1318	CCUGAAACCCGUGUUGCUUCUCC	AGAGCAACACGGGUUCAGGUA	4	5
(c)	1398-1418	CCUGGGCAUACCUACGCAACC	UUUCUGAGGUUUCGCCAGGAA	6	7
(d)	1434-1454	GCGACUCGCCAGAGUGGUUAU	AACCACUCUGGCGAGUCGUCUG	8	9
(e)	1435-1455	CGACUCGCCAGAGUGGUUAUC	UAACCACUCUGGCGAGUCGUCU	10	11
(f)	1436-1456	GACUCGCCAGAGUGGUUAUCU	AUAACCACUCUGGCGAGUCGCG	12	13
(g)	1438-1458	CUCGCCAGAGUGGUUAUCUUU	AGAUAAACCACUCUGGCGAGUC	14	15
(h)	1440-1460	CGCCAGAGUGGUUAUCUUUUG	AAAAGUAACCACUCUGGCGAG	16	17
(i)	1441-1461	GCCAGAGUGGUUAUCUUUUGA	AAAAGUAACCACUCUGGCGGA	18	19
(j)	1443-1463	CAGAGUGGUUAUCUUUUGAUG	UCAAAAAGUAACCACUCUGGC	20	21
(k)	1548-1568	GGGAUAACACACUCGCAAGUGG	ACUUGCAGUGUGUUUUCUCCUG	22	23
(l)	1557-1577	CACUGCAAGUGGACAUCAACG	UUGAUGUCCACUUCGAGUGUG	24	25
(s)	1557-1579	CACACUGCAAGUGGACAUCAACG	CGUUUGAUGUCCACUUGCAGUGUG	54	55
(m)	1608-1628	CCACCAUUCAUGGCAUGAACC	UUCAUGCCAUUGAAUGGUGGCC	26	27
(n)	1700-1720	GCCCUGGACACCAACUAUJGC	AAUAGUUJGGUGUCCAGGGCUC	28	29
(o)	1706-1726	GACACCAACUAUUGCUUCAGC	UGAAAGCAAUAGUUGGUGUCCA	30	31
(P)	1778-1798	GACCUCGGCUGGAAGUGGAUC	UCCACUUCAGCCCGAGGUCCU	32	33
(q)	1806-1826	CCAAGGGCUACCAUGCCCAACU	UUGGCAUGGUAGCCCUUGGGC	34	35
(r)	1887-1907	CCUUGUACCAACCAGCAUAACC	UUUUGCUGGUUGUACAGGGCC	36	37

Ejemplo 2 Evaluación del efecto inhibitorio sobre la expresión de TGF- β 1 (*in vitro*)

(1) Célula

5 Se utilizaron células A549 derivadas de epitelio alveolar humano (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.).

(2) Condiciones de Cultivo

10 Usando medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) que contenía suero bovino fetal al 10% (con 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin), se sembraron 1×10^5 células en una placa de 12 pocillos. Después de cultivar en condiciones de 37 °C y 5% de CO₂ durante la noche, las células A549 fueron 40% confluentes y el medio se reemplazó con un medio sin suero.

(3) Tratamiento previo y la cantidad de adición de ARNip

15 Como ARNip, se utilizaron los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 3 anteriormente, y cuando las células alcanzaron una confluencia del 40%, se introdujeron los oligonucleótidos en las células mencionadas anteriormente utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

20 Específicamente, se añadieron 2,0 μ l de Lipofectamine 2000 a 98 μ l de OPTI-MEM (Invitrogen) por pocillo, y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos (solución A).

25 A 99,375 μ l de OPTI-MEM, se añadieron 0,625 μ l de una solución de ARNip de 0,2 μ M (solución B). Las soluciones A y B se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de la incubación, la mezcla AB se añadió a cada pocillo de la placa de 12 pocillos. El ARNip se añadió para que la concentración final fuera 0,1 nM.

(4) Tratamiento posterior

(i) Tratamiento con citoquinas

30 Seis horas después de la adición de la solución mixta de ARNip y Lipofectamine, se reemplazó el medio con medio D-MEM que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1% y citoquina (1 ng/ml de IL-1 β y 1 ng/ml de TNF- α), seguido de cultivo durante 12 horas. Después del cultivo, se tomaron muestras de los sobrenadantes del cultivo.

(ii) Extracción de ARN celular total

35 Para la extracción del ARN celular total, se utilizaron un aparato automatizado de extracción de ácido nucleico QuickGene-810 (Fujifilm Corporation) y kit S de ARN de células cultivadas QuickGene (Fujifilm Corporation), que era un kit exclusivo para QuickGene-810. Las células se lavaron con 1,0 ml de PBS, al que se añadieron 0,5 ml de una solución de lisis celular para extraer el ARN celular total. Después la adición de 0,5 ml de la solución de lisis (LRC, ya se añadió mercapto etanol) a la placa de 12 pocillos, la placa se agitó en un agitador de sierra durante cinco minutos. La solución se mezcló bien pipeteando de cinco a seis veces y se transfirió, a continuación, a un tubo Eppendorf. Al tubo Eppendorf, se añadieron 420 μ l de etanol y la mezcla resultante se agitó en un mezclador vórtex durante 15 segundos y se procesó, a continuación, en QuickGene-810. Durante el procesamiento en QuickGene-810, se añadió DNasa (DNasa RQ1 sin RNasa, Promega Corporation). Las muestras del ARN total extraído de este modo, se almacenaron en un refrigerador a -80 °C hasta el procesamiento posterior.

(iii) Conversión del ARN total en ADNc

50 Las concentraciones de ARN (μ g/ml) en las muestras del ARN total extraído de las células cultivadas se calcularon a partir del valor de absorción medido a 260 nm (control: tampón TE). Basándose en los valores obtenidos de este modo, la solución de cada muestra se colocó en una placa de 96 pocillos en una cantidad tal que la cantidad de ARN fuera de 0,1 μ g. A cada pocillo, se añadió agua destilada para llevar el volumen total a 12 μ l y, adicionalmente, se añadieron 2 μ l de tampón de eliminación de ADNg incluido en el kit de transcripción inversa QuantiTect (QIAGEN). Después de mezclar con un agitador vorticial, las muestras se incubaron a 42 °C durante dos minutos y se enfriaron, a continuación, a 4 °C. A estas muestras, se añadieron 1 μ l de Transcriptasa Inversa de QuantiTect, 4 μ l de tampón RT de QuantiTect y 1 μ l de Mezcla de cebadores RT incluido en el kit de Transcripción Inversa QuantiTect (QIAGEN), seguido de mezcla e incubación a 42 °C durante 15 minutos. Posteriormente, las muestras se calentaron a 95 °C durante tres minutos para inactivar la Transcriptasa Inversa de QuantiTect y se enfriaron, a continuación, a 4 °C.

60 La solución preparada de este modo (es decir, una solución de preparación de ADNc sin diluir) se diluyó 5 veces con un tampón TE y sirvió como una solución de ADNc para PCR dirigida al gen diana (TGF- β 1).

65 Asimismo, la solución de preparación de ADNc sin diluir se diluyó 50 veces con un tampón TE y sirvió como solución

de ADNc para PCR dirigida a GAPDH, que se seleccionó como un gen de referencia interno. Debe observarse que una solución de preparación de ADNc sin diluir de una muestra control (es decir, administración sin ARNip) se diluyó 1, 10, 100 y 1000 veces con un tampón TE y sirvió como una muestra para construir una curva de calibración para PCR dirigida a TGF- β 1. Del mismo modo, la solución de preparación de ADNc sin diluir de una muestra de control se diluyó 10, 100, 1000 y 10000 veces con un tampón TE y sirvió como una muestra para construir una curva de calibración para PCR dirigida a GAPDH.

(5) Método para medir el nivel de expresión de TGF- β 1

Para 2,5 μ l de un producto de ADNc derivado de TGF- β 1, que se usó como una plantilla, se añadieron 12,5 μ l de QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN) y 2,5 μ l de Ensayo de cebado QuantiTect (QIAGEN) para el gen TGF- β 1 o para el gen GAPDH derivado humano. A la solución, se añadió agua destilada esterilizada para llevar el volumen final a 25 μ l, por lo que se preparó una solución de reacción de PCR. A continuación, utilizando Applied Biosystems 7500 (Life Technologies Japan Ltd.), la solución preparada, de este modo, se calentó a 95 °C durante cinco minutos y se sometió, a continuación, a 40 ciclos de PCR, donde un ciclo incluyó 1) 95 °C durante 10 segundos y 2) 60 °C durante 35 segundos, seguido de un enfriamiento gradual desde 95 °C a 60 °C. La solución resultante se sometió a medición de disociación térmica. Basándose en el valor del ciclo umbral (Ct) derivado del proceso de amplificación por PCR, se corrigió la tasa de amplificación de cada gen diana basándose en el valor Ct del gen GAPDH, y se evaluó el efecto inhibitorio sobre el ARNm de un gen diana. Los resultados obtenidos de este modo se muestran en la FIG. 1 y Tabla 4.

[Tabla 4]

ARNip		Tasa de expresión del ARNm de TGF- β 1 (TGF- β 1/GAPDH)	
n.º	nM	Media	DE
a	0,1	24,7	7,6
b	0,1	85	8.9
c	0,1	51,8	12,3
d	0,1	58,5	6,4
e	0,1	27,5	2,2
f	0,1	52.1	4,1
g	0,1	51,8	7,5
h	0,1	29.3	8,6
i	0,1	31,5	12,5
j	0,1	40,1	6,9
k	0,1	22.2	6,6
l	0,1	12,2	6.7
s	1	50,1	4.3
m	0,1	71,6	10,4
n	0,1	39.7	4,7
o	0,1	11,7	3.1
p	0,1	55,5	4,4
q	0,1	51,3	4,4
r	0,1	53,4	7,8

Se encontró que los ARNip que tienen números de ARNip de d, p, r, f, c, g, q, j, n, i, h, e, a, k, l y o tienen una eficacia de inhibición sobre la expresión de TGF- β 1 del 40% o más, incluso a una concentración de 0,1 nM. De forma particular, los ARNip que tienen números de ARNip de l y o mostraron una eficacia de inhibición del 80% o superior incluso a 0,1 nM. Además, estas secuencias mostraron efectos inhibitorios notables también a 0,01 nM.

Ejemplo 3 Producción de ARNip quimérico

Basándose en el número (l) de ARNip, se diseñaron moléculas de ARNip quiméricas que se dirigen al gen TGF- β 1 como se muestra en la Tabla 5 a continuación y cada oligonucleótido de ARNip quimérico se sintetizó químicamente. Los oligonucleótidos resultantes se purificaron por HPLC antes de su uso.

[Tabla 5]

N.º de ARNip	Sentido (5'→3')	SEQ ID NO	Antisentido (5'→3')	SEQ ID NO
(I-C8a)	CACUGCAAGUGGAc <u>atcaacg</u>	38	ttgatUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	39
(I-C7)	CACUGCAAGUGGAC <u>atcaacg</u>	40	ttgatGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	41
(I-C6)	CACUGCAAGUGGAC <u>Atcaacg</u>	42	ttgaUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	43
(I-C5)	CACUGCAAGUGGACAU <u>caacg</u>	44	ttgAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	45
(I-C4a)	CACUGCAAGUGGACAU <u>Caacg</u>	46	ttGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	47
(I-C3)	CACUGCAAGUGGACAU <u>CAacg</u>	48	tUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	49
(I-C2)	CACUGCAAGUGGACAU <u>CAAcg</u>	50	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
(I-C1)	CACUGCAAGUGGACAU <u>CAACg</u>	51	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
(I-C4b)	CACUGCAAGUGGACAU <u>Caacg</u>	46	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>tg</u>	56

En la tabla, las letras mayúsculas, las letras minúsculas y los subrayados indican las posiciones de ARN, ADN y saliente, respectivamente.

5

Ejemplo 4 Evaluación del efecto inhibitorio sobre la expresión de TGF-β1

Utilizando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 5 (concentración: 10 nM o 0,1 nM), se evaluó el efecto inhibitorio sobre la expresión de TGF-β1 mediante un método similar al del Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la FIG. 2 y la Tabla 6.

10

[Tabla 6]

ARNip		Tasa de expresión del ARNm de TGF-β1 (TGF-β1/GAPDH)	
n.º	nM	Media	DE
I	10	34,9	4,2
I-C8a	10	56,6	13,2
I-C7	10	37,5	5,1
I-C6	10	38,8	0,5
I-C5	10	35,1	6,2
I-C4a	10	37,2	8,0
I-C3	10	23,0	6,3
I-C2	10	38,4	7,9
I-C1	10	33,0	2,5
I-C4b	0,1	69,9	4,3

Ejemplo 5 Síntesis de ARNip quimérico unido a fosfato o tiofosfato

15

Basándose en el número (I) de ARNip, se diseñaron moléculas de ARNip quiméricas unidas a fosfato o tiofosfato que se dirigen al gen TGF-β1 como se muestra en la Tabla 7 a continuación y cada oligonucleótido de ARNip quimérico se sintetizó químicamente. Los oligonucleótidos resultantes se purificaron por HPLC antes de su uso.

20

[Tabla 7]

N.º de ARNip	Sentido (5'→3')	SEQ ID NO	Antisentido (5'→3')	SEQ ID NO
(I-CP8a)	CACUGCAAGUGGAC <u>atcaacg</u>	38	P-ttgatUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	39
(I-CP7)	CACUGCAAGUGGAC <u>atcaacg</u>	40	P-ttgatGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	41
(I-CP6)	CACUGCAAGUGGAC <u>Atcaacg</u>	42	P-ttgaUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	43
(I-CP5)	CACUGCAAGUGGACAU <u>caacg</u>	44	P-ttgAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	45
(I-CP4a)	CACUGCAAGUGGACAU <u>Caacg</u>	46	P-ttGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	47
(I-CP3a)	CACUGCAAGUGGACAU <u>CAacg</u>	48	P-tUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	49

N.º de ARNip	Sentido (5'→3')	SEQ ID NO	Antisentido (5'→3')	SEQ ID NO
(I-CP2)	CACUGCAAGUGGACAUCA <u>Acg</u>	50	P-UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
(I-CP1)	CACUGCAAGUGGACAUCA <u>ACg</u>	51	P-UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
(I-CP)	CACUGCAAGUGGACAUCA <u>ACG</u>	24	P-UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
(I-CP8b)	CACUGCAAGUGGACA <u>catcaacg</u>	38	P-UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>tg</u>	56
(I-CP4b)	CACUGCAAGUGGACAUC <u>aacg</u>	46	P-UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>tg</u>	56
(I-CPS4b)	CACUGCAAGUGGACAUC <u>aacg</u>	46	PS-UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>tg</u>	56
(I-CP3b)	CACUGCAAGUGGACAUCA <u>kcg</u>	57	P-UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>tg</u>	56

En la tabla, las letras mayúsculas, las letras minúsculas y los subrayados indican las posiciones de ARN, ADN y saliente, respectivamente. Asimismo, P y PS indican la fosforilación del terminal 5 y la tiofosforilación del terminal 5, respectivamente.

5

Ejemplo 6 Evaluación del efecto inhibitorio sobre la expresión de TGF-β1

Utilizando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 7, se evaluó el efecto inhibitorio sobre la expresión de TGF-β1 mediante un método similar al del Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la FIG. 3 y la Tabla 8.

10

[Tabla 8]

ARNip		Tasa de expresión del ARNm de TGF-β1 (TGF-β1/GAPDH)	
n.º	nM	Media	DE
I-CP8a	0,1	72,0	3,8
I-CP7	0,1	56,1	2,7
I-CP6	0,1	48,2	0,4
I-CP5	0,1	49,4	3,4
I-CP4a	0,1	45,1	3,6
I-CP3a	0,1	30,6	18,2
I-CP2	0,1	43,1	6,1
I-CP1	0,1	36,1	2,0
I-CP	0,1	44,9	2,0
I-CP8b	0,1	57,1	12,4
I-CP4b	0,1	46,4	17,4
I-CPS4b	0,1	70,8	2,2
I-CP3b	0,1	42,1	2,9

Ejemplo 7 Síntesis de ARNip que tiene ADN en su porción saliente

15 Basándose en el número (I) de ARNip, se diseñaron las moléculas de ARNip que tienen ADN en la porción saliente y que se dirigen al gen TGF-β1 como se muestra en la Tabla 9 a continuación y se sintetizó cada oligonucleótido de ARNip químicamente. Los oligonucleótidos resultantes se purificaron por HPLC antes de su uso.

[Tabla 9]

N.º de ARNip	Sentido (5'→3')	SEQ ID NO	Antisentido (5' → 3')	SEQ ID NO
I-OHa1	CACUGCAAGUGGACAUCA <u>ACGt</u>	58	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
I-OHa2	CACUGCAAGUGGACAUCA <u>ACGtt</u>	59	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
I-OHa3	CACUGCAAGUGGACAUCA <u>ACGttt</u>	60	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
I-OHa4	CACUGCAAGUGGACAUCA <u>ACGtttt</u>	61	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25

N.º de ARNip	Sentido (5'→3')	SEQ ID NO	Antisentido (5' → 3')	SEQ ID NO
I-OHa5	CACUGCAAGUGGACAUCAACG <u>ttttt</u>	62	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
I-OHa6	CACUGCAAGUGGACAUCAACG <u>tttttt</u>	63	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
I-OHa7	CACUGCAAGUGGACAUCAACG <u>ttttttt</u>	64	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
I-OHb1	CACUGCAAGUGGACAUCAACG <u>ta</u>	65	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
I-OHb2	CACUGCAAGUGGACAUCAACG <u>ttaa</u>	66	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
I-OHb3	CACUGCAAGUGGACAUCAACG <u>tttaaa</u>	67	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
I-OHb4	CACUGCAAGUGGACAUCAACG <u>ttttaaaa</u>	68	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
I-OHb5	CACUGCAAGUGGACatcaacg <u>ttaa</u>	69	ttgatgUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	39
I-OHb6	CACUGCAAGUGGACatcaacg <u>tttaaa</u>	70	ttgatgUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	39

En la tabla, las letras mayúsculas, las letras minúsculas y los subrayados indican las posiciones de ARN, ADN y saliente, respectivamente.

5 Ejemplo 8 Evaluación del efecto inhibitorio sobre la expresión de TGF-β1

Utilizando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 9, se evaluó el efecto inhibitorio sobre la expresión de TGF-β1 mediante un método similar al del Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

10

[Tabla 10]

ARNip		Tasa de expresión del ARNm de TGF-β1 (TGF-β1/GAPDH)	
n.º	nM	Media	DE
I-OHa1	0,1	26,0	1,0
I-OHa2	0,1	34,0	6,2
I-OHa3	0,1	32,8	3,8
I-OHa4	0,1	25,4	1,9
I-OHa5	0,1	27,4	1,5
I-OHa6	0,1	40,1	6,2
I-OHa7	1,0	39,7	22,6
I-OHb1	1	24,9	1,7
I-OHb2	1	25,6	0,9
I-OHb3	1	22,8	3,5
I-OHb4	1	20,4	1,5
I-OHb5	1	48,6	7,6
I-OHb6	1	46,6	6,7

Ejemplo 9 Evaluación de la eficacia en un modelo de fibrosis pulmonar (estudio *in vivo*)

15 Basándose en el número (q) de ARNip (SEQ ID NO: 34 y 35), que es una secuencia compartida entre ratones y seres humanos, se diseñaron el ARNip quimérico (q-C8: cadena sentido (5' → 3'): CCAAGGGCUACCAtgccaact (SEQ ID NO: 52), cadena antisentido (5' → 3'): ttgcaUGGUAGCCCUUGGGC (SEQ ID NO: 53), y se sintetizaron de manera similar a la del Ejemplo 3, los oligonucleótidos de ARNip quiméricos y se purificaron, a continuación, por HPLC. Usando los oligonucleótidos de ARNip quiméricos resultantes como sustancias de prueba, se evaluó la

20

Después de la administración intraperitoneal de pentobarbital (el producto de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a ratones (C57BL/6NCrSlc (SLC), hembra, 13 semanas de edad), se implantaron bombas osmóticas ALZET™ (modelo 2001, DURECT Corporation) debajo de la piel de la espalda de los ratones bajo anestesia para producir ratones con fibrosis pulmonar. Debe observarse que se infundieron 200 µl de una solución de aproximadamente 10 mg/ml de bleomicina en solución salina fisiológica en la bomba osmótica ALZET™ por adelantado, y para

25

Tres, siete y 14 días después de la implantación de la bomba osmótica ALZET™, las sustancias de prueba se disolvieron en agua destilada (el producto de Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) y se administraron por vía

intratraqueal usando MicroSprayer™ (modelo IA-1C, Penn- Century, Inc.) a una dosis de 100 µg/cuerpo. Los volúmenes de dosis fueron de 75 µl/cuerpo en los días 3 y 7, y de 50 µl/cuerpo en el día 14 después del inicio de la administración de bleomicina.

- 5 Asimismo, como el control comparativo, se preparó un grupo en el que se infundieron 200 µl solamente de solución salina fisiológica en la bomba osmótica ALZET™ y se administró agua destilada como sustancia de prueba, y un grupo en el que se infundieron 200 µl de una solución de aproximadamente 10 mg/ml de bleomicina en solución salina fisiológica en la bomba osmótica ALZET™ y se administró agua destilada como sustancia de prueba.
- 10 Veintiún días después de la implantación de la bomba osmótica ALZET™, se administró a los ratones pentobarbital por vía intraperitoneal y, bajo anestesia, se extirparon la piel y el músculo del cuello para exponer la tráquea. Los ratones se sacrificaron por exanguinación a través de la vena yugular y, posteriormente, utilizando una aguja permanente, se infundieron 2 ml de solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) en la tráquea en tres dosis divididas, y se recogieron aproximadamente 2 ml de fluido de lavado broncoalveolar (BALF).
- 15 Posteriormente, se abrió el tórax y se realizó una incisión en la aurícula izquierda, y se perfundió aproximadamente 1 ml de solución salina fisiológica del ventrículo derecho y se extirparon los pulmones. Para la evaluación histológica, se sumergió el lóbulo izquierdo de los pulmones extirpados en una solución de fijación con tampón neutro con formalina al 10% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).
- 20 El BALF recogido de este modo, se centrifugó (2000 rpm, 4 °C, durante 10 minutos) y se midió la cantidad de proteína TGF-β1 en el sobrenadante por ELISA. Los resultados se muestran en la Fig. 4. En la FIG. 4, SAL, AD y BLM representan solución salina, agua destilada y bleomicina, respectivamente.
- 25 El tejido pulmonar fijado con una solución de fijación con tampón neutro con formalina al 10% se embebió en parafina y se prepararon secciones de tejido, que se sometieron a tinción con hematoxilina-eosina (H.E.) y tinción con tricrómico de Masson. El diagrama de tejido se muestra en la Figura 5.

30 De la fig. 4, en el grupo de administración de sustancias de prueba (BLM/TGF-β1), se encontró que la cantidad de TGF-β1 en BALF disminuyó notablemente. Este efecto no se observó en el grupo de administración de agua destilada (BLM/AD) como control comparativo. Asimismo, del diagrama de tejido de la FIG. 5, se encontró que los grados de inflamación y formación de fibrillas se redujeron en el grupo de administración de la sustancia de prueba.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> MIE UNIVERSITY
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD
- < 120> AGENTE PREVENTIVO O TERAPÉUTICO PARA LA FIBROSIS
- 40 <130> OP0063
- <150> JP 2010-231946
<151> 14/10/2010
- 45 <160> 70
- <170> PatentIn versión 3.1
- 50 <210> 1
<211> 2346
<212> ARN
<213> Homo sapiens
- 55 <400> 1

ES 2 720 135 T3

ccuucgcgcc cugggccauc ucccucccac cucccuccgc ggagcagcca gacagcgagg 60
 gccccgggccg ggggcagggg ggacgccccg uccggggcac cccccggcu cugagccgcc 120
 cgcggggccg gccucggccc ggagcggagg aaggagucgc cgaggagcag ccugaggccc 180
 cagagucuga gacgagccgc cgccgcccc gccacugcgg ggaggagggg gaggaggagc 240
 gggaggaggg acgagcuggu cgggagaaga ggaaaaaac uuuugagacu uuuccguugc 300
 cgcugggagc cggaggcgcg gggaccucuu ggcgcgacgc ugccccgcga ggaggcagga 360
 cuuggggacc ccagaccgcc uccuuugcc gccggggacg cuugcucccu cccugcccc 420
 uacacggcgu cccucaggcg cccccauucc ggaccagccc ucgggagucg ccgaccggc 480
 cucccgaaa gacuuuucc cagaccucgg gcgcaccccc ugcacgccgc cuucauucc 540
 ggcugucuc cugagcccc gcgcauccua gaccuuucu ccuccaggag acggaucucu 600
 cuccgaccug ccacagaucc ccuauucaag accaccacc uucugguacc agaucgcgcc 660
 caucuagguu auuuccgugg gauacugaga ccccccggu ccaagccucc ccuccaccac 720
 ugcgccuuc ucccugagga ccucagcuuu cccucgaggc ccuccuaccu uuugccggga 780
 gacccccagc cccugcaggg gcggggccuc cccaccacac cagcccuguu cgcgcucucg 840
 gcagugccgg ggggcgcgc cuccccaug ccgcccuccg ggcugcggcu gcugccgcug 900
 cugcuaccgc ugcuguggcu acuggugcug acgccuggcc ggccggccgc gggacuaucc 960
 accugcaaga cuaucgacau ggagcuggug aagcggagc gcaucgaggc cauccgcggc 1020
 cagaucuguu ccaagcugcg gcucgccagc cccccgagcc agggggaggu gccgcccggc 1080
 ccgucgcccg aggccgugcu cgcccuguaa aacagcacc gcgaccgggu ggccggggag 1140
 agugcagaac cggagcccga gccugaggcc gacuacuacg ccaaggaggu caccgcgug 1200
 cuaauggugg aaaccacaa cgaaaucua gacaaguuca agcagaguac acacagcaua 1260

ES 2 720 135 T3

uauauguucu ucaacacauc agagcuccga gaagcggguac cugaacccgu guugcucucc 1320
 cgggcagagc ugcgucugcu gaggcucaag uuaaaagugg agcagcacgu ggagcugvac 1380
 cagaaauaca gcaacaauuc cuggcgauac cucagcaacc ggcugcuggc acccagcgac 1440
 ucgccagagu gguuaucuuu ugaugucacc ggaguugugc ggcagugguu gagccgugga 1500
 ggggaaauug agggcuuucg ccuuagcgcc cacugcuccu gugacagcag ggauaacaca 1560
 cugcaagugg acaucaacgg guucacuacc ggccgccgag gugaccuggc caccuucau 1620
 ggcaugaacc ggccuuuccu gcuucucaug gccaccccgc uggagagggc ccagcaucug 1680
 caaagcuccc ggccaccgag agcccuggac accaacuaau gcuucagcuc cacggagaag 1740
 aacugcugcg ugcggcagcu guacauugac uuccgcaagg accucggcug gaaguggauc 1800
 cacgagccca agggcuacca ugccaacuuc ugccucgggc ccugcccccua cauuuggagc 1860
 cuggacacgc aguacagcaa gguccuggcc cuguacaacc agcauaaccg gggcgccucg 1920
 gcggcgccgu gcugcgugcc gcagggcgug gagccgcugc ccaucgugua cuacgugggc 1980
 cgcaagccca agguggagca gcuguccaac augaucgugc gcuccugcaa gugcagcuga 2040
 ggucccgccc cgccccgccc cgccccggca ggccccggccc caccocgccc cgcccccgcu 2100
 gccuugccca ugggggcugu auuaaaggac acccgugccc caagcccacc uggggcccca 2160
 uuaaagaugg agagaggacu gcggaucucu gugucauugg gcgccugccu ggggucucca 2220
 ucccugacgu uccccacuc ccacuccuc ucucuccuc ucugccuccu ccugccuguc 2280
 ugcacuauc cuuugcccgg caucaaggca caggggacca guggggaaca cuacuguagu 2340
 uagauc 2346

5 <210> 2
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 2
 ccgagaagcg guaccugaac c 21

15 <210> 3
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 3
 uucagguacc gcuucucgga g 21

25 <210> 4
 <211> 21
 <212> ARN

ES 2 720 135 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

5

<400> 4
ccugaacccg uguugcucuc c 21

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

10

<220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

15

<400> 5
agagcaacac gguucaggu a 21

20

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

25

<220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

30

<400> 6
ccuggcgaua ccucagcaac c 21

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

35

<220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

40

<400> 7
uugcugaggu aucgccagga a 21

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

45

<220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

50

<400> 8
gcgacucgcc agagugguua u 21

<210> 9
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

60

<400> 9
aaccacucug gcgagucgu g 21

<210> 10
<211> 21
<212> ARN

65

ES 2 720 135 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

5

<400> 10
cgacucgcca gagugguuau c 21

<210> 11
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

15

<400> 11
uaaccacucu ggcgagucgc u 21

20

<210> 12
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

30

<400> 12
gacucgccag agugguuau c 21

<210> 13
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

40

<400> 13
auaaccacuc uggcgagucg c 21

<210> 14
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

50

<400> 14
cucgccagag ugguuau cuu u 21

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

55

<220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

60

<400> 15
agauaaccac ucuggcgagu c 21

<210> 16
<211> 21

65

ES 2 720 135 T3

<212> ARN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 16
cgccagagug guuauuuuu g 21

10 <210> 17
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 17
aaagauaacc acucuggcga g 21

20 <210> 18
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

30 <400> 18
gccagagugg uuauuuuuug a 21

35 <210> 19
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

40 <400> 19
aaaagauaac cacucuggcg a 21

45 <210> 20
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

50 <400> 20
cagagugguu auuuuuugau g 21

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

60 <220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 21
ucaaagaua accacucugg c 21

65 <210> 22
<211> 21

ES 2 720 135 T3

<212> ARN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 22
gggauaacac acugcaagug g 21

10 <210> 23
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

20 <400> 23
acuugcagug uguuaucucu g 21

25 <210> 24
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 24
cacugcaagu ggacaucaac g 21

35 <210> 25
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 25
uugaugucca cuugcagugu g 21

45 <210> 26
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 26
ccaccauuca uggcaugaac c 21

55 <210> 27
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 27
uucaugccau gaauggugc c 21

65 <210> 28
<211> 21

ES 2 720 135 T3

<212> ARN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 28
gcccuggaca ccaacuauug c 21

10 <210> 29
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

20 <400> 29
aauguuggu guccagggcu c 21

25 <210> 30
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 30
gaccaacu auugcuucag c 21

35 <210> 31
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 31
ugaagcaua guuggugucc a 21

45 <210> 32
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 32
gaccucggcu ggaaguggau c 21

55 <210> 33
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 33
uccacuucca gccgaggucc u 21

65 <210> 34
<211> 21

ES 2 720 135 T3

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 34
 ccaagggcua ccaugccaac u 21

10 <210> 35
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

20 <400> 35
 uuggcauggu agcccuuggg c 21

25 <210> 36
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 36
 cccuguacaa ccagcauaac c 21

35 <210> 37
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

<400> 37
 uuaugcuggu uguacagggc c 21

45 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> ARN

<400> 38
 cacugcaagu ggacatcaac g 21

60 <210> 39
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

ES 2 720 135 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(21)
 <223> ARN
 5
 <400> 39
 ttgatgucca cuugcagugu g 21
 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(14)
 <223> ARN
 20
 <400> 40
 cacugcaagu ggacatcaac g 21
 25
 <210> 41
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(21)
 <223> ARN
 35
 <400> 41
 ttgatgucca cuugcagugu g 21
 40
 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> ARN
 50
 <400> 42
 cacugcaagu ggacatcaac g 21
 55
 <210> 43
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente
 65
 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 720 135 T3

<222> (5)..(21)
 <223> ARN

5 <400> 43
 ttgaugucca cuugcagugu g 21

10 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> ARN

20 <400> 44
 cacugcaagu ggacaucaac g 21

25 <210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(21)
 <223> ARN

<400> 45
 ttgaugucca cuugcagugu g 21

40 <210> 46
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(17)
 <223> ARN

<400> 46
 cacugcaagu ggacaucaac g 21

55 <210> 47
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(21)
 <223> ARN

ES 2 720 135 T3

<400> 47
 ttgaugucca cuugcagugu g 21

5 <210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> ARN

20 <400> 48
 cacugcaagu ggacaucaac g 21

25 <210> 49
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(21)
 <223> ARN

40 <400> 49
 tugaugucca cuugcagugu g 21

45 <210> 50
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN

60 <400> 50
 cacugcaagu ggacaucaac g 21

65 <210> 51
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

75 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> ARN

80 <400> 51
 cacugcaagu ggacaucaac g 21

<210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> ARN
 <400> 52
 15 ccaagggcua ccatgccaac t 21
 <210> 53
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(21)
 <223> ARN
 30 <400> 53
 ttggcauggu agcccuuggg c 21
 <210> 54
 <211> 23
 35 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente
 40 <400> 54
 cacacugcaa guggacauca acg 23
 <210> 55
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente
 50 <400> 55
 uguugauguc cacuugcagu gug 23
 55 <210> 56
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> una cadena en antisentido de ARNip sintetizada artificialmente
 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN

ES 2 720 135 T3

<400> 56
 uugaugucca cuugcagugt g 21

5 <210> 57
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> ARN

<400> 57
 cacugcaagu ggacaucaac g 21

20 <210> 58
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> ARN

35 <400> 58
 cacugcaagu ggacaucaac gt 22

40 <210> 59
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> ARN

50 <400> 59
 cacugcaagu ggacaucaac gtt 23

55 <210> 60
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> ARN

65 <400> 60
 cacugcaagu ggacaucaac gttt 24

ES 2 720 135 T3

5 <210> 61
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN

15 <400> 61
cacugcaagu ggacaucaac gtttt 25

20 <210> 62
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN

30 <400> 62
cacugcaagu ggacaucaac gtttt 26

35 <210> 63
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN

45 <400> 63
cacugcaagu ggacaucaac gttttt 27

50 <210> 64
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN

60 <400> 64
cacugcaagu ggacaucaac gtttttt 28

65 <210> 65
<211> 23

<212> ADN
 <213> Artificial

5
 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> ARN

15
 <400> 65
 cacugcaagu ggacaucaac gta 23

20
 <210> 66
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

25
 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> ARN

35
 <400> 66
 cacugcaagu ggacaucaac gtaa 25

40
 <210> 67
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

45
 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> ARN

55
 <400> 67
 cacugcaagu ggacaucaac gttaaa 27

60
 <210> 68
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

65
 <220>
 <223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

70
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> ARN

75
 <400> 68
 cacugcaagu ggacaucaac gtttaaaa 29

80
 <210> 69
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 720 135 T3

<220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN

10 <400> 69
cacugcaagu ggacatcaac gttaa 25

<210> 70
<211> 27
15 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> una cadena en sentido de ARNip sintetizada artificialmente

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN

25 <400> 70
cacugcaagu ggacatcaac gtttaa 27

REIVINDICACIONES

1. Un ARNip que tiene una longitud total de 21 a 23 nucleótidos, que se selecciona de los siguientes (a) a (o):
 - 5 (a) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 2 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 3;
 - (e) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 10 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 11;
 - 10 (h) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 16 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 17;
 - (i) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 18 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 19;
 - (j) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 20 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 21;
 - 15 (k) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 22 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 23;
 - (l) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 24 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 25;
 - 20 (n) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 28 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 29; y
 - (o) un ARNip que comprende una secuencia en sentido de la SEQ ID NO: 30 y una secuencia antisentido de la SEQ ID NO: 31.
- 25 2. El ARNip de acuerdo con la reivindicación 1, donde se convierten en ADN de 1 a 10 nucleótidos consecutivos que excluyen un nucleótido saliente del extremo 3' de la cadena en sentido del ARNip.
3. El ARNip de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde se convierten en ADN de 1 a 10 nucleótidos consecutivos del extremo 5' de la cadena antisentido del ARNip.
- 30 4. El ARNip de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde se convierten en ADN de 1 a 10 nucleótidos consecutivos excluyendo un nucleótido saliente del extremo 3' de la cadena en sentido del ARNip y se convierten en ADN de 1 a 10 nucleótidos consecutivos del extremo 5' de la cadena antisentido del ARNip.
- 35 5. El ARNip de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el extremo 5' de la cadena antisentido está monofosforilado o monotiofosforilado.
6. El ARNip de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde un nucleótido es un análogo de nucleótido que tiene un azúcar, base, y/o fosfato modificado químicamente.
- 40 7. Una composición farmacéutica que comprende el ARNip de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Un inhibidor de la expresión del gen TGF-β1 que comprende el ARNip de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como principio activo.
- 45 9. Un agente preventivo o terapéutico para la fibrosis que comprende el ARNip de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como principio activo.
- 50 10. Un agente preventivo o terapéutico para la fibrosis pulmonar o el cáncer de pulmón que comprende el ARNip de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como principio activo.
- 55 11. El uso del ARNip de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la producción de un agente preventivo o terapéutico para la fibrosis o para la producción de un agente preventivo o terapéutico para la fibrosis pulmonar o cáncer de pulmón.
- 60 12. El ARNip de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la prevención o el tratamiento de la fibrosis.
13. El ARNip de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la prevención o tratamiento de la fibrosis pulmonar o cáncer de pulmón.

FIG. 1

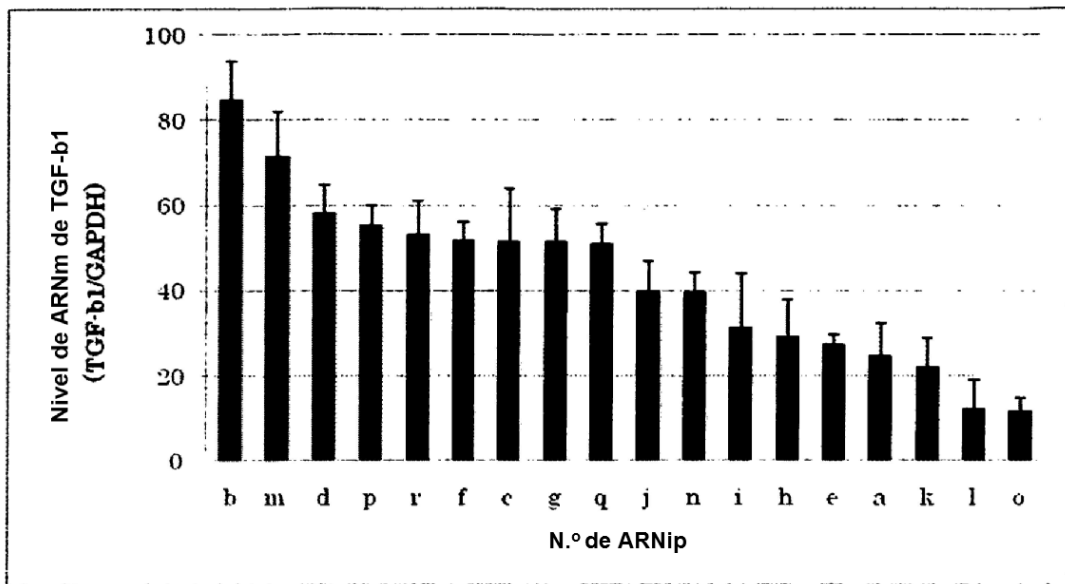


FIG. 2

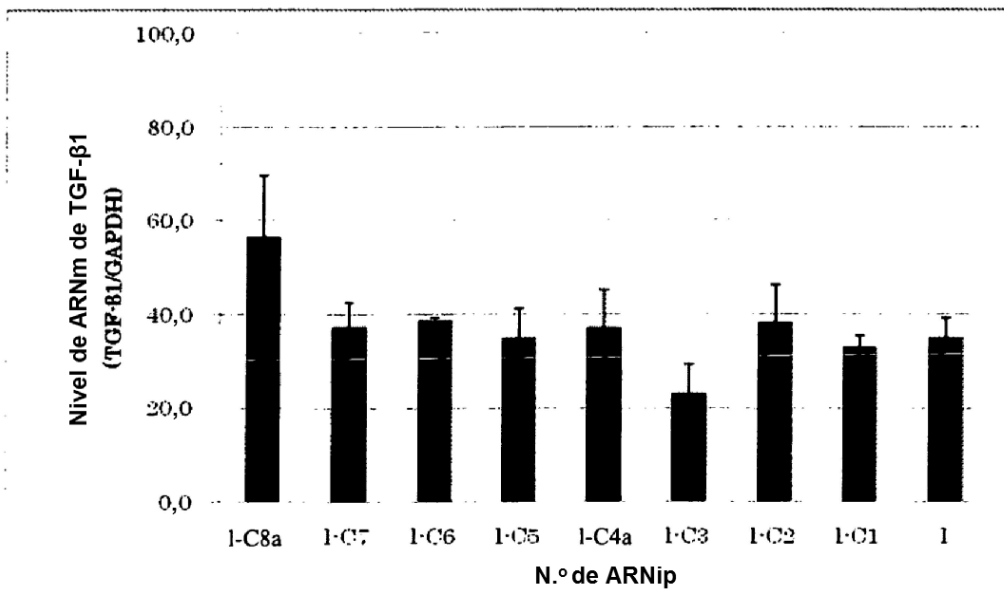


FIG. 3

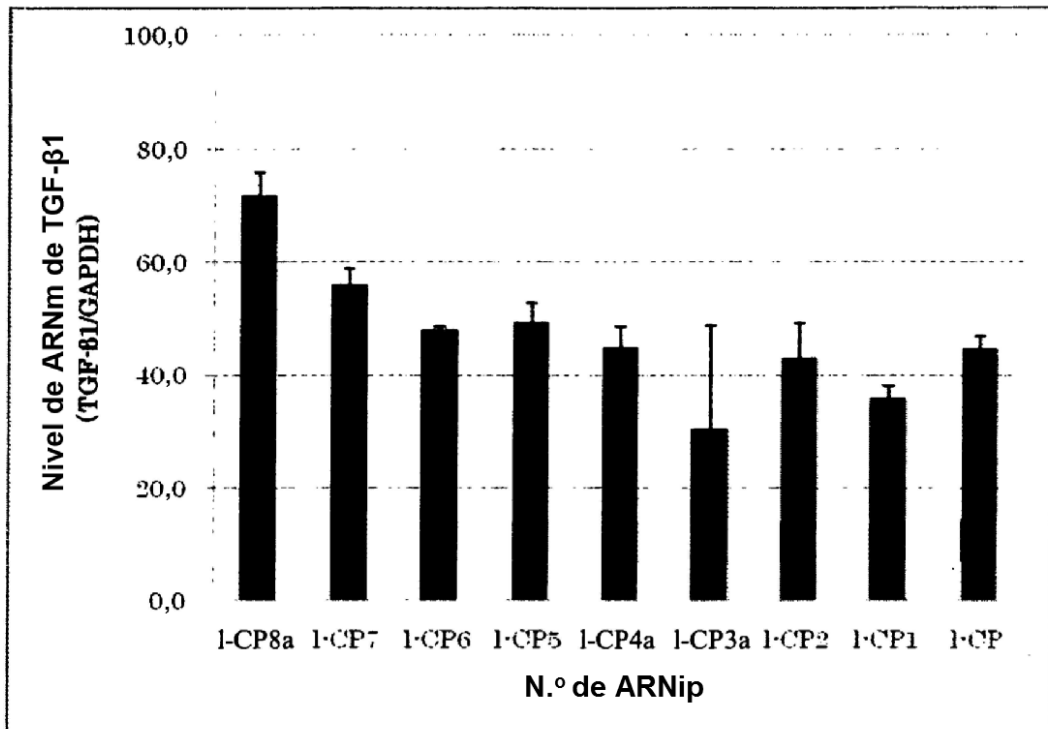


FIG. 4

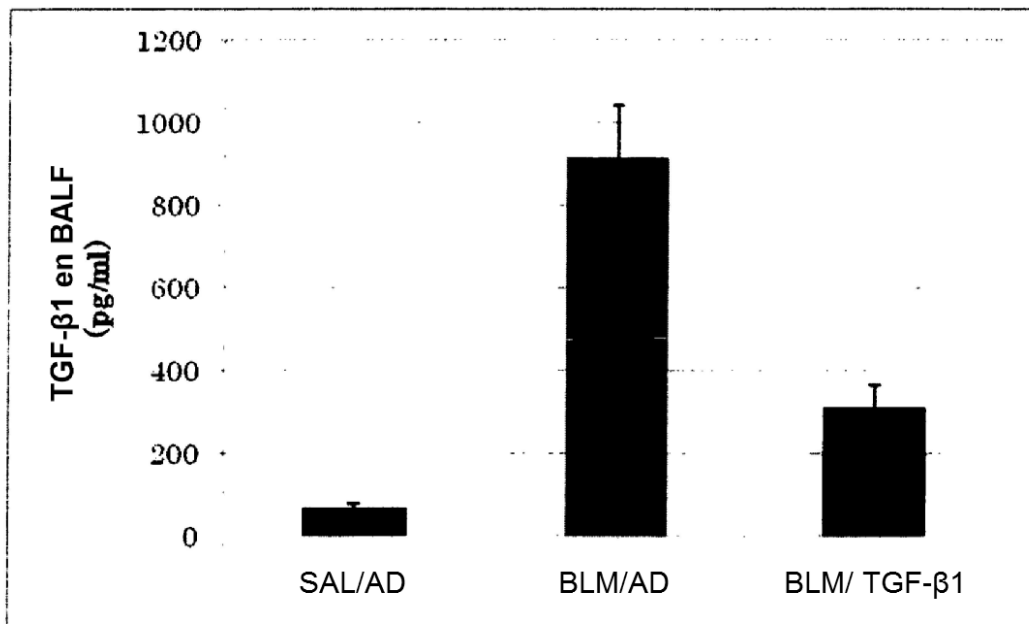


FIG. 5

