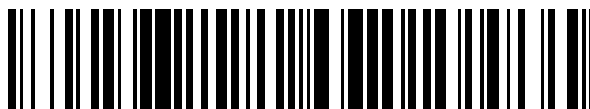


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 929**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2011** **PCT/KR2011/006632**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012** **WO12053741**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2011** **E 11834541 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019** **EP 2631291**

54 Título: **Moléculas de ácido nucleico que inducen interferencia de ARN y usos de las mismas**

30 Prioridad:

27.06.2011 KR 20110062504
22.10.2010 KR 20100103701

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
26.11.2019

73 Titular/es:

OLIX PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1014, Gwanggyo Ace Tower 1, 17, Daehak 4-ro,
Yeongtong-gu, Suwon-si
Gyeonggi-do 16226, KR

72 Inventor/es:

LEE, DONG KI

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 732 929 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

Moléculas de ácido nucleico que inducen interferencia de ARN y usos de las mismas

5 CAMPO TÉCNICO

La presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi que tiene una nueva estructura y el uso de la misma, y más particularmente a una nueva molécula de ácido nucleico que tiene una estructura que consiste en una primera cadena, que es de 24-121 nucleótidos (nt) de longitud y comprende una
 10 región parcial complementaria a un ácido nucleico diana, y una segunda cadena que tiene una longitud de 13-21 nt y tiene una región que se une de manera complementaria a la región parcial complementaria al ácido nucleico diana dentro de la primera cadena, de modo que la molécula de ácido nucleico inhibe la expresión del gen diana con mayor eficiencia, y a un procedimiento para inhibir la expresión de un gen diana utilizando 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
 20 ARN bicatenario, que comprende una cadena con sentido que tiene una secuencia homóloga al ARNm del gen diana 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.

En la mayoría de los siRNA que se han utilizado en la técnica, la longitud de la cadena antisentido está limitada a
 25 19-23 nucleótidos (nt). Esto se debe a que la estructura de los siRNA que han sido utilizados por los investigadores imita la estructura de los productos obtenidos al cortar ARNds largos en las células con una dicer (Elbashir y col., Nature 2001, 411:494-498). Además, los primeros estudios de cristalografía de rayos X sugirieron un modelo donde los extremos 5' y 3' de la cadena antisentido de siRNA introducida en Argonauta-2 (Ago2), que es el elemento clave de un complejo RISC, se unen al dominio medio y el bolsillo de unión del dominio PAZ, respectivamente (Song y col.
 30 Nat. Struct. Biol. 2003, 10:1026-1032), pero estudios posteriores revelaron que el extremo 3' que sigue al 16.º nucleótido de la cadena antisentido no está unido al dominio PAZ (Wang y col. Nature 2009, 461:754-761). Esto sugiere que puede haber flexibilidad en la secuencia y la longitud del extremo 3' de la cadena antisentido siRNA.

Mientras tanto, un estudio adicional sobre siRNA informó sobre un constructo de siRNA-ADN modificado, que
 35 comprende una molécula de ADN monocatenaria que puede funcionar como un cebador de la PCR para detectar siRNA en una muestra (documento US 2009/0012022 A1). Sin embargo, el constructo de siRNA-ADN modificado simplemente tiene una herramienta adicional para la cuantificación, pero no tiene una influencia positiva en la eficiencia con la que se inhibe un gen diana.

Por consiguiente, los presentes inventores han realizado grandes esfuerzos para conseguir una nueva molécula de ácido nucleico inductora de ARNi que inhiba un gen diana con mayor eficacia y, como resultado, han diseñado una molécula de ácido nucleico bicatenaria 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 13-21 nt y tiene una región que se une de manera complementaria a la región de la primera cadena, que es
 45 complementaria al ácido nucleico diana y los presentes inventores han predicho que un oligonucleótido de ácido nucleico contenido en la región monocatenaria en el extremo 3' de la primera cadena se dirigirá a otros genes diana o guiará esta molécula de ácido nucleico al gen diana. Además, los presentes inventores han construido una estructura de molécula de ácido nucleico, que tiene una región monocatenaria larga en el extremo 3' de la primera cadena, utilizando una estructura de siRNA (publicación de patente coreana en trámite N.º 10-2009-0065880).
 50 presentada por los presentes inventores) que muestra efectos distintos a los deseados minimizados y no satura la maquinaria de ARNi, y los presentes inventores han predicho que un oligonucleótido de ácido nucleico, que está contenido en la región monocatenaria en el extremo 3' de la primera cadena, puede mostrar el efecto de dirigirse a otros genes diana o guiar el siRNA en el extremo 5' del gen diana, mientras que los efectos distintos a los deseados se minimizan, cumplimentando así la presente invención.

55

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.

60 RESUMEN DE LA INVENCION

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi que tiene una nueva estructura y un efecto mejorado sobre la inhibición de la expresión génica.

Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi que comprende una primera cadena y una segunda cadena, donde la primera cadena tiene una longitud de 24-31 nt y es complementaria de un ácido nucleico diana y comprende una región monocatenaria de 10-15 nt de longitud, donde la segunda cadena tiene una longitud de 13-16 nt y se une de manera complementaria a la primera cadena, y donde el extremo 5' de la primera cadena y el extremo 3' de la segunda cadena forman un extremo romo.

La presente invención también proporciona un complejo de ácido nucleico que comprende un vehículo de suministro celular unido a la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi.

La presente invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para la administración intracelular de una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi, comprendiendo el procedimiento introducir el complejo de ácido nucleico anterior en una célula.

La presente invención también proporciona una composición para inhibir la expresión génica, que contiene la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi anterior.

La presente invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para inhibir la expresión génica, que comprende una etapa de introducción de la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi anterior en una célula.

La presente invención también proporciona un procedimiento *in vitro* 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.

La presente invención también proporciona una composición anticancerosa que contiene la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi anterior.

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

Las figuras que no pertenecen a la invención son solo para fines ilustrativos.

La fig. 1 es una vista esquemática que muestra una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi según la presente descripción.

La fig. 2 muestra un siRNA largo antisentido (lsiRNA) obtenido extendiendo el extremo 3' de la cadena antisentido para proporcionar una secuencia complementaria a un ARNm diana.

La fig. 3 muestra un asiRNA (lasiRNA) largo antisentido obtenido extendiendo el extremo 3' de la cadena antisentido de una estructura de asiRNA para proporcionar una secuencia complementaria a un ARNm diana.

La fig. 4 muestra una estructura obtenida extendiendo una secuencia de ribozima o ADNzima dirigida a ARNm diana en el extremo 3' de una estructura de siRNA.

La fig. 5 muestra estructuras de moléculas de siRNA que inhiben la expresión del gen KRAS que está involucrado en el crecimiento de células cancerosas.

La fig. 6 es un diagrama gráfico que muestra los niveles relativos de ARNm de KRAS causados por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la fig. 5.

La fig. 7 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la medición de los niveles de expresión del ARNm de KRAS, causados por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la fig. 5, en el día 1, el día 2 y el día 3.

La fig. 8 muestra las estructuras moleculares asiRNA y lasiRNA para KRAS.

La fig. 9 es un diagrama gráfico que muestra los niveles relativos de ARNm de KRAS causados por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la fig. 8.

La fig. 10 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la medición de las viabilidades de una línea celular AGS, causadas por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la fig. 8, en el día 5.

La fig. 11 muestra lsiRNA (21S +10r) y lasiRNA (16S +10r), que tienen una secuencia extendida complementaria al

ARNm, para KRAS, y estructuras moleculares (21S +10rc y 16S +10rc) que tienen una secuencia extendida no complementaria al ARNm.

La fig. 12 muestra los niveles relativos de ARNm de KRAS causados por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la fig. 11.

- 5 La fig. 13 muestra las estructuras moleculares de asiRNA y lasiRNA para CTNNB1-2.

La fig. 14 muestra los niveles de expresión de ARNm de KRAS causados por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la fig. 13.

La fig. 15 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la medición de las viabilidades de una línea celular Hep3B, causadas por la introducción de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la fig. 13, en el día 5.

- 10 La fig. 16 es una fotografía que muestra los resultados del análisis 5'RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 15 La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado según lo entiende comúnmente un experto en la materia al que pertenece esta invención. En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos experimentales que se describirán más adelante son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica.

- 20

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

- 25 Tal como se usa en el presente documento, 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 al mismo se introduce en células o similares para inducir la degradación del ARNm del gen diana e inhibir así la expresión del gen diana.

- 30 Tal como se usa en el presente documento, 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.

- 35 Tal como se usa en el presente documento, 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 hnARN) o una secuencia de ADN que es codificante o no codificante. Los términos "cadena antisentido" y "cadena guía" se utilizan indistintamente en el presente documento.

- 40 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 (por ejemplo, microARN, piwiRNA, ARNt, ARNr y hnRNA) o una secuencia de ADN codificante o no codificante.

- 45 Tal como se usa en el presente documento, el término "gen" pretende tener el significado más amplio, y el gen puede codificar una proteína estructural o una proteína reguladora. En el presente documento, 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 diana puede ser un gen en un genoma de VIH. En este caso, el constructo genético es útil para inactivar la traducción del gen del VIH en una célula de mamífero.

- 50 En un aspecto, se describe una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi 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 es 13-21 nt de longitud y tiene una región que se une de manera complementaria a la región de la primera cadena, que es complementaria al ácido nucleico diana (véase la fig. 1).

- 55 Los ejemplos del ácido nucleico diana incluyen, pero no se limitan a, ARNm (ARN mensajero), microARN, piRNA (ARN que interacciona con piwi), una secuencia de ADN codificante y una secuencia de ADN no codificante.

- 60

La región complementaria al ácido nucleico diana en la primera cadena 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. Preferentemente, la primera cadena puede comprender además, en la región monocatenaria, un oligonucleótido de ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en ADN antisentido, ARN antisentido, ribozima y desoxirribozima.

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 el presente documento, 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.

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 y la secuencia a la que se dirige la ribozima o la desoxirribozima de la región monocatenaria pueden ubicarse consecutivamente o ubicarse una aparte de la otra. Además, en el caso donde la región monocatenaria de la primera cadena tenga la secuencia complementaria al gen diana al que se dirige el siRNA, cuando la secuencia contenida en la región monocatenaria es un ADN antisentido o un ARN antisentido, la secuencia puede ser al menos aproximadamente 70-80 %, más preferentemente al menos aproximadamente 80-90 %, e incluso más preferentemente al menos 95-99 % complementaria a la secuencia del gen diana al que se dirige el siRNA, y cuando la región monocatenaria es ribozima o desoxirribozima, la secuencia de la región monocatenaria puede ser al menos aproximadamente 50-60 % complementaria a la secuencia del gen diana al que se dirige el siRNA.

Además, la región monocatenaria puede tener una longitud de 5-100 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. Preferentemente, la región monocatenaria puede tener una longitud de 9-100 nt o una longitud de 50 nt o menos. Más preferentemente, la región monocatenaria puede tener una longitud de 10-15 nt.

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.

En la presente invención, se predijo que el extremo 5' de una estructura nucleica obtenida extendiendo la cadena antisentido de siRNA de una manera complementaria a una secuencia de ARNm diana funcionará como el mecanismo de ARNi mientras que el extremo 3' funcionará como un mecanismo antisentido o guía el siRNA del extremo 5' al ARNm diana. Cuando la secuencia del extremo 3' antisentido, que es complementaria al ARNm, es ADN, puede inducir la escisión del ARNm dependiente de la ARNasa. Además, se predijo que cuando al menos uno de los nucleótidos de la región monocatenaria del extremo 3' antisentido comprende un análogo de base en volumen o la región monocatenaria se une al ARNm para formar una estructura abultada, puede inducirse la escisión. Además, cuando una molécula de ácido nucleico que comprende la ribozima o desoxirribozima es introducida en la región monocatenaria de la primera cadena puede inducir una escisión sinérgica.

La publicación de patente coreana en trámite N.º 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 distintos a los deseados 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 el presente documento, el término "efectos distintos a los deseados" se refiere a cualquier caso donde 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.

- 5 La molécula de siRNA de la presente invención puede ser una molécula sintetizada según 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
10 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 reemplazando el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de al menos un nucleótido, incluido en la molécula de ácido nucleico, por uno cualquiera de un átomo de hidrógeno, un
15 átomo de flúor, un grupo -O-alquilo, un grupo -O-acilo y un grupo amino, pero no se limita a los mismos. Para aumentar la capacidad de administrar la molécula de ácido nucleico, el grupo hidroxilo puede ser reemplazado por cualquiera de -Br, -Cl, -R, -R'OR, -SH, -SR, -N₃ y -CN (R = alquilo, arilo o alquilenilo). Además, la modificación química se puede obtener reemplazando el esqueleto de fosfato de al menos un nucleótido por cualquiera de una forma de fosforotioato, forma de fosforoditioato, forma de alquilfosfonato, forma de fosforatoamidato y forma de
20 boranofosfato. Además, 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 del grupo que consiste en lípidos, péptidos que penetran en las células y ligandos de direccionamiento celular.

25 Además, la molécula de ácido nucleico según la presente invención puede unirse a un vehículo de suministro celular para su introducción en una célula. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se dirige a un complejo de ácido nucleico que comprende un vehículo de suministro celular unido a la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi.

30 En la presente invención, el vehículo de suministro celular puede seleccionarse del grupo que consiste en polímeros catiónicos, lípidos, péptidos que penetran en las células y ligandos de direccionamiento celular. Los vehículos de suministro de células catiónicas, como los polímeros catiónicos y los lípidos catiónicos, son reactivos cargados positivamente que se utilizan para administrar ácido nucleico (es decir, siRNA) en células *in vitro* o *in vivo*. El
35 vehículo de suministro de células catiónicas puede interactuar fuertemente con la molécula de ácido nucleico de la presente invención para formar un complejo de modo que la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi pueda introducirse eficazmente en una célula. El vehículo de suministro celular que se usa en la presente invención puede ser un polímero catiónico tal como polietilenimina (PEI) o un liposoma tal como lipofectamina 2000 (Invitrogen), pero no se limita a los mismos. Será obvio para los expertos en la materia que puede usarse un reactivo cargado
40 positivamente para proporcionar el complejo según la presente invención. Además, un lípido tal como el colesterol puede enlazarse directamente a la molécula de ácido nucleico o enlazarse indirectamente a la molécula de ácido nucleico a través de otro vehículo de suministro celular.

Además, las realizaciones de la presente invención sugieren que la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de
45 la presente invención proporciona el efecto de inhibir eficazmente la expresión de un gen diana. Por lo tanto, en otro aspecto más, la presente invención se dirige a una composición para inhibir la expresión génica, que contiene la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi anterior. En el presente documento, la molécula de ácido nucleico puede estar en forma de un complejo de ácido nucleico que comprende un vehículo de suministro celular unido al mismo.

50 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 KRAS de gen diana o CTNNB1-2, la eficiencia con la que se inhibe la expresión del gen diana podría aumentarse significativamente, y la eficacia del mismo también podría mantenerse durante un largo período de tiempo. Por lo tanto, será evidente para los expertos en la materia que,
55 incluso cuando se proporcionan moléculas de ácido nucleico dirigidas a otros genes diana según la presente invención, se pueden obtener los mismos resultados.

Mientras tanto, la composición para inhibir la expresión génica según 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
60 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 *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana en una célula utilizando la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi anterior. Es decir, la presente invención está dirigida a un procedimiento *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana en una célula, 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 inductor 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 según la presente invención no está necesariamente limitada a un siRNA sintético y también puede aplicarse ventajosamente al siRNA o shRNA, que se expresa en células utilizando 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. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención se dirige a un procedimiento *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana en una célula, comprendiendo el procedimiento una etapa de expresar la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi anterior en la célula.

Mientras tanto, la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de la presente invención puede utilizarse para inhibir la expresión de un gen diana tal como un gen que causa o hace crecer el cáncer por sobreexpresión, es decir, un gen relacionado con un tumor. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi es útil como composición anticancerosa. En el presente documento, el gen relacionado con el tumor puede ser cualquiera de KRas, Wnt-1, Hec1, Survivin, Livin, Bcl-2, XIAP, Mdm2, EGF, EGFR, VEGF, VEGFR, Mcl-1, IGF1R, Akt1, Grp78, STAT3, STAT5a, β -catenina, WISP1 y c-myc, pero no se limita a los mismos. En un ejemplo de la presente invención, se encontró que el gen KRAS implicado en el crecimiento de células cancerosas se inhibía mediante la introducción de la molécula de siRNA de la presente invención en las células. Además, se demostró que una molécula de siRNA dirigida al gen de la beta-catenina destruía una línea de células cancerosas.

La composición anticancerosa de la presente invención puede proporcionarse como una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi o un complejo que comprende la molécula de ácido nucleico unida a un vehículo de suministro celular solo o en combinación con al menos un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. El complejo puede estar contenido en la composición farmacéutica en una cantidad farmacéuticamente efectiva según 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.

Tal como se usa en el presente documento, 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 portador, 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.

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.

Mientras tanto, la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de la presente invención o un complejo que comprende la molécula de ácido nucleico unida a un vehículo de suministro celular puede comprender además un agente quimioterapéutico anticanceroso conocido para proporcionar efectos combinados. Los ejemplos de un agente quimioterapéutico anticanceroso conocido que se puede utilizar en la presente invención incluyen cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona, valubicina, curcumina, gefitinib, erlotinib, irinotecán, topotecán, vinblastina, vincristina, docetaxel, paclitaxel y similares.

EJEMPLOS

A continuación, la presente invención se describirá más detalladamente con referencia a los ejemplos. Los ejemplos que no pertenecen a la invención son solo para fines ilustrativos.

5

Ejemplo 1: Construcción de siRNA guiado por antisentido largo: Ejemplo de preparación 1

Se construyó un siRNA de la siguiente manera: la segunda cadena tenía una longitud corta de 21 nt; la región de la primera cadena, que forma una doble cadena con la segunda cadena, tenía 19 nt de longitud; y el extremo 3' de la primera cadena tenía una región monocatenaria de 17 nt complementaria a un ARNm diana. El siRNA construido que tiene la cadena antisentido larga se denominó "siRNA antisentido largo (IsiRNA)". El oligonucleótido de ácido nucleico incluido en la secuencia extendida permite que el siRNA se guíe al ARNm diana o funcione como un mecanismo antisentido típico (véase la fig. 2).

Ejemplo 2: Construcción de siRNA antisentido largo: Ejemplo de preparación 2

Se construyó un siRNA de la siguiente manera: la segunda cadena tenía una longitud corta de 15 nt; la región de la primera cadena que forma una doble cadena con la segunda cadena tenía 19 nt de longitud; el extremo 3' de la primera cadena tenía una secuencia extendida de 17 nt complementaria a un ARNm diana; y el extremo 5' de la primera cadena era un extremo romo. El siRNA construido que tiene la cadena larga antisentido se denominó "siRNA antisentido largo (IsiRNA)". El oligonucleótido de ácido nucleico incluido en la secuencia extendida permite que el siRNA se guíe al ARNm diana o funcione como un mecanismo antisentido típico (véase la fig. 3).

Ejemplo 3: Construcción de siRNA guiado por desoxirribozima (o ribozima) (siRZNA): Ejemplo de preparación 3

Se construyó una estructura que tiene una cadena antisentido larga utilizando CTNNB1-2siRNA y desoxirribozima Dz339 de la siguiente manera: la cadena con sentido tenía una longitud corta de 21 nt; y el extremo 3' de la cadena antisentido de 19 nt tenía desoxirribozima. La estructura construida se denominó "siRNA guiado por desoxirribozima (siRZNA)" (véase la fig. 4).

Ejemplo 4: Construcción de IsiRNA que inhibe la expresión del gen KRAS y el examen de la capacidad para inhibir la expresión del gen KRAS

Se diseñó un siRNA que inhibe la expresión del gen KRAS implicado en el crecimiento de células cancerosas. Además, se construyeron siRNA antisentido largos (IsiRNA) añadiendo cada uno de 5 nt, 10 nt y 15 nt al extremo 3' de la cadena antisentido de una estructura de siRNA convencional (19+2). En el presente documento, se construyeron estructuras (21S+5d, 10d y 15d) que tienen una secuencia de ADN extendida complementaria a un ARNm diana, y estructuras de control (21S+5c, 10c y 15c) que tienen una secuencia de ADN extendida no complementaria a un ARNm diana, y las eficiencias con las que las estructuras construidas inhiben la expresión del gen diana se compararon entre sí (véase la fig. 5). Además, se construyó una estructura (21+15d-mut) mediante la mutación de la secuencia semilla de IsiRNA, y se analizó si la capacidad del IsiRNA para inhibir la expresión del gen depende de la secuencia semilla, como el siRNA. Cada uno del siRNA y IsiRNA se transfectó en células AGS (ATCC CRL 1739, adenocarcinoma gástrico, humano) a una concentración de 10 nM utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la PCR en tiempo real para la medición de ARNm son los siguientes: KRAS

secuencia directa 5'-GAGTGCCTTGACGATACAGC-3' (SEQ ID NO:15); y
secuencia inversa 5'-CCCTCATTGCACTGTACTCC-3' (SEQ ID NO:16).

Como resultado, como se puede ver en la fig. 6, el IsiRNA que tiene la región monocatenaria complementaria al ARNm diana mostró una capacidad mejorada para inhibir el gen diana, en comparación con la estructura del siRNA convencional, y esta tendencia fue proporcional a la longitud de la región monocatenaria. Sin embargo, en el caso del IsiRNA de control que tiene la región monocatenaria no complementaria al ARNm diana, no se pudo observar esta capacidad mejorada para inhibir la expresión génica. En el caso de que el IsiRNA que tiene la mutación de secuencia semilla, la capacidad de inhibir el gen diana casi desapareció. Esto sugiere que el IsiRNA inhibe el gen diana por el mecanismo de ARNi dependiente de la secuencia semilla, como el siRNA convencional, y no muestra silenciamiento génico no específico causado por la estructura modificada.

Luego, se examinó si la capacidad de IsiRNA para inhibir el gen diana se mantiene suficientemente después de la introducción intracelular en comparación con la del siRNA. Se demostró que la capacidad de la estructura de siRNA

convencional para inhibir la expresión génica alcanzó un máximo en 1 día después de la introducción intracelular y se redujo a los 2 días y 3 días después de la introducción intracelular (véase la fig. 7). Sin embargo, la capacidad del lsiRNA para inhibir la expresión del gen diana se mantuvo incluso hasta 3 días después de la introducción intracelular. En cambio, en el caso del lsiRNA de control que tiene la región monocatenaria no complementaria al ARNm diana, no se pudo observar esta capacidad mejorada para inhibir la expresión génica. Dichos resultados sugieren que el lsiRNA que tiene la región monocatenaria complementaria al ARNm del gen diana exhibe la alta eficiencia con la que inhibe la expresión génica, en comparación con la estructura del siRNA convencional, y la eficacia del mismo también se mantiene durante un período de tiempo más largo.

10 **Ejemplo 5: Construcción de lasiRNA que inhibe la expresión del gen KRAS y examen de la capacidad para inhibir la expresión del gen KRAS**

Además del Ejemplo 4, se realizó un examen para determinar si la estructura de la molécula de ácido nucleico de la presente invención, cuando se aplica a un siRNA dúplex más corto asimétrico (asiRNA), puede mejorar la capacidad de inhibir la expresión del gen diana.

De una manera similar al Ejemplo 4, las estructuras (16S+5d, 10d y 15d) se construyeron extendiendo el extremo 3' de la cadena antisentido de la estructura de siRNA convencional con un ADN que tiene una secuencia complementaria a un ARNm diana, y se construyeron estructuras de control (16S+5c, 10c y 15c; asiRNA largo antisentido (lasiRNA)) que tienen una secuencia de ADN extendida no complementaria a un ARNm diana (véase la fig. 8). Las estructuras construidas se transfectaron en células AGS y se compararon las capacidades para inhibir el crecimiento de las células cancerosas. Estos ARN se transfectaron en células AGS, y luego se realizó una PCR en tiempo real de la misma manera que se describe en el Ejemplo 4 para verificar las eficiencias con las que las estructuras inhiben la expresión del gen KRAS diana (véase la fig. 9). Cada uno del asiRNA y lasiRNA se transfectó en células AGS (ATCC CRL 1739, adenocarcinoma gástrico, humano) a una concentración de 10 nM utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen).

Como resultado, la capacidad inhibitoria del ARNm diana del lasiRNA que tiene la secuencia monocatenaria extendida complementaria al ARNm diana aumentó proporcionalmente a la longitud de la secuencia extendida, similar al caso del lsiRNA. Sin embargo, este efecto no se observó en el caso donde la secuencia extendida no fuera complementaria al ARNm diana.

35 **Ejemplo 6: lasiRNA que inhibe la expresión del gen KRAS y examen de la capacidad de lasiRNA para inhibir el crecimiento de células cancerosas AGS**

Luego, se realizó un examen para determinar si las estructuras de lsiRNA y lasiRNA dirigidas a KRAS que muestran una capacidad mejorada para inhibir el gen diana, en comparación con el siRNA y el asiRNA, también tienen mayor capacidad para inhibir el crecimiento de las células cancerosas AGS. Específicamente, las células AGS sembradas en una placa de 96 pocillos se transfectaron con 10 nM de ARN utilizando lipofectamina 2000, y después de 5 días, se midió la viabilidad de las células contando visualmente el número de células mediante observación microscópica.

Como resultado, se demostró que la capacidad para inhibir la expresión del ARNm de KRAS tenía una alta relación con la capacidad para inhibir el crecimiento de células cancerosas. Específicamente, se demostró que el lsiRNA (21S+15d) que tiene la secuencia extendida de 15 nucleótidos mostró una gran capacidad para inhibir el crecimiento de células cancerosas, en comparación con el siRNA, y la capacidad del lasiRNA (16S+15d) para inhibir el crecimiento de células cancerosas aumentó en comparación con la de asiRNA (véase la fig. 10). Mientras tanto, el lsiRNA que tiene una mutación introducida en la secuencia semilla (LASmut) no indujo la inhibición del crecimiento de células cancerosas, lo que sugiere que no aparece citotoxicidad no específica por la estructura de la secuencia prolongada. Dichos resultados sugieren que, cuando se introduce una región monocatenaria complementaria a un ARNm diana en el extremo 3' de la cadena antisentido de cada uno de siRNA y asiRNA, se puede aumentar la capacidad de inhibir la expresión génica y la expresión fenotípica en las células.

55 **Ejemplo 7: Examen de las capacidades de lsiRNA y lasiRNA (que tiene ARN como secuencia extendida) para inhibir la expresión del gen KRAS**

Luego, se realizó un examen para determinar si las capacidades de lsiRNA y lasiRNA (cada uno con ARN en lugar de ADN como una secuencia extendida) para inhibir la expresión de un gen diana aumentan en comparación con las de siRNA y asRNA, que corresponden al mismo.

Como se muestra en la fig. 11, se construyeron el lsiRNA (21S+10r) y el lasiRNA (16S+10r), cada uno con una

secuencia extendida de 10 nt complementaria al ARNm, y también se construyeron las estructuras de control (21S+10rc y 16S+10rc), cada una con una secuencia extendida no complementaria al ARNm. Las estructuras construidas se transfectaron en células AGS, y luego se examinaron las eficiencias con las que inhibían la expresión del ARNm de KRAS de la misma manera que se describe en el Ejemplo 4.

5 Como resultado, como se puede ver en la fig. 12, lsiRNA y lasiRNA, que tienen la secuencia de ARN extendida, tenían una alta capacidad para inhibir la expresión del gen diana, en comparación con siRNA y asiRNA, que corresponden a los mismos. Particularmente, lasiRNA que tiene una secuencia de ARN extendida mostró una capacidad inhibitoria aumentada en comparación con lasiRNA que tiene una secuencia de ADN extendida. Esto
10 sugiere que la capacidad para inhibir la expresión del gen diana se puede lograr incluso cuando la secuencia antisentido larga es ARN además de ADN.

Ejemplo 8: Construcción de lasiRNA que inhibe la expresión del gen CTNNB1 y examen de la capacidad para inhibir la expresión del gen CTNNB1

8-1: Medición del nivel de expresión de ARNm de CTNNB1

Luego, para examinar si la estructura de la molécula de ácido nucleico de la presente invención puede aumentar la actividad de los asiRNA que se dirigen a otros genes, se construyeron estructuras de lasiRNA que corresponden a
20 los asiRNA que se dirigen a la beta-catenina (CTNNB1) (véase la fig. 13). Luego, cada una de las estructuras construidas se transfectó en células Hep3B (ATCC HB 8064) a una concentración de 10 nM utilizando lipofectamina 2000, y luego se examinó la capacidad de inhibir la expresión del gen diana mediante PCR en tiempo real. CTNNB1

secuencia directa 5'-ATGTCCAGCGTTTGGCTGAA-3' (SEQ ID NO:32); y
25 secuencia inversa 5'-TGGTCCTCGTCATTAGCAGTT-3' (SEQ ID NO:33).

Como resultado, como se puede ver en la fig. 14, la capacidad del asiRNA para inhibir la expresión del gen diana disminuyó en comparación con la estructura del siRNA convencional, pero la capacidad inhibitoria del gen diana del lasiRNA (16S+15d) que tiene una secuencia de ADN de 15 nt complementaria a la secuencia del ARNm en el
30 extremo 3' de la cadena antisentido aumentó a un nivel similar al del siRNA. Por otro lado, en el caso de la estructura (16S+15c) que tiene una secuencia de ADN extendida no complementaria al gen diana, la disminución en la capacidad para inhibir el gen diana fue insignificante en comparación con la del asiRNA. Por lo tanto, se descubrió que la estructura de lasiRNA tiene una mayor capacidad para inhibir el gen diana, independientemente de la secuencia de asiRNA.

8-2: Medición de la capacidad para inhibir el crecimiento de células cancerosas Hep3B

La mayor capacidad de la estructura de lasiRNA para inhibir el gen diana se verificó de nuevo midiendo la capacidad de inhibir el crecimiento de las células cancerosas Hep3B. Específicamente, se transfectaron 10 nM de cada uno de
40 siRNA, asiRNA y lasiRNA en células Hep3B, y después de 5 días, se examinó el grado de crecimiento celular contando el número de células. La viabilidad de las células se examinó contando visualmente el número de células mediante observación microscópica. En pocas palabras, las células AGS sembradas en una placa de 96 pocillos se transfectaron con 10 nM de cada uno de siRNA, asiRNA y lasiRNA, y después de 5 días, se contó visualmente el número de células viables.

45 Como resultado, como se puede ver en la fig. 15, la capacidad del asiRNA para matar células cancerosas disminuyó en comparación con la del siRNA, pero el lasiRNA que tiene una secuencia extendida complementaria al gen diana mostró una capacidad de destrucción celular similar a la del siRNA. Por otro lado, la capacidad de destrucción celular del lasiRNA que tiene una secuencia extendida no complementaria al gen diana no aumentó en comparación
50 con la del asiRNA. Esto sugiere que la molécula de siRNA que contiene una secuencia extendida complementaria al gen diana en el extremo 3' de la cadena antisentido tiene mayor capacidad para inhibir la expresión del gen diana.

Ejemplo 9: Análisis del mecanismo de inhibición de la expresión génica

55 Con el fin de examinar si la molécula de ácido nucleico de la presente invención inhibe la expresión génica según el mismo mecanismo de ARNi que el siRNA 19+2 o el asiRNA convencional, se realizó la siguiente prueba. Específicamente, para analizar un sitio de escisión para un ARNm diana, se realizó el análisis 5'RACE (amplificación rápida de los extremos del ADNc).

60 Primero, cada uno de siKRAS, asiKRAS, LaiKRAS y LasiKRAS, construidos en los Ejemplos 4 y 5, se introdujeron

en células HeLa utilizando PEI, y después de 18 horas, se extrajo el ARN total utilizando un kit tri-reactivo (Ambion). El ARN total (3 µg) se ligó con 0,25 µg de oligo de ARN de GeneRacer, y el ARN total ligado a oligo de ARN de GeneRacer se transcribió de manera inversa utilizando el kit dT de oligo GeneRacer y RT SuperScript™ III (Invitrogen). El ARNm ligado a oligo de ARN se amplificó utilizando cebadores específicos de gen. El producto de la PCR se clonó en un vector T&A (RBC) y luego se secuenció con un cebador directo M13.

Cebador específico del gen KRAS: 5'-CTGCATGCACCAAAAACCCCAAGACA-3' (SEQ ID NO:34);
Cebador específico del gen KRAS anidado: 5'-CACAAAGAAAGCCCTCCCCAGTCCTCA-3' (SEQ ID NO:35).

10 Como resultado, como se puede ver en la fig. 16, los casos de tratamiento con siKRAS, asiKRAS, LsiKRAS y LasiKRAS podrían proporcionar productos RACE que tengan el mismo tamaño. Además, estos productos RACE se clonaron en vectores T (RBC) y se examinó una posición de escisión precisa en la secuencia de nucleótidos mediante secuenciación. Como resultado, se demostró que, en los casos de siKRAS, asiKRAS, LsiKRAS y LasiKRAS, la posición del ARNm correspondiente a la posición entre el 10.º nucleótido y el 11.º nucleótido desde el
15 extremo 5' del antisentido se escindió.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Como se describió anteriormente, la estructura de la molécula de ácido nucleico de la presente invención se dirige a un gen diana complementario a una porción de la primera cadena por el oligonucleótido nucleico incluido en la
20 región monocatenaria en el extremo 3' de la primera cadena para guiar el siRNA hacia el gen diana para aumentar la eficiencia con la que la molécula de ácido nucleico inhibe el gen diana. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico de la presente invención puede aumentar la capacidad del siRNA para unirse al gen diana o causar escisión sinérgica, mediante la introducción de ADN antisentido, ARN antisentido, ribozima o desoxirribozima,
25 aumentando así la eficiencia con la que la molécula de ácido nucleico inhibe el gen diana. Además, cuando se usa la molécula de ácido nucleico según la presente invención, la eficiencia con la que se inhibe el gen diana se puede mantener durante un período de tiempo prolongado. Por consiguiente, la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de la presente invención puede utilizarse eficazmente para el tratamiento del cáncer o infección vírica en lugar de moléculas de siRNA convencionales.

30 <110> UNIVERSIDAD DE SUNGKYUNKWAN Fundación para la colaboración empresarial

<120> Molécula de ácido nucleico que induce la interferencia del ARN y el uso de la misma

35 <130> PP-B1010

<150> KR10-2010-0103701

<151> 22-10-2010

40 <150> KR10-2011-0062504

<151> 27-06-2011

<160> 35

45 <170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> ARN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena con sentido de siRNA CTNNB1-2

55 <400> 1

cuaucagaagau gaugcagaac u 21

<210> 2

<211> 21

60 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena antisentido de siRNA CTNNB1-2

5 <400> 2
uucugcauca ucuugauagu u 21

<210> 3
10 <211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Desoxirribozima Dz339

<400> 3
agcatgaaag gctagctaca acgatgtgta gat 33

20 <210> 4
<211> 58
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Dz339 AS híbrido

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

30 <220>
<221> otras_características
<222> (1)..(19)
<223> ribonucleótidos

35 <220>
<221> otras_características
<222> (20)..(58)
<223> desoxirribonucleótidos

40 <400> 4
uucugcauca ucuugauagt ttttagcat gaaaggctag ctacaacgat gtgtagat 58

<210> 5
<211> 21

45 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena con sentido de siRNA de KRAS

50 <400> 5ggaagcaagu aguaauugau u 21

<210> 6
<211> 21

55 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena antisentido de siRNA de KRAS (19+2)

60

<400> 6
ucaauuacua cuugcuuccu u 21

<210> 7
5 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Cadena antisentido de lsiRNA de KRAS (21S+5d)

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

15 <220>
<221> otras_características
<222> (1)..(21)
<223> ribonucleótidos

20 <220>
<221> otras_características
<222> (22)..(26)
<223> desoxirribonucleótidos

25 <400> 7
ucaauuacua cuugcuuccu gtagga 26

<210> 8
<211> 26
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena antisentido de lsiRNA de KRAS (21S+5c)

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

<220>
40 <221> otras_características
<222> (1)..(21)
<223> ribonucleótidos

<220>
45 <221> otras_características
<222> (22)..(26)
<223> desoxirribonucleótidos

<400> 8
50 ucaauuacua cuugcuuccu gagcat 26

<210> 9
<211> 31
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena antisentido de lsiRNA de KRAS (21S+10d)

60 <220>

<223> Molécula combinada de ARN / ADN

<220>
 <221> otras_características
 5 <222> (1)..(21)
 <223> ribonucleótidos

<220>
 <221> otras_características
 10 <222> (22)..(31)
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 9
 ucaauuacua cuugcuuccu gtaggaatcc t 31
 15
 <210> 10
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Cadena antisentido de lsiRNA de KRAS (21S+10c)

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

<220>
 <221> otras_características
 <222> (1)..(21)
 30 <223> ribonucleótidos

<220>
 <221> otras_características
 <222> (22)..(31)
 35 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 10
 ucaauuacua cuugcuuccu gagcatgacc a 31
 40
 <210> 11
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cadena antisentido de lsiRNA de KRAS (21S+15d)

<220>
 <223> Molécula combinada de ARN / ADN
 50
 <220>
 <221> otras_características
 <222> (1)..(21)
 <223> ribonucleótidos

55
 <220>
 <221> otras_características
 <222> (22)..(36)
 <223> desoxirribonucleótidos
 60

<400> 11
ucaauuacua cuugcuuccu gtaggaatcc tctatt 36

<210> 12
5 <211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Cadena antisentido de lsiRNA de KRAS (21S+15c)

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

15 <220>
<221> otras_características
<222> (1)..(21)
<223> ribonucleótidos

20 <220>
<221> otras_características
<222> (22)..(36)
<223> desoxirribonucleótidos

25 <400> 12
ucaauuacua cuugcuuccu gagcatgacc acggtt 36

<210> 13
<211> 21
30 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena con sentido de lsiRNA de KRAS (21S+15d-mut)

35 <400> 13
ggaagcaagu aguuaacau u 21

<210> 14
40 <211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Cadena antisentido de lsiRNA de KRAS (21S+15d-mut)

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

50 <220>
<221> otras_características
<222> (1)..(21)
<223> ribonucleótidos

55 <220>
<221> otras_características
<222> (22)..(36)
<223> desoxirribonucleótidos

60 <400> 14

uguuaaacua cuugcuuccu gtaggaatcc tctatt 36

<210> 15
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia directa de KRAS

10 <400> 15
 gagtgccttg acgatacagc 20

<210> 16
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> secuencia inversa de KRAS

<400> 16
 ccctcattgc actgtactcc 20

25 <210> 17
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cadena con sentido de asiRNA de KRAS

<400> 17
 agcaaguagu aaauuga 16

35 <210> 18
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cadena antisentido de asiRNA de KRAS

<400> 18
 45 ucaauuacua cuugcuuccu u 21

<210> 19
 <211> 26
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena antisentido de lasiRNA de KRAS (16S +5d)

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

<220>
 <221> otras características
 60 <222> (1)..(21)

<223> ribonucleótidos

<220>
 <221> otras_características
 5 <222> (22)..(26)
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 19
 ucaauuacua cuugcuuccu gtagga 26

10 <210> 20
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cadena antisentido de lasiRNA de KRAS (16S +5c)

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

<220>
 <221> otras_características
 <222> (1)..(21)
 25 <223> ribonucleótidos

<220>
 <221> otras_características
 <222> (22)..(26)
 30 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 20
 ucaauuacua cuugcuuccu gagcat 26

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

40 <220>
 <223> Cadena antisentido de lasiRNA de KRAS (16S +10d)

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

45 <220>
 <221> otras_características
 <222> (1)..(21)
 <223> ribonucleótidos

50 <220>
 <221> otras_características
 <222> (22)..(31)
 <223> desoxirribonucleótidos

55 <400> 21
 ucaauuacua cuugcuuccu gtaggaatcc t 31

<210> 22
 60 <211> 31

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cadena antisentido de lasiRNA de KRAS (16S +10c)

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

 10 <220>
 <221> otras_características
 <222> (1)..(21)
 <223> ribonucleótidos

 15 <220>
 <221> otras_características
 <222> (22)..(31)
 <223> desoxirribonucleótidos

 20 <400> 22
 ucaauuacua cuugcuuccu gagcatgacc a 31

 <210> 23
 <211> 36
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cadena antisentido de lasiRNA de KRAS (16S +15d)
 30
 <220>
 <223> Molécula combinada de ARN / ADN

 <220>
 35 <221> otras_características
 <222> (1)..(21)
 <223> ribonucleótidos

 <220>
 40 <221> otras_características
 <222> (22)..(36)
 <223> desoxirribonucleótidos

 <400> 23
 45 ucaauuacua cuugcuuccu gtaggaatcc tctatt 36

 <210> 24
 <211> 36
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cadena antisentido de lasiRNA de KRAS (16S +15c)

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

 <220>
 <221> otras_características
 60 <222> (1)..(21)

<223> ribonucleótidos

<220>
 <221> otras_características
 5 <222> (22)..(36)
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 24
 ucaauuacua cuugcuuccu gagcatgacc acggtt 36

10 <210> 25
 <211> 31
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cadena antisentido de lasiRNA (21S+10r) o lasiRNA (16S +10r) de KRAS

<400> 25
 20 ucaauuacua cuugcuuccu guaggaucc u 31

<210> 26
 <211> 31
 <212> ARN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena antisentido de lasiRNA (21S+10rc) o lasiRNA (16S +10rc) de KRAS

30 <400> 26
 ucaauuacua cuugcuuccu gagcaugacc a 31

<210> 27
 <211> 21
 35 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena con sentido de siRNA CTNNB1-2 (19+2)

40 <400> 27
 cuaucaagau gaugcagaau u 21

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

<220>
 50 <223> Cadena antisentido de siRNA de KRAS (19+2) o asiRNA

<400> 28
 uucugcauca ucuugauagu u 21

55 <210> 29
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Cadena con sentido de siRNA CTNNB1-2

<400> 29
ucaagaugau gcagaa 16

5 <210> 30
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cadena antisentido de lasiRNA de KRAS (16S +15d)

<220>

15 <223> Molécula combinada de ARN / ADN

<220>
<221> otras_características
<222> (1)..(21)

20 <223> ribonucleótidos

<220>
<221> otras_características
<222> (22)..(36)

25 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 30
uucugcauca ucuugauagu uatcaagtt tacaac 36

30 <210> 31
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cadena antisentido de lasiRNA de KRAS (16S +15c)

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

40 <220>
<221> otras_características
<222> (1)..(21)
<223> ribonucleótidos

45 <220>
<221> otras_características
<222> (22)..(36)
<223> desoxirribonucleótidos

50 <400> 31
uucugcauca ucuugauagu uggagcatga ccacgg 36

<210> 32

55 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Secuencia directa CTNNB1

<400> 32
 atgtccagcg ttggctgaa 20

5 <210> 33
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia inversa CTNNB1

<400> 33
 tggctctcgt catttagcag tt 22

15 <210> 34
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador específico del gen KRAS

<400> 34
 25 ctgcatgcac caaaaacccc aagaca 26

<210> 35
 <211> 27
 <212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador específico del gen KRAS anidado

35 <400> 35
 cacaaagaaa gccctcccca gtcctca 27

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi que comprende una primera cadena y una segunda cadena, donde la primera cadena tiene una longitud de 24-31 nt y es complementaria a un ácido nucleico diana y comprende una región monocatenaria de 10-15 nt de longitud; donde la segunda cadena tiene una longitud de 13-16 nt y se une de manera complementaria a la primera cadena, y donde el extremo 5' de la primera cadena y el extremo 3' de la segunda cadena forman un extremo romo.
2. La molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de la reivindicación 1, donde el ácido nucleico diana es uno cualquiera de ARNm (ARN mensajero), microARN, piRNA (ARN que interacciona con piwi), una secuencia de ADN codificante y una secuencia de ADN no codificante.
3. La molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de la reivindicación 1, donde la molécula de ácido nucleico comprende una o más modificaciones químicas seleccionadas de entre:
 - i) la modificación química obtenida reemplazando el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa de al menos un nucleótido incluido en la molécula de ácido nucleico, por uno cualquiera de un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, un grupo -O-alquilo, un grupo -O-acilo y un grupo amino;
 - ii) la modificación química obtenida reemplazando el esqueleto de fosfato de al menos un nucleótido incluido en la molécula de ácido nucleico por cualquiera de una forma de fosforotioato, forma de fosforoditioato, forma de alquilfosfonato, forma de fosforoamidato y forma de boranofosfato;
 - iii) la modificación química obtenida reemplazando 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);
 - iv) la modificación química obtenida uniendo la molécula de ácido nucleico a uno o más seleccionados del grupo que consiste en lípidos, péptidos que penetran en las células y ligandos de direccionamiento celular; y
 - v) la modificación química que incluye un análogo de base en volumen entre al menos uno de los nucleótidos de la región monocatenaria en la primera cadena.
4. Un complejo de ácido nucleico que comprende un vehículo de suministro celular unido a la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
5. Un procedimiento *in vitro* para la administración intracelular de una molécula de ácido nucleico inductora de ARNi, comprendiendo el procedimiento introducir el complejo de ácido nucleico de la reivindicación 4 en una célula.
6. Una composición para inhibir la expresión génica, que contiene la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. Un procedimiento *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana en una célula, que comprende una etapa de introducir la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una célula.
8. Un procedimiento *in vitro* para inhibir la expresión de un gen diana en una célula, comprendiendo el procedimiento una etapa de expresar la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la célula.
9. Una composición anticancerosa que contiene la molécula de ácido nucleico inductora de ARNi de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

FIG. 1

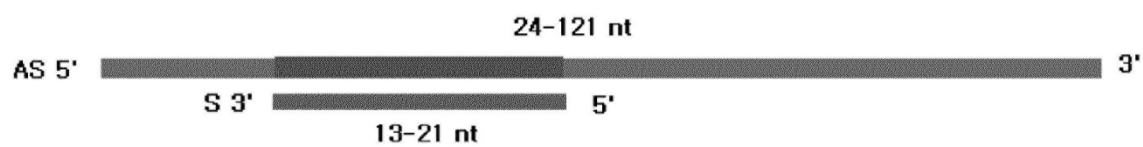


FIG. 2

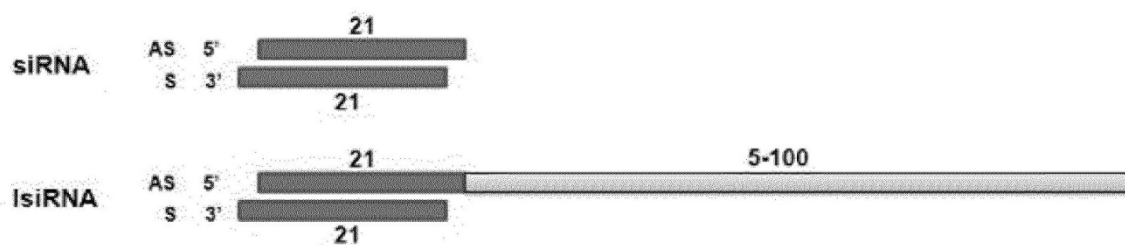
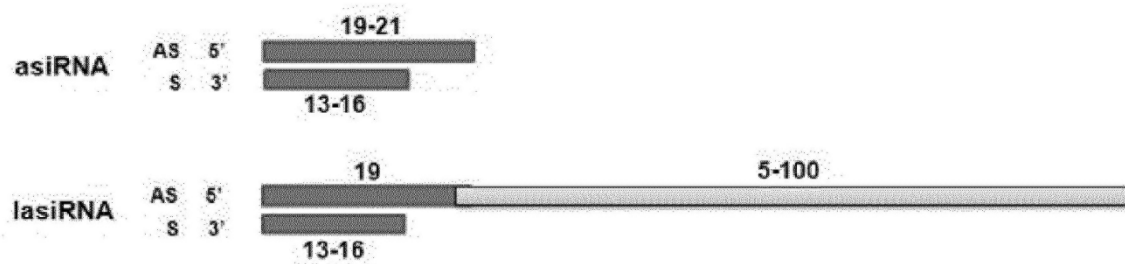


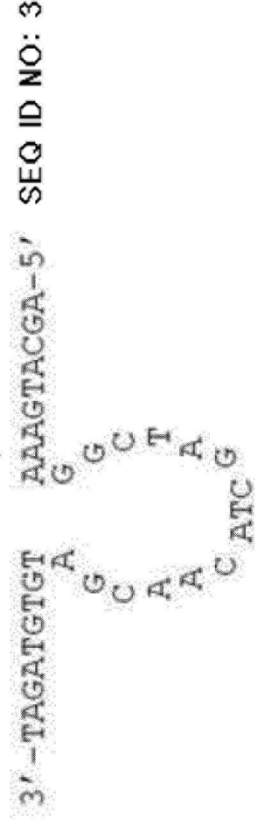
FIG. 3



SiRNA CTNNB1-2

S 5' -CUAUCAGAUGCAGAACU-3' SEQ ID NO: 1
AS 3' -UUGAUAGUUCUACGUCUU-5' SEQ ID NO: 2

Desoxirribozima Dz339



Dz339-AS híbrido



FIG. 4

FIG. 5

KRAS	19+2	5' - GGAAGCAAGUAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -UUCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS)	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 6
	21S+5d	5' - GGAAGCAAGUAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -aggatGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS)	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 7
	21S+5c	5' - GGAAGCAAGUAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -tacgaGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS)	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 8
	21S+10d	5' - GGAAGCAAGUAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -tcctaaggatGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS)	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 9
	21S+10c	5' - GGAAGCAAGUAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -accagtaaggatGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS)	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 10
	21S+15d	5' - GGAAGCAAGUAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -ttatctcctaaggatGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS)	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 11
	21S+15c	5' - GGAAGCAAGUAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -ttggcaccagtaaggatGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS)	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 12
	21S+15d-mut	5' - GGAAGCAAGUAGUAAUUGAUU-3' (S) 3' -ttatctcctaaggatGUCCUUCGUUCAUCAAAUUGU-5' (AS)	SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14

FIG. 6

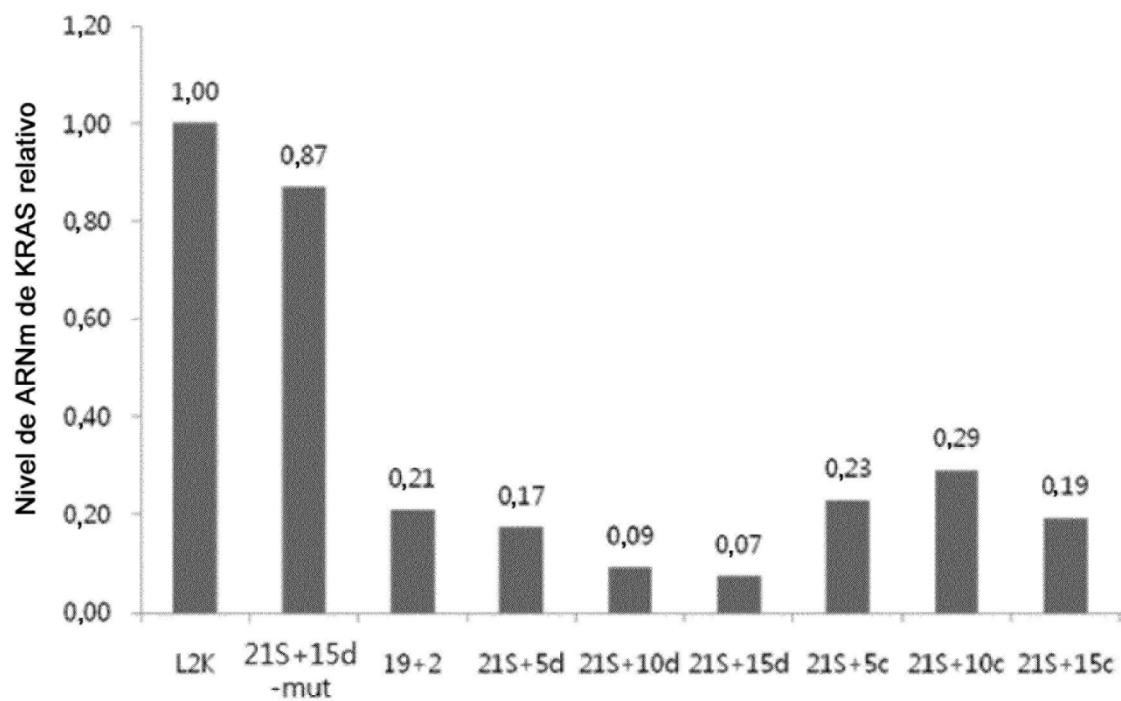


FIG. 7

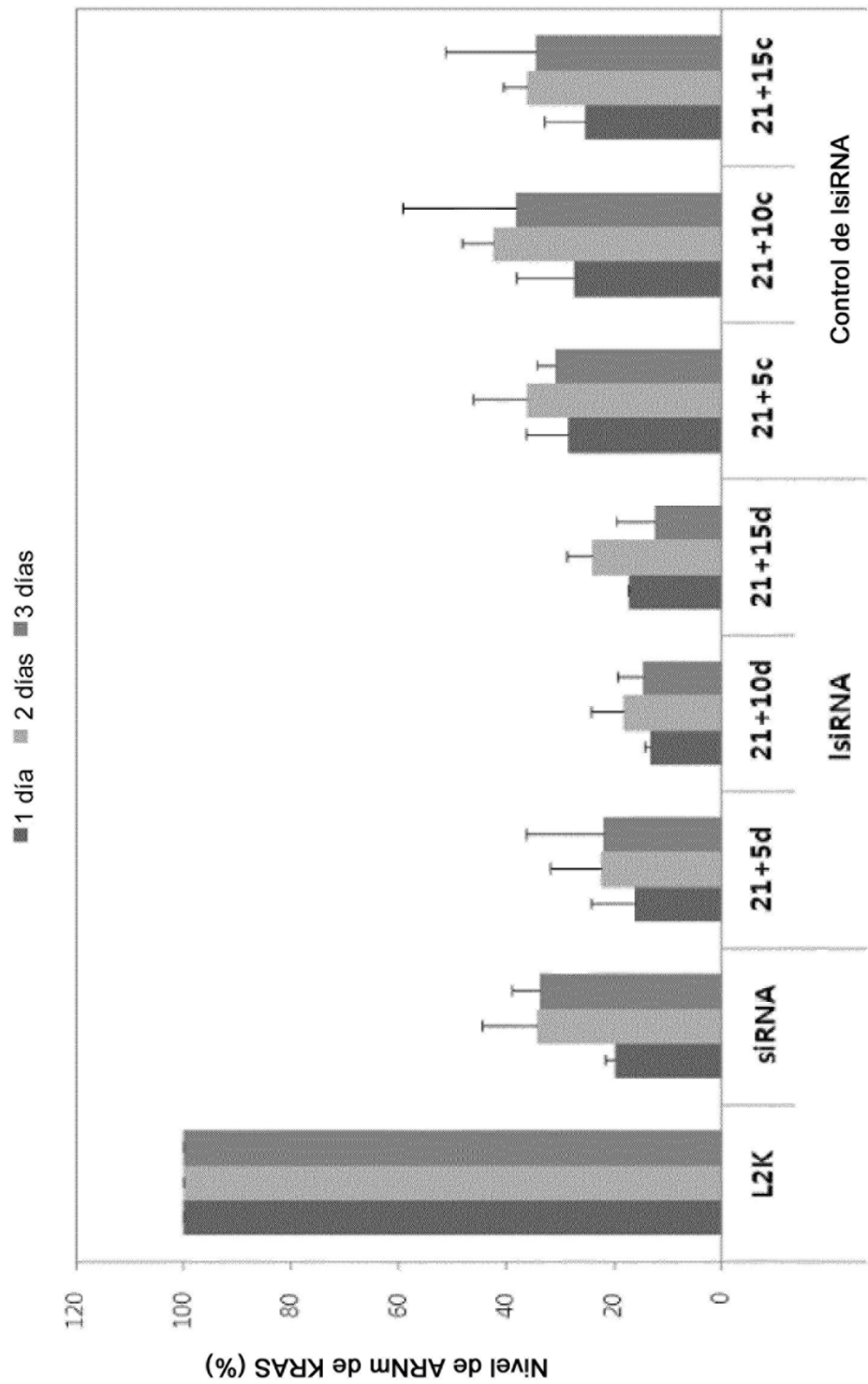


FIG. 8

KRAS	asiRNA	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -UUCCUUCGUUCAUCAUUAACU -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 18
	16S+5d	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -aggatGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 19
	16S+5c	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -tacgagUCCUUCGUUCAUCAUUAACU -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 20
	16S+10d	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -tcctaaggatGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 21
	16S+10c	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -accagtaacgagUCCUUCGUUCAUCAUUAACU -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 22
	16S+15d	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -ttatctcctaaggatGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 23
	16S+15c	5' -AGCAAGUAGUAAUUGA -3' (S) 3' -ttggcaccagtaacgagUCCUUCGUUCAUCAUUAACU -5' (AS)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 24

FIG. 9

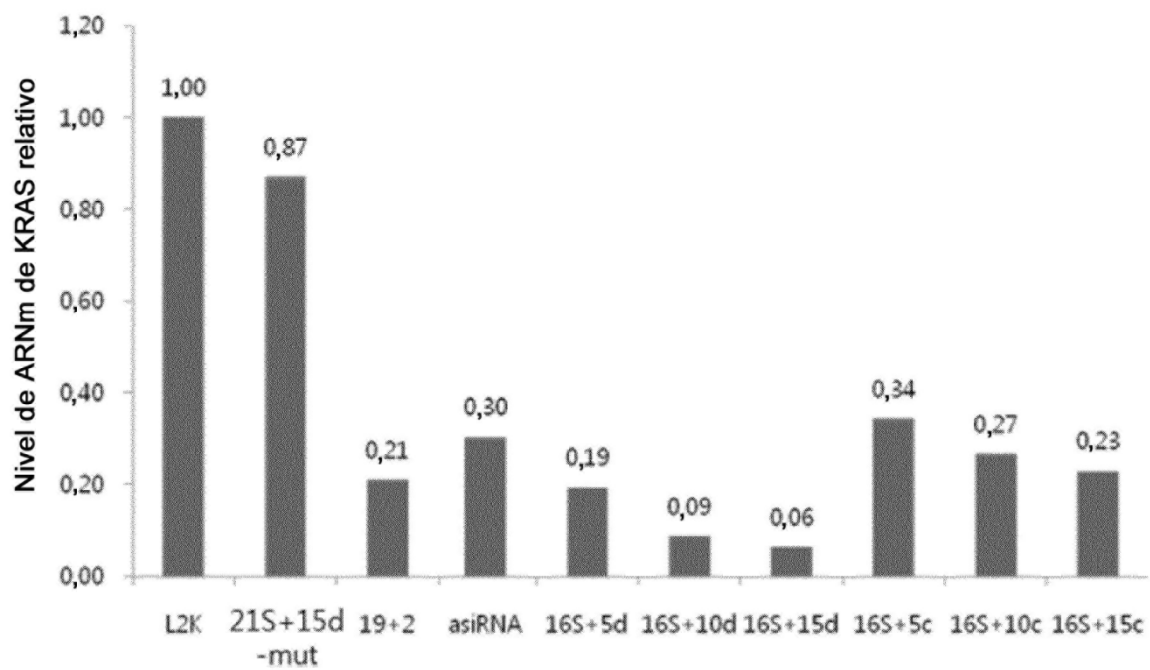


FIG. 10

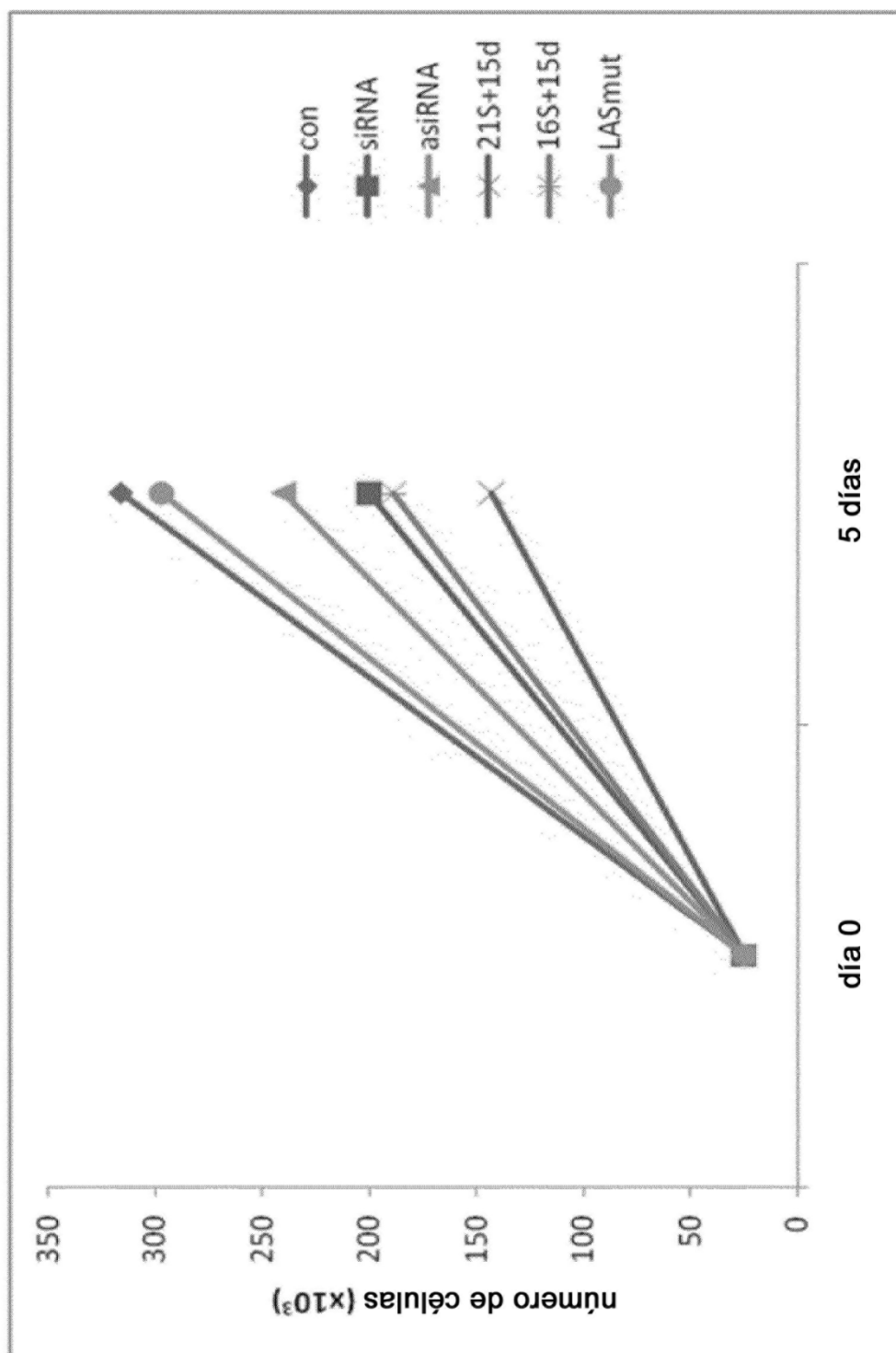


FIG. 11

KRAS	21S+10r	3' -UCCUAAGGAUGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS) 5' -GGAAGCAAGUAGUAAUUGAUU-3' (S)	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 25
	21S+10rc	3' -ACCAGUACGAGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS) 5' -GGAAGCAAGUAGUAAUUGAUU-3' (S)	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 26
	16S+10r	3' -UCCUAAGGAUGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS) 5' -AGCAAGUAGUAAUUGA-3' (S)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 25
	16S+10rc	3' -ACCAGUACGAGUCCUUCGUUCAUCAUUAACU-5' (AS) 5' -AGCAAGUAGUAAUUGA-3' (S)	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 26

FIG. 12

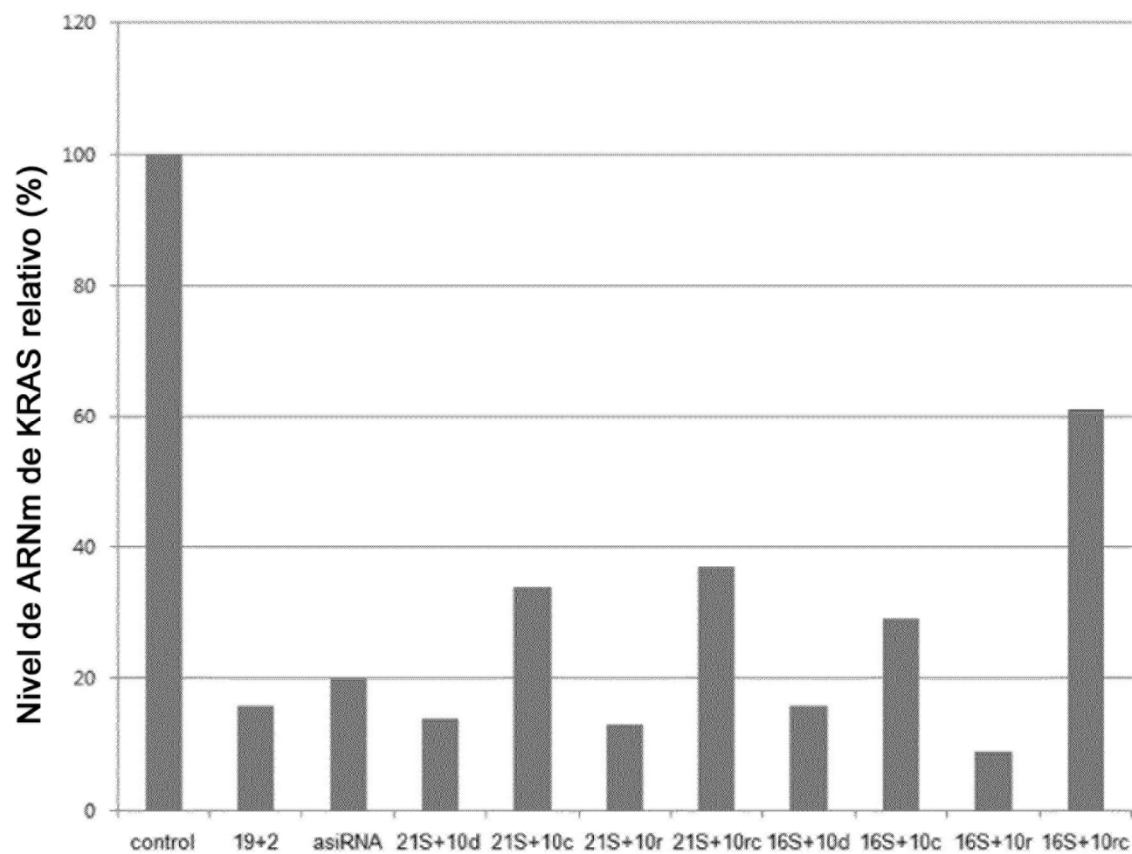


FIG. 13

CTNNB1- 2	19+2	5' -CUAUCAGAUAGCAGAAU-3' (S) 3' -UUGAUGUUCUACUACGUCUU-5' (AS)	SEQ ID NO:27 SEQ ID NO:28
	asiRNA	5' -UCAAGAUAGCAGAA-3' (S) 3' -UUGAUGUUCUACUACGUCUU-5' (AS)	SEQ ID NO:29 SEQ ID NO:28
	16S+15d	5' -UCAAGAUAGCAGAA-3' (S) 3' -caacatttgaactaaUUGAUGUUCUACUACGUCUU-5' (AS)	SEQ ID NO:29 SEQ ID NO:30
	16S+15c	5' -UCAAGAUAGCAGAA-3' (S) 3' -ggcaccagtacgaggUUGAUGUUCUACUACGUCUU-5' (AS)	SEQ ID NO:29 SEQ ID NO:31

FIG. 14

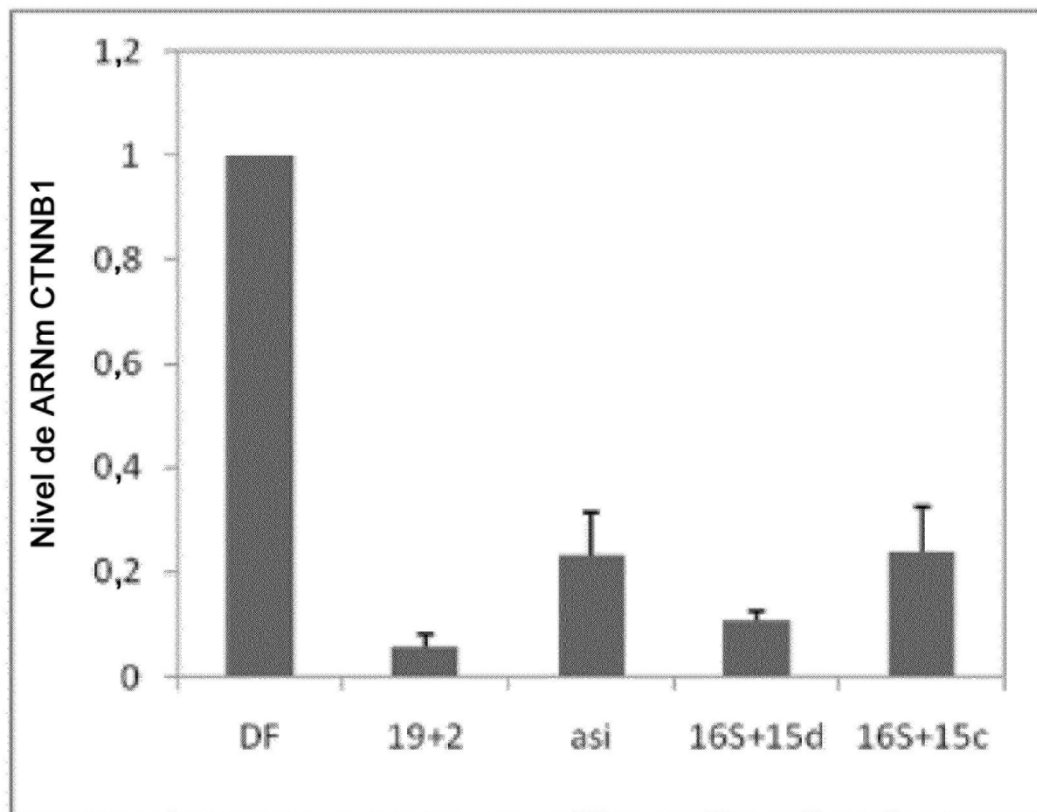


FIG. 15

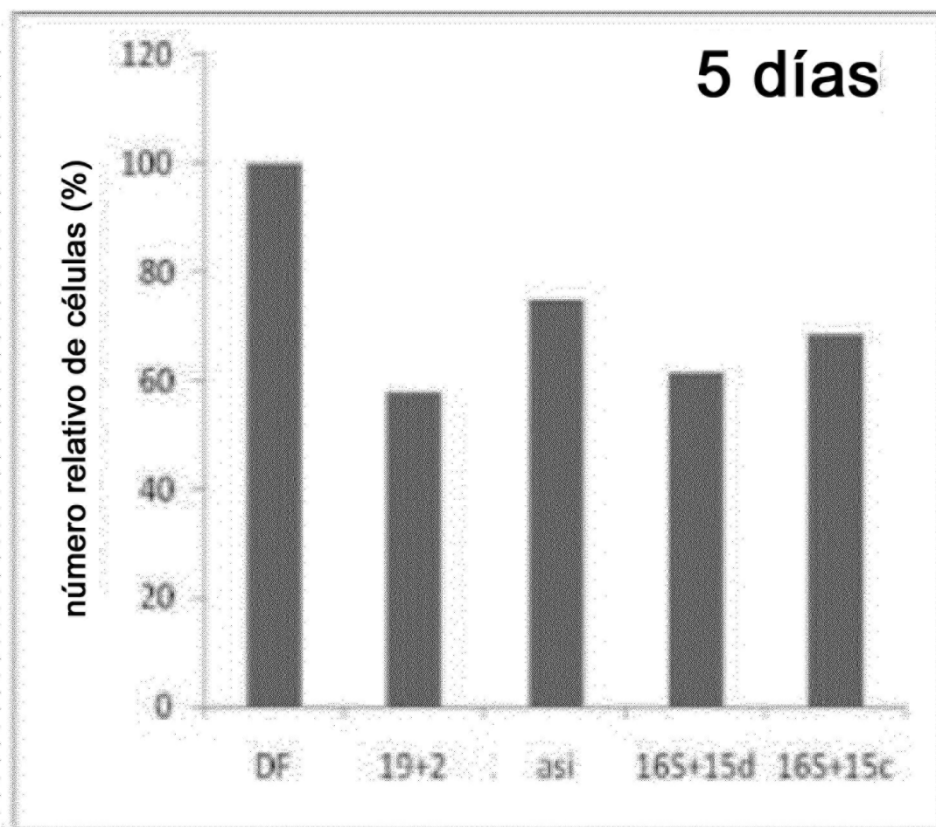


FIG. 16

