

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 789 049**

51 Int. Cl.:

A61K 31/712 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2015 PCT/US2015/067553**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16106400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2015 E 15874361 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3236974**

54 Título: **Agentes de interferencia de ARN para modulación génica de GST-π**

30 Prioridad:

26.12.2014 JP 2014266198

24.06.2015 US 201562184239 P

13.12.2015 US 201562266664 P

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

23.10.2020

73 Titular/es:

**NITTO DENKO CORPORATION (100.0%)
1-2, Shimohozumi 1-chome
Ibaraki-shi, Osaka 567-8680, JP**

72 Inventor/es:

**YING, WENBIN;
MINOMI, KENJIROU;
HARBORTH, JENS;
TAKAHASHI, HIROKAZU;
TERADA, ERIKA;
ZHANG, JUN y
AHMADIAN, MOHAMMAD**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 789 049 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

Agentes de interferencia de ARN para modulación génica de GST- π

5 **Campo técnico de la invención**

Esta invención se refiere a los campos de productos biofarmacéuticos y agentes terapéuticos que se componen de moléculas a base de ácido nucleico. Más particularmente, esta invención se refiere a compuestos y a composiciones que utilizan la interferencia de ARN (iARN) para modular la expresión de GST- π humana, y a usos de los mismos.

10

Antecedentes de la invención

Se ha encontrado que diversos tejidos cancerosos humanos se correlacionan con la aparición del gen KRAS mutado. En algunos casos, los tejidos también presentan niveles elevados de expresión de glutatión S-transferasa pi (GST- π). (Miyaniishi *et al.*, Gastroenterology, 2001, vol. 121:865-874, Resumen). Por ejemplo, se observaron niveles séricos de GST- π elevados en pacientes con diversos tumores malignos gastrointestinales. (Niitsu *et al.*, Cancer, 1989, vol.63, n.º 2, págs. 317-323, Resumen)

GST- π es un miembro de la familia de GST de enzimas que desempeña un papel en la detoxificación catalizando la conjugación de compuestos hidrófobos y electrófilos con glutatión reducido. Puede reducirse la expresión de GST- π *in vitro* con un ARNip (Niitsu *et al.*, documento US 2014/0315975 A1). Hokaiwado *et al.* (Carcinogenesis vol. 29, n.º 6, págs. 1134-1138, 2008) estudian la glutatión S-transferasa pi que media en la proliferación de células de cáncer de próstata independientes de andrógenos. Müller *et al.* (Int. J. Cancer 123, 1797-1806, 2008) describen tiazolidas que inhiben el crecimiento e inducen la muerte celular dependiente de glutatión S-transferasa pi (GSTP1) en células de cáncer de colon humano. Sawers *et al.* (British Journal of Cancer 111, 1150-1158, 2014) se refieren a glutatión S-transferasa P1 (GSTP1) que influye directamente en la quimiosensibilidad al fármaco de platino en líneas celulares tumorales ováricas. El documento WO 2007/061922 A2 se refiere a métodos para predecir e impedir la resistencia a compuestos taxoides. El documento EP 2 724 729 A1 describe un agente de inducción de la apoptosis que contiene como componentes activos un fármaco que suprime la GST- π y un fármaco que suprime la autofagia. Sin embargo, existen muchos inconvenientes de los agentes de ARNip existentes, tales como actividad insuficiente, efectos fuera de la diana, falta de estabilidad sérica, y falta de potencia o eficacia *in vivo*.

Existe la necesidad urgente de composiciones y métodos para modular la expresión de genes asociados con cáncer. En particular, agentes terapéuticos basados en la inhibición de la expresión de GST- π requerirán secuencias y estructuras de ARNip muy potentes y estables, que pueden reducir los efectos fuera de la diana.

Lo que se necesita son secuencias, compuestos y estructuras de ARNip para modular la expresión de GST- π , con usos para tratar una enfermedad, tal como tumores malignos.

40 **Breve resumen**

Esta invención se refiere a compuestos, a composiciones y a su uso en métodos para modular la expresión de GST- π humana usando interferencia de ARN.

45 En algunas realizaciones, esta invención proporciona moléculas, que comprenden una cadena sentido de SEQ ID NO: 131 y una cadena antisentido de SEQ ID NO: 157 que forman una región dúplex, para silenciar genes de interferencia de ARN de GST- π .

En realizaciones adicionales, las estructuras, moléculas y composiciones de esta invención pueden usarse en métodos para prevenir o tratar enfermedades, o mejorar síntomas de estados o trastornos asociados con GST- π , incluyendo un tumor maligno.

Las realizaciones de esta invención incluyen lo siguiente:

55 una molécula de ácido nucleico para inhibir la expresión de GST- π que comprende una cadena sentido de SEQ ID NO: 131 y una cadena antisentido de SEQ ID NO: 157, en la que las cadenas forman una región dúplex. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser moléculas de ARNip para inhibir la expresión de GST- π , y pueden contener uno o más nucleótidos que se modifican químicamente.

60 En algunas realizaciones, las moléculas de ARNip de ácido nucleico para inhibir la expresión de GST- π pueden incluir nucleótidos 2'-deoxi, nucleótidos sustituidos con 2'-O-alquilo, nucleótidos sustituidos con 2'-deoxi-2'-fluoro, o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, los nucleótidos 2'-deoxi pueden estar en la región semilla de las moléculas de ARNip. En determinados aspectos, las moléculas de ARNip para inhibir la expresión de GST- π pueden tener desoxinucleótidos en una pluralidad de posiciones en la cadena antisentido.

65

Las moléculas de ácido nucleico de esta invención pueden inhibir ventajosamente la expresión de ARNm de GST- π con una CI50 de menos de 300 pM. En determinadas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden inhibir la expresión de niveles de ARNm de GST- π en al menos el 25% *in vivo*, tras una única administración de las moléculas. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden tener actividad fuera de la diana de la cadena pasajera reducida, o reducida en al menos 50 veces, o al menos 100 veces.

Algunas realizaciones de esta invención proporcionan además composiciones farmacéuticas que contienen las moléculas de ARNiP y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el portador puede ser una molécula lipídica o un liposoma. Esta divulgación incluye vectores o células que comprenden las moléculas de ácido nucleico.

También se contemplan en esta invención composiciones para su uso en métodos para tratar una enfermedad asociada con la expresión de GST- π , administrando una composición a un sujeto que lo necesita que contiene un ARNiP, en la que la enfermedad es tumor maligno, cáncer, cáncer provocado por células que expresan KRAS mutado, sarcoma o carcinoma.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: la figura 1 muestra la profunda reducción de tumores ortotópicos de cáncer de pulmón *in vivo* por un ARNiP de esta invención dirigido a GST- π . El ARNiP de GST- π se administró en una formulación liposomal a una dosis de 2 mg/kg a ratones desnudos atímicos que presentan tumores ortotópicos de cáncer de pulmón A549. Los pesos de los tumores primarios finales se midieron en la necropsia para el grupo de tratamiento y un grupo de control de vehículo. El ARNiP de GST- π mostró eficacia significativa para la inhibición de tumores de cáncer de pulmón en este estudio de seis semanas. Tal como se muestra en la figura 1, después de 43 días, el ARNiP de GST- π mostró una inhibición tumoral marcadamente ventajosa, con pesos tumorales primarios finales promedio significativamente reducidos en 2,8 veces, en comparación con los del control.

Figura 2: la figura 2 muestra la eficacia de inhibición tumoral *in vivo* para un ARNiP de GST- π . Se utilizó un modelo de xenoinjerto de cáncer usando células A549 con una dosis relativamente baja de ARNiP a 0,75 mg/kg. El ARNiP de GST- π mostró inhibición tumoral ventajosa en el plazo de unos pocos días. Después de 36 días, el ARNiP de GST- π mostró inhibición tumoral marcadamente ventajosa, con volúmenes tumorales finales promedio significativamente reducidos en aproximadamente 2 veces, en comparación con los del control.

Figura 3: la figura 3 muestra la eficacia de inhibición tumoral *in vivo* para un ARNiP de GST- π en el criterio de valoración de la figura 2. El ARNiP de GST- π mostró inhibición tumoral ventajosa con pesos tumorales promedio reducidos en más de 2 veces.

Figura 4: la figura 4 muestra que un ARNiP de GST- π de esta invención aumentó en gran medida la muerte de células cancerosas mediante apoptosis *in vitro*. El ARNiP de GST- π provocó la regulación por incremento de PUMA, un biomarcador para la apoptosis, que se asocia con pérdida de la viabilidad celular. En la figura 4, la expresión de PUMA se aumentó en gran medida desde 2-6 días después de la transfección del ARNiP de GST- π .

Figura 5: la figura 5 muestra que un ARNiP de GST- π de esta invención proporcionó eficacia de silenciamiento para tumores de xenoinjerto de A549 *in vivo*. Se observó silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π en ratones hembra (nu/nu) desnudos atímicos (Charles River) con el ARNiP dirigido a GST- π . Tal como se muestra en la figura 5, a una dosis de 4 mg/kg, se detectó una reducción significativa de aproximadamente el 40% en el ARNm de GST- π 24 horas después de la inyección.

Figura 6: la figura 6 muestra que un ARNiP de GST- π de esta invención inhibió los tumores de xenoinjerto de cáncer de páncreas *in vivo*. El ARNiP de GST- π proporcionó potencia de silenciamiento génico *in vivo* cuando se administró en una formulación liposomal a tumores de xenoinjerto de cáncer de páncreas en ratones hembra desnudos atímicos, de 6 a 8 semanas de edad. Tal como se muestra en la figura 6, se obtuvo una respuesta a la dosis con dosis que oscilaban desde 0,375 mg/kg hasta 3 mg/kg de ARNiP dirigido a GST- π . El ARNiP de GST- π mostró inhibición tumoral ventajosa en el plazo de unos pocos días después de la administración, reduciéndose el volumen del tumor en aproximadamente 2 veces en el criterio de valoración.

Figura 7: la figura 7 muestra que un ARNiP de GST- π de esta invención mostró estabilidad sérica aumentada. Tal como se muestra en la figura 7, la semivida ($t_{1/2}$) en suero tanto para la cadena sentido (figura 7, parte superior) como para la cadena antisentido (figura 7, parte inferior) de un ARNiP de GST- π fue de aproximadamente 100 minutos.

Figura 8: la figura 8 muestra que un ARNiP de GST- π de esta invención mostró estabilidad potenciada en la formulación en plasma. La figura 8 muestra la incubación de una formulación liposomal de un ARNiP de GST- π en suero humano al 50% en PBS, y detección del ARNiP restante en diversos puntos de tiempo. Tal como se muestra

en la figura 8, la semivida ($t_{1/2}$) en plasma de la formulación del ARNip de GST- π fue significativamente más larga de 100 horas.

5 Figura 9: la figura 9 muestra el silenciamiento *in vitro* para la cadena guía de un ARNip de GST- π . Tal como se muestra en la figura 9, el silenciamiento de cadenas guía del ARNip de GST- π fue aproximadamente exponencial, en comparación con un control con secuencia reorganizada al azar que no mostró ningún efecto.

10 Figura 10: la figura 10 muestra el silenciamiento *in vitro* para la cadena pasajera del ARNip de GST- π de la figura 9. Tal como se muestra en la figura 10, el silenciamiento fuera de la diana de cadenas pasajeras para el ARNip de GST- π se redujo en gran medida, esencialmente sin ningún efecto.

15 Figura 11: la figura 11 muestra el silenciamiento *in vitro* para las cadenas guía de varios ARNip de GST- π muy activos. Tal como se muestra en la figura 11, las actividades de silenciamiento de las cadenas guía de los ARNip de GST- π fueron aproximadamente exponenciales.

Figura 12: la figura 12 muestra silenciamiento *in vitro* para la cadena pasajera de los ARNip de GST- π de la figura 11. Tal como se muestra en la figura 12, las actividades de silenciamiento fuera de la diana de cadenas pasajeras para los ARNip de GST- π se redujeron significativamente por debajo de aproximadamente 500 pM.

20 Figura 13: la figura 13 muestra silenciamiento *in vitro* para la cadena guía de un ARNip de GST- π muy activo. Tal como se muestra en la figura 13, la actividad de silenciamiento de cadenas guía del ARNip de GST- π fue aproximadamente exponencial.

25 Figura 14: la figura 14 muestra silenciamiento *in vitro* para la cadena pasajera del ARNip de GST- π de la figura 13. Tal como se muestra en la figura 14, la actividad de silenciamiento fuera de la diana de cadenas pasajeras para el ARNip de GST- π se redujo significativamente.

Descripción detallada de la invención

30 Esta invención se refiere a compuestos, a composiciones y a su uso en métodos para agentes terapéuticos a base de ácido nucleico para modular la expresión de GST- π .

35 En algunas realizaciones, esta invención proporciona moléculas activas en la interferencia de ARN, que comprenden una cadena sentido de SEQ ID NO: 131 y una cadena antisentido de SEQ ID NO: 157 que forman un dúplex, así como estructuras y composiciones que pueden silenciar la expresión de GST- π .

Las estructuras y composiciones de esta divulgación pueden usarse en la prevención o tratamiento de diversas enfermedades tales como tumor maligno.

40 En realizaciones adicionales, esta divulgación proporciona composiciones para la administración y captación de una o más moléculas de iARN terapéuticas de esta invención, así como métodos de uso de las mismas. Las composiciones a base de ARN de esta invención pueden usarse en métodos para prevenir o tratar tumores malignos, tales como cánceres.

45 Las composiciones terapéuticas de esta invención incluyen moléculas de ácido nucleico, tal como se definen en las reivindicaciones, que son activas en la interferencia de ARN. Las moléculas de ácido nucleico terapéuticas pueden dirigirse a GSTP1 (GST- π) para silenciamiento génico.

50 En diversas realizaciones, esta invención proporciona una gama de moléculas, tal como se definen en las reivindicaciones, que pueden ser activas como un ARN pequeño de interferencia (ARNip), y puede regular o silenciar la expresión génica de GST- π .

Los ARNip de esta invención pueden usarse para prevenir o tratar tumores malignos.

55 Algunos aspectos de esta divulgación proporcionan además un vehículo, una formulación o una formulación lipídica de nanopartículas para administrar los ARNip de la invención a sujetos que necesitan prevenir o tratar un tumor maligno. Esta divulgación contempla además métodos para administrar ARNip como agentes terapéuticos a mamíferos.

60 Las moléculas y composiciones terapéuticas de esta invención pueden usarse para la interferencia de ARN dirigida a prevenir o tratar una enfermedad asociada con la GST- π , administrando un compuesto o una composición a un sujeto que lo necesita.

65 Los métodos de esta divulgación pueden utilizar los compuestos de la invención para prevenir o tratar un tumor maligno.

5 En algunos aspectos, el tumor maligno puede presentarse en diversas enfermedades, por ejemplo, cánceres que expresan sumamente GST- π , cánceres provocados por células que expresan KRAS mutado, sarcomas, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma, rhabdomioma, leiomioma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, linfangiosarcoma, sarcoma sinovial, condrosarcoma, osteosarcoma y carcinomas.

10 En determinados aspectos, los métodos de esta divulgación pueden utilizar los compuestos de la invención para prevenir o tratar tumores malignos y cánceres en cualquier órgano o tejido, incluyendo, por ejemplo, tumor cerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de duodeno, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de riñón, cáncer de uretra, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de piel, leucemia, linfoma maligno, tumores malignos epiteliales y tumores malignos no epiteliales.

15 En determinados casos, puede usarse una combinación de moléculas terapéuticas de esta divulgación para silenciar o inhibir la expresión génica de GST- π .

20 Esta divulgación proporciona una gama de moléculas de iARN, en la que cada molécula tiene una cadena sentido de polinucleótidos y una cadena antisentido de polinucleótidos; cada cadena de la molécula tiene de desde 15 hasta 30 nucleótidos de longitud; una región contigua de desde 15 hasta 30 nucleótidos de la cadena antisentido es complementaria a una secuencia de un ARNm que codifica para GST- π ; y al menos una porción de la cadena sentido es complementaria a al menos una porción de la cadena antisentido, y la molécula tiene una región dúplex de desde 15 hasta 30 nucleótidos de longitud.

25 Una molécula de iARN de esta divulgación puede tener una región contigua de desde 15 hasta 30 nucleótidos de la cadena antisentido que es complementaria a una secuencia de un ARNm que codifica para GST- π , que se sitúa en la región dúplex de la molécula.

30 En algunos casos, una molécula de iARN puede tener una región contigua de desde 15 hasta 30 nucleótidos de la cadena antisentido que es complementaria a una secuencia de un ARNm que codifica para GST- π .

35 Algunos aspectos de esta divulgación pueden proporcionar además métodos para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas de tumor maligno, o reducir el riesgo de desarrollar tumor maligno, o retrasar la aparición de tumor maligno en un mamífero que lo necesita.

GST- π y moléculas de iARN

40 La secuencia de ácido nucleico de un ejemplo de ARNm de glutatión S-transferasa pi (GST- π humana) humana diana se divulga en el número de registro de GenBank NM_000852.3 (hGSTP1), y tiene 986 nucleótidos de longitud.

Un experto habitual en la técnica deberá entender que una secuencia notificada puede cambiar a lo largo del tiempo y, por consiguiente, incorporar cualquier cambio necesario en las moléculas de ácido nucleico en el presente documento.

45 Algunas realizaciones de esta invención pueden proporcionar composiciones y su uso en métodos para silenciamiento génico de la expresión de GST- π usando moléculas pequeñas de ácido nucleico tal como se definen en las reivindicaciones. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico incluyen moléculas activas en la interferencia de ARN (moléculas de iARN), moléculas de ARN pequeño de interferencia (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), micro ARN (miARN) y ARN de horquilla corta (ARNhc), así como ARN dirigidos por ADN (ddARN), ARN asociados a Piwi (piARN) y ARNip asociados a repeticiones (rasiARN). Tales moléculas pueden mediar en la interferencia de ARN contra la expresión génica de GST- π .

55 La composición y los métodos divulgados en el presente documento también pueden usarse en el tratamiento de diversas clases de tumores malignos en un sujeto.

Las moléculas de ácido nucleico, tal como se definen en las reivindicaciones, y su uso en métodos de esta invención pueden usarse para regular por disminución la expresión génica que codifica para GST- π .

60 Las composiciones y los métodos de esta divulgación pueden incluir una o más moléculas de ácido nucleico que, independientemente o en combinación, pueden modular o regular la expresión de proteína de GST- π y/o genes que codifican para proteínas de GST- π , proteínas y/o genes que codifican para GST- π asociada con el mantenimiento y/o el desarrollo de las enfermedades, los estados o trastornos asociados con GST- π , tal como un tumor maligno.

65 Las composiciones y su uso en métodos de esta invención se describen con referencia a secuencias a modo de ejemplo de GST- π . Un experto habitual en la técnica entenderá que diversos aspectos y realizaciones de la

invención se refieren a cualquier gen, secuencia o variante de GST- π relacionada, tales como genes de homólogos y variantes de transcritos y polimorfismos, incluyendo polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) asociados con cualquier gen de GST- π .

5 En algunas realizaciones, las composiciones, tal como se definen en las reivindicaciones, y su uso en métodos de esta invención pueden proporcionar una molécula de ácido nucleico pequeño de interferencia (ARNip) bicatenario que regula por disminución la expresión de un gen de GST- π , por ejemplo, GST- π humana.

10 Una molécula de iARN de esta invención, tal como se define en las reivindicaciones, puede dirigirse a GST- π y cualquier secuencia homóloga, por ejemplo, usando secuencias complementarias o incorporando pares de bases no canónicas, por ejemplo, pares de bases de apareamiento erróneo y/o titubeo, que pueden proporcionar secuencias diana adicionales.

15 En casos en los que se identifican apareamientos erróneos, pueden usarse pares de bases no canónicas, por ejemplo, bases de apareamiento erróneo y/o titubeo para generar moléculas de ácido nucleico que seleccionan como diana más de una secuencia génica.

20 Por ejemplo, pueden usarse pares de bases no canónicas tales como pares de bases UU y CC para generar moléculas de ácido nucleico que son capaces de seleccionar como diana secuencias para dianas de GST- π discrepantes que comparten homología de secuencia. Por tanto, una molécula de iARN puede dirigirse a una secuencia de nucleótidos que se conserva entre genes homólogos, y puede usarse una única molécula de iARN para inhibir la expresión de más de un gen.

25 En algunos aspectos, las composiciones, tal como se definen en las reivindicaciones, y su uso en métodos de esta invención incluyen moléculas de iARN que son activas contra el ARNm de GST- π , en los que la molécula de iARN incluye una secuencia complementaria a cualquier ARNm que codifica para una secuencia de GST- π .

30 En algunas realizaciones, una molécula de iARN de esta divulgación puede tener actividad contra el ARN de GST- π , en la que la molécula de iARN incluye una secuencia complementaria a un ARN que tiene una GST- π variante que codifica para una secuencia, por ejemplo, un gen de GST- π mutante conocido en la técnica que va a asociarse con tumor maligno.

35 En realizaciones adicionales, una molécula de iARN de esta invención, tal como se define en las reivindicaciones, puede incluir una secuencia de nucleótidos que puede interactuar con una secuencia de nucleótidos de un gen de GST- π y puede mediar el silenciamiento de la expresión génica de GST- π .

40 Las moléculas de ácido nucleico para inhibir expresión de GST- π tienen una cadena sentido y una cadena antisentido, en las que las cadenas forman una región dúplex. Las moléculas de ácido nucleico pueden tener uno o más de los nucleótidos en la región dúplex que se modifica químicamente, incluyendo tales modificaciones tal como se conocen en la técnica. Cualquier nucleótido en una proyección del ARNip también puede modificarse químicamente.

45 En algunas realizaciones, los nucleótidos modificados químicamente preferidos son nucleótidos 2'-deoxi. En realizaciones adicionales, los nucleótidos modificados químicamente pueden incluir nucleótidos sustituidos con 2'-O-alquilo, nucleótidos sustituidos con 2'-deoxi-2'-fluoro, nucleótidos de fosforotioato, nucleótidos bloqueados, o cualquier combinación de los mismos.

50 En determinadas realizaciones, una estructura preferida puede tener una cadena antisentido que contiene desoxinucleótidos en una pluralidad de posiciones, siendo la pluralidad de posiciones una de las siguientes: cada una de las posiciones 4, 6 y 8, desde el extremo 5' de la cadena antisentido; cada una de las posiciones 3, 5 y 7, desde el extremo 5' de la cadena antisentido; cada una de las posiciones 1, 3, 5 y 7, desde el extremo 5' de la cadena antisentido; cada una de las posiciones 3-8, desde el extremo 5' de la cadena antisentido; y cada una de las posiciones 5-8, desde el extremo 5' de la cadena antisentido. Cualquiera de estas estructuras puede combinarse con uno o más nucleótidos sustituidos con 2'-deoxi-2'-fluoro en la región dúplex.

55 Las moléculas de ácido nucleico de esta invención pueden inhibir la expresión de ARNm de GST- π con una CI50 ventajosa de menos de aproximadamente 300 pM, o menos de aproximadamente 200 pM, o menos de aproximadamente 100 pM, o menos de aproximadamente 50 pM.

60 Además, las moléculas de ácido nucleico pueden inhibir la expresión de los niveles de ARNm de GST- π en al menos el 25% *in vivo*, tras una única administración.

65 Se contemplan composiciones farmacéuticas en esta invención, que pueden contener ARNip tal como se describe en el presente documento, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Puede usarse cualquier portador adecuado, incluyendo los conocidos en la técnica, así como moléculas lipídicas, nanopartículas o

liposomas, cualquiera de los cuales puede encapsular las moléculas de ARNip.

5 Esta invención divulga composiciones farmacéuticas para su uso en métodos para tratar una enfermedad asociada con la expresión de GST- π , métodos que incluyen administrar una composición a un sujeto que lo necesita que contiene los ARNip. Las enfermedades que van a tratarse pueden incluir tumor maligno, cáncer, cáncer provocado por células que expresan KRAS mutado, sarcoma y carcinoma, entre otras.

Los ejemplos de moléculas de iARN de esta divulgación dirigidas al ARNm de GST- π se muestran en la tabla 1.

10 Tabla 1: secuencias de moléculas de iARN para GST- π

ID	Pos. de ref.	SEQ ID NO	CADENA SENTIDO (5'-->3') SEQ ID NO: de 1 a 65	SEQ ID NO	CADENA ANTISENTIDO (5'-->3') SEQ ID NO: de 66 a 130
A1	652	1	UCCAGAACCCAGGGAGGCAtt	66	UGCCUCCUGGUUCUGGGACa
A10	635	2	CUUUUGAGACCCUGCUGCtt	67	GACAGCAGGGUCUCAAAAAGgc
A11	649	3	CUGUCCAGAACCCAGGGAGtt	68	CUCCUCCUGGUUCUGGGACAGca
A12	650	4	UGUCCAGAACCCAGGGAGGtt	69	CCUCCUCCUGGUUCUGGGACAgc
A13	631	5	AAGCCUUUUGAGACCCUGCtt	70	GCAGGGUCUCAAAAAGGCUuca
A14	638	6	UUGAGACCCUGCUGUCCAtt	71	UGGGACAGCAGGGUCUCAAAAaa
A15	636	7	UUUUGAGACCCUGCUGUCCtt	72	GGACAGCAGGGUCUCAAAAagg
A16	640	8	GAGACCCUGCUGUCCAGAtt	73	UCUGGGACAGCAGGGUCUCAaa
A17	332	9	GCUGGAAGGAGGAGGUGGUtt	74	ACCACCUCCUCCUCCAGCctc
A18	333	10	CUGGAAGGAGGAGGUGGUtt	75	CACCACCUCCUCCUCCAGCct
A19	321	11	UCAGGGCCAGAGCUGGAAGtt	76	CUUCCAGCUCUGGCCUCAGAtc
A2	639	12	UGAGACCCUGCUGUCCAGtt	77	CUGGGACAGCAGGGUCUCAAAAa
A20	323	13	AGGGCCAGAGCUGGAAGGAtt	78	UCCUCCAGCUCUGGCCUUGa
A21	331	14	AGCUGGAAGGAGGAGGUGGtt	79	CCACCUCCUCCUCCAGCUct
A22	641	15	AGACCCUGCUGUCCAGAAtt	80	UUCUGGGACAGCAGGGUCUCAca
A23	330	16	GAGCUGGAAGGAGGAGGUGtt	81	CACCUCUCCUCCUCCAGCUctg
A25	647	17	UGCUGUCCAGAACCCAGGGtt	82	CCUCCUGGUUCUGGGACAGCAgg
A26	653	18	CCCAGAACCCAGGGAGGCAAtt	83	UUGCCUCCUCCUGGUUCUGGGac
A3	654	19	CCAGAACCCAGGGAGGCAAGtt	84	CUUGCCUCCUCCUGGUUCUGGga
A4	637	20	UUUGAGACCCUGCUGUCCtt	85	GGGACAGCAGGGUCUCAAAAag
A5	642	21	GACCCUGCUGUCCAGAAct	86	GUUCUGGGACAGCAGGGUCctc
A6	319	22	GAUCAGGGCCAGAGCUGGAtt	87	UCCAGCUCUGGCCUCAGAUctg
A7	632	23	AGCCUUUUGAGACCCUGCUtt	88	AGCAGCUCUCAAAAAGGCUtc
A8	633	24	GCCUUUUGAGACCCUGCUGtt	89	CAGCAGGGUCUCAAAAAGGctt
A9	634	25	CCUUUUGAGACCCUGCUGUtt	90	ACAGCAGGGUCUCAAAAAGGct
AG7	632	26	CGCCUUUUGAGACCCUGCAtt	91	UGCAGGGUCUCAAAAAGGCGtc
AK1	257	27	CCUACACCGUGGUCUAUUUtt	92	AAAUAGACCACGGUGUAGGgc
AK10	681	28	UGUGGGAGACCAGAUCUCCtt	93	GGAGAUCUGGUUCUCCACAAat
AK11	901	29	GCGGGAGGCAGAGUUUGCCtt	94	GGCAAACUCUGCCUCCCGCtc
AK12	922	30	CCUUUCUCCAGGACCAAUAtt	95	UAUUGGUCCUGGAGAAAGGaa
AK13/A24	643	31	ACCCUGCUGUCCAGAACct	96	GGUUCUGGGACAGCAGGGUct
AK2	267	32	GGUCUAUUUCCAGUCCGAtt	97	UCGAACUGGGAAAUAGACCac
AK3	512	33	CCUUGUGGACAUUGGUAAtt	98	UUCACCAUGUCCACAGGGct
AK4	560	34	ACAUCUCCUCAUCUACActt	99	GUGUAGAUGAGGGAGAUat
AK5	593	35	GCAAGGAUGACUAUGUAAtt	100	UUCACAUAGUCAUCCUUGCcc
AK6	698	36	CCUUCGCUGACUAACAACCUtt	101	AGGUUGUAGUCAGCGAAGGag
AK7	313	37	CUGGCAGAUACAGGGCCAGAtt	102	UCUGGCCUUGAUCCAGCAca
AK8	421	38	GACGGAGACCUCACCCUGUtt	103	ACAGGGUGAGGUCUCCGUCct
AK9	590	39	CGGGCAAGGAUGACUAUGUtt	104	ACAUAGUCAUCCUUGCCCgcc
AU10	635	40	CUUUUGAGACCCUGCUGUAtt	105	UACAGCAGGGUCUCAAAAAGgc
AU23	330	41	GAGCUGGAAGGAGGAGGUAtt	106	UACCUCCUCCUCCAGCUctg
AU24	643	42	ACCCUGCUGUCCAGAACAtt	107	UGUUCUGGGACAGCAGGGUct
AU25	648	43	UGCUGCCAGAACCCAGGAtt	108	UCCUGGUUCUGGGACAGCAgg
AU7	632	44	AGCCUUUUGAGACCCUGCAtt	109	UGCAGGGUCUCAAAAAGGctc
AU9	634	45	CCUUUUGAGACCCUGCUGAtt	110	UCAGCAGGGUCUCAAAAAGGct
B1	629	46	UGAAGCCUUUUGAGACCCUtt	111	AGGGUCUCAAAAAGGCUUCAgt
B10	627	47	ACUGAAGCCUUUUGAGACctt	112	GGUCUCAAAAAGGCUUCAGUtg
B11	596	48	AGGAUGACUAUGUGAAGGctt	113	GCCUUCACAUAGUCAUCCUtg
B12	597	49	GGAUGACUAUGUGAAGGCAtt	114	UGCCUUCACAUAGUCAUCCtt

B13	598	50	GAUGACUAUGUGAAGGCACt	115	GUGCCUUCACAUAGUCAUCct
B14	564	51	CUCCCUCAUCUACACCAACt	116	GUUGGUGUAGAUGAGGGAGat
B2	630	52	GAAGCCUUUUGAGACCCUGt	117	CAGGGUCUCAAAGGCUUCag
B3	563	53	UCUCCCUCAUCUACACCAAt	118	UUGGUGUAGAUGAGGGAGAtg
B4	567	54	CCUCAUCUACACCAACUAUtt	119	AUAGUUGGUGUAGAUGAGGGga
B5	566	55	CCCUCAUCUACACCAACUAAtt	120	UAGUUGGUGUAGAUGAGGGGag
B6	625	56	CAACUGAAGCCUUUUGAGAtt	121	UCUCAAAAGGCUUCAGUUGcc
B7	626	57	AACUGAAGCCUUUUGAGACTt	122	GUCUCAAAAGGCUUCAGUUGc
B8	628	58	CUGAAGCCUUUUGAGACCCt	123	GGGUCUCAAAGGCUUCAGtt
B9	565	59	UCCUCAUCUACACCAACUtt	124	AGUUGGUGUAGAUGAGGGGaga
BG3	563	60	GCUCCCUCAUCUACACCAAt	125	UUGGUGUAGAUGAGGGAGCtg
BU2	630	61	GAAGCCUUUUGAGACCCUAAtt	126	UAGGGUCUCAAAGGCUUCag
BU10	627	62	ACUGAAGCCUUUUGAGACAtt	127	UGUCUCAAAAGGCUUCAGUtg
BU14	565	63	CUCCCUCAUCUACACCAAAAt	128	UUUGGUGUAGAUGAGGGAGat
BU4	567	64	CCUCAUCUACACCAACUAAtt	129	UUAGUUGGUGUAGAUGAGGGga
C1-934	934	65	ACCAUAAAAUUUCUAAGAtt	130	UCUUAGAAAAUUUUAUUGGUcc

Leyenda para la tabla 1: las mayúsculas A, G, C y U se refieren a ribo A, ribo G, ribo C y ribo U, respectivamente. Las letras minúsculas a, u, g, c, t se refieren a 2'-deoxi-A, 2'-deoxi-U, 2'-deoxi-G, 2'-deoxi-C, y desoxitimidina respectivamente.

5 Los ejemplos de moléculas de iARN de esta divulgación y la invención dirigidas al ARNm de GST- π se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: secuencias de moléculas de iARN para GST- π

ID	SEQ ID NO	CADENA SENTIDO (5'-->3') SEQ ID NO: de 131 a 156	SEQ ID NO	CADENA ANTISENTIDO (5'-->3') SEQ ID NO: de 157 a 182
BU2'	131	GAAGCCUUUUGAGACCCUANN	157	UAGGGUCUCAAAGGCUUCNN
14	132	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	158	UAGGGUCUCAAAGGCUUCJU
15	133	GAAGCCUUUUGAGACCCUAUU	159	uagggucuCAAAGGCUUCUU
16	134	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	160	UagggucuCAAAGGCUUCJU
17	135	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	161	UAgggucuCAAAGGCUUCJU
18	136	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	162	UAGggucuCAAAGGCUUCJU
19	137	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	163	UAGGgucuCAAAGGCUUCJU
20	138	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	164	uAgGgUcUCAAAGGCUUCJU
21	139	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	165	UAgGgUcUCAAAGGCUUCJU
22	140	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	166	UaGgGuCuCAAAGGCUUCJU
23	141	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	167	UAGgGuCuCAAAGGCUUCJU
24	142	GAAGCCUUUUGAGACCCUAAtt	168	UagggucuCAAAGGCUUCJU
25	143	GAAGCLUUUUGAGACCCUAJU	169	UAGGGUCUCAAAGGCUUCJU
26	144	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	170	fUAGGGUCUCAAAGGCUUCJU
27	145	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	171	uAGGGUCUCAAAGGCUUCJU
28	146	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	172	UsAGGGUCUCAAAGGCUUCJU
29	147	GAAGCCUUUUGAGACCCUfAUU	173	fUAGGGUCUfCAAAGGCUUCJU
30	148	GAAGCCUUUUGAGfACCCUfAUU	174	fUAGGGUCUfCAfAFAAGGCUUCJU
31	149	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	175	UAGGGUCUCAAAGGCUUCJU
31'	150	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	176	fUAGGGUCUCAAAGGCUUCJU
32	151	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	177	UAGGGUCUCAAAGGCUUCJU
39	152	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	178	UAGgGuCuCAAAGGCUUCJU
45	153	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	179	UAGgGuCuCAAAGGCUUCJU
46	154	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	180	UAGgGuCuCAAAGGCUUCJU
47	155	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	181	UAGgGuCuCAAAGGCUUCJU
48	156	GAAGCCUUUUGAGACCCUAJU	182	fUAGgGuCuCAAAGGCUUCJU

Leyenda para la tabla 2: las mayúsculas A, G, C y U se refieren a ribo A, ribo G, ribo C y ribo U, respectivamente. Las letras minúsculas a, u, g, c, t se refieren a 2'-deoxi-A, 2'-deoxi-U, 2'-deoxi-G, 2'-deoxi-C y desoxitimidina (dT = T) respectivamente. El subrayado se refiere a sustituido con 2'-OMe, por ejemplo, U. La letra minúscula f se refiere a sustitución con 2'-deoxi-2'-fluoro, por ejemplo, fU es 2'-deoxi-2'-fluoro-U. N es A, C, G, U, U, a, c, g, u, t, o un nucleótido modificado, invertido o químicamente modificado. Un carácter "s" representa una unión fosforotioato.

15 Los ejemplos de moléculas de iARN de esta divulgación dirigidas al ARNm de GST- π se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: secuencias de moléculas de iARN para GST- π

ID	SEQ ID NO	CADENA SENTIDO (5'-->3') SEQ ID NO: de 183 a 194	SEQ ID NO	CADENA ANTISENTIDO (5'-->3') SEQ ID NO: de 195 a 206
A9'	183	CCUUUUGAGACCCUGCUGUNN	195	ACAGCAGGGUCUCAAAAGGNN
1	184	CCUCAUCUACACCAACU <u>UUU</u>	196	AUAGUUGGUGUAGAU <u>GAGGUU</u>
2	185	CCUCAUCUACACCAACU <u>UUU</u>	197	auaguuggUGUAGAUGAG <u>GUU</u>
3	186	CCUCAUCUACACCAACU <u>UUU</u>	198	AuaguuggUGUAGAUGAG <u>GUU</u>
4	187	CCUCAUCUACACCAACU <u>UUU</u>	199	AUaguuggUGUAGAUGAG <u>GUU</u>
5	188	CCUCAUCUACACCAACU <u>UUU</u>	200	AUAguuggUGUAGAUGAG <u>GUU</u>
6	189	CCUCAUCUACACCAACU <u>UUU</u>	201	AUAGuuggUGUAGAUGAG <u>GUU</u>
7	190	CCUCAUCUACACCAACU <u>UUU</u>	202	auaGuUgGUGUAGAUGAG <u>GUU</u>
8	191	CCUCAUCUACACCAACU <u>UUU</u>	203	AUaGuUgGUGUAGAUGAG <u>GUU</u>
9	192	CCUCAUCUACACCAACU <u>UUU</u>	204	AuAgUuGgUGUAGAUGAG <u>GUU</u>
10	193	CCUCAUCUACACCAACU <u>UUU</u>	205	AUAgUuGgUGUAGAUGAG <u>GUU</u>
11	194	CCUCAUCUACACCAACU <u>UUU</u>	206	AuaguuggUGUAGAUGAG <u>GUU</u>

5 Leyenda para la tabla 3: las letras mayúsculas A, G, C y U se refieren a ribo A, ribo G, ribo C y ribo U, respectivamente. Las letras minúsculas a, u, g, c, t se refieren a 2'-deoxi-A, 2'-deoxi-U, 2'-deoxi-G, 2'-deoxi-C y desoxitimidina (dT = T = t) respectivamente. El subrayado se refiere a sustituido con 2'-OMe, por ejemplo, U. La letra minúscula f se refiere a sustitución con 2'-deoxi-2'-fluro, por ejemplo, fU es 2'-deoxi-2'-fluro-U. N es A, C, G, U, U, a, c, g, u, t, o un nucleótido modificado, invertido o químicamente modificado.

10

Los ejemplos de moléculas de iARN de esta divulgación dirigidas al ARNm de GST- π se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: secuencias de moléculas de iARN para GST- π

ID	SEQ ID NO	CADENA SENTIDO (5'-->3') SEQ ID NO: de 207 a 221	SEQ ID NO	CADENA ANTISENTIDO (5'-->3') SEQ ID NO: de 222 a 236
B13'	207	GAUGACUAUGUGAAGGCACNN	222	GUGCCUUCACAUAGUCAUCNN
4	208	GGAUGACUAUGUGAAGGCA <u>UU</u>	223	UGCCUUCACAUAGUCAUCC <u>UU</u>
5	209	GGAUGACUAUGUGAAGGCA <u>UU</u>	224	ugccuucaCAUAGUCAUCC <u>UU</u>
6	210	GGAUGACUAUGUGAAGGCA <u>UU</u>	225	UgccuucaCAUAGUCAUCC <u>UU</u>
7	211	GGAUGACUAUGUGAAGGCA <u>UU</u>	226	UGccuucaCAUAGUCAUCC <u>UU</u>
8	212	GGAUGACUAUGUGAAGGCA <u>UU</u>	227	UGCcuucaCAUAGUCAUCC <u>UU</u>
9	213	GGAUGACUAUGUGAAGGCA <u>UU</u>	228	UGCCuucaCAUAGUCAUCC <u>UU</u>
10	214	GGAUGACUAUGUGAAGGCA <u>UU</u>	229	uGcCuUcACAUAGUCAUCC <u>UU</u>
11	215	GGAUGACUAUGUGAAGGCA <u>UU</u>	230	UGcCuUcACAUAGUCAUCC <u>UU</u>
12	216	GGAUGACUAUGUGAAGGCA <u>UU</u>	231	UgCcUuCaCAUAGUCAUCC <u>UU</u>
13	217	GGAUGACUAUGUGAAGGCA <u>UU</u>	232	UGCcUuCaCAUAGUCAUCC <u>UU</u>
14	218	GGAUGACUAUGUGAAGGCA <u>UU</u>	233	UgccuucaCAUAGUCAUCC <u>UU</u>
15	219	GGAUGACUAUfGUfGAAGGCA <u>UU</u>	234	UGCfCUUCACAUAGUCAUCC <u>UU</u>
17	220	GGAUGACUAUGUGAAGGCA <u>UU</u>	235	UGCCUUCACAUAGUCAUCC <u>UU</u>
18	221	GGAUGACUAUGUGAAGGCA <u>UU</u>	236	UGCCUUCACAUAGUCAUCC <u>UU</u>

15

Leyenda para la tabla 4: las letras mayúsculas A, G, C y U se refieren a ribo A, ribo G, ribo C y ribo U, respectivamente. Las letras minúsculas a, u, g, c, t se refieren a 2'-deoxi-A, 2'-deoxi-U, 2'-deoxi-G, 2'-deoxi-C, y desoxitimidina (dT = T = t) respectivamente. El subrayado se refiere a sustituido con 2'-OMe, por ejemplo, U. La letra minúscula f se refiere a sustitución con 2'-deoxi-2'-fluro, por ejemplo, fU es 2'-deoxi-2'-fluro-U. N es A, C, G, U, U, a, c, g, u, t, o un nucleótido modificado, invertido o químicamente modificado.

20

Los ejemplos de moléculas de iARN de esta divulgación dirigidas a ARNm de GST- π se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: secuencias de moléculas de iARN para GST- π

25

ID	SEQ ID NO	CADENA SENTIDO (5'-->3') SEQ ID NO: de 237 a 248	SEQ ID NO	CADENA ANTISENTIDO (5'-->3') SEQ ID NO: de 249 a 260
B2'	237	GAAGCCUUUUGAGACCCUGNN	249	CAGGGUCUCAAAAGGCUUCNN
1	238	GAAGCCUUUUGAGACCCUG <u>UU</u>	250	CAGGGUCUCAAAAGGCUUC <u>UU</u>
2	239	GAAGCCUUUUGAGACCCUG <u>UU</u>	251	cagggucuCAAAGGCUUC <u>UU</u>

3	240	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	252	CagggucuCAAAGGCUUCUU
4	241	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	253	CAGggucuCAAAGGCUUCUU
5	242	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	254	CAGggucuCAAAGGCUUCUU
6	243	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	255	CAGGgucuCAAAGGCUUCUU
7	244	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	256	cAgGgUcUCAAAAGGCUUCUU
8	245	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	257	CAgGgUcUCAAAAGGCUUCUU
9	246	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	258	CaGgGuCuCAAAGGCUUCUU
10	247	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	259	CAGgGuCuCAAAGGCUUCUU
11	248	GAAGCCUUUUGAGACCCUGUU	260	CagggucuCAAAGGCUUCUU

Leyenda para la tabla 5: las letras mayúsculas A, G, C y U se refieren a ribo A, ribo G, ribo C y ribo U, respectivamente. Las letras minúsculas a, u, g, c, t se refieren a 2'-deoxi-A, 2'-deoxi-U, 2'-deoxi-G, 2'-deoxi-C y desoxitimidina (dT = T = t) respectivamente. El subrayado se refiere a sustituido con 2'-OMe, por ejemplo, U. La letra minúscula f se refiere a sustitución con 2'-deoxi-2'-fluro, por ejemplo, fU es 2'-deoxi-2'-fluro-U. N es A, C, G, U, U, a, c, g, u, t, o un nucleótido modificado, invertido o químicamente modificado.

Los ejemplos de moléculas de iARN de esta divulgación dirigidas al ARNm de GST- π se muestran en la tabla 6.

10 Tabla 6: secuencias de moléculas de iARN para GST- π

ID	SEQ ID NO	CADENA SENTIDO (5'-->3') SEQ ID NO: de 261 a 272	SEQ ID NO	CADENA ANTISENTIDO (5'-->3') SEQ ID NO: de 273 a 284
B4'	261	CCUCAUCUACACCAACUAUNN	273	AUAGUUGGUGUAGAUGAGGNN
1	262	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	274	AUAGUUGGUGUAGAUGAGGUU
2	263	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	275	auaguuggUGUAGAUGAGGUU
3	264	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	276	AuaguuggUGUAGAUGAGGUU
4	265	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	277	AUaguuggUGUAGAUGAGGUU
5	266	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	278	AUAguuggUGUAGAUGAGGUU
6	267	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	279	AUAGuuggUGUAGAUGAGGUU
7	268	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	280	aUaGuUgGUGUAGAUGAGGUU
8	269	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	281	AUaGuUgGUGUAGAUGAGGUU
9	270	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	282	AuAgUuGgUGUAGAUGAGGUU
10	271	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	283	AUAgUuGgUGUAGAUGAGGUU
11	272	CCUCAUCUACACCAACUAUUU	284	AuaguuggUGUAGAUGAGGUU

Leyenda para la tabla 6: las letras mayúsculas A, G, C y U se refieren a ribo A, ribo G, ribo C y ribo U, respectivamente. Las letras minúsculas a, u, g, c, t se refieren a 2'-deoxi-A, 2'-deoxi-U, 2'-deoxi-G, 2'-deoxi-C, y desoxitimidina (dT = T = t) respectivamente. El subrayado se refiere a sustituido con 2'-OMe, por ejemplo, U. La letra minúscula f se refiere a sustitución con 2'-deoxi-2'-fluro, por ejemplo, fU es 2'-deoxi-2'-fluro-U. N es A, C, G, U, U, a, c, g, u, t, o un nucleótido modificado, invertido o químicamente modificado.

En algunos aspectos, esta divulgación proporciona una gama de moléculas de ácido nucleico, en las que: a) la molécula tiene una cadena sentido de polinucleótidos y una cadena antisentido de polinucleótidos; b) cada cadena de la molécula es de desde 15 hasta 30 nucleótidos de longitud; c) una región contigua de desde 15 hasta 30 nucleótidos de la cadena antisentido es complementaria a una secuencia de un ARNm que codifica para GST- π ; d) al menos una porción de la cadena sentido es complementaria a al menos una porción de la cadena antisentido, y la molécula tiene una región dúplex de desde 15 hasta 30 nucleótidos de longitud.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico puede tener una región contigua de desde 15 hasta 30 nucleótidos de la cadena antisentido que es complementaria a una secuencia de un ARNm que codifica para GST- π se sitúa en la región dúplex de la molécula.

En casos adicionales, la molécula de ácido nucleico puede tener una región contigua de desde 15 hasta 30 nucleótidos de la cadena antisentido que es complementaria a una secuencia de un ARNm que codifica para GST- π .

En determinados casos, cada cadena de la molécula de ácido nucleico puede ser de desde 18 hasta 22 nucleótidos de longitud. La región dúplex de la molécula de ácido nucleico puede ser de 19 nucleótidos de longitud.

En formas alternativas, la molécula de ácido nucleico puede tener una cadena sentido de polinucleótidos y una cadena antisentido de polinucleótidos que se conectan como una única cadena, y forman una región dúplex conectada en un extremo por un bucle.

Algunos aspectos de una molécula de ácido nucleico de esta divulgación pueden tener un extremo romo. En

determinados casos, una molécula de ácido nucleico puede tener una o más proyecciones en 3'.

Esta divulgación proporciona una gama de moléculas de ácido nucleico que son moléculas de iARN activas para el silenciamiento génico. Las moléculas de ácido nucleico divulgadas pueden ser un ARNbc, un ARNip, un micro ARN, o un ARNhc activo para el silenciamiento génico, así como ARN dirigido por ADN (ddARN), ARN asociado a Piwi (piARN), o un ARNip asociado a repeticiones (rasiARN). Las moléculas de ácido nucleico pueden ser activas para inhibir la expresión de GST- π .

Algunas realizaciones de esta invención proporcionan además moléculas de ácido nucleico, tal como se definen en las reivindicaciones, que tienen una CI50 para el silenciamiento de GST- π de menos de 100 pM.

Algunas realizaciones adicionales de esta invención proporcionan moléculas de ácido nucleico, tal como se definen en las reivindicaciones, que tienen una CI50 para el silenciamiento de GST- π de menos de 50 pM.

Esta invención contempla además composiciones que contienen una o más de las moléculas de ácido nucleico de la invención, tal como se definen en las reivindicaciones junto con un portador farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, el portador puede ser una molécula lipídica o un liposoma.

Los compuestos y las composiciones de esta invención, tal como se definen en las reivindicaciones, son útiles en métodos para prevenir o tratar una enfermedad asociada con la GST- π , administrando un compuesto o una composición a un sujeto que lo necesita.

Los métodos de esta divulgación pueden utilizar los compuestos de la invención para prevenir o tratar un tumor maligno. El tumor maligno puede presentarse en diversas enfermedades, por ejemplo, cánceres asociados con la expresión de GST- π , cánceres provocado por células que expresan KRAS mutado, sarcomas, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma, rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, linfangiosarcoma, sarcoma sinovial, condrosarcoma, osteosarcoma, carcinomas, tumor cerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de duodeno, cáncer de apéndice, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de ano, cáncer de riñón, cáncer de uretra, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de piel, leucemia, linfoma maligno, tumores malignos epiteliales y tumores malignos no epiteliales.

ARNip modificados químicamente

Las realizaciones de esta invención abarcan moléculas de ARNip, tal como se definen en las reivindicaciones, que se modifican químicamente para proporcionar propiedades potenciadas para el uso terapéutico, tales como actividad y potencia aumentadas para el silenciamiento génico. Esta invención proporciona moléculas de ARNip modificadas químicamente, tal como se definen en las reivindicaciones, que pueden tener estabilidad sérica aumentada, así como efectos fuera de la diana reducidos, sin pérdida de actividad y potencia de las moléculas de ARNip para la modulación génica y el silenciamiento génico. En algunos aspectos, esta invención proporciona ARNip, tal como se definen en las reivindicaciones, que tienen modificaciones químicas en diversas combinaciones, que potencian la estabilidad y eficacia del ARNip.

En algunas realizaciones, las moléculas de ARNip de esta invención, tal como se definen en las reivindicaciones, pueden tener actividad fuera de la diana de la cadena pasajera reducida en al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 50 veces, o al menos 100 veces.

Tal como se usan en el presente documento, los términos modificado y modificado químicamente se refieren a cambios realizados en la estructura de un nucleótido que se produce de manera natural o una estructura de ácido nucleico de un ARNip, que abarca ARNip que tienen uno o más análogos de nucleótido, nucleótidos alterados, nucleótidos no convencionales, nucleótidos que se producen de manera no natural, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el número de estructuras modificadas químicamente en un ARNip pueden incluir todos los componentes estructurales, y/o todos los nucleótidos de la molécula de ARNip.

Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tienen modificación del grupo azúcar de un nucleótido, modificación de una nucleobase de un nucleótido, modificación de una estructura principal o unión de ácido nucleico, modificación de la estructura de un nucleótido o nucleótidos en el extremo terminal de una cadena de ARNip, y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tienen una modificación del sustituyente en el carbono 2' del azúcar.

Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tienen una modificación en el

extremo 5', el extremo 3', o en ambos extremos de una cadena.

Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tienen modificaciones que producen apareamientos erróneos de complementariedad entre las cadenas.

5 Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tienen un extremo 5'-propilamina, un extremo 5'-fosforilado, un extremo S'-puromicina, o un grupo en el extremo 3'-biotina.

10 Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tienen un ribonucleótido sustituido con 2'-fluoro, un ribonucleótido sustituido con 2'-OMe, un ribonucleótido sustituido con 2'-deoxi, un ribonucleótido sustituido con 2'-amino, un ribonucleótido sustituido con 2'-tio.

15 Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tienen una o más 5-halouridinas, 5-halocitidinas, 5-metilcitidinas, ribotimidinas, 2-aminopurinas, 2,6-diaminopurinas, 4-tiouridinas o 5-aminoaliluridinas.

Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tiene uno o más grupos fosforotioato.

20 Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tienen uno o más ribonucleótidos sustituidos con 2'-fluoro, 2'-fluorouridinas, 2'-fluorocitidinas, 2'-desoxirribonucleótidos, 2'-desoxiadenosinas o 2'-desoxiguanosinas.

25 Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tiene una o más uniones fosforotioato.

Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tienen una o más uniones alquilendiol, uniones oxi-alquiltio o uniones oxicarboniloxilo.

30 Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tienen uno o más grupos desoxiabásicos, inosinas, N3-metil-uridinas, N6,N6-dimetil-adenosinas, pseudouridinas, ribonucleósidos de purina y ribavirinas.

35 Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tienen uno o más grupos terminales invertidos en 3' o 5'.

Los ejemplos de ARNip modificados y modificados químicamente incluyen ARNip que tienen una o más 5-(2-amino)propiluridinas, 5-bromouridinas, adenosinas, 8-bromoguanosinas, 7-deaza-adenosinas o N6-metiloadenosina.

40 Métodos para modular la GST- π y tratar un tumor maligno

Las realizaciones de esta invención pueden proporcionar moléculas de iARN, tal como se definen en las reivindicaciones, que pueden usarse para regular por disminución o inhibir la expresión de GST- π y/o proteínas de GST- π .

45 En algunas realizaciones, una molécula de iARN de esta invención, tal como se define en las reivindicaciones, puede usarse para regular por disminución o inhibir la expresión de GST- π y/o proteínas de GST- π que surgen a partir de polimorfismos de haplotipo de GST- π que pueden asociarse con una enfermedad o un estado tal como un tumor maligno.

50 La monitorización de niveles de proteína de GST- π o ARNm pueden usarse para caracterizar el silenciamiento génico, y para determinar la eficacia de los compuestos y las composiciones de esta invención.

55 Las moléculas de iARN de esta divulgación pueden usarse de manera individual, o en combinación con otros ARNip para modular la expresión de uno o más genes.

60 Las moléculas de iARN de esta divulgación pueden usarse de manera individual, o en combinación, o junto con otros fármacos conocidos para prevenir o tratar enfermedades, o mejorar síntomas de estados o trastornos asociados con la GST- π , incluyendo un tumor maligno.

Las moléculas de iARN de esta invención, tal como se definen en las reivindicaciones, pueden usarse para modular o inhibir la expresión de GST- π de una manera específica de secuencia.

65 Las moléculas de iARN de esta divulgación pueden incluir una cadena guía para la que una serie de nucleótidos contiguos son al menos parcialmente complementarios a un ARNm de GST- π .

En determinados aspectos, puede tratarse un tumor maligno por interferencia de ARN usando una molécula de iARN de esta invención, tal como se define en las reivindicaciones.

5 El tratamiento de un tumor maligno puede caracterizarse en modelos a base de células adecuados, así como modelos animales *ex vivo* o *in vivo*.

El tratamiento de un tumor maligno puede caracterizarse determinando el nivel de ARNm de GST- π o el nivel de proteína de GST- π en células de tejido afectado.

10 El tratamiento de un tumor maligno puede caracterizarse mediante exploración médica no invasiva de un órgano o tejido afectado.

15 Las realizaciones de esta invención pueden incluir composiciones farmacéuticas para su uso en métodos para prevenir, tratar o mejorar los síntomas de una enfermedad o un estado asociados con la GST- π en un sujeto que lo necesita.

20 En algunos casos, los métodos para prevenir, tratar o mejorar los síntomas de un tumor maligno en un sujeto pueden incluir administrar al sujeto una molécula de iARN de esta invención para modular la expresión de un gen de GST- π en el sujeto u organismo.

25 En algunos aspectos, esta divulgación contempla métodos para regular por disminución la expresión de un gen de GST- π en una célula o un organismo, poniendo en contacto la célula o el organismo con una molécula de iARN de esta invención.

Algunos aspectos de esta divulgación abarcan moléculas de ARNip de las tablas 1-6 que se modifican o se modifican químicamente según los ejemplos anteriores.

30 Interferencia de ARN

La interferencia de ARN (iARN) se refiere a silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia en animales mediada por ARN pequeños de interferencia (ARNip). Véanse, por ejemplo, Zamore *et al.*, Cell, 2000, vol. 101, págs. 25-33; Fire *et al.*, Nature, 1998, vol. 391, págs. 806811; Sharp, Genes & Development, 1999, vol. 13, págs. 139-141.

35 Una respuesta de iARN en células puede desencadenarse por un ARN bicatenario (ARNbc), aunque el mecanismo aún no se comprende completamente. Determinados ARNbc en células pueden experimentar la acción de enzima Dicer, una enzima de la ribonucleasa III. Véanse, por ejemplo, Zamore *et al.*, Cell, 2000, vol. 101, págs. 25-33; Hammond *et al.*, Nature, 2000, vol. 404, págs. 293-296. Dicer puede procesar el ARNbc en trozos más cortos de ARNbc, que son ARNip.

40 En general, los ARNip pueden ser de desde aproximadamente 21 hasta aproximadamente 23 nucleótidos de longitud e incluyen una región dúplex de pares de bases de aproximadamente 19 nucleótidos de longitud.

45 El iARN implica un complejo de endonucleasa conocido como el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés). Un ARNip tiene una cadena antisentido o guía que entra en el complejo RISC y media la escisión de una diana de ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNip. La otra cadena del ARNip es la cadena pasajera. La escisión del ARN diana tiene lugar en el medio de la región complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNip. Véase, por ejemplo, Elbashir *et al.*, Genes & Development, 2001, vol. 15, págs. 188-200.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "cadena sentido" se refiere a una secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNip que es parcial o completamente complementaria a al menos una porción de una cadena antisentido correspondiente de la molécula de ARNip. La cadena sentido de una molécula de ARNip puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con una secuencia de ácido nucleico diana.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término "cadena antisentido" se refiere a una secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNip que es parcial o completamente complementaria a al menos una porción de una secuencia de ácido nucleico diana. La cadena antisentido de una molécula de ARNip puede incluir una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a al menos una porción de una cadena sentido correspondiente de la molécula de ARNip.

60 Las moléculas de iARN pueden regular por disminución o silenciar la expresión génica mediando la interferencia de ARN de una manera específica de secuencia. Véanse, por ejemplo, Zamore *et al.*, Cell, 2000, vol. 101, págs. 25-33; Elbashir *et al.*, Nature, 2001, vol. 411, págs. 494-498; Kreutzer *et al.*, documento WO2000/044895; Zemicka-Goetz *et*

al., documento WO2001/36646; Fire *et al.*, documento WO1999/032619; Plaetinck *et al.*, documento WO2000/01846; Mello *et al.*, documento WO2001/029058.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “inhibir”, “regular por disminución” o “reducir” con respecto a la expresión génica significan que la expresión del gen, o el nivel de moléculas de ARNm que codifica para una o más proteínas, o la actividad de una o más de las proteínas codificadas se reduce por debajo de la observada en ausencia de una molécula de iARN o ARNip de esta invención. Por ejemplo, el nivel de expresión, el nivel de ARNm o el nivel de actividad de proteínas codificadas, puede reducirse en al menos el 1%, o al menos el 10%, o al menos el 20%, o al menos el 50%, o al menos el 90%, o más del observado en ausencia de una molécula de iARN o ARNip de esta invención.

Las moléculas de iARN también pueden usarse para silenciar la expresión génica viral y, por tanto, afectan a la replicación viral.

Las moléculas de iARN pueden elaborarse a partir de cadenas de polinucleótido diferenciadas: una cadena sentido o cadena pasajera, y una cadena antisentido o cadena guía. Las cadenas guía y pasajera son al menos parcialmente complementarias. La cadena guía y cadena pasajera pueden formar una región dúplex que tiene desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 49 pares de bases.

En algunos casos, la región dúplex de un ARNip puede tener 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 ó 49 pares de bases.

En determinadas realizaciones, una molécula de iARN puede activarse en un complejo RISC, con una longitud de la región dúplex activa para RISC.

En realizaciones adicionales, una molécula de iARN puede activarse como un sustrato de Dicer, que va a convertirse en una molécula de iARN que puede activarse en un complejo RISC.

En algunos aspectos, una molécula de iARN puede tener porciones de secuencia guía y pasajera complementarias en extremos opuestos de una molécula larga, de manera que la molécula puede formar una región dúplex con las porciones de secuencias complementarias, y las cadenas se unen en un extremo de la región dúplex por o bien ligadores nucleotídicos o bien no nucleotídicos. Por ejemplo, una disposición en horquilla, o una disposición en tallo y bucle. Las interacciones de ligadores con las cadenas pueden ser enlaces covalentes o interacciones no covalentes.

Una molécula de iARN de esta divulgación puede incluir un ligador nucleotídico, no nucleotídico o nucleotídico/no nucleotídico mixto que une la región sentido del ácido nucleico a la región antisentido del ácido nucleico. Un ligador nucleotídico puede ser un ligador de ≥ 2 nucleótidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 nucleótidos de longitud. El ligador nucleotídico puede ser un aptámero de ácido nucleico. Por “aptámero” o “aptámero de ácido nucleico” tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico que se une específicamente a una molécula diana en la que la molécula de ácido nucleico tiene una secuencia que incluye una secuencia reconocida por la molécula diana en su entorno natural. De manera alternativa, un aptámero puede ser una molécula de ácido nucleico que se une a una molécula diana, en la que la molécula diana no se une de manera natural a un ácido nucleico. Por ejemplo, el aptámero puede usarse para unirse a un dominio de unión a ligando de una proteína, impidiéndose así la interacción del ligando que se produce de manera natural con la proteína. Véanse, por ejemplo, Gold *et al.*, Annu Rev Biochem, 1995, vol. 64, págs. 763-797; Brody *et al.*, J. Biotechnol., 2000, vol. 74, págs. 5-13; Hermann *et al.*, Science, 2000, vol. 287, págs. 820-825.

Los ejemplos de un ligador no nucleotídico incluyen un nucleótido, poliéter, poliamina, poliamida, péptido, hidrato de carbono, lípido, polihidrocarburo u otros compuestos poliméricos abásicos, por ejemplo, polietilenglicoles tales como los que tienen desde 2 hasta 100 unidades de etilenglicol. Algunos ejemplos se describen en Seela *et al.*, Nucleic Acid Research, 1987, vol. 15, págs. 3113-3129; Cload *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1991, vol. 113, págs. 6324-6326; Jaeschke *et al.*, Tetrahedron Lett., 1993, vol. 34, págs. 301; Arnold *et al.*, documento WO1989/002439; Usman *et al.*, documento WO1995/006731; Dudycz *et al.*, documento WO1995/011910, y Ferentz *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1991, vol. 113, págs. 4000-4002.

Una molécula de iARN puede tener una o más proyecciones de la región dúplex. Las proyecciones, que son regiones monocatenarias no emparejadas con bases, pueden ser de desde uno hasta ocho nucleótidos de longitud, o más largas. Una proyección puede ser una proyección en el extremo 3', en la que el extremo 3' de una cadena tiene una región monocatenaria de desde uno hasta ocho nucleótidos. Una proyección puede ser una proyección en el extremo 5', en la que el extremo 5' de una cadena tiene una región monocatenaria de desde uno hasta ocho nucleótidos.

Las proyecciones de una molécula de iARN pueden tener la misma longitud, o pueden ser de longitudes diferentes.

Una molécula de iARN puede tener uno o más extremos romos, en la que los extremos de la región dúplex sin

proyección, y las cadenas se emparejan con bases en el extremo de la región dúplex.

Una molécula de iARN de esta divulgación puede tener uno o más extremos romos, o puede tener una o más proyecciones, o puede tener una combinación de un extremo romo y un extremo de proyección.

5 Un extremo 5' de una cadena de una molécula de iARN puede estar en un extremo romo, o puede estar en una proyección. Un extremo 3' de una cadena de una molécula de iARN puede estar en un extremo romo, o puede estar en una proyección.

10 Un extremo 5' de una cadena de una molécula de iARN puede estar en un extremo romo, mientras que el extremo 3' está en una proyección. Un extremo 3' de una cadena de una molécula de iARN puede estar en un extremo romo, mientras que el extremo 5' está en una proyección.

15 En algunos casos ambos extremos de una molécula de iARN son extremos romos.

En una realización, ambos extremos de una molécula de iARN tienen una proyección.

Las proyecciones en los extremos 5' y 3' pueden ser de longitudes diferentes.

20 En determinados casos, una molécula de iARN puede tener un extremo romo en la que el extremo 5' de la cadena antisentido y el extremo 3' de la cadena sentido no tienen ningún nucleótido de proyección.

En casos adicionales, una molécula de iARN puede tener un extremo romo en la que el extremo 3' de la cadena antisentido y el extremo 5' de la cadena sentido no tienen ningún nucleótido de proyección.

25 Una molécula de iARN puede tener apareamientos erróneos en apareamiento de bases en la región dúplex.

Cualquier nucleótido en una proyección de una molécula de iARN puede ser un desoxirribonucleótido o un ribonucleótido.

30 Uno o más desoxirribonucleótidos pueden estar en el extremo 5', donde el extremo 3' de la otra cadena de la molécula de iARN puede no tener una proyección, o puede no tener una proyección de desoxirribonucleótido.

35 Uno o más desoxirribonucleótidos pueden estar en el extremo 3', donde el extremo 5' de la otra cadena de la molécula de iARN no puede tener una proyección, o no puede tener una proyección de desoxirribonucleótido.

En algunas realizaciones, uno o más, o todos los nucleótidos de la proyección de una molécula de iARN, tal como se define en las reivindicaciones, pueden ser 2'-desoxirribonucleótidos.

40 Moléculas de iARN de sustrato de Dicer

En algunos aspectos, una molécula de iARN puede ser de una longitud adecuada como un sustrato de Dicer, que puede procesarse para producir una molécula de iARN activa por RISC. Véase, por ejemplo, Rossi *et al.*, documento US2005/0244858.

45 Un ARN bicatenario (ARNbc) que es un sustrato de Dicer puede ser de una longitud suficiente de manera que se procesa por Dicer para producir una molécula de iARN activa, y puede incluir además una o más de las siguientes propiedades: (i) el ARNbc del sustrato de Dicer puede ser asimétrico, por ejemplo, teniendo una proyección en 3' en la cadena antisentido, y (ii) el ARNbc del sustrato de Dicer puede tener un extremo 3' modificado en la cadena sentido para dirigir la orientación de la unión y procesamiento de Dicer del ARNbc a una molécula de iARN activa.

50 En determinados casos, la cadena más larga en un ARNbc del sustrato de Dicer puede ser de 24-30 nucleótidos de longitud.

55 Un ARNbc del sustrato de Dicer puede ser simétrico o asimétrico.

En algunos casos, un ARNbc del sustrato de Dicer puede tener una cadena sentido de 22-28 nucleótidos y una cadena antisentido de 24-30 nucleótidos.

60 En determinadas realizaciones, un ARNbc del sustrato de Dicer puede tener una proyección en el extremo 3' de la cadena antisentido.

65 En casos adicionales, un ARNbc del sustrato de Dicer puede tener una cadena sentido de 25 nucleótidos de longitud, y una cadena antisentido de 27 nucleótidos de longitud, con una proyección en 3' de 2 bases. La proyección puede ser de 1, 2 ó 3 nucleótidos de longitud. La cadena sentido también puede tener un fosfato en 5'.

Un ARNbc asimétrico del sustrato de Dicer puede tener dos desoxirribonucleótidos en el extremo 3' de la cadena sentido en lugar de dos de los ribonucleótidos.

5 La cadena sentido de un ARNbc del sustrato de Dicer puede ser de desde aproximadamente 22 hasta aproximadamente 30, o desde aproximadamente 22 hasta aproximadamente 28; o desde aproximadamente 24 hasta aproximadamente 30; o desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 30; o desde aproximadamente 26 hasta aproximadamente 30; o desde aproximadamente 26 y 29; o desde aproximadamente 27 hasta aproximadamente 28 nucleótidos de longitud.

10 La cadena sentido de un ARNbc del sustrato de Dicer puede ser de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 nucleótidos de longitud.

15 En determinados casos, un ARNbc del sustrato de Dicer puede tener cadenas sentido y antisentido que son de al menos aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, y no más largas de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud.

En determinados casos, un ARNbc del sustrato de Dicer puede tener cadenas sentido y antisentido que son de 26 a 29 nucleótidos de longitud.

20 En determinados casos, un ARNbc del sustrato de Dicer puede tener cadenas sentido y antisentido que son de 27 nucleótidos de longitud.

25 Las cadenas sentido y antisentido de un ARNbc del sustrato de Dicer pueden ser de la misma longitud que teniendo extremos romos, o longitudes diferentes que teniendo proyecciones, o pueden tener un extremo romo y una proyección.

Un ARNbc del sustrato de Dicer puede tener una región dúplex de 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ó 27 nucleótidos de longitud.

30 La cadena antisentido de un ARNbc del sustrato de Dicer puede tener cualquier secuencia que se aparea a al menos una porción de la secuencia de la cadena sentido en condiciones biológicas, tales como dentro del citoplasma de una célula eucariota.

35 Un sustrato de Dicer con una cadena sentido y una antisentido puede unirse por una tercera estructura, tal como un grupo ligador o un oligonucleótido ligador. El ligador conecta las dos cadenas del ARNbc, por ejemplo, de manera que se forma una horquilla tras el apareamiento.

40 Las cadenas sentido y antisentido de un sustrato de Dicer son, en general, complementarias, pero pueden tener apareamientos erróneos en el apareamiento de bases.

En algunos casos, un ARNbc del sustrato de Dicer puede ser asimétrico de manera que la cadena sentido tiene 22-28 nucleótidos y la cadena antisentido tiene 24-30 nucleótidos.

45 Una región de una de las cadenas, particularmente la cadena antisentido, del ARNbc del sustrato de Dicer puede tener una longitud de secuencia de al menos 19 nucleótidos, en la que estos nucleótidos están en la región de 21 nucleótidos adyacente al extremo 3' de la cadena antisentido y son suficientemente complementarias a una secuencia de nucleótidos del ARN producido a partir del gen diana.

50 Una cadena antisentido de un ARNbc del sustrato de Dicer puede tener desde 1 hasta 9 ribonucleótidos en el extremo 5', para dar una longitud de 22-28 nucleótidos. Cuando la cadena antisentido tiene una longitud de 21 nucleótidos, entonces pueden añadirse 1-7 ribonucleótidos o 2-5 ribonucleótidos o 4 ribonucleótidos en el extremo 3'. Los ribonucleótidos añadidos pueden tener cualquier secuencia.

55 Una cadena sentido de un ARNbc del sustrato de Dicer puede tener 24-30 nucleótidos. La cadena sentido puede ser sustancialmente complementaria a la cadena antisentido para aparearse a la cadena antisentido en condiciones biológicas.

Métodos para usar moléculas de iARN

60 Las moléculas de ácido nucleico y moléculas de iARN de esta divulgación pueden administrarse a una célula o un tejido mediante aplicación directa de las moléculas, o con las moléculas combinadas con un portador o un diluyente.

65 Las moléculas de ácido nucleico y moléculas de iARN de esta invención, tal como se definen en las reivindicaciones, pueden suministrarse o administrarse a una célula, un tejido, un órgano o un sujeto mediante aplicación directa de las moléculas con un portador o diluyente, o cualquier otro vehículo de administración que actúa para ayudar, fomentar o facilitar la entrada en una célula, por ejemplo, secuencias virales, material viral, o formulaciones de

lípidos o liposomas.

Las moléculas de ácido nucleico y moléculas de iARN de esta invención, tal como se definen en las reivindicaciones, pueden complejarse con lípidos catiónicos, envasados dentro de liposomas, o administrarse de otra manera a células o tejidos diana. El ácido nucleico o complejos de ácido nucleico pueden administrarse de manera local a tejidos relevantes *ex vivo* o *in vivo* a través de aplicación dérmica directa, aplicación transdérmica o inyección.

Los sistemas de administración pueden incluir, por ejemplo, geles acuosos y no acuosos, cremas, emulsiones, microemulsiones, liposomas, pomadas, disoluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, bases y polvos hidrocarbonados, y pueden contener excipientes tales como solubilizantes y potenciadores de la permeación.

Las composiciones y los métodos de esta divulgación pueden incluir un vector de expresión que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica para al menos una molécula de iARN de esta invención de manera que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico.

Las moléculas de ácido nucleico y moléculas de iARN de esta invención, tal como se definen en las reivindicaciones, pueden expresarse a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN. Los vectores recombinantes pueden ser plásmidos de ADN o vectores virales. Pueden usarse vectores virales que se proporcionan para la expresión transitoria de moléculas de ácido nucleico.

Por ejemplo, el vector puede contener secuencias que codifican para ambas cadenas de una molécula de iARN de un dúplex, o una única molécula de ácido nucleico que es autocomplementaria y, por tanto, forma una molécula de iARN. Un vector de expresión puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica para dos o más moléculas de ácido nucleico.

Una molécula de ácido nucleico puede expresarse dentro de células a partir de promotores eucariotas. Los expertos en la técnica se dan cuenta que cualquier ácido nucleico puede expresarse en células eucariotas a partir del vector de ADN/ARN apropiado.

En algunos aspectos, puede usarse un constructo viral para introducir un constructo de expresión en una célula, para la transcripción de un constructo de ARNbc codificado por el constructo de expresión.

Pueden administrarse formulaciones lipídicas a animales mediante inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, o por vía oral o mediante inhalación u otros métodos tal como se conocen en la técnica.

Se conocen y pueden usarse formulaciones farmacéuticamente aceptables para administrar oligonucleótidos.

Protocolo de ejemplo para silenciamiento *in vitro*

Un día antes de la transfección, se sembraron en placa células en una placa de 96 pocillos a 2×10^3 células por pocillo con 100 μ l de DMEM (n.º de catálogo de HyClone SH30243,01) que contenía SBF al 10% y cultivo en una incubadora a 37°C que contenía una atmósfera humidificada del 5% de CO₂ en aire. Antes de la transfección, se cambió el medio a 90 μ l de medio de suero reducido Opti-MEM I (n.º de catálogo de Life Technologies 31985-070) que contenía SBF al 2%. Luego, se mezclaron 0,2 μ l de Lipofectamine RNAiMax (n.º de catálogo de Life Technologies 13778-100) con 4,8 μ l de Opti-MEM I durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se mezcló 1 μ l de ARNip con 4 μ l de Opti-MEM I y se combinó con la disolución de LF2000, y se mezcló suavemente, sin vórtex. Después de 5 minutos a temperatura ambiente, se incubó la mezcla durante 10 minutos adicionales a temperatura ambiente para dejar que se formaran los complejos ARN-RNAiMax. Además, se añadieron 10 μ l de complejos ARN-RNAiMax a un pocillo, y se agitó a mano suavemente la placa. Se incubaron las células en una incubadora a 37°C que contenía una atmósfera humidificada del 5% de CO₂ en aire durante 2 horas. Se cambió el medio a medio de suero reducido Opti-MEM I recién preparado que contenía SBF al 2%. 24 horas después de la transfección, se lavaron las células una vez con PBS enfriado con hielo. Se lisaron las células con 50 μ l de tampón de lisis Cell-to-Ct (n.º de catálogo de Life Technologies 4391851 C) durante 5-30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 5 μ l de disolución de parada, y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se midió inmediatamente el nivel de ARNm mediante RT-qPCR con TAQMAN. Pudieron congelarse muestras a -80°C y se sometieron a ensayo en un momento posterior.

Protocolo de ejemplo para estabilidad sérica

Se incubaron 0,2 mg/ml de ARNip con suero humano al 10% a 37°C. En determinados puntos de tiempo (0, 5, 15 y 30 min), se tomaron alícuotas de 200 μ l de muestra y se extrajeron con 200 μ l de disolvente de extracción (cloroformo: fenol:alcohol isoamílico =24:25:1). Se agitó con vórtex y se centrifugó la muestra a 13.000 rpm durante 10 min a TA, luego se transfirió la disolución de la fase superior y se filtró con un filtro de 0,45 μ m. Se transfirió el filtrado a un vial de inyección de HPLC de 300 μ l. Para la CL-EM, la fase móvil fue fase móvil A: HFIP 100 mM + TEA 7 mM en H₂O, fase móvil B: metanol al 50 %+ acetonitrilo al 50%. La columna: Waters Acquity OST 2,1 x

50 mm, 1,7 μ m.

Ejemplos

- 5 Ejemplo 1: se encontró que los ARNip de esta divulgación dirigidos a GST- π eran activos para el silenciamiento génico *in vitro*. Se encontró que las actividades dependientes de la dosis de los ARNip de GST- π para el silenciamiento génico presentaban una CI50 por debajo aproximadamente 250 picomolar (pM), y tan bajo como 1 pM.
- 10 Se realizó transfección *in vitro* en una línea celular A549 para determinar la eficacia de silenciamiento del ARNip. Se observó silenciamiento dependiente de la dosis para el ARNm de GST- π con los ARNip de la tabla 1, tal como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7: silenciamiento dependiente de la dosis para ARNm de GST- π en una línea celular A549

15

Estructura de ARNip	CI50 (pM)
A9 (SEQ ID NO: 25 y 90)	24
B2 (SEQ ID NO: 52 y 117)	121
B3 (SEQ ID NO: 53 y 118)	235
B4 (SEQ ID NO: 54 y 119)	229
B13 (SEQ ID NO: 50 y 115)	17
BU2 (SEQ ID NO: 61 y 126)	31

Tal como se muestra en la tabla 7, las actividades de los ARNip de GST- π de la tabla 1 estuvieron en el intervalo 17-235 pM, que es adecuado para muchos usos, incluyendo como agente farmacológico que va a usarse *in vivo*.

- 20 Ejemplo 2: la estructura de los ARNip de GST- π de esta divulgación que tenían desoxinucleótidos situados en la región semilla de la cadena antisentido del ARNip proporcionó una actividad de silenciamiento génico *in vitro* inesperada y ventajosamente aumentada.
- Se realizó transfección *in vitro* en una línea celular A549 para determinar la eficacia de silenciamiento para los ARNip de GST- π basados en la estructura BU2' (SEQ ID NO: 131 y 157). Se observó el silenciamiento dependiente de la dosis del ARNm de GST- π con los ARNip de GST- π basados en la estructura BU2' tal como se muestra en la tabla 8.

25

Tabla 8: silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π en una línea celular A549 para los ARNip de GST- π basados en la estructura BU2'

30

Estructura de ARNip de GST- π	CI50 (pM)
BU2 sin desoxinucleótidos en la región dúplex (SEQ ID NO: 61 y 126)	31
BU2 con desoxinucleótidos en las posiciones 3, 5 y 7 de la región semilla de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 139 y 165)	5
BU2 con desoxinucleótidos en las posiciones 4, 6 y 8 de la región semilla de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 141 y 167)	8
BU2 con desoxinucleótidos en las posiciones 4, 6 y 8 de la región semilla de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 156 y 182)	5

Tal como se muestra en la tabla 8, las actividades de los ARNip de GST- π basados en la estructura BU2' que tenía tres desoxinucleótidos en la región semilla de la cadena antisentido se aumentaron de manera sorprendente e inesperada hasta en 6 veces, en comparación con un ARNip de GST- π sin desoxinucleótidos en la región dúplex.

35

Estos datos muestran que los ARNip de GST- π que tenían una estructura con tres desoxinucleótidos situados en las posiciones 3, 5 y 7, o en las posiciones 4, 6 y 8 en la región semilla de la cadena antisentido proporcionaron una actividad de silenciamiento génico sorprendentemente aumentada en comparación con un ARNip de GST- π sin desoxinucleótidos en la región dúplex.

40

Las actividades mostradas en la tabla 8 para los ARNip de GST- π que tenían tres desoxinucleótidos en la región semilla de la cadena antisentido estaban en el intervalo de 5 a 8 pM, que es excepcionalmente adecuado para muchos usos, incluyendo como agente farmacológico que va a usarse *in vivo*.

45

Ejemplo 3: la estructura de los ARNip de GST- π de esta divulgación que tenían desoxinucleótidos situados en la región semilla de la cadena antisentido del ARNip proporcionó una actividad de silenciamiento génico *in vitro* inesperada y ventajosamente aumentada.

5 Se realizó transfección *in vitro* en una línea celular A549 para determinar la eficacia del silenciamiento para los ARNip de GST- π basados en la estructura A9' (SEQ ID NO:183 y 195). Se observó el silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π con los ARNip de GST- π basados en la estructura A9', tal como se muestra en la tabla 9.

10 Tabla 9: silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π en una línea celular A549 para los ARNip de GST- π basados en la estructura A9'

Estructura de ARNip de GST- π	CI50 (pM)
A9 sin desoxinucleótidos en la región dúplex (SEQ ID NO: 25 y 90)	24
A9 con desoxinucleótidos en las posiciones 4, 6 y 8 de la región semilla de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 193 y 205)	1
A9 con desoxinucleótidos en las posiciones 1, 3, 5 y 7 de la región semilla de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 190 y 202)	5
A9 con desoxinucleótidos en las posiciones 3-8 de la región semilla de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 187 y 199)	6
A9 con desoxinucleótidos en las posiciones 5-8 de la región semilla de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 189 y 201)	7
A9 con desoxinucleótidos en las posiciones 3, 5 y 7 de la región semilla de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 191 y 203)	15

15 Tal como se muestra en la tabla 9, las actividades de los ARNip de GST- π basados en la estructura A9' que tenía de tres a seis desoxinucleótidos en la región semilla de la cadena antisentido se aumentaron sorprendentemente hasta en 24 veces, en comparación con un ARNip de GST- π sin desoxinucleótidos en la región dúplex.

20 Estos datos muestran que los ARNip de GST- π que tenían una estructura con de tres a seis desoxinucleótidos situados en las posiciones 4, 6 y 8, o en las posiciones 1, 3, 5 y 7, o en las posiciones 3-8, o en las posiciones 5-8, o en las posiciones 3, 5 y 7 en la región semilla de la cadena antisentido proporcionaron actividad de silenciamiento génico inesperadamente aumentada en comparación con un ARNip de GST- π sin desoxinucleótidos en la región dúplex.

25 La actividad mostrada en la tabla 9 para los ARNip de GST- π que tenían de tres a seis desoxinucleótidos en la región semilla de la cadena antisentido estaba en el intervalo de 1 a 15 pM, que es excepcionalmente adecuado para muchos usos, incluyendo como agente farmacológico que va a usarse *in vivo*.

30 Ejemplo 4: la estructura de los ARNip de GST- π que tenía desoxinucleótidos situados en la región semilla de la cadena antisentido del ARNip proporcionó una actividad de silenciamiento génico *in vitro* inesperada y ventajosamente aumentada.

35 Se realizó transfección *in vitro* en una línea celular A549 para determinar la eficacia del silenciamiento para los ARNip de GST- π basados en la estructura B13' (SEQ ID NO:207 y 222). Se observó el silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π con los ARNip de GST- π basados en la estructura B13', tal como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10: silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π en una línea celular A549 para los ARNip de GST- π basados en la estructura B13'

Estructura de ARNip de GST- π	CI50 (pM)
B13 sin desoxinucleótidos en la región dúplex (SEQ ID NO: 50 y 115)	17
B13 con desoxinucleótidos en las posiciones 4, 6 y 8 de la región semilla de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 217 y 232)	11

40

Tal como se muestra en la tabla 10, la actividad de un ARNip de GST- π basado en la estructura B13' que tenía tres desoxinucleótidos en la región semilla de la cadena antisentido se aumentó inesperadamente, en comparación con un ARNip de GST- π sin desoxinucleótidos en la región dúplex.

5 Estos datos muestran que los ARNip de GST- π que tenían una estructura con tres desoxinucleótidos ubicados en las posiciones 4, 6 y 8 en la región semilla de la cadena antisentido proporcionaron actividad de silenciamiento génico inesperadamente aumentada en comparación con un ARNip de GST- π sin desoxinucleótidos en la región dúplex.

10 La actividad mostrada en la tabla 10 para los ARNip de GST- π que tenían tres desoxinucleótidos en la región semilla de la cadena antisentido estaba en el intervalo picomolar a 11 pM, que es excepcionalmente adecuado para muchos usos, incluyendo como agente farmacológico que va a usarse *in vivo*.

15 Ejemplo 5: la estructura de los ARNip de GST- π que tenían desoxinucleótidos situados en la región semilla de la cadena antisentido del ARNip proporcionó una actividad de silenciamiento génico *in vitro* inesperada y ventajosamente aumentada.

Se realizó transfección *in vitro* en una línea celular A549 para determinar la eficacia del silenciamiento para los ARNip de GST- π basados en la estructura B4' (SEQ ID NO:261 y 273). Se observó silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π con los ARNip de GST- π basados en la estructura B4', tal como se muestra en la tabla 11.

20 Tabla 11: silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π en una línea celular A549 para los ARNip de GST- π basados en la estructura B4'

Estructura de ARNip de GST- π	CI50 (pM)
B4 sin desoxinucleótidos en la región dúplex (SEQ ID NO: 54 y 119)	229
B4 con desoxinucleótidos en las posiciones 3-8 de la región semilla de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 265 y 277)	113

25 Tal como se muestra en la tabla 11, las actividades de los ARNip de GST- π basados en la estructura B4' que tenían seis desoxinucleótidos en la región semilla de la cadena antisentido se aumentaron inesperadamente en más de dos veces, en comparación con un ARNip de GST- π sin desoxinucleótidos en la región dúplex.

30 Estos datos muestran que los ARNip de GST- π que tenían una estructura con seis desoxinucleótidos ubicados en las posiciones 3-8 en la región semilla de la cadena antisentido proporcionaron actividad de silenciamiento génico sorprendentemente aumentada en comparación con un ARNip de GST- π sin desoxinucleótidos en la región dúplex.

35 La actividad mostrada en la tabla 11 para un ARNip de GST- π que tenía seis desoxinucleótidos en la región semilla de la cadena antisentido estaba en el intervalo picomolar a 113 pM, que es excepcionalmente adecuado para muchos usos, incluyendo como agente farmacológico que va a usarse *in vivo*.

40 Ejemplo 6: la estructura de los ARNip de GST- π que tenían desoxinucleótidos ubicados en la región semilla de la cadena antisentido del ARNip proporcionó una actividad de silenciamiento génico *in vitro* inesperada y ventajosamente aumentada.

Se realizó transfección *in vitro* en una línea celular A549 para determinar la eficacia del silenciamiento para los ARNip de GST- π basados en la estructura B2' (SEQ ID NO: 237 y 249). Se observó silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π con los ARNip de GST- π basados en la estructura B2', tal como se muestra en la tabla 12.

45 Tabla 12: silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π en una línea celular A549 para los ARNip de GST- π basados en la estructura B2'

Estructura de ARNip de GST- π	CI50 (pM)
B2 sin desoxinucleótidos en la región dúplex (SEQ ID NO: 52 y 117)	121
B2 con desoxinucleótidos en las posiciones 5-8 de la región semilla de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 243 y 255)	30
B2 con desoxinucleótidos en las posiciones 1, 3, 5 y 7 de la región semilla de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 244 y 256)	50
B2 con desoxinucleótidos en las posiciones 3, 5 y 7 de la región semilla de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 245 y 257)	100

Tal como se muestra en la tabla 12, las actividades de los ARNip de GST- π basados en la estructura B2' que tenían

de tres a cuatro desoxinucleótidos en la región semilla de la cadena antisentido se aumentaron sorprendentemente en hasta 4 veces, en comparación con un ARNip de GST- π sin desoxinucleótidos en la región dúplex.

5 Estos datos muestran que los ARNip de GST- π que tenían una estructura con de tres a cuatro desoxinucleótidos ubicados en las posiciones 5-8, o las posiciones 1, 3, 5 y 7, o las posiciones 3, 5 y 7 en la región semilla de la cadena antisentido proporcionaron actividad de silenciamiento génico inesperadamente aumentada en comparación con un ARNip de GST- π sin desoxinucleótidos en la región dúplex.

10 Las actividades mostradas en la tabla 12 para los ARNip de GST- π que tenían de tres a cuatro desoxinucleótidos en la región semilla de la cadena antisentido estaban en el intervalo de 30-100 pM, que es excepcionalmente adecuado para muchos usos, incluyendo como agente farmacológico que va a usarse *in vivo*.

15 Ejemplo 7: la estructura de los ARNip de GST- π que contenían uno o más nucleótidos sustituidos con 2'-deoxi-2'-fluoro proporcionaron actividad de silenciamiento génico inesperadamente aumentada *in vitro*.

20 Se realizó transfección *in vitro* en una línea celular A549 para determinar la eficacia de silenciamiento para los ARNip de GST- π basados en la estructura BU2' (SEQ ID NO: 131 y 157). Se observó el silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π con los ARNip de GST- π basados en la estructura BU2', tal como se muestra en la tabla 13.

Tabla 13: silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π en una línea celular A549 para los ARNip de GST- π basados en la estructura BU2'

Estructura de ARNip de GST- π	CI50 (pM)
BU2 sin desoxinucleótidos 2'-F (SEQ ID NO: 61 y 126)	31
BU2 con siete desoxinucleótidos 2'-F, uno en la posición 1 en el extremo 3' de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 148 y 174)	3
BU2 con cuatro desoxinucleótidos 2'-F, uno en la posición 1 en el extremo 3' de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 147 y 173)	11
BU2 con un desoxinucleótido 2'-F en la posición 1 en el extremo 3' de la cadena antisentido (SEQ ID NO: 144 y 170)	13

25 Tal como se muestra en la tabla 13, las actividades de los ARNip de GST- π basados en la estructura BU2' que tenían uno o más desoxinucleótidos 2'-F se aumentaron sorprendentemente en hasta 10 veces, en comparación con un ARNip de GST- π sin desoxinucleótidos 2'-F.

30 Estos datos muestran que los ARNip de GST- π que tenían una estructura con uno o más desoxinucleótidos 2'-F proporcionaron actividad de silenciamiento génico inesperadamente aumentada en comparación con un ARNip de GST- π sin un desoxinucleótido 2'-F.

35 Las actividades mostradas en la tabla 13 para los ARNip de GST- π que tenían uno o más desoxinucleótidos 2'-F estaban en el intervalo de 3 a 13 pM, que es excepcionalmente adecuado para muchos usos, incluyendo como agente farmacológico que va a usarse *in vivo*.

Ejemplo 8: la estructura de los ARNip de GST- π que contenían uno o más nucleótidos sustituidos con 2'-deoxi-2'-fluoro proporcionó actividad de silenciamiento génico inesperadamente aumentada *in vitro*.

40 Se realizó transfección *in vitro* en una línea celular A549 para determinar la eficacia de silenciamiento para los ARNip de GST- π basados en la estructura B13' (SEQ ID NO: 207 y 222). Se observó silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π con los ARNip de GST- π basados en la estructura B13', tal como se muestra en la tabla 14.

45 Tabla 14: silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π en una línea celular A549 para los ARNip de GST- π basados en la estructura B13'

Estructura de ARNip de GST- π	CI50 (pM)
B13 sin desoxinucleótidos 2'-F (SEQ ID NO: 50 y 115)	17
B13 con tres desoxinucleótidos 2'-F situados en posiciones de no proyección (SEQ ID NO: 219 y 234)	6

Tal como se muestra en la tabla 14, la actividad de un ARNip de GST- π basado en la estructura B13' que tenía tres desoxinucleótidos 2'-F situados en posiciones de no proyección se aumentó sorprendentemente en aproximadamente 3 veces, en comparación con un ARNip de GST- π sin desoxinucleótidos 2'-F.

5 Estos datos muestran que los ARNip de GST- π que tenían una estructura con uno o más desoxinucleótidos 2'-F proporcionaron actividad de silenciamiento génico inesperadamente aumentada en comparación con un ARNip de GST- π sin un desoxinucleótido 2'-F.

10 La actividad mostrada en la tabla 14 para los ARNip de GST- π que tenían uno o más desoxinucleótidos 2'-F estaba en el intervalo picomolar a 6 pM, que es excepcionalmente adecuado para muchos usos, incluyendo como agente farmacológico que va a usarse *in vivo*.

15 Ejemplo 9: modelo de ratón de cáncer de pulmón ortotópico A549. Los ARNip de GST- π de esta divulgación pueden mostrar una reducción profunda de los tumores ortotópicos de cáncer de pulmón *in vivo*. En este ejemplo, un ARNip de GST- π proporcionó potencia de silenciamiento génico *in vivo* cuando se administró en una formulación liposomal a los tumores ortotópicos de cáncer de pulmón en ratones desnudos atímicos.

20 En general, un modelo de ratón ortotópico puede mostrar relevancia clínica directa para la eficacia y potencia del fármaco, así como capacidad predictiva mejorada. En el modelo de ratón ortotópico, se implantan directamente células tumorales en la misma clase de órgano del que se originaron las células.

25 Se evaluó la eficacia antitumoral de la formulación de ARNip contra cáncer de pulmón humano A549 comparando los pesos de los tumores primarios finales medidos en la necropsia para el grupo de tratamiento y el grupo de control de vehículo.

La figura 1 muestra la inhibición tumoral de cáncer de pulmón ortotópico *in vivo* para un ARNip de GST- π basado en la estructura BU2 (SEQ ID NO: 61 y 126). Se utilizó un modelo de ratón de cáncer de pulmón ortotópico A549 con una dosis relativamente baja a 2 mg/kg del ARNip dirigido a GST- π .

30 El ARNip de GST- π mostró una eficacia de inhibición de tumor de pulmón significativa e inesperadamente ventajosa en este estudio de seis semanas. Tal como se muestra en la figura 1, después de 43 días, el ARNip de GST- π mostró eficacia de inhibición tumoral marcadamente ventajosa, con pesos tumorales finales promedio significativamente reducidos en 2,8 veces en comparación con el control.

35 Para este estudio, se usaron ratones NCr nu/nu machos, de 5-6 semanas de edad. Los animales de experimentación se mantuvieron en un entorno filtrado con HEPA durante el periodo de experimentación. Se almacenaron las formulaciones de ARNip a 4°C antes de su uso, y se calentaron hasta temperatura ambiente 10 minutos antes de la inyección en el ratón.

40 Para este modelo ortotópico de cáncer de pulmón humano A549, en el día de la implantación ortotópica quirúrgica (SOI, por sus siglas en inglés), se recogieron los tumores de reserva del sitio subcutáneo de animales que portaban xenoinjerto de tumores A549 y se colocaron en medio RPMI-1640. Se extirparon los tejidos necróticos y se cortaron los tejidos viables en trozos de 1,5-2 mm³. Se anestesiaron los animales con inhalación de isoflurano y se esterilizó el área quirúrgica con yodo y alcohol. Se realizó una incisión transversal de aproximadamente 1,5 cm de longitud en la parte izquierda de la pared torácica del ratón usando unas tijeras quirúrgicas. Se realizó una incisión intercostal entre la tercera y la cuarta costilla y se expuso el pulmón izquierdo. Se trasplantó un fragmento de tumor A549 a la superficie del pulmón con una sutura quirúrgica 8-0 (nailon). Se cerró la pared torácica con una sutura quirúrgica 6-0 (seda). Se infló de nuevo el pulmón mediante punción intratorácica usando una jeringa de 3 cm³ con una aguja de 25 G X 1 ½ para extraer el aire restante de la cavidad torácica. Se cerró la pared torácica con una sutura quirúrgica de seda 6-0. Todos los procedimientos de la operación descritos anteriormente se realizaron con un microscopio con un aumento de 7 x en campanas de flujo laminar filtradas con HEPA.

45 Tres días después de la implantación tumoral, los ratones modelo que portan tumores se dividieron de manera aleatoria en grupos de diez ratones por grupo. Para el grupo de interés, se inició el tratamiento de los diez ratones tres días después de la implantación tumoral.

50 Para el grupo de interés, la formulación era (lípidos ionizables:colesterol:DOPE:DOPC:DPPE-PEG-2K:DSPEPEG-2K), una composición liposomal. Los liposomas encapsularon el ARNip de GST- π .

60 Para determinar el criterio de valoración del estudio, se sacrificaron los ratones de experimentación cuarenta y dos días después del inicio del tratamiento. Se extirparon y pesaron los tumores primarios en una balanza electrónica para el análisis posterior.

65 Para realizar una estimación de la toxicidad del compuesto, se mantuvo el peso corporal medio de los ratones en los grupos tratados y de control dentro del intervalo normal durante el periodo de experimentación completo. No se

observaron otros síntomas de toxicidad en los ratones.

Ejemplo 10: los ARNip de GST- π de esta divulgación mostraron una reducción profunda de los tumores de xenoinjerto de cáncer *in vivo*. Los ARNip de GST- π proporcionaron potencia de silenciamiento génico *in vivo* cuando se administraron en una formulación liposomal a los tumores de xenoinjerto de cáncer.

La figura 2 muestra la eficacia de inhibición tumoral para un ARNip de GST- π (SEQ ID NO: 156 y 182). Se utilizó un modelo de xenoinjerto de cáncer con una dosis relativamente baja a 0,75 mg/kg de ARNip dirigido a GST- π .

El ARNip de GST- π mostró una eficacia de inhibición tumoral significativa e inesperadamente ventajosa en el plazo de unos pocos días después de la administración. Después de 36 días, el ARNip de GST- π mostró eficacia de inhibición tumoral marcadamente ventajosa, con volumen del tumor reducido en 2 veces en comparación con el control.

Tal como se muestra en la figura 3, el ARNip de GST- π demostró eficacia de inhibición tumoral significativa e inesperadamente ventajosa en el día del criterio de valoración. En particular, se redujo el peso del tumor en más de 2 veces.

El ARNip de GST- π se administró en dos inyecciones (día 1 y 15) de una formulación liposomal que tenía la composición (lípidos ionizables: colesterol: DOPE: DOPC: DPPE-PEG-2K) (25:30:20:20:5).

Para el modelo de xenoinjerto de cáncer, se obtuvo una línea celular A549 de ATCC. Se mantuvieron las células en medio de cultivo complementado con suero bovino fetal al 10% y 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina. Se dividieron las células 48 h antes de la inoculación de manera que las células estaban en crecimiento de fase logarítmica cuando se recogieron. Se tripsinizaron ligeramente las células con tripsina-EDTA y se recogieron del cultivo de tejidos. Se contó el número de células viables y se determinó en un hemocitómetro en presencia de azul tripano (sólo se cuentan las células viables). Se resuspendieron las células hasta una concentración de 5×10^7 /ml en medios sin suero. Luego se mezcló bien la suspensión celular con BD Matrigel descongelado en hielo a una razón 1:1 para la inyección.

Los ratones eran ratones hembra (nu/nu) desnudos atímicos de Charles River Laboratory, inmunodeprimidos, de 6-8 semanas de edad, 7-8 ratones por grupo.

Para la preparación del modelo del tumor, se inoculó por vía subcutánea cada ratón en el costado derecho con 0,1 ml de un inóculo de $2,5 \times 10^6$ de células A549 usando una aguja 25 G y jeringa, un inóculo por ratón. Los ratones no se anestesiaron para la inoculación.

Para las mediciones y aleatorización del volumen del tumor, se midió el tamaño del tumor al 0,1 mm más cercano. Se calcularon los volúmenes del tumor usando la fórmula: volumen del tumor = longitud x ancho²/2. Una vez que los tumores establecidos alcanzaron aproximadamente 120-175 mm³, el volumen del tumor promedio fue de aproximadamente 150 mm³, se asignaron los ratones en los diversos grupos de control de vehículo y de tratamiento de manera que los volúmenes del tumor medios en los grupos tratados estaban dentro del 10% del volumen del tumor medio en el grupo de control de vehículo, de manera ideal, el % de CV de volumen del tumor fue de menos del 25%. En el mismo día, se administraron artículos de prueba y vehículo de control según la pauta posológica. Se monitorizaron los volúmenes del tumor tres veces durante la semana 1, dos veces durante el resto de semanas, incluyendo el día del fin del estudio.

Para determinar la administración de dosificación, en el día de la dosificación, los artículos de prueba se sacaron del congelador a -80°C y se descongelaron en hielo. Antes de aplicarse a las jeringas, el frasco que contenía la formulación se invirtió a mano varias veces. Todos los artículos de prueba se dosificaron a 0,75 mg/kg por vía i.v., cada 2 semanas X 2, a 10 ml/kg.

Para determinar el peso corporal, se pesaron los ratones al 0,1 g más cercano. Se monitorizaron los pesos corporales y se registraron diariamente dentro de los 7 días tras la dosificación de la primera dosis. Se monitorizaron los pesos corporales y se registraron dos veces durante semanas, para el resto de semanas, incluyendo el día del fin del estudio.

Para la recogida de tumores, 28 días después de la primera dosificación, se midió el volumen del tumor, y se diseccionó el tumor para la medición del peso, y se almacenó para el estudio de biomarcador de PD. Se registró el peso del tumor.

Ejemplo 11: los ARNip de GST- π de esta divulgación demostraron muerte de células cancerosas aumentada por apoptosis de células cancerosas *in vitro*. Los ARNip de GST- π proporcionaron silenciamiento de GST- π , que dio como resultado la regulación por incremento de PUMA, un biomarcador para la apoptosis y asociado con pérdida de viabilidad celular.

Las SEQ ID NO: 156 y 182 de ARNip de GST- π , que contenían una combinación de desoxinucleótidos en la región semilla, un desoxinucleótido sustituido con 2'-F y ribonucleótidos sustituidos con 2'-OMe, proporcionaron una apoptosis inesperadamente aumentada de células cancerosas.

5 El nivel de expresión de PUMA para las SEQ ID NO: 156 y 182 de ARNip de GST- π se midió tal como se muestra en la figura 4. En la figura 4, la expresión de PUMA se aumentó en gran medida desde 2-4 días después de la transfección del ARNip de GST- π .

10 Estos datos muestran que la estructura de los ARNip de GST- π que contenían una combinación de desoxinucleótidos en la región semilla, un desoxinucleótido sustituido con 2'-F y ribonucleótidos sustituidos con 2'-OMe proporcionaron una apoptosis inesperadamente aumentada de células cancerosas.

15 El protocolo para el biomarcador de PUMA fue de la siguiente manera. Un día antes de la transfección, se sembraron en placa células en una placa de pocillos a 2×10^3 células por pocillo con 100 μ l de DMEM (n.º de catálogo de HyClone SH30243,01) que contenía SBF al 10% y se cultivó en una incubadora a 37°C que contenía una atmósfera humidificada del 5% de CO₂ en aire. Al día siguiente, antes de transfección se sustituyó el medio con 90 μ l de medio de suero reducido Opti-MEM I (n.º de catálogo de Life Technologies 31985-070) que contenía SBF al 2%. Luego, se mezclaron 0,2 μ l de Lipofectamine RNAiMAX (n.º de catálogo de Life Technologies 13778-100) con 4,8 μ l de Opti-MEM I durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se mezcló 1 μ l del ARNip de GST- π (concentración de reserva 1 μ M) con 4 μ l de Opti-MEM I y se combinaron con la disolución de RNAiMAX y luego se mezclaron suavemente. Se incubó la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir que se formaran los complejos ARN-RNAiMAX. Se añadieron 10 μ l de complejos ARN-RNAiMAX por pocillo, a una concentración final del ARNip de 10 nM. Se incubaron las células durante 2 horas y se cambió el medio a medio de suero reducido Opti-MEM I recién preparado que contenía SBF al 2%. Durante 1, 2, 3, 4 y 6 días después de la transfección, se lavaron una vez las células con PBS enfriado con hielo y luego se lisaron con 50 μ l de tampón de lisis Cell-to-Ct (n.º de catálogo de Life Technologies 4391851 C) durante 5-30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 5 μ l de disolución de parada y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se midieron los niveles de ARNm de PUMA (BBC3, n.º de catálogo Hs00248075, Life Technologies) mediante qPCR con TAQMAN.

30 Ejemplo 12: los ARNip de GST- π de esta divulgación pueden mostrar una reducción profunda de tumores de xenoinjerto de cáncer *in vivo*. Los ARNip de GST- π pueden proporcionar potencia de silenciamiento génico *in vivo* cuando se administran en una formulación liposomal a los tumores de xenoinjerto de cáncer.

35 La figura 5 muestra eficacia de inhibición tumoral para un ARNip de GST- π (SEQ ID NO: 61 y 126). Se observó el silenciamiento dependiente de la dosis de ARNm de GST- π *in vivo* con el ARNip dirigido a GST- π . Se utilizó un modelo de xenoinjerto de cáncer con un ARNip dirigido a GST- π .

40 El ARNip de GST- π mostró eficacia de inhibición tumoral significativa e inesperadamente ventajosa en el plazo de unos pocos días después de la administración. Tal como se muestra en la figura 5, el tratamiento con un ARNip de GST- π dio como resultado una reducción significativa de la expresión de ARNm de GST- π 4 días después de la inyección en una formulación lipídica. A la dosis más alta de 4 mg/kg, se detectó una reducción significativa de aproximadamente el 40% 24 horas después de la inyección.

45 El ARNip de GST- π se administró en una única inyección de 10 ml/kg de una formulación liposomal que tenía la composición (lípidos ionizables: colesterol: DOPE: DOPC: DPPE-PEG-2K) (25:30:20:20:5).

50 Para el modelo de xenoinjerto de cáncer, se obtuvo una línea celular A549 de ATCC. Se mantuvieron las células en RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10% y 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Se dividieron las células 48 h antes de la inoculación de manera que las células estaban en crecimiento de fase logarítmica cuando se recogieron. Se tripsinizaron suavemente las células con tripsina-EDTA y se recogieron del cultivo de tejidos. Se contó el número de células viables y se determinó en un hemocitómetro en presencia de azul tripano (sólo se cuentan las células viables). Se resuspendieron las células a una concentración de 4×10^7 /ml en medio RPMI sin suero. Luego se mezcló la suspensión celular con BD Matrigel descongelado en hielo a una razón 1:1 para la inyección.

55 Los ratones eran ratones hembra (nu/nu) desnudos atímicos de Charles River Laboratory, inmunodeprimidos, de 6-8 semanas de edad, 3 ratones por grupo.

60 Para la preparación del modelo del tumor, se inoculó por vía subcutánea cada ratón en el costado derecho con 0,1 ml de un inóculo de 2×10^6 de células A549 usando una aguja 25 G y jeringa, un inóculo por ratón. Los ratones no se anestesiaron para la inoculación.

Para las mediciones y aleatorización del volumen del tumor, se midió el tamaño del tumor al 0,1 mm más cercano.

Se calcularon los volúmenes del tumor usando la fórmula: volumen del tumor = longitud x ancho²/2. Los volúmenes del tumor se monitorizaron dos veces a la semana. Una vez que los tumores establecidos alcanzaron aproximadamente 350 - 600 mm³, se asignaron los ratones en grupos con criterios de valoración variados. En el mismo día, se administraron artículos de prueba según la pauta posológica.

5 Para determinar la administración de dosificación, el día en el que los tumores establecidos alcanzaron aproximadamente 350 - 600 mm³, se sacaron artículos de prueba del frigorífico a 4°C. Antes de aplicarse a las jeringas, el frasco que contenía la formulación se invirtió a mano varias veces para conseguir una disolución homogénea.

10 Para determinar el peso corporal, se pesaron los ratones al 0,1 g más cercano. Se monitorizaron los pesos corporales y se registraron dos veces durante semanas, para el resto de semanas, incluyendo el día del fin del estudio.

15 Para la recogida de tumores, se sacrificaron los animales mediante sobredosis de CO₂ y se extirparon los tumores a las 0, 24, 48, 72, 96 (opcional) y 168 horas tras la dosificación. En primer lugar, se pesaron los tumores en húmedo, y luego se separaron en tres partes para el análisis de KD, distribución y biomarcadores. Las muestras se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta que estuvieron listas para ser procesadas.

20 Ejemplo 13: los ARNip de GST- π de esta divulgación inhibieron los tumores de xenoinjerto de cáncer de páncreas *in vivo*. Los ARNip de GST- π proporcionaron potencia de silenciamiento génico *in vivo* cuando se administraron en una formulación liposomal a los tumores de xenoinjerto de cáncer de páncreas.

25 En este modelo de xenoinjerto, se inoculó por vía subcutánea cada ratón en el costado derecho con 0,1 ml de un inóculo de $2,5 \times 10^6$ de células PANC-1. Se usaron ratones hembra desnudos atímicos, de 6 a 8 semanas, Charles River. Se midió el tamaño del tumor al 0,1 mm más cercano. Una vez que los tumores establecidos alcanzaron aproximadamente 150 - 250 mm³ (volumen del tumor promedio a aproximadamente 200 mm³), se asignaron los ratones a diversos grupos de control de vehículo y de tratamiento de manera que los volúmenes del tumor medios en los grupos tratados estaban dentro del 10% del volumen del tumor medio en el grupo de control de vehículo. En el mismo día, se administraron artículos de prueba y vehículo de control según la pauta posológica. Se monitorizaron los volúmenes del tumor tres veces durante la semana 1, dos veces para el resto de semanas, incluyendo el día del fin del estudio.

35 La figura 6 muestra la eficacia de inhibición tumoral para un ARNip de GST- π (SEQ ID NO: 61 y 126). Tal como se muestra en la figura 6, se obtuvo una respuesta a la dosis con dosis que oscilaban desde 0,375 mg/kg hasta 3 mg/kg de ARNip dirigido a GST- π . El ARNip de GST- π mostró eficacia de inhibición tumoral significativa e inesperadamente ventajosa en el plazo de unos pocos días después de la administración. Por tanto, el ARNip de GST- π demostró eficacia de inhibición tumoral significativa e inesperadamente ventajosa en el criterio de valoración.

40 Los ARNip de GST- π se administraron en una formulación liposomal que tenía la composición (lípidos ionizables: colesterol: DOPE: DOPC: DPPE-PEG-2K) (25:30:20:20:5).

45 Ejemplo 14: los ARNip de GST- π de esta divulgación mostraron estabilidad sérica aumentada.

La figura 7 muestra la incubación en suero humano y detección de ARNip restante en diversos puntos de tiempo mediante HPLS/CL-EM. Tal como se muestra en la figura 7, la semivida ($t_{1/2}$) en suero tanto para la cadena sentido (figura 7, parte superior) como para la cadena antisentido (figura 7, parte inferior) de un ARNip de GST- π (SEQ ID NO: 61 y 126) fue de aproximadamente 100 minutos.

50 Ejemplo 15: los ARNip de GST- π de esta divulgación mostraron estabilidad mejorada en la formulación en plasma.

La figura 8 muestra la incubación de formulación en plasma y la detección de ARNip restante en diversos puntos de tiempo. Tal como se muestra en la figura 8, la semivida ($t_{1/2}$) en plasma de una formulación de ARNip de GST- π (SEQ ID NO: 61 y 126) fue significativamente más larga de 100 horas.

60 El ARNip de GST- π se preparó en una formulación liposomal que tenía la composición (lípidos de ionización: colesterol: DOPE: DOPC: DPPE-PEG-2K) (25:30:20:20:5). El tamaño promedio z para las nanopartículas liposomales fue de 40,0 nm, y el ARNip se encapsuló al 91%.

La formulación se incubó en suero humano al 50% en PBS durante 40 min, 1,5 h, 3 h, 24 h y 96 h. La cantidad del ARNip de GST- π se determinó mediante un ensayo basado en ELISA.

65 Ejemplo 16: los ARNip de GST- π de esta divulgación mostraron efectos fuera de la diana reducidos por la cadena pasajera.

Para el ARNip de GST- π (SEQ ID NO: 156 y 182), la figura 9 muestra que el silenciamiento *in vitro* para la cadena guía fue aproximadamente exponencial, en comparación con un control con secuencia reorganizada al azar que no mostró ningún efecto. La CI50 de este ARNip se midió a 5 pM. La figura 10 muestra el silenciamiento *in vitro* para la cadena pasajera del mismo ARNip de GST- π . Tal como se muestra en la figura 10, el silenciamiento fuera de la diana de cadenas pasajeras para el ARNip de GST- π se redujo en gran medida, en más de 100 veces.

Para los ARNip de GST- π (SEQ ID NO: 187 y 199), (SEQ ID NO: 189 y 201) y (SEQ ID NO: 190 y 202), la figura 11 muestra que los silenciamientos *in vitro* para las cadenas guía fueron aproximadamente exponenciales. Las CI50 de estos ARNip se midieron a 6, 7 y 5 pM, respectivamente. Tal como se muestra en la figura 12, los silenciamientos *in vitro* para las cadenas pasajeras de estos ARNip de GST- π se redujeron significativamente en al menos 10 veces. Todos estos ARNip de GST- π tenían desoxinucleótidos en la región semilla de la región dúplex, sin otras modificaciones en la región dúplex.

Para los ARNip de GST- π (SEQ ID NO: 217 y 232), la figura 13 muestra que el silenciamiento *in vitro* para la cadena guía de este ARNip de GST- π muy activo fue aproximadamente exponencial. La CI50 de este ARNip se midió a 11 pM. Tal como se muestra en la figura 14, el silenciamiento *in vitro* para la cadena pasajera de este ARNip de GST- π se redujo significativamente en más de 100 veces. Este ARNip de GST- π tenía desoxinucleótidos en la región semilla de la región dúplex, sin otras modificaciones en la región dúplex.

Se determinaron los efectos fuera de la diana usando el plásmido indicador de expresión psiCHECK-2, que codifica para el gen de luciferasa de Renilla. (Sistema de ensayo indicador de luciferasa doble, Promega, n.º de catálogo: E1960). La concentración de ARNip fue normalmente de 50 pM. Protocolo: día 1, célula HeLa sembrada a de 5 a $7,5 \times 10^3/100\text{ul/pocillo}$. Día 2, transfección conjunta con confluencia celular aproximadamente del 80%. Día 3, células recogidas para la medición de actividad de luciferasa. Se midió la actividad de luciferasa usando el sistema de ensayo de luciferasa de Promega (E4550), según el protocolo del fabricante.

El vector psiCHECK-2 permitió la monitorización de los cambios en la expresión de un gen diana fusionado al gen indicador de luciferasa de Renilla. Los constructos de ARNip se clonaron en la región de clonación múltiple, y el vector se transfectó conjuntamente con el ARNip en células HeLa. Si un ARNip específico se une al ARNm diana e inicia el proceso de iARN, la luciferasa de Renilla: ARNm del constructo fusionados se escindirán y se degradarán posteriormente, disminuyendo la señal de luciferasa de Renilla.

Por ejemplo, los insertos de plásmidos para los ARNip con la estructura de BU2' fueron de la siguiente manera:

inserto de plásmido de PsiCHECK-2 (F):

SEQ ID NO: 285

ctcgag gggcaacTGAAGCCTTTT GAGACCCTGcTgTccag gcggccgc

inserto de plásmido de PsiCHECK-2 (R):

SEQ ID NO: 286

ctcgag cTgggacagCAGGGTCTCAAAGGCTTCagTTgccc gcggccgc

Ejemplo 17: los ARNip de GST- π de esta divulgación mostraron efectos fuera de la diana similares al miARN ventajosamente reducidos, que son silenciamiento génico fuera de la diana no deseado dependiente de semilla.

Para los ARNip de GST- π (SEQ ID NO: 156 y 182), (SEQ ID NO: 187 y 199), (SEQ ID NO: 189 y 201), (SEQ ID NO: 190 y 202) y (SEQ ID NO: 217 y 232), se descubrió que la actividad fuera de la diana que imitaba al miARN era esencialmente insignificante. El silenciamiento génico fuera de la diana no deseado dependiente de semilla para estos ARNip de GST- π era de al menos 10 veces a 100 veces menor que la actividad en la diana de la cadena guía.

Para someter a prueba los efectos fuera de la diana relacionados con miARN, se introdujeron de una a cuatro repeticiones de secuencias diana emparejadas con semillas complementarias a la región que contenía la semilla completa, posiciones 1-8 del extremo 5' de la cadena antisentido, pero no a la región no semilla restante, posiciones 9-21, en la región correspondiente a la 3'UTR del ARNm de luciferasa, para determinar la eficacia de los efectos fuera de la diana no deseados dependientes de semilla. Se usaron insertos de plásmidos para imitar un miARN con apareamiento completo en la región semilla y apareamientos erróneos (protuberancias) en la región no semilla.

Por ejemplo, los insertos de plásmidos para los ARNip con la estructura BU2' fueron de la siguiente manera:

inserto de plásmido de PsiCHECK-2 (Fmi1):

SEQ ID NO: 287

ctcgag gggcaacTCTACGCAAACAGACCCTGcTgTcccag gcggccgc

5

inserto de plásmido de PsiCHECK-2 (Fmi2):

SEQ ID NO.: 288

ctcgag gggcaacTCTACGCAAACAGACCCTGcT CTACGCAAACAGACCCTGcT
gTcccag gcggccgc

10 inserto de plásmido de PsiCHECK-2 (Fmi3):

SEQ ID NO.: 289

ctcgag gggcaacTCTACGCAAACAGACCCTGcT CTACGCAAACAGACCCTGcT
CTACGCAAACAGACCCTGcT gTcccag gcggccgc

15 inserto de plásmido de PsiCHECK-2 (Fmi4):

SEQ ID NO.: 290

ctcgag gggcaacTCTACGCAAACAGACCCTGcT CTACGCAAACAGACCCTGcT
CTACGCAAACAGACCCTGcT CTACGCAAACAGACCCTGcT gTcccag
gcggccgc

20 Las realizaciones descritas en el presente documento no son limitativas y un experto en la técnica puede apreciar fácilmente que las combinaciones específicas de las modificaciones descritas en el presente documento pueden someterse a prueba sin experimentación innecesaria para identificar moléculas de ácido nucleico con actividad de iARN mejorada.

25 Se entiende que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, materiales y reactivos particulares descritos, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención. Resultará fácilmente evidente para un experto en la técnica que pueden hacerse sustituciones y modificaciones variables en la descripción divulgada en el presente documento.

30 Debe indicarse que, tal como se usan en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Asimismo, los términos “un” (o “una”), “uno o más” y “al menos uno” pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento. También debe indicarse que los términos “comprende”, “que comprende”, “que contiene”, “que incluye” y “que tiene” pueden usarse de manera intercambiable, y deben leerse de manera expansiva y sin limitación.

35 La enumeración de intervalos de valores en el presente documento tiene el único propósito de servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor diferenciado que está dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor diferenciado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Para los grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que esta descripción incluye a los miembros individuales, así como a los subgrupos de los miembros del grupo Markush.

45 Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, basándose en la descripción anterior, utilizar la presente invención en toda su extensión. Por tanto, las siguientes realizaciones específicas deben interpretarse como meramente ilustrativas y no limitativas del resto de la divulgación de ninguna manera.

Todas las características descritas en esta memoria descriptiva pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica divulgada en esta memoria descriptiva puede sustituirse por una característica alternativa que tenga el mismo propósito, equivalente o similar.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de ácido nucleico para inhibir la expresión de GST- π que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, en la que las cadenas forman una región dúplex, y en la que la cadena antisentido es SEQ ID NO: 157 y la cadena sentido es SEQ ID NO: 131.
- 10 2. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que uno o más de los nucleótidos en la región dúplex se modifican químicamente, en la que los nucleótidos modificados químicamente son nucleótidos 2'-deoxi, nucleótidos sustituidos con 2'-O-alkilo, nucleótidos sustituidos con 2'-deoxi-2'-fluoro, nucleótidos de fosforotioato, nucleótidos bloqueados, o cualquier combinación de los mismos.
- 15 3. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2, en la que la cadena antisentido tiene desoxinucleótidos en una pluralidad de posiciones, siendo la pluralidad de posiciones una las siguientes:
 - 20 cada una de las posiciones 4, 6 y 8, desde el extremo 5' de la cadena antisentido;
 - cada una de las posiciones 3, 5 y 7, desde el extremo 5' de la cadena antisentido;
 - cada una de las posiciones 1, 3, 5 y 7, desde el extremo 5' de la cadena antisentido;
 - 25 cada una de las posiciones 3-8, desde el extremo 5' de la cadena antisentido; o
 - cada una de las posiciones 5-8, desde el extremo 5' de la cadena antisentido.
- 30 4. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 3, en la que la molécula tiene uno o más nucleótidos sustituidos con 2'-deoxi-2'-fluoro en la región dúplex.
- 35 5. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2, en la que la cadena antisentido es SEQ ID NO: 182 y la cadena sentido es SEQ ID NO: 156.
6. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2, en la que la cadena antisentido es SEQ ID NO: 180 y la cadena sentido es SEQ ID NO: 154.
7. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2, en la que la cadena antisentido es SEQ ID NO: 181 y la cadena sentido es SEQ ID NO: 155.
- 40 8. Molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la molécula inhibe la expresión de ARNm de GST- π con una CI50 de menos de 50 pM.
- 45 9. Molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que una única administración de la molécula inhibe la expresión de niveles de ARNm de GST- π en al menos el 25% *in vivo*.
10. Molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la cadena pasajera tiene actividad fuera de la diana reducida en al menos 50 veces.
- 50 11. Composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 55 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, en la que el portador comprende una molécula lipídica o un liposoma.
13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, para su uso en un método para tratar una enfermedad asociada con la expresión de GST- π , comprendiendo el método administrar dicha composición a un sujeto que lo necesita, en la que la enfermedad es tumor maligno, cáncer, cáncer provocado por células que expresan KRAS mutado, sarcoma o carcinoma.

FIG. 1

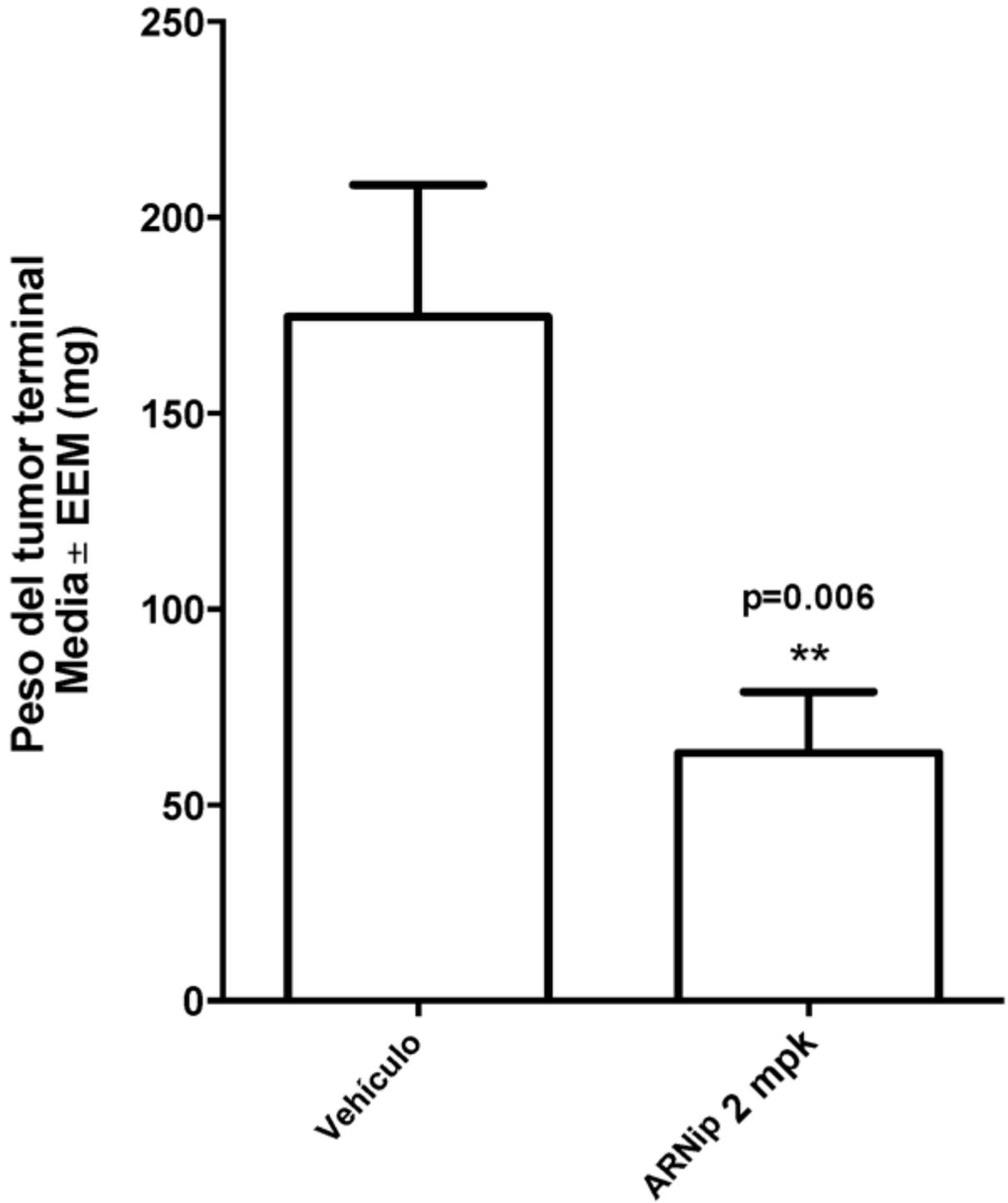


FIG. 2

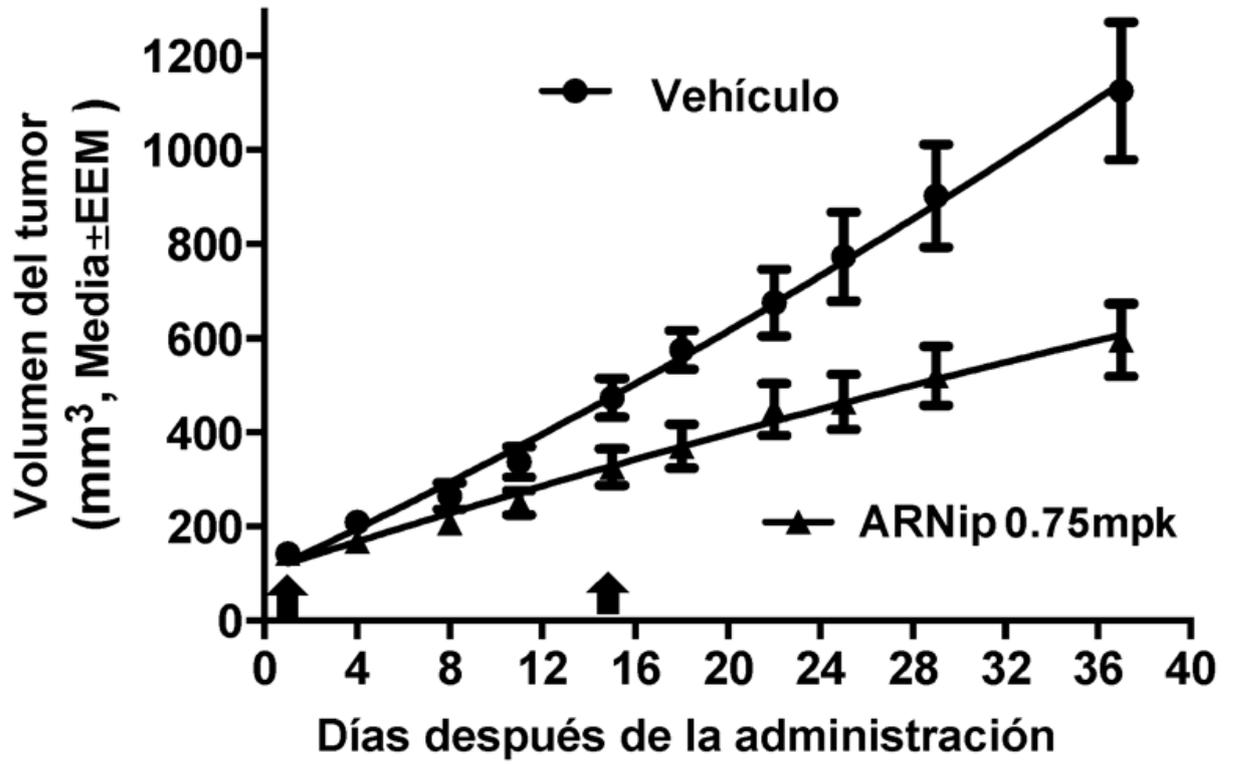


FIG. 3

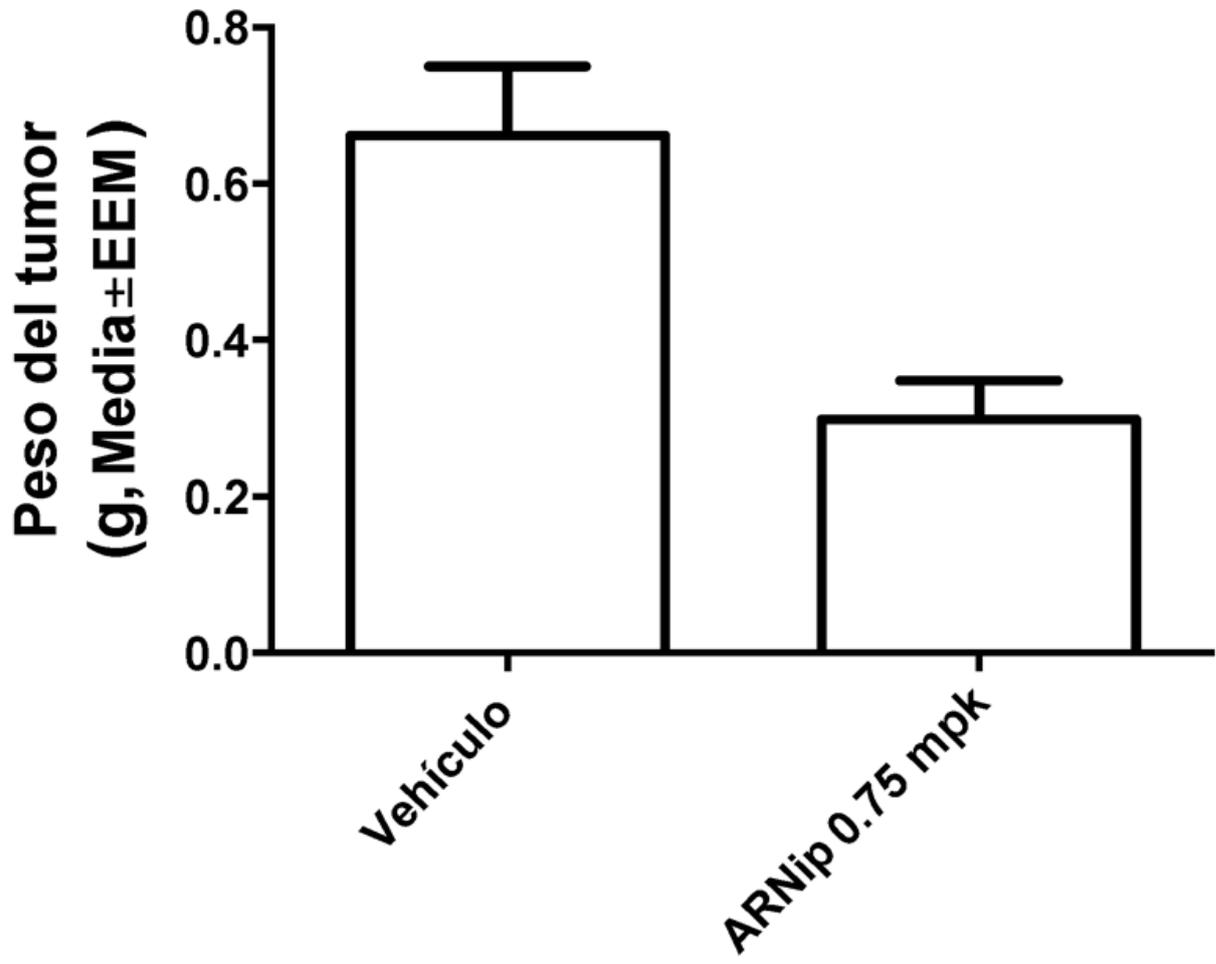


FIG. 4

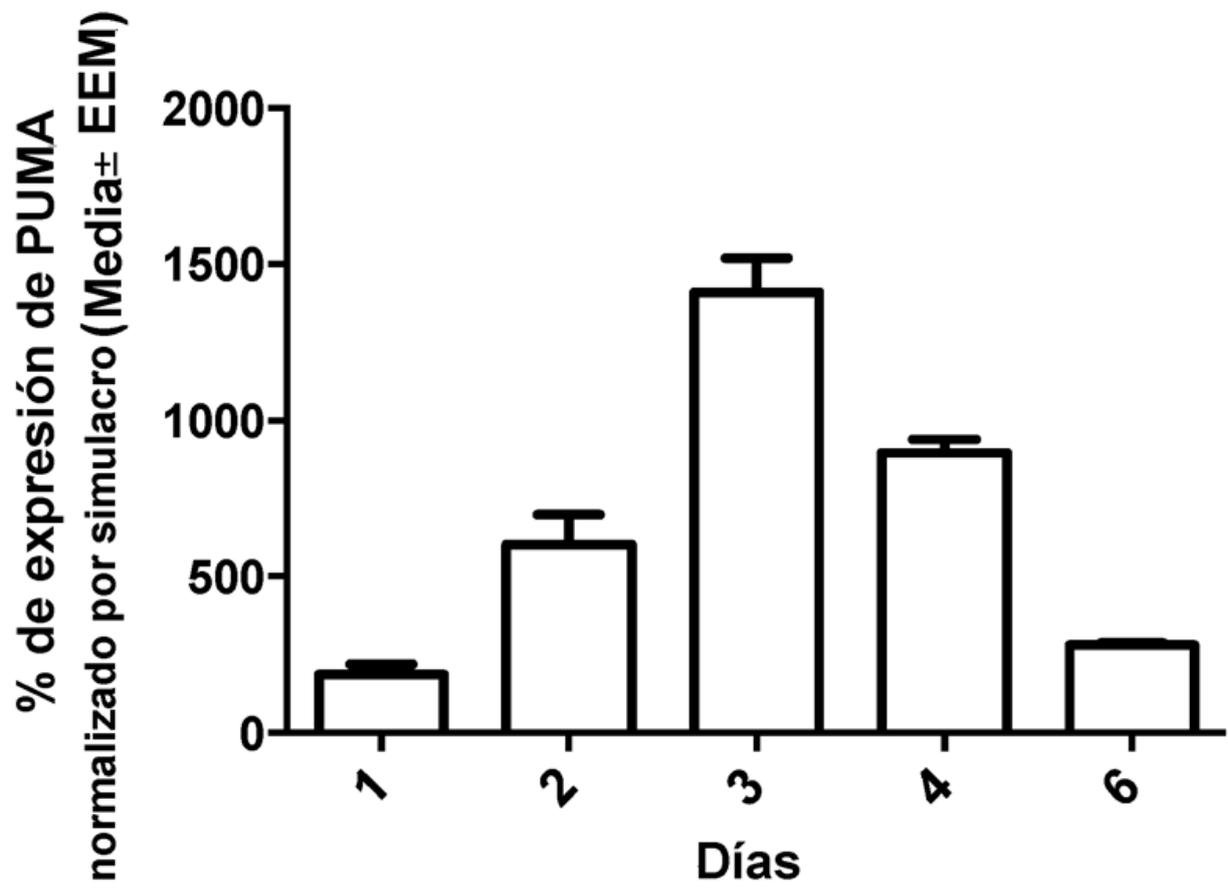


FIG. 5

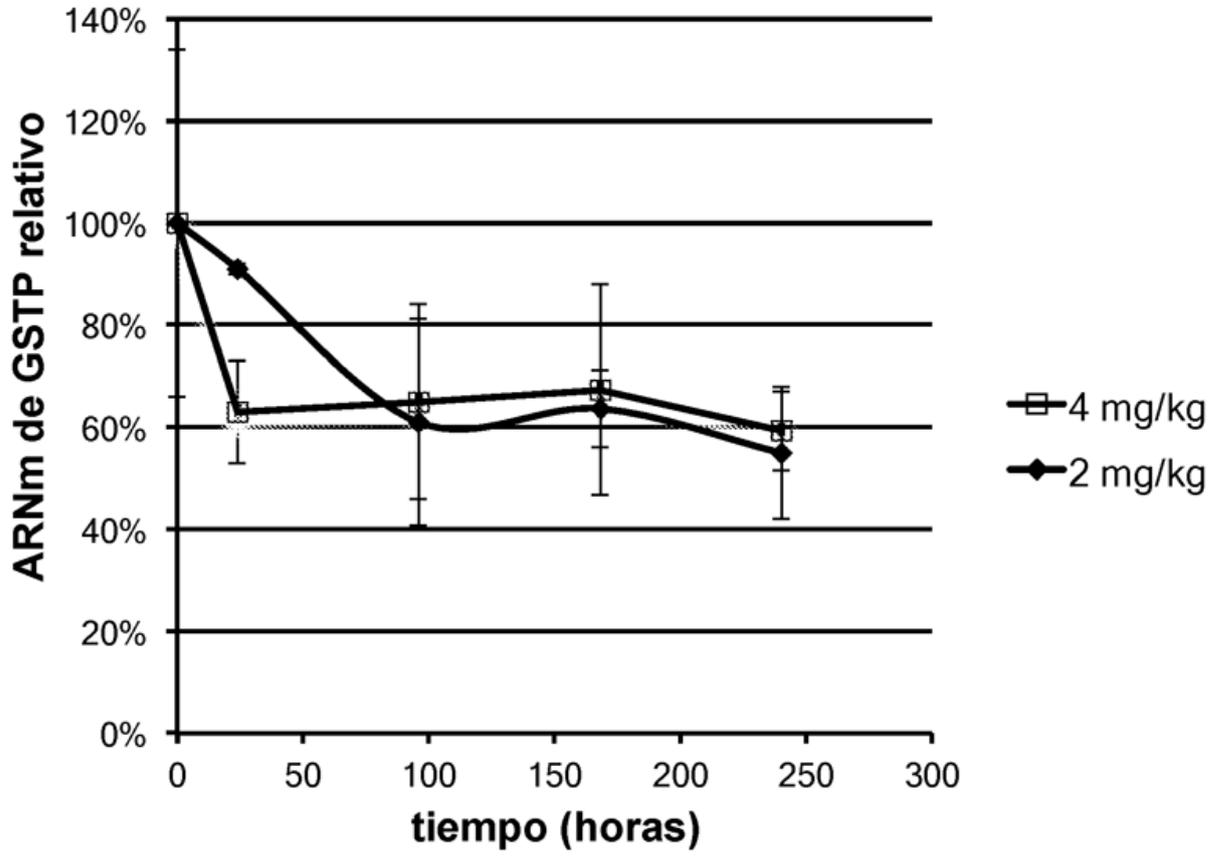


FIG. 6

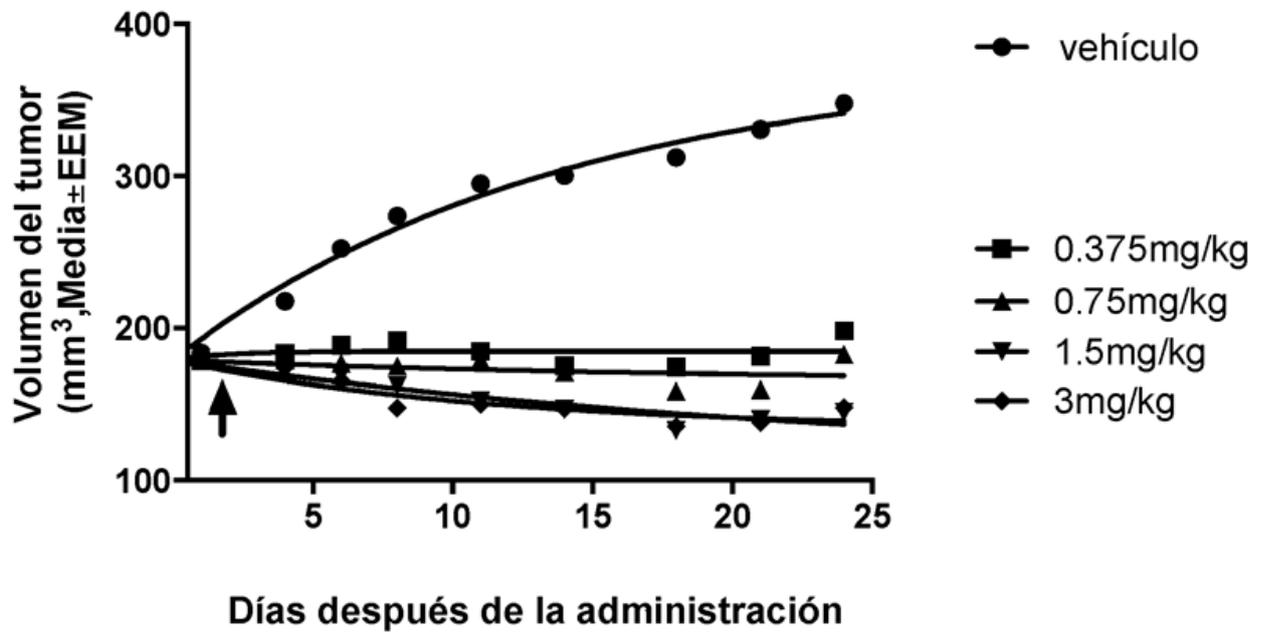


FIG. 7

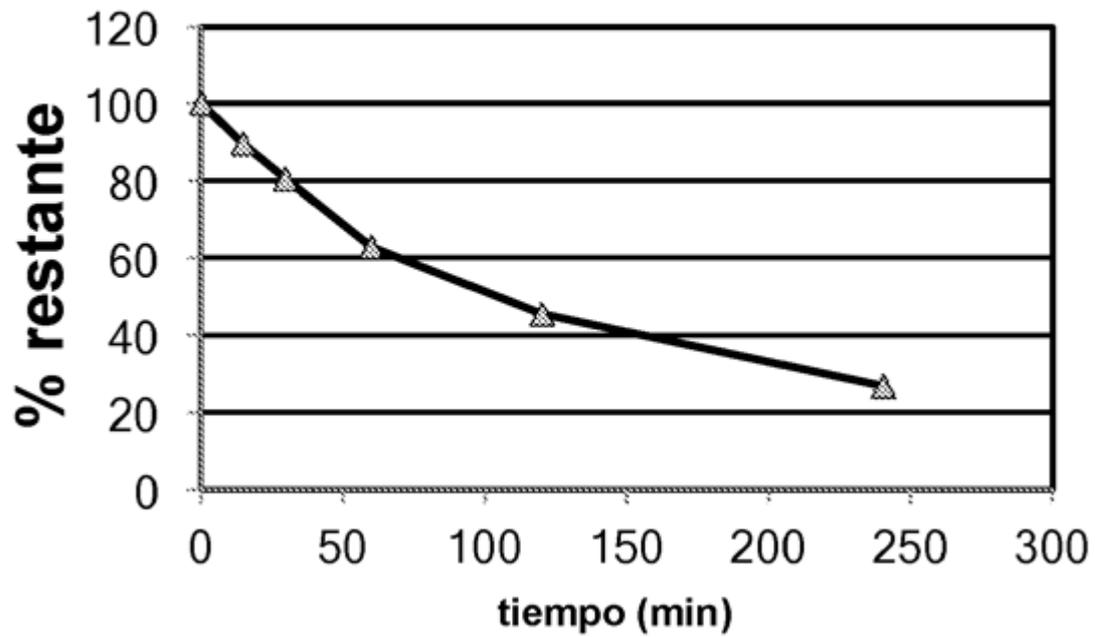
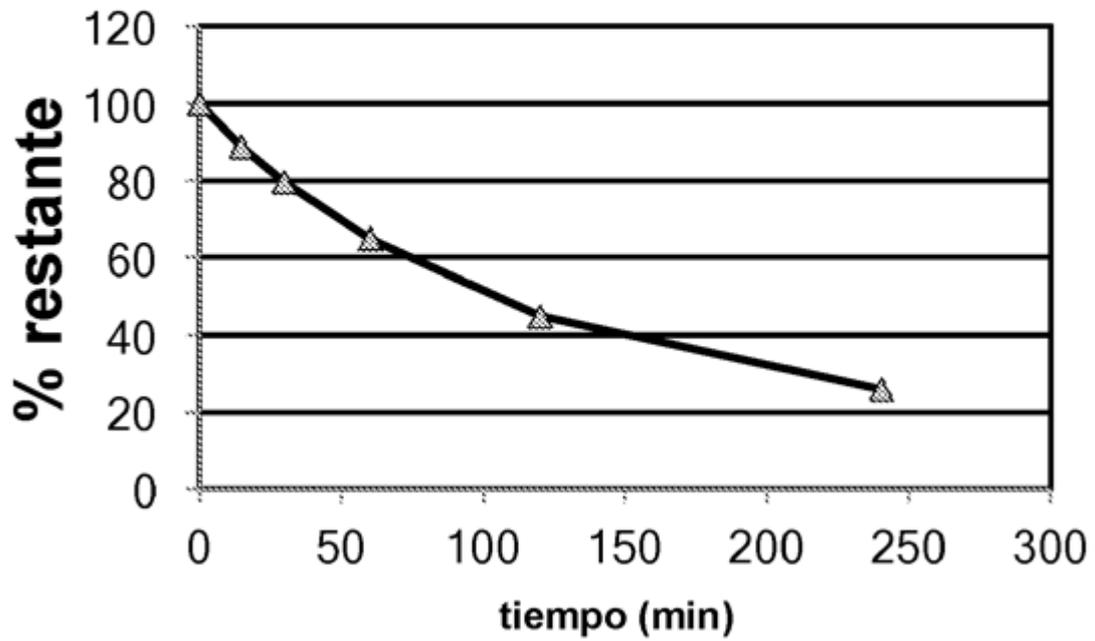


FIG. 8

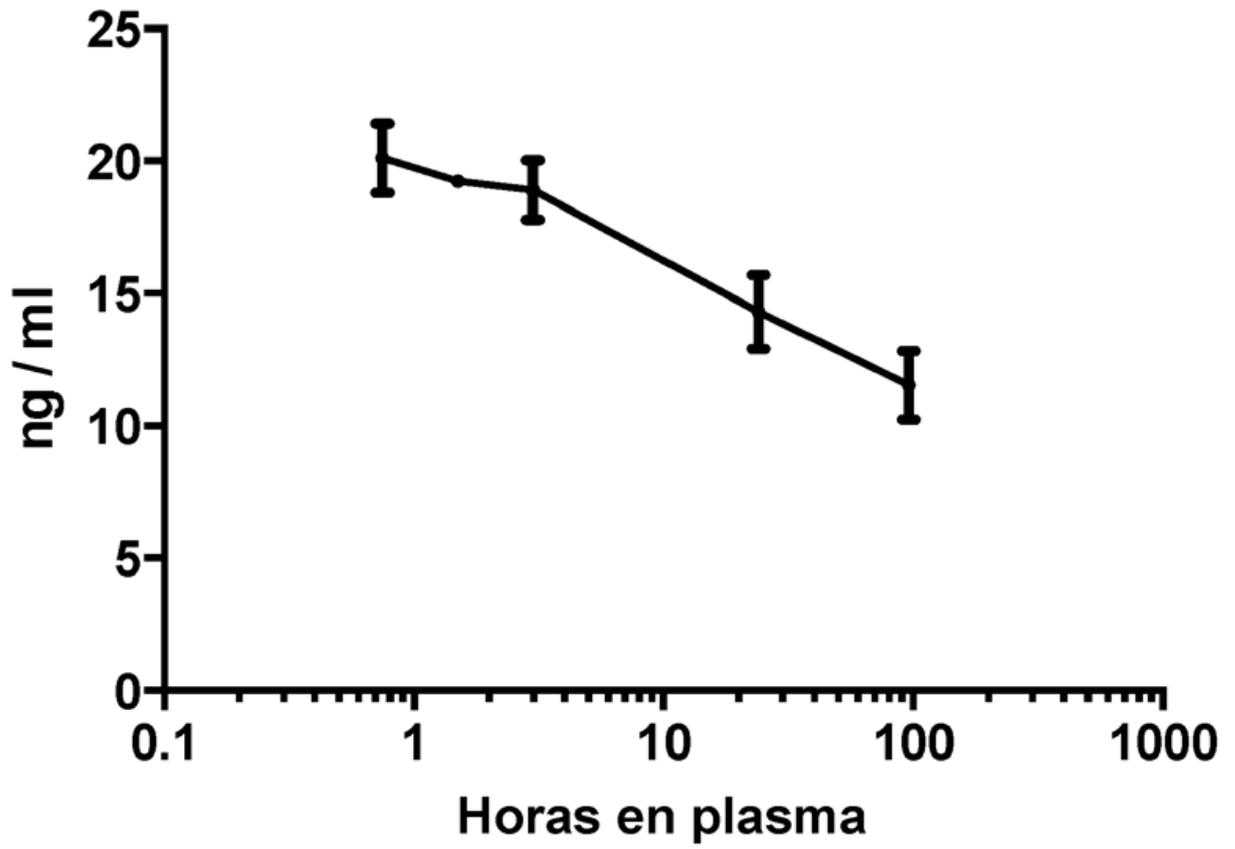


FIG. 9

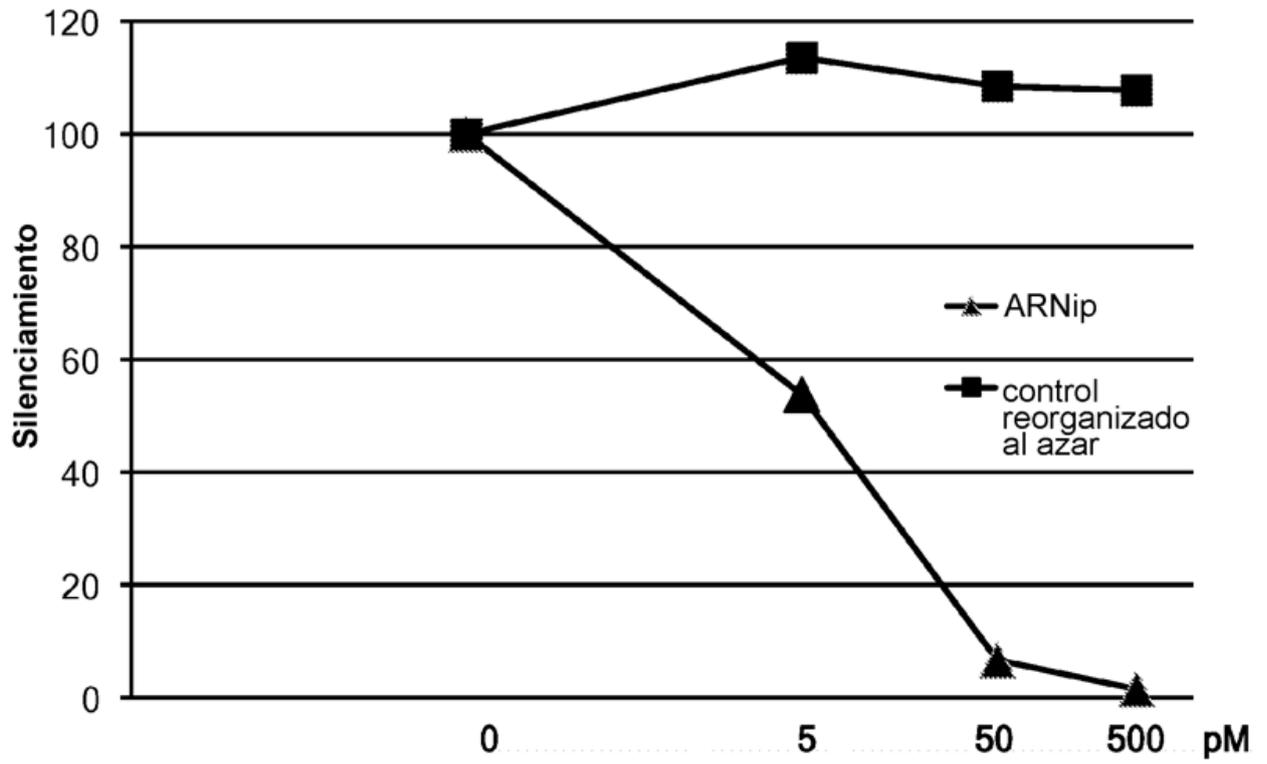


FIG. 10

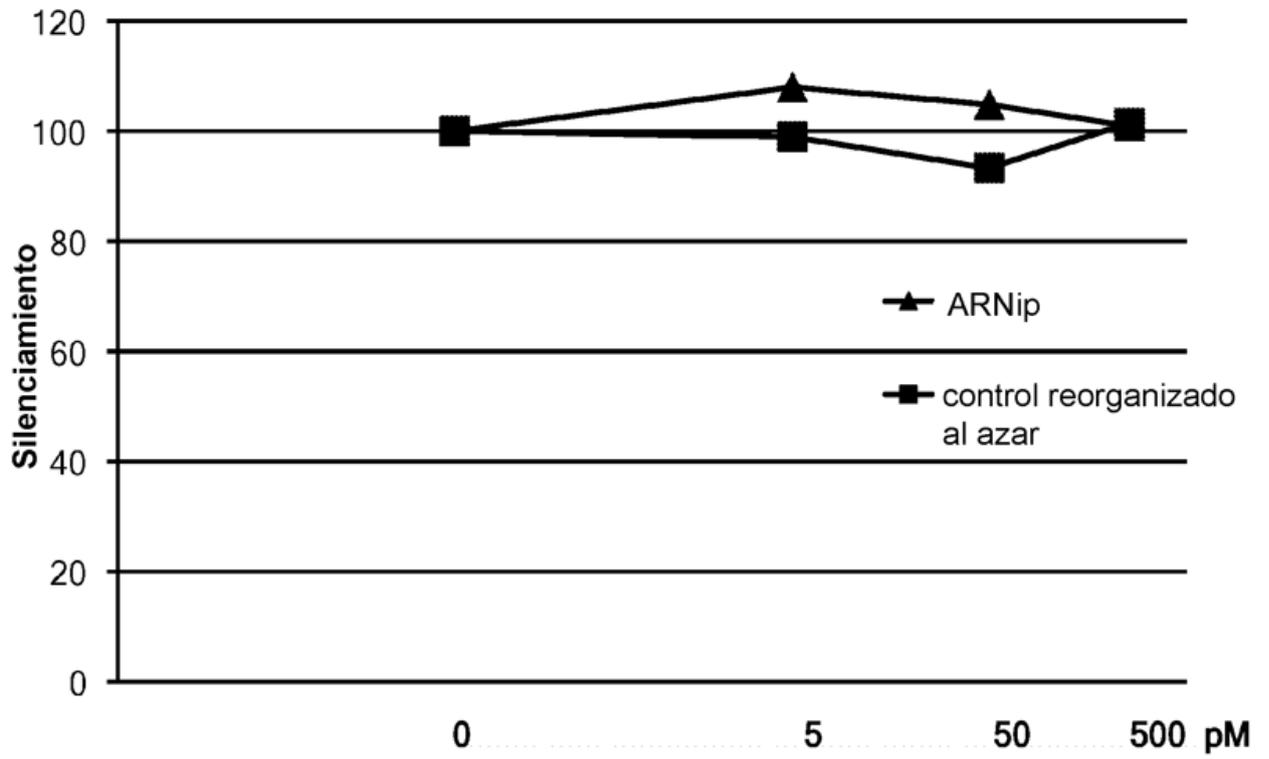


FIG. 11

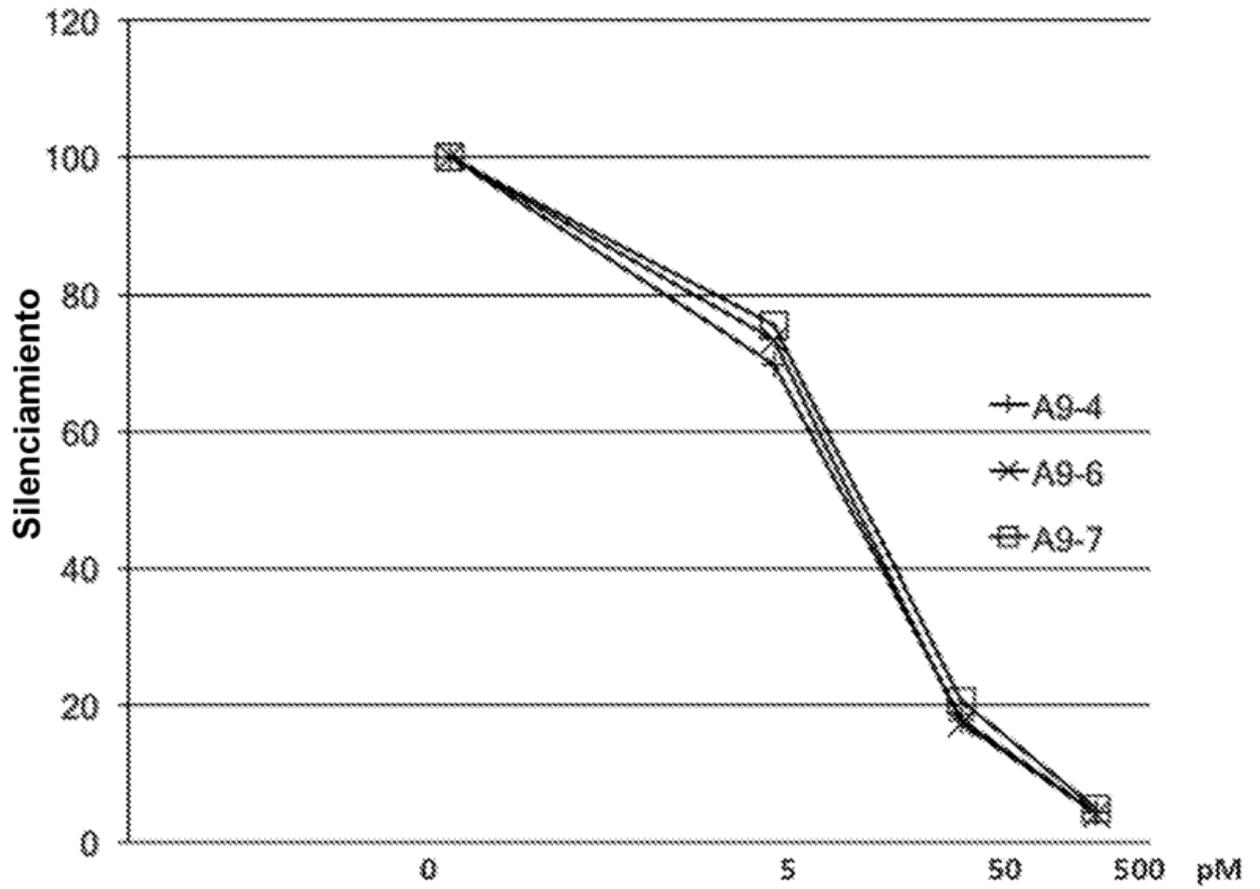


FIG. 12

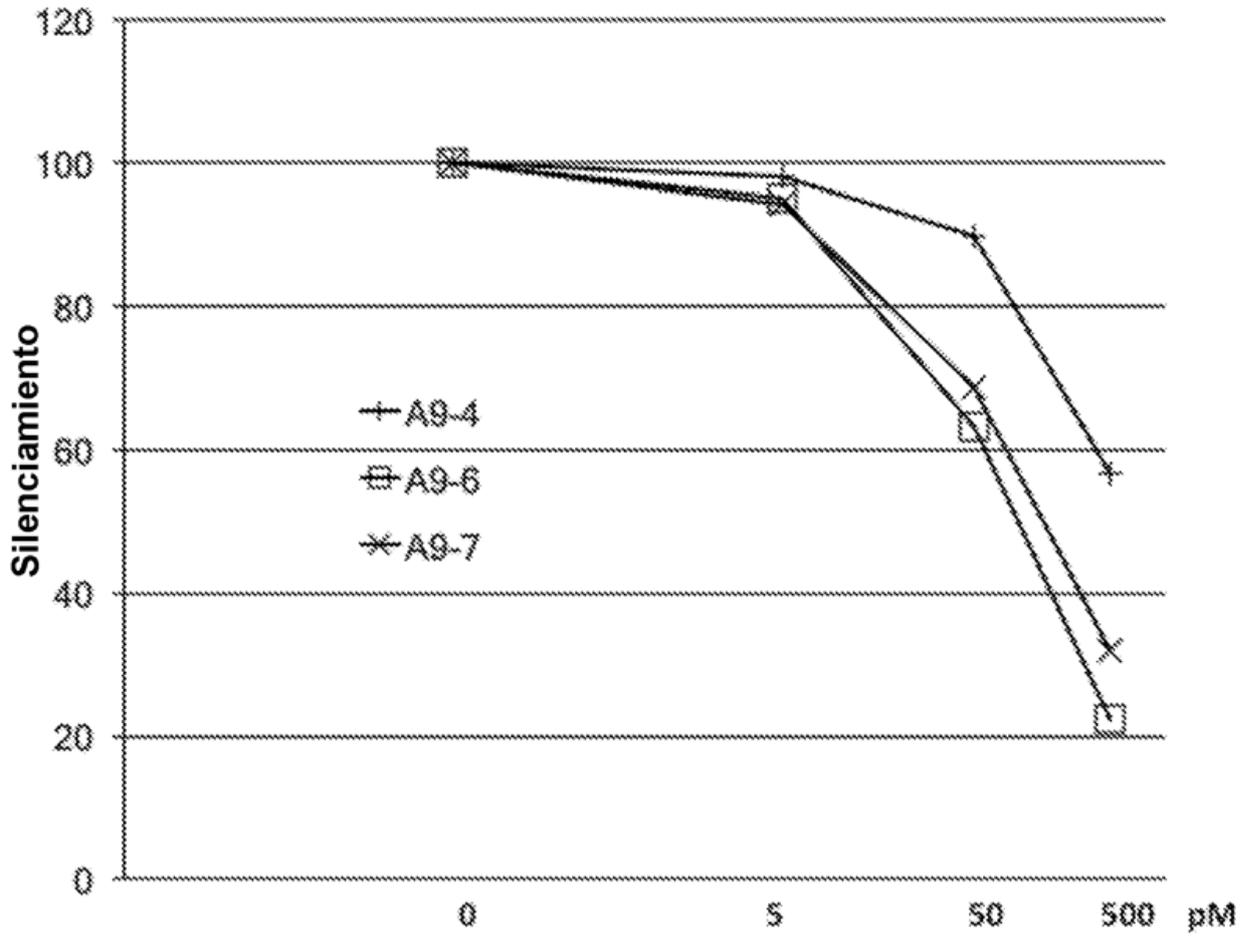


FIG. 13

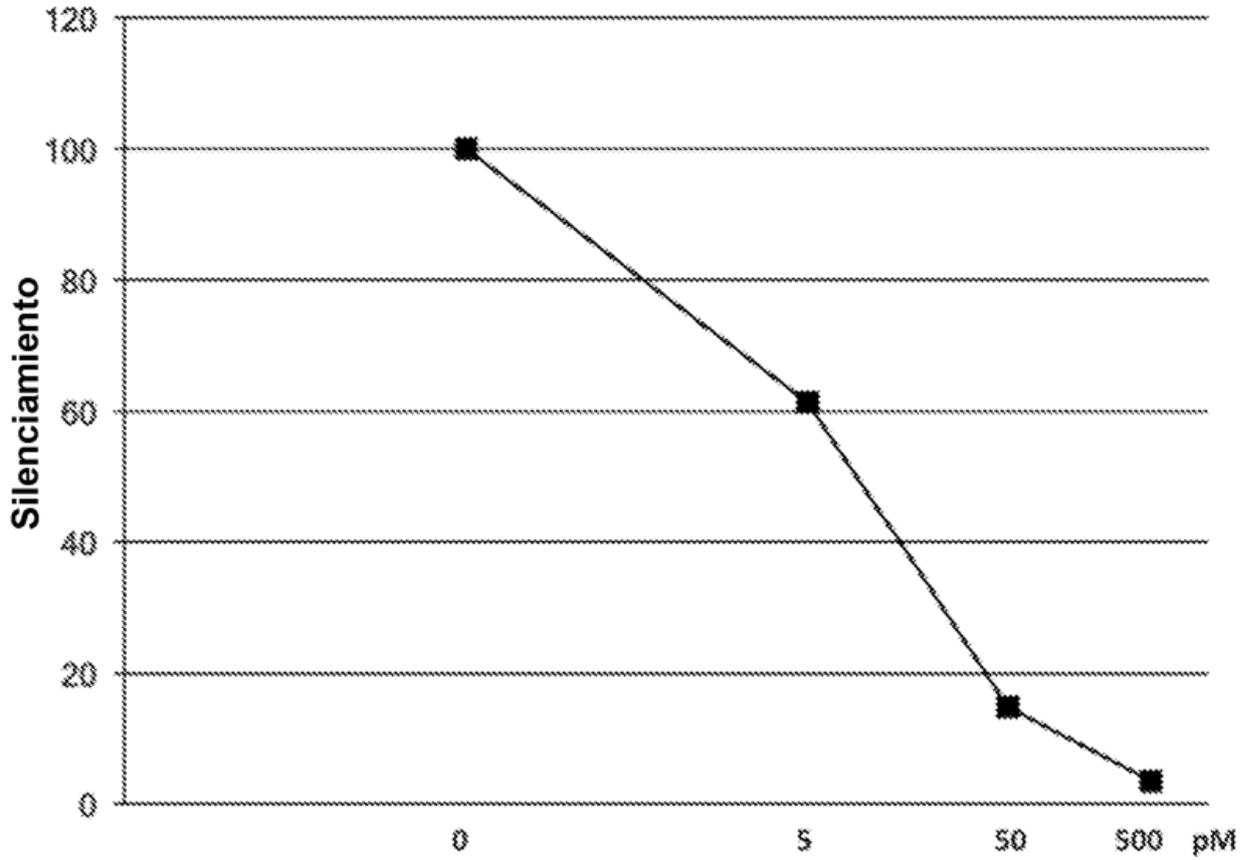


FIG. 14

