



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 343 292**

⑫ Número de solicitud: 200802214

⑤① Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 27/06 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **24.07.2008**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2010**

⑫④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
27.07.2010

⑦① Solicitante/s: **Universidad Complutense de Madrid**
Avenida de Séneca, nº 2
28040 Madrid, ES

⑦② Inventor/es: **Pintor Just, Jesús y**
Crooke Álvarez, Almudena

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **siRNA y shRNA para la elaboración de medicamentos frente a la presión intraocular elevada.**

⑤⑦ Resumen:
siRNA y shRNA para la elaboración de medicamentos frente a la presión intraocular elevada. La presente invención proporciona moléculas de siRNA y de shRNA para silenciar de manera selectiva el gen del receptor purinérgico P2Y₂. Estas moléculas son útiles para la elaboración de composiciones farmacéuticas con capacidad de disminuir la presión intraocular por lo que su aplicación es de utilidad en aquellas enfermedades que cursan con presión intraocular elevada como son el glaucoma, la uveítis, la retinopatía diabética así como determinadas enfermedades infecciosas o sistémicas.

ES 2 343 292 A1

DESCRIPCIÓN

siRNA y shRNA para la elaboración de medicamentos frente a la presión intraocular elevada.

5 **Campo de la invención**

La presente invención trata de la elaboración de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la hipertensión ocular. Más concretamente se refiere al empleo de la tecnología de los siRNA para silenciar de manera selectiva el gen del receptor purinérgico P2Y₂.

10

Estado de la técnica

Desde hace relativamente poco tiempo los investigadores han observado que el RNA de doble hebra (dsRNA, del inglés *doble strand* RNA) tiene propiedades interesantes al ser capaz de inhibir la expresión de genes. Esta capacidad de silenciar un gen tiene un amplio potencial para el tratamiento de algunas enfermedades humanas motivo por el cual tanto empresas como laboratorios de las universidades están poniendo un gran esfuerzo en el desarrollo de nuevas terapias basadas en esta tecnología.

15

Se considera que el mecanismo principal que tiene el dsRNA para inducir el silenciamiento de genes en mamíferos es la degradación del RNA mensajero (mRNA). En este caso, al dsRNA que degrada el mRNA se le llama siRNA (del inglés *small interference* RNA) o iRNA (interferente RNA).

20

Los primeros abordajes para el uso de dsRNA con el fin de silenciar un gen en particular tuvieron como resultado la síntesis de cadenas demasiado grandes que condujeron a fenómenos no deseados. De hecho, se ha comprobado que existe una limitación en mamíferos: siRNA de longitud superior a 30 nucleótidos producen respuesta inespecífica a interferón debido a que activan un mecanismo celular de defensa ante infecciones víricas. Esta observación puso de manifiesto la necesidad de buscar cadenas de dsRNA que no fuesen demasiado grandes.

25

Recientemente, se ha podido comprobar que cadenas entre 18 y 30 pares de bases de dsRNA pueden entrar en células y tejidos y, si su secuencia está bien escogida, pueden destruir selectivamente un mRNA sin disparar la respuesta del interferón. A estas moléculas de dsRNA con una secuencia específica para destruir a su vez a un mRNA en particular se les ha denominado siRNA, como se ha descrito anteriormente.

30

La estructura de los denominados siRNA proviene del procesamiento de los dsRNA por mediación del enzima DICER, una proteína que pertenece a la familia de la RNasa III, que escinde el dsRNA en fragmentos pequeños. Un complejo de proteínas denominado RISC (del inglés *RNA induced silencing complex*) recoge estos siRNA y a continuación busca y destruye cualquier RNA presente en la célula con una secuencia complementaria, como es el mRNA diana para el que se diseñó el dsRNA. El mecanismo de acción de los siRNA así como algunos de sus usos se pueden ver en las siguientes referencias: Provost *et al.* (2002) *Ribonuclease Activity and RNA Binding of Recombinant Human Dicer*, *EMBO J.* 21(21): 5864-5874; Tabara *et al.* (2002) *The dsRNA Binding Protein RDE-4 Interacts with RDE-1, DCR-1 and a DexH-box Helicase to Direct RNAi in C. elegans*, *Cell* 109(7):861-71; Martínez *et al.*, (2002) *Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi*, *Cell* 110(5):563-574; Hutvagner & Zamore (2002) *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*, *Science* 297:2056; (para la revisión vea Bosher & Labouesse (2000) *RNA interference: genetic wand and genetic watchdog*, *Nat. Cell. Biol.* 2 (2): E31-E36). De modo resumido, el fenómeno de la interferencia o silenciamiento del RNA se completa mediante los siguientes pasos: (i) en primer lugar se produce el reconocimiento del dsRNA y la unión a DICER; (ii) a continuación, la actividad RNasa III de DICER produce la escisión del dsRNA dando lugar a la producción de siRNA; (iii) se produce la asociación de los siRNA al complejo proteico RISC que (iv) reconoce el mRNA complementario diana y (v) induce la ruptura del mRNA diana en el centro de la región complementaria al siRNA; (vi) el último paso consiste en la degradación del mRNA diana y el reciclaje del complejo RISC.

45

50

Las dos principales ventajas de esta tecnología consisten en que el efecto es bastante más duradero que el de un fármaco normal y que la interferencia se mantiene, *in vitro*, después de numerosas divisiones celulares. Otra característica fundamental es que el siRNA se diseña de manera específica por lo que se puede inhibir la expresión de un gen sin afectar a ningún otro (Kisielow, M. *et al.* (2002) *Isoform-specific knockdown and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA*, *J. Biochem.* 363:1-5). Esto no solo permite aplicaciones selectivas para patologías muy complejas sino que, además, los siRNA pueden emplearse para comprobar la participación de un determinado gen (y por ende su proteína) en los procesos bioquímicos y fisiológicos de una célula.

55

Se han utilizado diversos sistemas en los que, con el empleo de siRNA, se ha logrado la supresión específica de la biosíntesis de proteínas en diferentes líneas celulares mamíferas, de modo que este método ha permitido asignar una función a los genes. Por ejemplo, se ha podido demostrar la inhibición de la expresión génica a nivel postranscripcional en células eucarióticas. En este contexto, los iRNA son una herramienta excelente para evaluar rápidamente la función del gen y para revelar fenotipos nulos.

60

65

Más allá de los posibles papeles de este tipo de RNA como herramienta para comprender el significado de los genes está el empleo con fines terapéuticos. De este modo se podría emplear los iRNA para tratar enfermedades.

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa que ocurre en muchos casos como consecuencia del incremento en la presión intraocular (PIO) que estrangula la arteria ciliar privando de flujo sanguíneo a la retina e induciendo la muerte de las células retinianas con la consiguiente pérdida de visión. Si la PIO es muy elevada el nervio óptico puede ser incluso estrangulado con lo que el proceso es, si cabe, más grave. El caso más habitual de glaucoma es el que se acaba de comentar, que se denomina de ángulo abierto, y su prevalencia es notable en mayores de 40 años, entre quienes tiene una incidencia de un caso cada 200 personas.

No se conocen bien los motivos que pueden desencadenar el glaucoma, pero parece que podría tener un componente genético. Por ejemplo, el gen de la miocilina, presenta más de 30 mutaciones y se ha comprobado que es responsable del 5% de los casos de glaucoma de ángulo abierto (véase las revisiones en Wirtz & Samples (2003) *The genetic loci of open angle glaucoma. Ophthalmol. Clin. North Am.* 16: 505-514, y Khaw *et al.*, (2004) *Glaucoma -1: diagnosis. BMJ*, 328: 97-99).

Las terapias que actualmente se están desarrollando frente al glaucoma pasan por la cirugía y la farmacología, con el fin de hacer caer la presión intraocular anormalmente elevada en estos pacientes. Al margen de la cirugía, la farmacología se lleva a cabo por medio de 5 tipos de familias de fármacos:

Inhibidores de las anhidrasas carbónicas;

Agentes betabloqueantes;

Agentes agonistas alfaadrenérgicos;

Parasimpáticomiméticos;

Análogos de las protaglandinas.

Todas y cada una de estas aproximaciones presentan ventajas e inconvenientes y son precisamente los inconvenientes los que demandan la generación de nuevas estrategias para el tratamiento de esta patología.

Recientemente en la patente WO2006021817 se describe el diseño y empleo de iRNA para el tratamiento de las patologías oculares y en particular en el tratamiento del glaucoma. Sin embargo, las dianas seleccionadas por los inventores nada tienen que ver, ni ponen en compromiso alguno, con la invención que aquí se describe. La mencionada patente reivindica 1829 secuencias oligonucleotídicas para las anhidrasas carbónicas II, IV y XII, para los receptores adrenérgicos beta1 y beta2, alfala, para la acetilcolinesterasa, ciclooxigenasas 1 y 2, ATPasas, ELAM, el sistema renina angiotensina y la coclina. En ningún momento se reivindica el uso de un iRNA para silenciar el gen de la proteína que se reivindica en este documento.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un siRNA para la elaboración de medicamentos frente a la presión intraocular elevada en animales y humanos. Patologías como el glaucoma, la uveitis y los procesos inflamatorios suelen ocurrir con incrementos notables de la presión intraocular. El siRNA de la invención es específico para el silenciamiento del gen que codifica el receptor purinérgico P2Y₂, que es uno de los receptores purinérgicos P2Y con influencia en el comportamiento del humor acuoso. El silenciamiento y la no expresión de este gen se deben al empleo de un RNA de doble hebra que directamente interfiere con el mRNA del receptor P2Y₂.

En la presente invención el gen del receptor purinérgico P2Y₂ se denomina también gen diana puesto que es su expresión la que específica y selectivamente se silencia.

El diseño del siRNA se establece entorno a unos criterios generales como son una longitud entre 21 y 26 pares de bases, la selección de la región homóloga dentro del gen, distancia del codón de iniciación, contenido G/C y la localización de dímeros de adenosina. Dado que esto no es un proceso exacto es necesario diseñar varias secuencias y ensayarlas para así seleccionar aquella más adecuada.

De una manera más detallada, para una buena selección de la secuencia de un siRNA se deben seguir los siguientes pasos:

- 1.- En la secuencia del mRNA, buscar una región localizada de 50 a 100 nucleótidos en sentido 3' desde el codón AUG de iniciación.
- 2.- En esta región se buscan las secuencias AA(N19), CA(N19), es decir, secuencias de 19 pares de bases precedidas bien por AA o bien por CA.
- 3.- El porcentaje ideal de G/C debe ser superior al 30% pero no sobrepasar el 70% (50% sería ideal).

ES 2 343 292 A1

4.- Se evitan secuencias con las siguientes repeticiones: AAA, CCC, GGG, TTT, AAAA, CCCC, GGGG, TTTT.

5.- Se realiza una predicción de la estructura secundaria del mRNA.

6.- Se realiza una búsqueda por homología de secuencias en bases de datos especializadas (es decir, un BLAST a través de las bases de datos tipo NCBI ESTs) con las secuencias que se ajustan mejor a los requisitos aquí expuestos, para garantizar que solo se va a silenciar el gen que nos interesa.

La secuencia oligonucleotídica para la que se han diseñado los siRNA de la invención incluye 19 nucleótidos del gen del receptor purinérgico P2Y₂ y es la siguiente (SEQ ID NO 1):

CCTGTACTGCAGCATCCTC

Esta secuencia es la secuencia diana y se corresponde con la del fragmento de mRNA del receptor purinérgico P2Y₂ contra la que se ha diseñado los siRNA.

La invención también se refiere a siRNA de entre 19 y 26 nucleótidos cuyas secuencias contienen los 19 nucleótidos diseñados frente a la secuencia diana definida más arriba.

Por otro lado, las dos hebras de los siRNA de la invención pueden tener uno o más nucleótidos en el extremo 3', preferentemente dos, que no se complementan con la hebra complementaria. Estos nucleótidos libres pueden ser tanto ribonucleótidos como deoxyribonucleótidos. Por ejemplo, las dos hebras de los siRNA de la invención pueden comprender dos desoxitimas (TT) o dos uridinas (uu) libres en ambos extremos 3'.

Además, la invención incluye siRNA cuyas secuencias difieren de la de los siRNA frente a SEQ ID NO 1 en uno o más nucleótidos, pero que cumplen el requisito de mediar la degradación del mRNA del gen diana por la acción del fenómeno de interferencia de RNA. Los nucleótidos en que difieren las secuencias de estos siRNA pueden haber sido modificados mediante procedimientos químicos o enzimáticos.

Además del silenciamiento mediante siRNA, otra posibilidad es el silenciamiento mediado por shRNA o RNA en horquilla. El shRNA es una molécula de RNA que contiene una secuencia nucleotídica "sentido" (5'-3'), una secuencia nucleotídica antisentido (3'-5'), y una secuencia corta entre la "secuencia sentido" y la "antisentido". Debido a la complementariedad de las secuencias sentido y antisentido, tales moléculas de RNA tienden a formar un RNA de doble cadena con un bucle (el bucle es la secuencia corta). El shRNA se reproduce a partir de un vector, bajo la expresión de un promotor de la RNA polimerasa III. El shRNA expresado se exporta al citoplasma donde es procesado por el DICER de igual forma que el dsRNA y, de esta manera, se incorpora a la ruta de silenciamiento del siRNA. Esta forma de silenciar se utiliza cuando se quiere conseguir un silenciamiento duradero, "estable".

Uno de los aspectos de esta invención se refiere a un shRNA cuya cadena antisentido contiene la secuencia complementaria a SEQ ID NO 1 y que es capaz de silenciar la expresión del gen del receptor purinérgico P2Y₂. Ambas cadenas (sentido y antisentido) pueden contener de 19 a 29 nucleótidos distribuidos indistintamente entre ambas secuencias.

La invención también incluye shRNA cuyas secuencias difieren de la de los shRNA frente a SEQ ID NO 1 en uno o más nucleótidos, pero que cumplen el requisito de mediar la degradación del mRNA del gen diana por la acción del fenómeno de interferencia de RNA. Los nucleótidos en que difieren las secuencias de estos shRNA pueden haber sido modificados mediante procedimientos químicos o enzimáticos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un compuesto farmacéutico que incluye cualquiera de las versiones de siRNA o shRNA frente a SEQ ID NO 1 que se han detallado en esta descripción así como su uso en la elaboración de un medicamento para disminuir la PIO anormalmente elevada debido a enfermedades como el glaucoma, la uveítis, la retinopatía diabética o determinadas enfermedades infecciosas o sistémicas.

También se refiere a un método para tratar la PIO mediante el uso de siRNA o shRNA frente a la secuencia diana del gen del receptor purinérgico P2Y₂ en pacientes con PIO elevada debido a cualquiera de las enfermedades mencionadas.

Las preparaciones que contienen los siRNA o shRNA pueden tener diversas formulaciones, de modo que los siRNA o shRNA puedan estar preparados en un vehículo adecuado para permitir una penetración más eficaz del principio activo (como por ejemplo liposomas). Dichos vehículos deben poseer propiedades aceptables para la administración ocular y pueden comprender, además de los mencionados liposomas, polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas, microesferas, dendrímeros o vectores para proteínas. En otros casos el siRNA o el shRNA podrá estar formulado con polietileneimina o derivados como polietileneimina polietilenglicol-N-acetilgalactosamina o polietilenglicol-triN-acetilgalactosamina. Los siRNA y shRNA también pueden prepararse con agentes que permiten la permeabilización a través de membranas, como pueden ser preparados lipídicos.

La administración de los siRNA y shRNA puede realizarse en soluciones acuosas y no acuosas, geles acuosos y no acuosos, cremas, emulsiones, microemulsiones, liposomas, aceites, lociones o aerosoles.

El siRNA se aplica de manera tópica como manera más sencilla, aunque también se pueden emplear otros protocolos y composiciones. Los siRNA preparados pueden aplicarse de manera sistémica o local, por vía oral, transdérmica o en inyecciones. En este último caso, son especialmente interesantes las inyecciones intracamerular, subconjuntival e intravítrea.

La dosis farmacéuticamente efectiva será aquella que prevenga, inhiba la aparición o trate el estado patológico en cuestión. Esto varía dependiendo de la patología que produzca la hipertensión ocular, la composición, la vía de administración, el tipo de animal a tratar y otros aspectos que dependen del análisis médico por parte del especialista (como otros tratamientos simultáneos). De manera general se administra una cantidad que oscila entre 0.1 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal al día.

Breve descripción de los dibujos

Para facilitar la comprensión de las principales características de la invención y formando parte integrante de esta memoria descriptiva, se acompaña una figura. Con carácter ilustrativo y no limitativo se ha representado lo siguiente:

Figura 1: Efecto del siRNA frente al gen del receptor P2Y₂ donde se puede ver la bajada de la presión intraocular (PIO) en los animales tratados cuando se compara con los ojos contralaterales tratados solamente con solución salina.

Modo de realización

Habiendo descrito la presente invención, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no son limitativos de su alcance; dicho alcance viene definido exclusivamente por la nota reivindicatoria adjunta.

Ejemplo 1

Para el diseño del siRNA específico del receptor P2Y₂ de conejo fue necesario clonar dicho receptor. El clonaje se realizó a partir de RNA total de epitelio corneal de conejo utilizando oligonucleótidos degenerados y las técnicas RT-PCR y RACE (*Rapid Amplification of cDNA ends*) que cualquier experto en la materia conoce. Para obtener las secuencias diana con mayor probabilidad de éxito de silenciamiento por siRNA, se utilizó el sistema de búsqueda de Applied Biosystems con el que, mediante una serie de criterios empíricos, se seleccionaron 9 secuencias. Los siRNA que reconocen esas secuencias dianas fueron proporcionados por Applied Biosystems en la forma anillada, purificados y liofilizados. Para medir la eficacia de dichos siRNA *in vitro*, se resuspendieron en agua libre de RNasas y para su aplicación *in vivo* fueron resuspendidos en NaCl 0.9%.

Ejemplo 2

El siRNA fue ensayado en el modelo animal del conejo de Nueva Zelanda. Para ello se usó siRNA cuya secuencia es complementaria a la secuencia anteriormente descrita (SEQ ID NO 1) y cuya obtención se ejemplifica en el ejemplo 1 de esta memoria. La secuencia de conejo es la homóloga para el receptor humano por lo que el siRNA diseñado puede utilizarse en el ser humano.

Los estudios para valorar la especificidad de los siRNA se realizaron tanto *in vitro* como *in vivo*. Se realizaron estudios *in vitro* que demostraron la eficiencia y especificidad de los siRNA diseñados al silenciar, en cultivos celulares primarios de epitelio, los niveles del mRNA correspondiente al receptor P2Y₂. El análisis de la eficacia de dichos siRNA se determinó mediante inmunocitoquímica, a partir de células de epitelio corneal de conejo transfectadas con 300 nM de dichos siRNAs. Este análisis reveló la eficiencia de silenciamiento del siRNA que tenía como secuencia diana la secuencia caracterizada por SEQ ID NO 1.

Posteriormente se realizaron estudios *in vivo*. Por un lado se estudió el silenciamiento *in vivo* del receptor por técnicas inmunohistoquímicas. Para ello se trató al animal con el siRNA y en el momento de máxima disminución de la presión intraocular se sacrificó para realizar técnicas inmunohistoquímicas de los procesos ciliares con el anticuerpo para el receptor P2Y₂, empleando el anticuerpo comercial de la casa Santa Cruz (SC-1520), y realizando la inmunohistoquímica siguiendo las especificaciones del fabricante. Estos resultados demostraron la desaparición de la proteína, y permitieron realizar a continuación estudios del efecto de los siRNA sobre la presión intraocular.

Los estudios de la presión intraocular se realizaron en conejos de la raza Nueva Zelanda midiéndoles la presión intraocular. El ojo del conejo es especialmente interesante al ser grande y de ese modo poderse realizar medidas de presión intraocular de una manera precisa. La presión intraocular de estos animales, entorno a 20 mm Hg, puede disminuir hasta el 40% con el uso de tratamientos comerciales para la hipertensión ocular.

Los animales empleados fueron normotensos ya que de ese modo la reproducibilidad de las medidas de presión intraocular y la facilidad de las mismas estaban garantizadas.

ES 2 343 292 A1

Los conejos se mantuvieron en jaulas individuales con libre acceso a comida y bebida. Estaban sometidos a ciclos de luz/ oscuridad de 12 horas para evitar las oscilaciones debidas a los ciclos circadianos. Para la realización de la experimentación se siguió la directiva europea 86/609/EEC para el uso y manejo de los animales de experimentación.

Los siRNA se aplicaron instilando tópicamente un volumen de 40 μ l en la superficie de la córnea. El ojo contralateral recibió un volumen equivalente del vehículo utilizado, es decir, solución salina, y se utilizó como ojo control.

Las medidas de la presión intraocular se realizaron por medio de un tonómetro de rebote TonoVet. Este tonómetro es mínimamente invasivo, por lo que no requiere el uso de anestesia. Las medidas se realizaron midiendo el nivel basal de la presión intraocular y el experimento se repitió un total de 8 veces. Para evitar problemas, los experimentos se realizaron siempre a la misma hora del día, lo que permitió obtener una valoración más objetiva de los resultados.

El protocolo de aplicación del siRNA fue el siguiente: las dosis del siRNA preparadas en solución salina (NaCl 0.9% p/v) en un volumen final de 40 μ l se aplicaron en cada ojo durante cuatro días consecutivos a la misma hora. El ojo contralateral recibió 40 μ l de solución salina, durante el mismo número de días y a la misma hora. La presión intraocular fue medida antes de cada aplicación y cada 2, 4 y 6 horas durante los siguientes 7 días. Las máximas respuestas en la bajada de la presión intraocular se obtuvieron a las 24 horas de comenzar el tratamiento y duraron hasta el quinto día.

La figura 1 muestra los resultados obtenidos. Los cuadrados negros indican los datos obtenidos a partir del ojo en el que se aplicó únicamente solución salina; los círculos blancos reflejan los resultados obtenidos en el ojo que se trató con el siRNA de la invención. El eje de las X expresa el tiempo en horas y el de las Y indica el valor de la PIO y cómo varía respecto al control (al que se le da un valor del 100%) Como se aprecia en la figura 1, el resultado del tratamiento con el siRNA mostró una disminución de la presión intraocular que, además, resultó estadísticamente significativa, objetivo fundamental de todas las terapias para patologías que cursan con hipertensiones oculares como el glaucoma. Comparativamente con el ojo contralateral tratado con solución salina, que apenas fluctuó, los ojos tratados con el siRNA de la invención disminuyeron la presión intraocular por debajo de la línea base hasta un 50% (figura 1). Dichos valores fueron normalizados sobre los valores de la línea base y los puntos en la figura representan la media y el error estándar de la media.

El efecto del siRNA no solamente fue notable en su capacidad hipotensora de la presión intraocular sino que además su efecto fue muy duradero ya que llegó a durar cuatro días, en clara comparación con los fármacos comerciales cuya duración es de unas pocas horas.

Adicionalmente, no se observaron efectos secundarios ni durante ni después del tratamiento con el siRNA. Los posibles efectos secundarios que se estudiaron fueron irritación corneo conjuntival, edema corneal, tindall en cámara anterior y formación de cataratas.

REIVINDICACIONES

1. Molécula aislada de siRNA que comprende una secuencia de 19 nucleótidos complementaria a la secuencia
diana SEQ ID NO 1 del gen del receptor purinérgico P2Y₂.

2. Molécula aislada de siRNA, según la reivindicación 1, cuya secuencia contiene hasta 7 nucleótidos más que
SEQ ID NO 1 distribuidos indistintamente en ambos extremos.

3. Molécula aislada de siRNA, según la reivindicación 1, cuya secuencia contiene dos nucleótidos más que SEQ
ID NO 1 en el extremo 3' de cada una de las hebras siendo esos dos nucleótidos o bien dos desoxitimas (TT) o bien
dos uridinas (uu).

4. Molécula aislada de siRNA, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene nucleótidos mo-
dificados químicamente.

5. Composición farmacéutica que comprende la molécula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un
excipiente farmacéuticamente aceptable.

6. Uso de la molécula de RNA de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para elaborar un medicamento para el
tratamiento de la presión intraocular elevada.

7. Uso, según la reivindicación 6, donde la presión intraocular elevada está causada por glaucoma.

8. Uso, según la reivindicación 6, donde la presión intraocular elevada está causada por retinopatía diabética.

9. Uso, según la reivindicación 6, donde la presión intraocular elevada está causada por una uveítis.

10. Uso, según la reivindicación 6, donde la presión intraocular elevada está causada por una enfermedad sistémica.

11. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, donde el medicamento se administra tópicamente en el ojo
del paciente.

12. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, donde el medicamento se administra en el ojo del paciente
a través de una inyección intracamerular.

13. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, donde el medicamento se administra en el ojo del paciente
a través de una inyección subconjuntival.

14. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, donde el medicamento se administra en el ojo del paciente
a través de una inyección intravítrea.

15. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, donde el medicamento se administra en la córnea del
paciente.

16. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 6-15, donde el paciente es un ser humano.

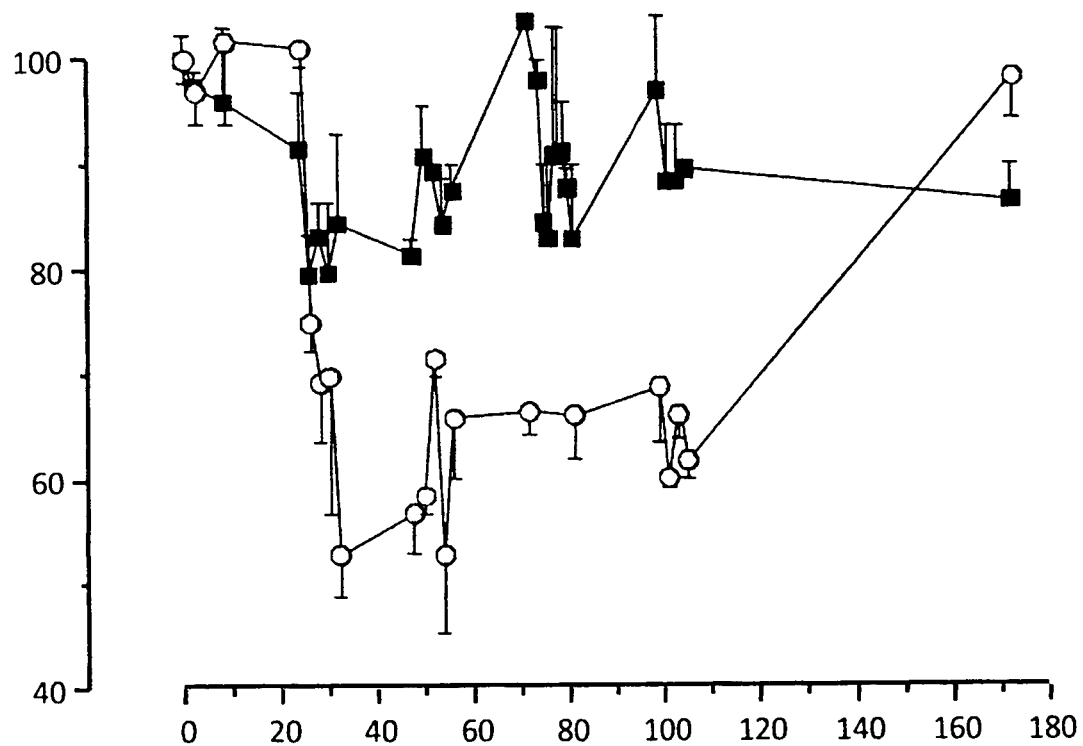


Fig. 1

ES 2 343 292 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Complutense de Madrid

5 <120> siRNA y shRNA para la elaboración de medicamentos frente a la presión intraocular elevada

<160> 1

10 <210> 1

<211> 19

<212> DNA

15 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 1

20 CCTGTACTGC AGCATCCTC

19

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 343 292

⑫ Nº de solicitud: 200802214

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **24.07.2008**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	Crooke A. et al. Nucleotides in ocular secretions: their role in ocular physiology. Pharmacology and Therapeutics. 01.07.2008, Vol. 119, páginas 55-73 (todo el documento).	1-16
Y	WO 2004/094636 A1 04.11.2004 GALAPAGOS GENOMICS N.V. AND VAN DER SCHUEREN, J. páginas 1-34; páginas 39 y 260.	1-16
A	Pintor J. et al. Immunolocalisation of P2Y receptors in the rat eye. Purinergic Signalling. 2004, Vol. 1, páginas 83-90 (todo el documento).	1-16
A	Abbracchio M. P. et al. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. Pharmacological Reviews. 2006, Vol. 58, Nº 3, páginas 281-341 (todo el documento).	1-16
A	Campochiaro P. A. Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. Gene Therapy. 2006, Vol. 13, páginas 559-562 (todo el documento).	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

24.06.2010

Examinador

M. Cumbreño Galindo

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-16	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-16	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Crooke A. et al. Pharmacology and Therapeutics. Vol. 119, páginas 55-73	01-07-2008
D02	WO 2004/094636 A1	04-11-2004
D03	Pintor J. et al. Purinergic Signalling. Vol. 1, páginas 83-90	2004
D04	Abbracchio M. P. et al. Pharmacological Reviews. Vol. 58, Nº 3, páginas 281-341	2006
D05	Campochiaro P. A. Gene Therapy. Vol. 13, páginas 559-562	2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto una molécula de siRNA aislada que comprende una secuencia de 19 nucleótidos complementaria a la secuencia diana SEQ ID NO 1 del gen del receptor purinérgico P2Y2 que puede contener dos nucleótidos más en el extremo 3' de cada una de las hebras, los cuales pueden ser desoxitimas o uridinas (reivindicaciones 1 a 3) o nucleótidos modificados químicamente (reivindicación 4), así como una composición farmacéutica que comprende la molécula mencionada (reivindicación 5). Además, la presente invención tiene por objeto el uso de dicha molécula para elaborar un medicamento para el tratamiento de la presión intraocular elevada (reivindicaciones 6 a 16).

D01 explica cómo el conocimiento de las acciones de los nucleótidos y dinucleótidos presentes en el humor acuoso puede servir de punto de partida para el desarrollo de fármacos para el tratamiento del glaucoma, del ojo seco y del desprendimiento de retina. Así, la movilización de Ca²⁺ generada por los receptores P2Y2 es esencial para incrementar el flujo de HCO₃⁻ que, a su vez, aumenta el transporte de fluido en la córnea. Por otro lado, algunos nucleótidos como 2-MeSATP, ATP-gamma-S y ATP aumentan la presión intraocular (IOP) causante del glaucoma y actúan sobre los receptores P2Y1 y P2Y2 presentes en las células de los cuerpos ciliares de conejo.

D02 anticipa moléculas de RNA para su uso en el silenciamiento de genes, de modo que pueden ser utilizadas para disminuir o inhibir la cantidad producida de determinadas proteínas y/o moléculas de RNA. Entre los genes utilizados como diana se encuentra el gen del receptor P2Y2 (P2RY2, número de acceso: NM_002564) para el cual se proponen tres moléculas distintas de siRNA.

D03 establece la presencia de receptores P2Y2 en la córnea, en los procesos ciliares y en el epitelio de la retina. También están presentes en la red trabecular de la córnea, responsable del drenaje del humor acuoso y, por tanto, de la regulación de la presión intraocular.

D04 habla de distintos aspectos relacionados con la familia de receptores P2Y como son las interacciones entre ellos, su distribución o las posibles aplicaciones terapéuticas. En relación con el receptor P2Y2, se menciona su uso como diana de fármacos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades oculares.

D05 expone que el ojo es un órgano que presenta ventajas para la utilización de siRNAs, habiéndose demostrado que la aplicación tópica de siRNAs dirigidos contra VEGF o sus receptores suprime la neovascularización en la córnea y los dirigidos contra TGF-beta-R2 resultan beneficiosos en un modelo de excesiva cicatrización ocular tras cirugía de glaucoma, constituyendo una herramienta que puede ser utilizada para el desarrollo de fármacos destinados al tratamiento de enfermedades oculares.

Hoja adicional

1. NOVEDAD

Las reivindicaciones 1-16 cumplen con el requisito de novedad.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA

La presente invención tiene por objeto una molécula de siRNA aislada que comprende una secuencia de 19 nucleótidos complementaria a la secuencia diana SEQ ID NO 1 del gen del receptor purinérgico P2Y2 que puede contener dos nucleótidos más en el extremo 3' de cada una de las hebras, los cuales pueden ser desoxitimas o uridinas (reivindicaciones 1 a 3) o nucleótidos modificados químicamente (reivindicación 4), así como una composición farmacéutica que comprende la molécula mencionada (reivindicación 5). Además, la presente invención tiene por objeto el uso de dicha molécula para elaborar un medicamento para el tratamiento de la presión intraocular elevada (reivindicaciones 6 a 16).

D01, que es el documento más próximo del estado de la técnica, explica cómo el conocimiento de las acciones de los nucleótidos y dinucleótidos presentes en el humor acuoso puede servir de punto de partida para el desarrollo de fármacos para el tratamiento del glaucoma, del ojo seco y del desprendimiento de retina. Así, la movilización de Ca^{2+} generada por los receptores P2Y2 es esencial para incrementar el flujo de HCO_3^- que, a su vez, aumenta el transporte de fluido en la córnea. Por otro lado, algunos nucleótidos como 2-MeSATP, ATP-gamma-S y ATP aumentan la presión intraocular (IOP) causante del glaucoma y actúan sobre los receptores P2Y1 y P2Y2 presentes en las células de los cuerpos ciliares de conejo. También en D04 se menciona que los receptores P2Y2 están presentes en la red trabecular de la córnea, responsable del drenaje del humor acuoso y, por tanto, de la regulación de la presión intraocular.

D02 anticipa moléculas de RNA para su uso en el silenciamiento de genes, de modo que pueden ser utilizadas para disminuir o inhibir la cantidad producida de determinadas proteínas y/o moléculas de RNA. Entre los genes utilizados como diana se encuentra el gen del receptor P2Y2 (P2RY2, número de acceso: NM_002564) para el cual se proponen tres moléculas distintas de siRNA.

Puesto que la movilización de Ca^{2+} generada por los receptores P2Y2 es esencial para incrementar el flujo de HCO_3^- que, a su vez, aumenta el transporte de fluido en la córnea y, además, algunos nucleótidos como 2-MeSATP, ATP-gamma-S y ATP aumentan la presión intraocular (IOP) causante del glaucoma, y actúan sobre los receptores P2Y1 y P2Y2 presentes en las células de los cuerpos ciliares de conejo (D01), para un experto en la materia sería evidente el uso de siRNAs para silenciar la expresión del gen del receptor P2Y2 (D02) y, de este modo, lograr una disminución de la presión intraocular (IOP).

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-16 no presentan actividad inventiva.