



① Número de publicación: **2 374 344**

② Número de solicitud: 200950017

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/113 (2000.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 5/28 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **19.09.2007**

⑩ Prioridad: **21.09.2006 AR P060104146**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2012**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **16.02.2012**

⑦ Solicitante/s: **GEN-MED, S.A.**
Saladillo 2452, 1er. Piso - Depto. B
C1232AAY C.A. de Buenos Aires, AR

⑦ Inventor/es: **Álvarez-Roger, María Carolina;**
Balañá, María Eugenia;
Dugour, Andrea y
Kerner, Néstor

⑦ Agente: **Paz Espuche, Alberto**

⑤ Título: **Una composición farmacéutica o cosmética que comprende un oligonucleótido de RNA de doble cadena y uso del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el metabolismo de andrógenos.**

⑦ Resumen:

Una composición farmacéutica o cosmética que comprende un oligonucleótido de RNA de doble cadena y uso del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el metabolismo de andrógenos.

La presente invención se refiere a nuevos oligonucleótidos de ácido ribonucleico de doble cadena, los cuales poseen actividad antiandrogénica y en particular, a la utilización de los mismos en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el metabolismo de andrógenos. De preferencia, los oligonucleótidos pueden ser formulados con un soporte farmacéuticamente aceptable en composiciones farmacéuticas o cosméticas destinadas al tratamiento de enfermedades relacionadas con el metabolismo de andrógenos o para proveer un efecto beneficioso en la piel y/o el cabello.

ES 2 374 344 A1

DESCRIPCIÓN

Una composición farmacéutica o cosmética que comprende un oligonucleótido de RNA de doble cadena y uso del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el metabolismo de andrógenos.

Antecedentes de la invención

Hacia fines de la década de 1960, la manipulación del material genético de diversos organismos sentó las bases de lo que actualmente se denomina ingeniería genética. Mediante esta técnica, secuencias de **DNA** (ácido desoxirribonucleico por su sigla en inglés), provenientes de organismos totalmente diferentes (por ejemplo virus y bacterias), pudieron ser unidas en una sola molécula.

En 1970 se encontró que los retrovirus -virus con un genoma constituido por **RNA** (ácido ribonucleico)- eran capaces de incluir en su genoma secuencias génicas ajenas, quizás tomadas del material genético de la última célula que infectaron, para luego transportarlas a manera de vector al interior de una nueva célula receptora e integrarlas en el genoma de ésta. La así denominada "terapia génica" surgiría años más tarde de la observación de que las secuencias integradas podían ser tomadas como propias por la célula y expresadas como proteínas funcionales, lo cual dió la pauta para que se postulara que algunas enfermedades genéticas podrían ser tratadas mediante la sustitución o reparación del ADN deficiente y, en el caso de las infecciones, destruir los genes vitales de los agentes patógenos. La aplicación clínica de la terapia génica en seres humanos despertó grandes expectativas en la comunidad científica y médica. No obstante, el desaliento en el terreno de la clínica se presentó cuando los pacientes mostraron complicaciones posteriores al tratamiento. Al parecer, dichas complicaciones fueron consecuencia de la expresión de los genes insertados y al mismo tiempo de los genomas virales usados como vectores. Además, la inserción incorrecta de secuencias génicas en sitios de control del genoma del paciente provocó alteraciones a nivel molecular cuyas consecuencias fisiológicas fueron, en casi todos los casos fatales.

Los obstáculos encontrados en la aplicación de la terapia génica alentaron a los científicos a buscar nuevos tratamientos clínicos y, en general, la ciencia biomédica ha continuado la exploración de nuevas estrategias de manipulación genética. Es así que en años recientes, las investigaciones se han enfocado más que a sustituir a algún gen dañado, a tratar de inhibir su expresión. Esto significa, en última instancia, evitar que se lleve a cabo la síntesis de la proteína para la que ese gen dañado codifica.

Tras un arduo proceso de investigación se ha encontrado que en las células eucarióticas que son infectadas con algunos tipos de virus existe un mecanismo de regulación génica que controla la presencia de las moléculas de RNA virales potencialmente expresables. Dicho mecanismo, encontrado en plantas y hongos, constituyó un descubrimiento sorprendente ya que significaba un nuevo mecanismo de inmunidad antiviral desconocido hasta ese momento. Además de en plantas y en hongos, algunos componentes de este mecanismo fueron encontrados en células de animales invertebrados tales como gusanos planos, protozoarios como el ciliado *Paramecium*, la ameba *Dictyostelium discoideum* y en algunos tripanosomas. Es sabido que este tipo de organismos no posee la maquinaria necesaria para montar una respuesta inmune mediada por interferón y que es característica en infecciones virales en vertebrados. Quizá por esta razón los patógenos virales que infectan a los organismos invertebrados tienen la capacidad de duplicar su genoma en las células infectadas de manera relativamente fácil. Entonces, la pregunta obligada es ¿cómo responden los invertebrados a este tipo de infecciones? La respuesta está dada por el mismo mecanismo molecular empleado por las plantas y los hongos: el sistema de **RNA** de interferencia (**RNAi**). Este mecanismo es inducido por una molécula de **RNA** de doble cadena, tal vez generada por los intermediarios replicativos de los virus infectantes. Se ha propuesto que la interferencia por **RNAi** es un mecanismo evolutivamente conservado que mantiene la integridad genómica de los organismos eucariotas, controla la expresión de los genes y protege contra las infecciones virales exógenas.

Un avance importante se conoce en 1998, cuando un grupo de embriólogos del Instituto Carnegie de Washington estaba estudiando en *Caenorhabditis elegans* la interferencia que se produce en la expresión génica mediante la introducción de RNA antisentido en las células [Fire et al., *Nature* **391**:806-11(1998)]. Desde 1990, y gracias a estudios en las plantas, se conocía que la unión de moléculas antisentido de DNA o RNA al mRNA bloqueaba su traducción. Lo original del estudio del grupo del Carnegie consistió en introducir en las células RNA de doble cadena (es decir, sentido y antisentido hibridados). La sorpresa debió ser grande cuando comprobaron que el efecto de silenciamiento génico era mucho más potente que con RNA de cadena sencilla, contra lo que cabría esperar. Aún más sorprendente fue constatar que la estequiometría del proceso no coincidía con la idea de un simple bloqueo del mRNA por hibridación. Unas pocas moléculas de RNA de doble cadena bastaban para silenciar la expresión génica a pesar de la cantidad mucho mayor de mRNA existente en la célula. Es por ello que los investigadores apuntaron a la existencia de un mecanismo amplificador o catalítico de naturaleza desconocida.

Aunque el silenciamiento génico es diferente en los animales respecto al producido en hongos y plantas, el proceso y sus actores moleculares son esencialmente los mismos. La vía normal, fisiológica, de silenciamiento comienza cuando se expresa un **pre-miRNA** (*precursor micro-RNA*), una cadena sencilla que puede plegarse y formar una horquilla de doble cadena denominada **miRNA**. Otra posibilidad es la aparición de **RNA** de doble cadena que puede proceder de virus o transposones. En ambos casos, estas cadenas dobles de **RNA** son cortadas en pequeños fragmentos (19 a 24 nucleótidos) de doble cadena denominados **siRNAs** (*short interfering RNA*) por una endonucleasa denominada Dicer.

ES 2 374 344 A1

La caracterización de Dicer [Bernstein et al., *Nature* 409:363-6 (2001)] permitió identificarla como una RNAsaIII así como localizar en su estructura un dominio de unión a RNA de doble cadena.

Los siRNA se ligan con un complejo denominado RISC (RNA-induced silencing complex), activándolo y manifestando una actividad helicasa que separa las dos hebras y, de preferencia, utiliza una de las hebras de RNA como guía para degradar moléculas de RNA complementarias. El complejo ribonucleoproteico resultante se une al mRNA diana. Si la complementariedad no es perfecta, RISC queda asociado al mensajero y se atenúa la traducción. Pero si es perfecta, RISC actúa como una ribonucleasa (RNAsa), cortando al mensajero y quedando libre para repetir el proceso. Esto es lo que explica que un número pequeño de moléculas de siRNA puedan destruir un número mucho mayor de mRNA.

Hasta hace muy poco se pensaba que RISC era un complejo multiproteico de componentes desconocidos. Los análisis señalaban la familia de proteínas Argonauta, una familia muy conservada en todos los eucariotas, cuyos miembros se presentan en un número variable en cada especie. Era conocido que algunas mutaciones en los integrantes específicos de esta familia causaban defectos en procesos también específicos y en ocasiones muy interesantes. Es el caso de uno de los más conocidos representantes de las Argonautas, la proteína Piwi de *Drosophila*, fundamental para la generación de las señales moleculares que se generan en el nicho de las GSC (*germ-line stem cells*) [Lin y Spradling, *Development* 124:2463-76 (1997)]. En éste y en muchos de estos procesos se descubrió que la alteración se producía en procesos específicos de silenciamiento. Sin embargo, no se pudo determinar cuál era el papel real de las Argonautas en el proceso, hasta que en septiembre de 2004 la revista *Science* publicó la estructura tridimensional de un homólogo de Piwi [Joshua-Tor et al., *Science* 305:1434-7. (2004)]. Estos autores mostraron la homología estructural entre un dominio común de las Argonautas, el dominio Piwi, y un dominio de una RNAsa, la ribonucleasa H, concluyendo que los integrantes de la familia Argonauta eran precisamente los RISC, al menos en sus actividades más importantes, lo cual no descarta la posibilidad de que participen otros péptidos con funciones accesorias.

Las funciones fisiológicas conocidas que posee el sistema RNAi son muy variadas. Entre otras, el sistema funcionaría como un sistema de defensa contra virus, control de transposones o elementos génicos anómalos.

Por otro lado la formación de miRNA se ha revelado como un mecanismo importante en la regulación de la expresión génica endógena, y numerosos casos lo han puesto de manifiesto en diferentes organismos. Se sabe que en *Drosophila*, el silenciamiento se relaciona con mecanismos de regulación de la proliferación, muerte celular y el metabolismo de las grasas [Hay et al., *Curr. Biology* 13:790-795 (2003)]. Otros ejemplos serían el control de la asimetría neuronal izquierda/derecha en nemátodos [Johnston and Hobert., *Nature* 426:845-9 (2003)], la modulación de la diferenciación de la línea hematopoyética en mamíferos [Bartel et al., *Science* 303:83-6 (2004)], o el control del desarrollo de la hoja y la flor en plantas [Moussian et al., *EMBO J.* 17:1799-809.(1998)]. Aunque probablemente la interferencia participe en otros procesos en los que aún no ha sido descrita, hay que notar la estrecha relación que existe con los procesos de desarrollo y con los mecanismos de mantenimiento y diferenciación de las células madre, proceso que podría estar modulado de alguna forma por las proteínas Argonauta como sucede en *Drosophila*. Así, los ratones genosuprimidos (*knock-out*) para el gen *Dicer1* no pueden procesar los miRNA, mueren muy pronto y carecen de células madre. Por tanto el sistema RNAi se revela como esencial para el mantenimiento de la población de células madre embrionarias por medio de mecanismos aun no descritos totalmente [Bernstein et al. *Nat. Genet.* 35:215-217 (2003)].

La caracterización de Dicer [Bernstein et al., *Nature* 409:363-6 (2001)] permitió identificarla como una RNAsaIII así como localizar en su estructura un dominio de unión a RNA de de doble cadena.

El RNAi es una potente herramienta que está sufriendo un gran desarrollo con fines terapéuticos, debido principalmente a dos hechos: todas las células contienen la maquinaria para llevar a cabo el RNA de interferencia y todos los genes son dianas potenciales. Esta tecnología presenta ventajas frente a la investigación de otro tipo de terapias, incluyendo un desarrollo racional a partir del conocimiento de la diana terapéutica sobre la que se quiere actuar, una gran especificidad de acción y un reducido número de efectos secundarios.

En la actualidad se posee una idea general del mecanismo de RNAi en plantas y se conocen los mecanismos que los mamíferos (y otros organismos) han conservado a través de la evolución. En plantas, un aumento en la cantidad de RNA sobre un nivel umbral determinado -por ejemplo, un aumento generado por una infección viral o un transposón- es censado como anormal, activando una RNA polimerasa dependiente de RNA, la cual sintetiza una hebra complementaria al RNA en exceso, es decir, generando un RNA de doble hebra. Los procesos que le siguen son comunes en plantas y animales. Este RNA de doble hebra es también reconocido como extraño y es cortado en fragmentos de 21 a 23 nucleótidos (RNA pequeños interferentes de doble hebra o RNAi) los que tienen dos nucleótidos protuberantes en uno de los extremos de cada hebra. La energía necesaria para el procesamiento (hidrólisis) del RNA es suministrada por el ATP (el cual presumiblemente es requerido para desenrollar la doble hebra de RNA). Los siRNA de doble hebra son luego reconocidos por proteínas específicas formando un complejo proteína-RNA, el cual también requeriría de ATP. El complejo proteína-RNA "vigila" todos los RNAs producidos en la célula y, cuando encuentra alguno cuya secuencia es complementaria a una de las hebras del RNAi cataliza la destrucción del mRNA. Claramente, esta destrucción de los mRNAs produce la pérdida del mensaje imposibilitando la síntesis la proteína, lo que es equivalente a haber apagado el gen que la codifica.

Por otra parte, es conocido que los andrógenos median respuestas metabólicas diversas, a través del receptor de andrógenos (**RA**). El **RA** es un receptor nuclear de 110 kD, activado por ligandos específicos. La expresión del **RA**, la cual ocurre en una variedad de tejidos, puede ser activada tanto por la testosterona como por la dehidrotestosterona, las cuales se unen al receptor con diferentes afinidades. Un análisis estructural del **RA** indica que este es un miembro de una superfamilia de receptores de esteroides, la cual incluye al receptor de hormonas tiroideas, al receptor de vitamina D y el receptor de retinoides.

El **RA** se expresa en altos niveles en diferentes tipos de células reproductivas, jugando un rol importante en el desarrollo y mantenimiento de las funciones sexuales. También se expresa en tejidos no involucrados en la reproducción, regulando una serie de enzimas y proteínas. Asimismo, se ha postulado que una regulación anormal del gen del **RA** es causal significativa de diversos desórdenes hormonales.

Los compuestos que bloquean la síntesis o la acción de los andrógenos podrían tener un papel beneficioso en procesos en los que la acción androgénica tiene un importante papel: hiperplasia y carcinoma de próstata, acné, calvicie, síndromes virilizantes en mujeres, pubertad precoz y disminución de la libido en individuos con alteración de la conducta sexual.

Los inventores de la presente han sintetizado nuevos **RNAi** de doble cadena los cuales se unen de manera específica al **RA** y presentan actividad antiandrogénica.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un oligonucleótido de RNA de doble cadena seleccionado del grupo que consiste en IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4, IRA-5, IRA-6 y IRA-7 los cuales presentan actividad antiandrogénica. En particular, los oligonucleótidos IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4 son inhibidores que presentan una actividad antiandrogénica alta, mientras que los oligonucleótidos IRA-5, IRA-6 y IRA-7 son inhibidores que presentan una actividad antiandrogénica moderada.

En una realización particular, el oligonucleótido de RNA de doble cadena de la invención se encuentra formulado en una composición farmacéutica o en una composición cosmética. Donde dicha composición comprende al menos dicho oligonucleótido de la invención en una cantidad efectiva como para que cuando se la administra a un individuo que necesite de dicho tratamiento, bloquee el receptor de andrógenos. De preferencia, la composición está destinada a ser administrada por vía tópica, aunque también se contemplan dentro del alcance de la invención composiciones destinadas a ser administradas por vía transdermal u oral.

Es otro de los objetos de la invención, el uso de un oligonucleótido de RNA de doble cadena, seleccionado entre los oligonucleótidos IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4, IRA-5, IRA-6 y IRA-7, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el metabolismo de andrógenos. Es otro de los objetos de la invención el uso de un oligonucleótido de RNA de doble cadena, seleccionado entre los oligonucleótidos IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4, IRA-5, IRA-6 y IRA-7, en la preparación de una composición cosmética y en el tratamiento de la pérdida del cabello y para proveer un efecto beneficioso sobre la piel.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Se describe la estructura de los oligonucleótidos IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4, IRA-5, IRA-6 y IRA-7, de la invención.

Figuras 2A, 2B y 2C. Se describe un ensayo realizado con los oligonucleótidos IRA-1, IRA-2, IRA-3 y IRA-4 de acuerdo con la invención. Se observa una caída en la expresión de un gen reportero bajo el control de un promotor respondedor de andrógenos a niveles inferiores al 10% de expresión residual (inhibición superior al 90%).

Figura 2A b): Representa la inhibición de la expresión de RA por IRA-4. Ensayo Biológico.

La línea celular PC3AR se transfectó transcientemente con 0.05 ug de pARE-luc y 0.05 ug de pSport β gal según protocolo LipofecAMINE 2000 en p. 96 wells. A las 24 hs se estimuló con mibolerone (mib) 10 nM. A las 48 hs. post transfección se midió actividad luciferasa y β galactosidasa (normalización de datos). El control es un siRNA cuya secuencia no es homologa al RA. Cada punto se realizo por triplicado representándose la media y el desvío standard.

Figura 2B c): Representa la inhibición de la expresión de RA por el IRA-1 y el IRA 4. Detección por western blot.

Células PC3ARII fueron tratadas con 10 nM de IRA-1 o bien IRA-4. Luego de 24 hs. se realizó un extracto proteico de las células tratadas, se cuantificó y se corrieron 50 ug en un gel de poliacrilamida. Posteriormente se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se trató con 0.4 mg/ml de un anticuerpo primario monoclonal contra el RA y otro contra la actina (control de carga). La flecha indica la posición de la actina.

Se revelo por quimioluminiscencia.

ES 2 374 344 A1

Figura 2C d): Representa la inhibición de la expresión de RA por IRA-1, IRA-2, IRA-3. Ensayo Biológico.

La línea celular PC3AR se transfectó transcientemente con 0.05 ug de pAREluc y 0.05 ug de pSportBETAgal según protocolo LipofecAMINE 2000 en placas de 96 pozos. A las 24 hs se estimuló con DHT 10 nM. A las 48 hs. post transfección se midió actividad luciferasa y BETAgalactosidasa (normalización de datos). El control es un siRNA C cuya secuencia no es homologa al RA. Cada punto se realizó por triplicado representándose la media y el desvío standard.

Figura 3. Se describe un ensayo realizado con los oligonucleótidos IRA-5, IRA-6 y IRA-7 de acuerdo con la invención. Se observa una caída en la expresión de un gen reportero bajo el control de un promotor respondedor de andrógenos a niveles cercanos al 50% de expresión residual (inhibición de alrededor del 50%).

Oligonucleótidos RNAi de moderada capacidad antiandrogénica (IRA-Grupo 2).

Inhibición de la expresión de RA por IRA-5, IRA-6 E e IRA-7. Ensayo Biológico.

La línea celular PC3AR se transfectó transcientemente con 0.05 ug de pAREluc y 0.05 ug de pSport β gal según protocolo LipofecAMINE 2000 en placas de 96 pozos. A las 24 hs se estimuló con DHT 10 nM. A las 48 hs. post transfección se midió actividad de luciferasa y β galactosidasa (normalización de datos). El control es un siRNA cuya secuencia no es homologa al RA. Cada punto se realizó por triplicado representándose la media y el desvío standard.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un oligonucleótido de RNA de doble cadena seleccionado del grupo que consiste en los oligonucleótidos IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4, IRA-5, IRA-6 y IRA-7. Se trata de ribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster o modificaciones de dichos enlaces. Asimismo comprende las estructuras químicas derivadas de las bases nitrogenadas así como de las ribosas que lo conforman incluyendo modificaciones internas como 2' -O- alquilo, tiolaciones, alquilaciones en bloque a todo lo largo de la secuencia, así como en bases alternadas. Por otra parte, las estructuras químicas de los RNA de doble cadena IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4, IRA-5, IRA-6 y IRA-7 no deben necesariamente contener los dobles de nucleótidos de uracilo salientes a 3' de cada extremo de las cadenas sentido y antisentido, ni otros nucleótidos en dicha posición, tales como nucleótidos de timidina u otros.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 374 344 A1

Los oligonucleótidos IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4, IRA-5, IRA-6 y IRA-7 se describen a continuación:

Nombre del RNAi	Secuencia	SEQ ID NO
IRA-1	5' ggcgauccuucaccaauguuu 3'(sentido)	1
	3' uuccgcuaggaagugguuaca 5' (antisentido)	2
IRA-2	5' ggauggggcucaugguguu 3'(sentido)	3
	3' uuccuaccccgaguaccac 5'(antisentido)	4
IRA-3	5' cugaucugguuucaaugauu 3'(sentido)	5
	3' uugacuagaccaaaguacu 5'(antisentido)	6
IRA-4	5' cgccagcagaaaugauugcuu 3'(sentido)	7
	3' uugcggucgucuuuacuaacg 5'(antisentido)	8
IRA-5	5' cuucacagccgaagaaggcuu 3'(sentido)	9
	3' uugaagugucggcuucuuccg 5'(antisentido)	10
IRA-6	5' accguguggugguggugguu 3'(sentido)	11
	3' uuuggcacaccaccacccc 5'(antisentido)	12
IRA-7	5' uggcacacucucuucacaguu 3' (sentido)	13
	3' uuaccgugucagagaaguguc 5'(antisentido)	14

Dentro del alcance de la invención se encuentran comprendidos también las diversas variantes, miméticos y derivados, así como aquellas moléculas que compartan al menos 10 nucleótidos de los oligonucleótidos IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4, IRA-5, IRA-6, IRA-7 revelados más arriba.

En particular, de manera sorprendente, se ha detectado que los oligonucleótidos de la invención pueden inhibir la expresión del receptor de andrógenos (RA) según un determinado nivel de capacidad. En particular, los oligonucleótidos IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4 son inhibidores que presentan una actividad antiandrogénica alta, mientras que los oligonucleótidos IRA-5, IRA-6 y IRA-7 son inhibidores que presentan una actividad antiandrogénica moderada. De acuerdo con la presente invención, se entiende por "actividad antiandrogénica alta" aquella actividad que permite alcanzar una disminución en la expresión androgénica de por lo menos alrededor de un 80%, y por "actividad antiandrogénica moderada" aquella actividad que permite alcanzar una disminución en la expresión androgénica de alrededor de un 50%.

Esta capacidad farmacológica diferencial resulta particularmente útil en el tratamiento de patologías ligadas al metabolismo de andrógenos según las necesidades terapéuticas. Por ejemplo, una alta capacidad inhibitoria podría ser requerida en el tratamiento de patologías severas tales como, por ejemplo, las oncológicas. Por otro lado, una actividad antiandrogénica moderada podría ser deseable en los tratamientos dermo-cosmetológicos.

5 El diseño de los oligonucleótidos de la invención se basó en el criterio de apuntar las moléculas de pequeños RNAi dirigidas a determinadas zonas de la estructura terciaria del mRNA del receptor de andrógenos (RA). Sorprendentemente, las moléculas así diseñadas han demostrado tener un determinado grado de capacidad inhibitoria de la expresión del RA. Esto ha permitido generar dos diferentes grupos de inhibidores que pueden resultar útiles en función
10 del grado de actividad farmacológica que se quiera obtener. En particular, el primer grupo es de alto poder inhibitorio, tal como puede apreciarse en los ensayos farmacológicos en modelo de células en cultivo.

En una realización particular de la invención, los oligonucleótidos de RNA doble cadena pueden ser formulados en una composición cosmética o farmacéutica, para producir un efecto beneficioso en la piel o cabellos. De preferencia,
15 la composición comprende al menos un oligonucleótido, en una cantidad efectiva como para que cuando se la administre a un individuo que necesite de dicho tratamiento, bloquee total o parcialmente el receptor de andrógenos. De preferencia dicha cantidad efectiva esté comprendida entre 0,005% y 35% p/p o p/v. De manera particular, la composición puede comprender además otros principios activos usuales tales como minoxidil, de preferencia en una cantidad comprendida entre 1% y 20% p/p o p/v. En una realización particular, la composición de la invención también puede
20 comprender al menos un oligonucleótido en combinación con otras sustancias terapéuticamente activas, tales como por ejemplo finasteride, y/o sustancias cosméticas que pueden brindar un efecto terapéutico o cosmético beneficioso.

La composición puede ser administrada por vía sistémica, aunque se prefiere la vía tópica, oral o transdermal. Dentro de las diferentes realizaciones, se contempla que la composición tópica o transdermal de la invención pueda
25 administrarse tópicamente y que se encuentre en forma de solución acuosa u oleosa, una emulsión, un gel, una crema, una loción, una pasta, un unguento, un aerosol o un parche oclusivo, etc. De acuerdo con la forma galénica en que se encuentre, la composición puede comprender además soportes seleccionados entre componentes oleosos y componentes hidrosolubles, como por ejemplo cera autoemulsionable, vaselina, miristato de isopropilo y alcohol cetílico, glicerina, metilparabeno y propilparabeno, agentes beneficiosos para la piel, y agentes antioxidantes cosméticamente
30 y/o farmacéuticamente aceptables. Esta forma galénica, en una opción favorita de la presente invención, comprende dicho oligonucleótido de RNA de doble cadena en una cantidad efectiva como para que cuando se la administra a un individuo que necesite de dicho tratamiento, bloquee el receptor de andrógenos.

Asimismo, la composición tópica o transdermal de la invención podría contener además agentes beneficiosos para
35 la piel como por ejemplo humectantes, hidratantes, aminoácidos, oligoelementos y vitaminas, los cuales son conocidos y pueden ser elegidos por el experto en la técnica. De ser necesario, la composición de la invención puede comprender además antioxidantes cosmética y/o farmacéuticamente aceptables.

También, la composición de la invención podría contener además agentes beneficiosos para una mejor absorción
40 cutánea como por ejemplo los promotores de permeación o absorción d-ácido oleico, alcohol oleílico, alcohol etílico, limoneno, terpenos, saponinas, mentol, y propilenglicol, los cuales son conocidos y pueden ser elegidos por el experto en la técnica. Asimismo la composición de la invención podría contener ingredientes técnicamente útiles para mejorar la absorción, como por ejemplo nanosomas, niosomas y ciclodextrinas, los cuales son conocidos y pueden ser elegidos por el experto en la técnica. En una realización de la invención, la composición de la invención también
45 puede ser vehiculizada en vectores coloidales, particulados, biopolímeros. Más precisamente en ácido poliláctico-poliglicólico, poliisobutilcianoacrilato, polialginatos o derivados. También pueden ser vehiculizados mediante liposomas neutros, aniónicos o catiónicos, sensibles al pH o elásticos. Además, en una realización preferida de la invención, dicho oligonucleótido de RNA de doble cadena de la invención se encuentra encapsulado en el núcleo o en la pared de microesferas, nanoesferas, oleosomas, niosomas, liposomas o nanocápsulas.

50 Por otra parte, dentro del alcance de la invención se provee un método para el tratamiento de la pérdida del cabello que comprenda la aplicación de una composición farmacéutica o cosmética que comprenda al menos uno de los oligonucleótidos de la invención. La dosis de administración podrá ser determinada por el profesional médico de acuerdo a la manifestación que produzca el exceso de andrógenos en el paciente. Como es bien conocido en medicina,
55 la dosis a aplicarse en un paciente puede depender de muchos factores como por ejemplo el peso, edad, sexo, el oligonucleótido a ser administrado, tiempo y ruta de administración, salud general y las otras drogas que pueden ser administradas concomitantemente.

Los oligonucleótidos de la invención pueden ser químicamente sintetizados según los procedimientos establecidos.
60 En pocas líneas, la síntesis puede realizarse mediante la química de la fosoramidita y el uso de t-butildimetilsilil (TBDMS) como grupo protector. Es un procedimiento similar al de la síntesis de ADN, salvo por el hecho de necesitar un grupo protector adicional en la posición del hidroxilo 2' de la ribosa. También puede emplearse como estrategia de protección de la posición 2' de la ribosa la estrategia química de la 2'-O-triisopropilsililoximetil (TOM) o bien de la 2-O-bis (2-acetoxietoxi)metil (ACE). Esta estrategia se combina con una serie de grupos protectores de bases.

65 A continuación se presentan algunos ejemplos de realización de la presente invención, como así también evidencias *in vitro* respecto de la actividad antiandrogénica de los oligonucleótidos de la invención.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

5 1) *Generación de una línea celular PC3 que expresa constitutivamente el ADNc del receptor de andrógenos (RA)*

a) *Subclonado del ADNc del receptor de andrógenos (AR) en el vector pCIneo*

10 El ADNc del RA fue insertado en el vector p5HBhAR. El ADNc del AR de 3100 bp fue subclonado en el vector de expresión pCIneo (*Promega Corp., Madison, WI, USA*) el cual presenta resistencia a la neomicina (G-418). El p5HBhAR fue digerido con XbaI y parcialmente con EcoRI para ser subclonado en el vector pCIneo (pCIneoAR).

15 Para verificar la correcta inserción del ADNc correspondiente en el plásmido pCIneo, se realizaron mapeos de restricción y secuenciación parcial.

b) *Cultivo de células PC3*

20 PC3 (ATCC® Number CRL-1435™) es una línea celular proveniente de un cultivo primario de células epiteliales de próstata provenientes de un paciente con adenocarcinoma de próstata grado IV [22363: *Kaighn ME, et al. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). Invest. Urol. 17: 16-23, 1979. PubMed: 447482*]. Las células de la línea arriba mencionada, se cultivaron de DMEM: F12 suplementado con 10% de SFB y 50 µg/mL gentamicina, en estufa a 37°C con atmósfera de 5% CO₂.

c) *Transfección y selección de una línea estable*

25 Se sembraron las células PC3 en placas de 10 cm² de superficie, un día antes de la transfección, en una densidad tal como para obtener una confluencia de alrededor del 50% el día de la transfección. Se utilizó medio DMEM: F12 suplementado con 10% suero fetal bovino y 50 µg/mL de gentamicina, en estufa a 37°C con atmósfera de 5% CO₂.

30 Se incubaron 2 µg del plásmido pCIneoAR en un pozo de placa de 48 pozos con 100 µL de medio DMEM. Paralelamente en otro pozo, se colocaron 5 µL de Lipofectina y 100 µL de medio DMEM y se incubó durante 45 minutos. Se combinó el contenido de cada pozo, se agitó suavemente y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 1,8 mL de medio DMEM al pozo con la mezcla Lipofectina-ADN, se agitó suavemente y se agregó a la placa con las células previamente lavadas con DMEM sin suero ni antibiótico.

35 Se incubó durante 6 horas en estufa. Posteriormente se retiró el medio y se agregó DMEM: F12 con 10% de suero fetal bovino (libre de antibiótico) y se mantuvo durante 48 horas. Pasado este tiempo, las células se encontraban confluyentes. Se despegaron con tripsina y se transfirieron a otras placas del mismo tamaño con i diluciones 1:10 y 1:20 con medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino y 400 µg/mL G418 (medio de selección).

d) *Selección de clones*

40 Aproximadamente a los 10 días de la transfección se comenzaron a visualizar los clones resistentes. Con cilindros plásticos de 5 mm de diámetro con grasa de vacío aplicada en sus bases se selló la zona del clon para poder aislarlo, despegarlo con tripsina y transferirlo a un pocillo individual.

A medida que los clones se fueron aislando, se transfirieron en placa de 12 pozos con medio de selección con 20% de suero fetal bovino.

50 Los clones se mantuvieron en estas condiciones hasta que su densidad permitió expandirlos en placas de 6 pozos. El medio se mantuvo con 400 µg/mL de G418 durante aproximadamente cinco pasajes (un mes). Después de esto, se redujo la cantidad del antibiótico (200 µg/mL) por un período similar y finalmente se reemplazó por gentamicina 50 g/mL.

Ejemplo 2

Detección de la proteína RA mediante la técnica de western blot

60 Se sembraron cerca de 1 millón de células de cada clon a estudiar en placa de 100 mm de diámetro. Se incubaron hasta subconfluencia, se lavaron con PBS 1x y finalmente se desprendieron de la placa. Se centrifugó y resuspendió en 70 µL de buffer de extracción de proteínas totales (125 mM Tris-HCl pH 8,0, 2% SDS, 5% Tritón X-100, 2 mM PMSF). Se determinó la concentración de proteínas totales por la técnica de Lowry [*Lowry et al., 1951*].

65 Se sembraron 200 µg de estas muestras, que se separaron electroforéticamente en SDS-Page 8% (acrilamida-bisacrilamida, 29:1) con buffer SDS-Page 0,5x, durante 70 minutos a 200 voltios. Se empleó un marcador de peso molecular precoloreado (*Rainbow™*).

ES 2 374 344 A1

Las muestras fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (*HybondTM*), en buffer de transferencia durante 45 minutos a 300 mA. Se corroboró la transferencia por medio de la tinción momentánea de la membrana con rojo Ponceau, y luego se incubó con una solución bloqueante de leche descremada en polvo 5% en PBS-Tween 20 durante toda la noche a 4°C.

5 Para la detección del RA se utilizó un anticuerpo policlonal primario preparado en conejos dirigido a la zona N-terminal de la proteína (*rabbit polyclonal AR N-20 sc-816, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA*). Se prepararon 5 mL de la dilución 1:500 del anticuerpo en PBS-Tween 20. Se puso en contacto la membrana con el anticuerpo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno, con PBS-Tween 20 durante 10 minutos y se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (*Amersham*) en una dilución 1:1000 (5 mL) en PBS-Tween 20 y se incubó durante 1 hora. Posteriormente se hicieron dos lavados de 10 minutos con PBS-Tween 20 y uno con PBS 1x.

15 La membrana fue revelada por quimioluminiscencia (*Hybond ECLTM, Amersham*). Se utilizaron placas de autoradiografía de alta sensibilidad (*Hyperfilm ECLTM, Amersham*).

Ejemplo 3

20 *Ensayo de inhibición por oligonucleótidos ira (RNAi) utilizando como gen reportero la luciferasa*

a) Se sembraron células PC3ARII en placas de 96 pozos a 80% de confluencia 6 hs. antes de la transfección. Las células fueron crecidas en DMEM:F12 suplementado con 10% SFB y gentamicina a 37°C y 5% CO₂.

25 Inmediatamente antes de la transfección las células fueron lavadas con PBS y suplementadas con medio fresco libre de suero y antibióticos. Posteriormente fueron transcientemente transfectadas con 0.05 ug de pCMVSPORTBgal (*Life Technologies, Inc. Gaithersburg, USA*), 0.05 ug de pARELuc y 2.5 pmol de RNAi 2 uM (*Ambion, Austin, USA*) según protocolo co-transfección siARN y plásmidos ADN de LipofectAMINE 2000 (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA*). Luego de 24 hs. el medio de las células fue reemplazado por 200 ul de DMEN suplementado con 2.5% de SFB y 20 nM de DHT. Las células fueron estimuladas con DHT durante 24 hs y posteriormente lavadas con PBS 1X y lisadas según el protocolo del kit: Luciferasa Assay System (*Promega, Madison, USA*). Un porcentaje de dicho lisado fue utilizado para medir actividad de luciferasa y otro para medir actividad de B galactosidasa (normalización de datos). La actividad de luciferasa fue medida utilizando un luminómetro marca *Berthold modelo FB 14*.

35 b) *Ensayo Beta galactosidasa*

La actividad de β galactosidasa fue medida en un lector de Elisa a 420 nm. Luego de una incubación de 4 hs. Mezcla de reacción:

40 10 ul de lisado celular,

500 ul buffer PM2.

0.35 ul de B mercaptoetanol

45 40 ul de agua.

Buffer PM2:

50 Na₂HPO₄·12H₂O 60 mM

NaH₂PO₄ 23 mM

55 KCl 10 mM

MgSO₄·H₂O 1 mM

60 Ejemplo 4

Realización de formulaciones cosméticas o farmacéuticas

65 Los oligonucleótidos IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4, IRA-5, IRA-6 y IRA-7 pueden asociarse en formulaciones cosméticas de aplicación tópica con retinol (vitamina A) o sus derivados, tales como por ejemplo el ácido retinoico, para el tratamiento del envejecimiento de la piel o fotoenvejecimiento. Asimismo, pueden asociarse a principios activos orientados a la hidratación de la piel tales como ácidos grasos de cadena mediana o larga, sus amidas derivadas, hidroximetil celulosa, hidroxietil urea o dimeticona. En formulaciones cosméticas para aplicación capilar, los oligo-

ES 2 374 344 A1

nucleótidos IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4, IRA-5, IRA-6 y IRA-7 pueden asociarse a minoxidil o a péptido activo 1 de cobre. En formulaciones farmacéuticas indicadas para el tratamiento de acné los oligonucleótidos de la presente invención pueden asociarse a antiinflamatorios, tales como betametasona, a antibióticos, tales como eritromicina, o a una combinación de estos.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

i) *Gel para tratamiento facial*

Activos: IRA 0,1%-0,5%, Péptido activo 1 de cobre 0,05%.

Excipientes y conservadores: Agua, glicerina 5%, carbómero 3%, alcohol bencílico 0,3%, cloruro de sodio 0,6%.

ii) *Emulsión para rostro y cuerpo*

Activos: IRA 0,1%, Escualano 5%, Dimeticona PEG 0,5%.

Excipientes y conservadores: Agua, ciclometicona 6%, Propilenglicol 5%, (Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno) 0,6%.

iii) *Crema para acné*

Activos: IRA 0,5%, eritromicina 3%, peróxido de benzoilo 5%.

Excipientes y conservadores: Agua, octilmetoxicinamato 5%, propilenglicol 5%, ciclometicona 5%, (fenoxietanol, isopropilparabeno, isobutilparabeno y butilparabeno) 1%, EDTA 0,1%

iv) *Loción capilar*

Activos: IRA 0,1%-0,5%, Minoxidil 5%, Dimeticona 0,5%, extractos vegetales de aloe vera 0,1%.

Excipientes y conservadores: Agua, alcohol cetílico 0,3%, glicerina 5%, lanolina 2%, dicaprilil maleato 0,5%, hidroxietilcelulosa 5%, cloruro de benzalconio 0,01%, (metilparabeno, propilparabeno, etilparabeno) 0,8%, EDTA 0,1%.

REIVINDICACIONES

1. Una composición cosmética, **caracterizada** porque comprende al menos un oligonucleótido de ARN doble cadena seleccionado del grupo consistente en IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4, IRA-5, IRA-6 y IRA-7, en donde dicho oligonucleótido de ARN doble cadena inhibe la expresión del receptor de andrógenos; y vehículos; donde:

Nombre del RNAi	Secuencia	SEQ ID NO
IRA-1	5' ggcgauccuucaccauguuu 3'(sentido)	1
	3' uuccgcuaggaagugguuaca 5' (antisentido)	2
IRA-2	5' ggaugggggcucauggguguu 3'(sentido)	3
	3' uuccuaccccgaguaccac 5'(antisentido)	4
IRA-3	5' cugaucugguuuucaaugauu 3'(sentido)	5
	3' uugacuagaccaaaguuuacu 5'(antisentido)	6
IRA-4	5' cgccagcagaaaugauugcuu 3'(sentido)	7
	3' uugcggucgucuuuacuaacg 5'(antisentido)	8
IRA-5	5' cuucacagccgaagaaggcuu 3'(sentido)	9
	3' uugaagugucggcuucuuccg 5'(antisentido)	10
IRA-6	5' accguguggugguggugguu 3'(sentido)	11
	3' uuuggcacaccaccaccacc 5'(antisentido)	12
IRA-7	5' uggcacacucucucacaguu 3' (sentido)	13
	3' uuaccgugucagagaaguguc 5'(antisentido)	14

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada** porque al menos un oligonucleótido de ARN doble cadena es seleccionado del grupo comprendido por IRA-5, IRA-6 y IRA-7.

3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada** porque dicha composición se encuentra en la forma seleccionada del grupo comprendido por gel, emulsión, crema, pasta, pomada, aerosol, parches y loción.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada** porque dichos vehículos son seleccionados del grupo comprendido por medios oleosos, acuosos, hidrosolubles, promotores de la absorción, mejoradores de la absorción y mezclas de los mismos.

5. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada** porque dichos vehículos son seleccionados del grupo comprendido por liposomas, partículas, coloides y polímeros.

6. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada** porque el oligonucleótido de ARN doble cadena se une al ARNm del receptor de andrógenos.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada** porque comprende una cantidad de oligonucleótido de ARN doble cadena entre 0,005% y 35% p/p.

8. El uso de la composición de la reivindicación 2 para la elaboración de una composición cosmética que disminuye la caída del cabello.

9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la composición cosmética es de aplicación tópica.

10. Una composición farmacéutica, **caracterizada** porque comprende al menos un oligonucleótido de ARN doble cadena seleccionado del grupo consistente en IRA-1, IRA-2, IRA-3, IRA-4, en donde dicho oligonucleótido de ARN doble cadena inhibe la expresión del receptor de andrógenos; y excipientes.

ES 2 374 344 A1

11. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada** porque se encuentra en la forma seleccionada del grupo comprendido por gel, emulsión, crema, pasta, pomada, aerosol, parches, solución, sólida y loción.

5 12. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada** porque el oligonucleótido de ARN doble cadena se une al ARNm del receptor de andrógenos.

13. El uso de la composición de la reivindicación 10 para preparar un medicamento para el tratamiento de individuos que padecen desórdenes en el metabolismo de andrógenos.

10 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13 en donde la administración de la composición es seleccionada del grupo comprendido por tópica, oral, sublingual, transdermal y endovenosa.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Nombre del RNAi	Secuencia	SEQ ID NO
IRA-1	5' ggcgauccuucaccaauguuu 3'(sentido) 3' uuccgcuaggaagugguuaca 5' (antisentido)	1 2
IRA-2	5' ggauggggcucaugguguu 3'(sentido) 3' uuccuaccccgaguaccac 5'(antisentido)	3 4
IRA-3	5' cugaucugguuuucaaugauu 3'(sentido) 3' uugacuagaccaaaguacu 5'(antisentido)	5 6
IRA-4	5' cgccagcagaaaugauugcuu 3'(sentido) 3' uugcggucgucuuuacuaacg 5'(antisentido)	7 8
IRA-5	5' cuucacagccgaagaaggcuu 3'(sentido) 3' uugaagugucggcuucuuccg 5'(antisentido)	9 10
IRA-6	5' accgugugguggugguguu 3'(sentido) 3' uuuggcacaccaccaccacc 5'(antisentido)	11 12
IRA-7	5' uggcacacucucuucacaguu 3' (sentido) 3' uuaccgugucagagaaguguc 5'(antisentido)	13 14

FIGURA 1

FIGURA 2A

Oligonucleótidos RNAi de alta capacidad antiandrogénica (IRA-Grupo 1)

RNAi antiandrogénico	% de inhibición de la expresión del RA
IRA-1	97.08± 2.18
IRA-2	94.00±4.38
IRA-3	94.07± 2.31
IRA-4	94.06±4.36

Actividad luciferasa

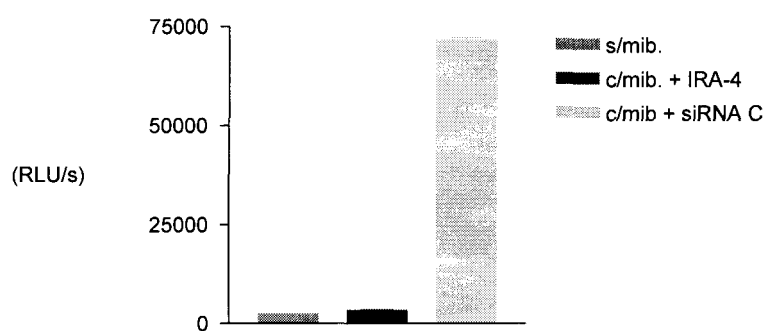


FIGURA 2B

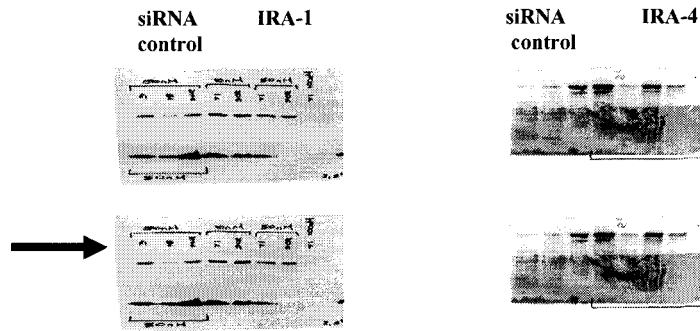


FIGURA 2C

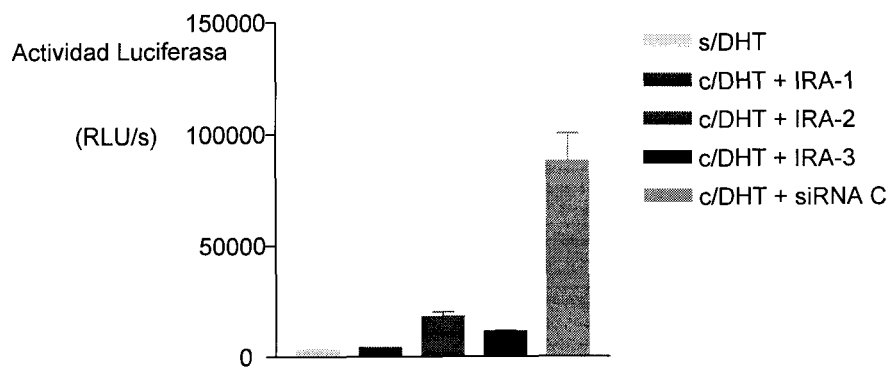


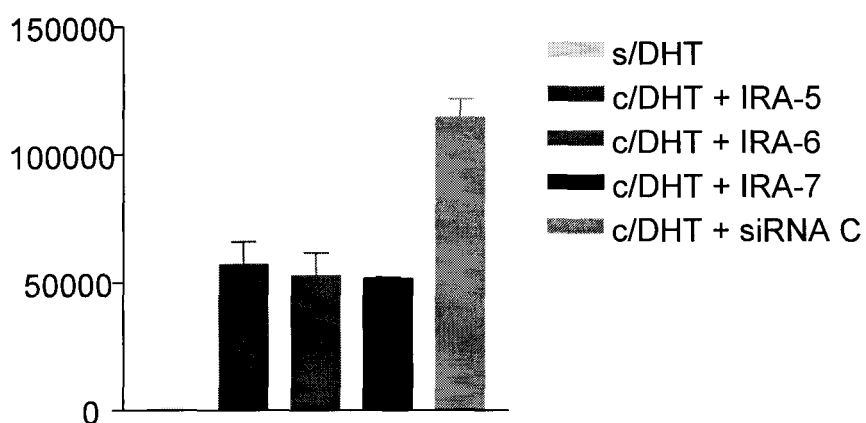
FIGURA 2D

FIGURA 3

**Oligonucleótidos RNAi de moderada capacidad antiandrogénica
(IRA-Grupo 2)**

RNAi antinadrógeno	% de inhibición de la expresión del RA
IRA-5	50.93± 0.85
IRA-6	64.64 ± 15.07
IRA-7	48.4±9.19

Actividad Luciferasa
(RLU/s)



ES 2 374 344 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Pablo Cassará do Brasil, comercio de medicamentos Ltda;
KERNER, Néstor; DUGOUR, Andrea; BALAÑÁ, María Eugenia; ÁLVAREZ-ROGER, María Carolina
- 10 <120> UN OLIGONUCLEÓTIDO DE RNA DE DOBLE CADENA UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA O
COSMÉTICA QUE LO COMPRENDE Y USO DEL MISMO EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICA-
MENTO PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL METABOLISMO
DE ANDRÓGENOS
- <130>
- 15 <140> PCT/IB2007/053786
- <141> 2007-09-19
- 20 <150> ARP060104146
- <151> 2006-09-12
- <160> 14
- 25 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 30 <211> 21
- <212> RNA
- <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
- <223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido
- 40 <400> 1
- ggcgauccuu caccaauguu u 21
- 45 <210> 2
- <211> 21
- <212> RNA
- <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
- <223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido
- 55 <400> 2
- acaugguga aggaucgccu u 21
- 60 <210> 3
- <211> 19
- <212> RNA
- 65 <213> Secuencia Artificial
- <220>

ES 2 374 344 A1

	<223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido	
	<400> 3	
5	ggau gggg gc caugguguu	19
	<210> 4	
10	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido	
	<400> 4	
20	caccaugagc cccauccuu	19
	<210> 5	
25	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido	
35	<400> 5	
	cugaucuggu uuucaaugau u	21
	<210> 6	
40	<211> 21	
	<212> RNA	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido	
50	<400> 6	
	ucaaugaaaa ccagaucagu u	21
55	<210> 7	
	<211> 21	
60	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
65	<223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido	

ES 2 374 344 A1

	<400> 7	
	cgccagcaga aaugauugcu u	21
5		
	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> RNA	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido	
	<400> 8	
20	gcaaucuuu cugcuggcgu u	21
	<210> 9	
	<211> 21	
25	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido	
	<400> 9	
35	cuucacagcc gaagaaggcu u	21
	<210> 10	
40	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido	
	<400> 10	
50	gccuucuucg gcugugaagu u	21
	<210> 11	
55	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido	
	<400> 11	
65	accguguggu gguggugggu u	21

ES 2 374 344 A1

<210> 12
<211> 21
<212> RNA
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido
10
<400> 12
cccaccacca ccacacgguu u 21

15
<210> 13
<211> 21
<212> RNA
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido
<400> 13
30 uggcacacuc ucuucacagu u 21

<210> 14
<211> 21
35 <212> RNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
40 <223> oligonucleótido sintético con actividad antiandrogénica - hebra sentido
<400> 14
45 cugugaagag acugugccau u 21

50
55
60
65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200950017

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.09.2007

③② Fecha de prioridad: **21-09-2006**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 1518928 A1 (FUNDACIÓN PABLO CASSARA) 30.03.2005, todo el documento.	1-14
X	BALAÑÁ M. E. et al. Antiandrogen oligonucleotides: active principles in hair- and skin-derived culture cells. Journal of Drugs in Dermatology. 2004, Vol. 3, Nº 3, páginas 287-294, todo el documento.	1-14
X	WO 2004063331 A2 (GENCIA CORPORATION) 29.07.2004, páginas 1-27; reivindicaciones 1-18; tabla 3.	1-14
X	US 20050215497 A1 (HAREL-BELLAN et al.) 29.09.2005, ejemplo 4, página 7; reivindicaciones 37-89; secuencias 19,20.	1-14
X	WO 2005062760 A2 (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 14.07.2005, páginas 1-141; secuencias 9-11.	1-14
X	EDER I. E. et al. Inhibition of LNCaP prostate tumor growth <i>in vivo</i> by an antisense oligonucleotide directed against the human androgen receptor. Cancer Gene Therapy. 2002, Vol. 9, páginas 117-125, todo el documento.	1-14

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
01.02.2012

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/113 (2010.01)

A61K31/713 (2006.01)

A61P5/28 (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, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, STN

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.02.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 10-14	SI
	Reivindicaciones 1-9	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	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 se publica.

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	EP 1518928 A1	30.03.2005
D02	BALANÁ M. E. et al. Journal of Drugs in Dermatology. Vol. 3, Nº 3, páginas 287-294	2004
D03	WO 2004063331 A2	29.07.2004
D04	US 20050215497 A1	29.09.2005
D05	WO 2005062760 A2	14.07.2005
D06	EDER I. E. et al. Cancer Gene Therapy. 2002, Vol. 9, páginas 117-125	2002

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 composición farmacéutica que comprende, al menos, un ARN de doble cadena seleccionado del grupo consistente en IRA-1, IRA-2, IRA-3 y IRA-4 y su uso para preparar un medicamento para el tratamiento de desórdenes en el metabolismo de andrógenos, así como una composición que comprende, al menos, un ARN de doble cadena seleccionado del grupo consistente en IRA-5, IRA-6 y IRA-7 y su uso en la elaboración de una composición cosmética para disminuir la caída del cabello (reivindicaciones de la 1 a la 14).

D01 anticipa oligonucleótidos antiandrogénicos útiles en el tratamiento de la caída del cabello y otras enfermedades dermatológicas relacionadas con el metabolismo de andrógenos, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen.

D02 describe el uso de oligonucleótidos antisentido con actividad antiandrogénica como principios activos apropiados para inhibir la expresión del receptor de andrógenos.

D03 divulga composiciones que contienen ácidos ribonucleicos de doble cadena para inhibir, interferir o bloquear la proteína de transducción de la señal de andrógenos y su uso el tratamiento de la alopecia y la caída del cabello.

D04 anticipa oligonucleótidos de doble cadena una de cuyas secuencias es complementaria a una secuencia diana de una molécula de DNA o RNA y su uso con la finalidad de inhibirla y, de este modo, poder utilizar dichos oligonucleótidos en composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento del cáncer.

D05 divulga composiciones y métodos para modular la actividad del receptor de andrógenos (AR).

D06 investiga los efectos de un oligonucleótido ODN antisentido cuya diana es la secuencia (CAG)_n poliglutamina del mRNA del receptor de andrógeno humano (AR) sobre el crecimiento del tumor de próstata *in vivo* utilizando un modelo de ratón.

NOVEDAD

D01 anticipa oligonucleótidos antiandrogénicos útiles en el tratamiento de la caída del cabello y otras enfermedades dermatológicas relacionadas con el metabolismo de andrógenos, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen. La secuencia INN-73 se corresponde con la secuencia 12 de la presente solicitud (IRA-6).

D02 describe el uso de oligonucleótidos antisentido con actividad antiandrogénica como principios activos apropiados para inhibir la expresión del receptor de andrógenos en células obtenidas de la piel y el cabello y válidos, por tanto, para ser empleados en el tratamiento de enfermedades dermatológicas como la alopecia androgénica o el acné. La secuencia ODN 73 se corresponde con la secuencia 12 de la presente solicitud (IRA-6).

En consecuencia, las características de las reivindicaciones de la 1 a la 9 ya son conocidas por lo que esas reivindicaciones no se pueden considerar nuevas ni, por tanto, presentan actividad inventiva.

ACTIVIDAD INVENTIVA

D01 anticipa oligonucleótidos antiandrogénicos útiles en el tratamiento de la caída del cabello y otras enfermedades dermatológicas relacionadas con el metabolismo de andrógenos, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen. La secuencia INN-73 se corresponde con la secuencia 12 de la presente solicitud (IRA-6).

D02 describe el uso de oligonucleótidos antisentido con actividad antiandrogénica como principios activos apropiados para inhibir la expresión del receptor de andrógenos en células obtenidas de la piel y el cabello y válidos, por tanto, para ser empleados en el tratamiento de enfermedades dermatológicas como la alopecia androgénica o el acné. La secuencia ODN 73 se corresponde con la secuencia 12 de la presente solicitud (IRA-6).

D03 divulga composiciones que contienen ácidos ribonucleicos de doble cadena para inhibir, interferir o bloquear la proteína de transducción de la señal de andrógenos y su uso el tratamiento de la alopecia y la caída del cabello.

D04 anticipa oligonucleótidos de doble cadena una de cuyas secuencias es complementaria a una secuencia diana de una molécula de DNA o RNA y su uso con la finalidad de inhibirla y, de este modo, poder utilizar dichos oligonucleótidos en composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento del cáncer. Expone la inhibición de las formas salvajes o mutantes de los receptores de los andrógenos en el tratamiento de los carcinomas prostáticos utilizando dos oligonucleótidos ARN complementarios de una región de la secuencia que codifica el receptor de andrógenos (AR) no mutado humano o unos ARNsi, denominados LNCaP, que reconocen específicamente la mutación del receptor de andrógenos (T877A) en las células de carcinoma prostático LNCaP.

D05 divulga composiciones y métodos para modular la actividad del receptor de andrógenos (AR) y para el diagnóstico del cáncer de mama. Así, para el tratamiento del cáncer de mama expone el uso de siRNA que inhiban el mRNA del AR.

D06 investiga los efectos de un oligonucleótido ODN antisentido cuya diana es la secuencia (CAG)_n poliglutamina del mRNA del receptor de andrógeno humano (AR) sobre el crecimiento del tumor de próstata *in vivo* utilizando un modelo de ratón. Previamente se había demostrado que dicho oligonucleótido inhibía la expresión de AR *in vitro* en células de cáncer de próstata LNCaP, hecho que iba acompañado de una inhibición significativa del crecimiento celular y la secreción de PSA. Concluye que la inhibición de la expresión de AR da como resultado una inhibición significativa del crecimiento del tumor de próstata.

Así pues, son sobradamente conocidas en el estado de la técnica composiciones que contienen ARN de doble cadena que bloquean la síntesis o la acción de los andrógenos y su uso en procesos en los que la acción androgénica tiene un importante papel como son: hiperplasia y carcinoma de próstata, acné, calvicie y otras patologías relacionadas con el metabolismo de andrógenos y, por tanto, las reivindicaciones de la 1 a la 14 no presentan actividad inventiva.