

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 085**

51 Int. Cl.:
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05786796 .2**
- 96 Fecha de presentación: **16.08.2005**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1791568**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2007**

54 Título: **Usos terapéuticos de los inhibidores de RTP801**

30 Prioridad:
16.08.2004 EP 04019405
17.08.2004 US 601983 P
25.08.2004 US 604668 P
14.09.2004 US 609786 P
22.12.2004 US 638659 P
22.03.2005 US 664236 P
08.06.2005 US 688943 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.11.2012

73 Titular/es:
QUARK PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)
6501 DUMBARTON CIRCLE
FREMONT, CALIFORNIA 94555, US y
SILENCE THERAPEUTICS
AKTIENGESELLSCHAFT (50.0%)

72 Inventor/es:
FEINSTEIN, ELENA;
KAUFMANN, JÖRG y
GIESE, KLAUS

74 Agente/Representante:
LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 390 085 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Usos terapéuticos de los inhibidores de RTP801

5 Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente europea núm. EP 04019405.2, presentada el 16 de agosto de 2004; las solicitudes provisionales de Estados Unidos núms. 60/601,983, presentada el 17 de agosto de 2004; 60/604,668, presentada el 25 de agosto de 2004; 60/609,786, presentada el 14 de septiembre de 2004; 60/638,659, presentada el 22 de diciembre de 2004; 60/664,236, presentada el 22 de marzo de 2005 y 60/688,943, presentada el 8 de junio de 2005.

10

CAMPO DE LA INVENCION

15 La presente invención se relaciona con nuevas moléculas de ARNip que inhiben el gen RTP801 y con el uso de tales moléculas para tratar trastornos respiratorios de todo tipo (incluyendo trastornos pulmonares), afecciones y enfermedades oculares, trastornos microvasculares, afecciones relacionadas con la angiogénesis y la apoptosis.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), afecta más de 16 millones de americanos y es la cuarta causa más alta de muerte en los Estados Unidos. La fuma de cigarrillos causa la mayoría de las apariciones de la enfermedad debilitante pero otros factores ambientales no pueden excluirse (Petty TL. 2003. Definition, epidemiology, course, and prognosis of COPD. Clin. Cornerstone, 5-10).

25

El enfisema pulmonar es una manifestación importante de la COPD. La destrucción permanente de los espacios de aire periférico, bronquiolos distal a terminal, es el sello distintivo del enfisema (Tuder RM, y otros. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor blockade. Am J Respir Cell Mol Biol, 29:88-97; 2003.). El enfisema se caracteriza además por acumulación de células inflamatorias tales como macrófagos y neutrófilos en las estructuras bronquial y alveolar (Petty, 2003).

30

La patogénesis del enfisema es compleja y multifactorial. En humanos, se ha demostrado que una deficiencia de inhibidores de proteasas producida por las células inflamatorias, tales como alfa1-antitripsina, contribuye al desbalance proteasa/antiproteasa, favoreciendo así la destrucción de la matriz extracelular alveolar en el enfisema inducido por el humo del cigarrillo (CS) (Eriksson, S. 1964. Pulmonary Emphysema and Alpha1-Antitrypsin Deficiency. Acta Med Scand 175:197-205. Joos, L., Pare, P.D., and Sandford, A.J. 2002. Genetic risk factors of chronic obstructive pulmonary disease. Swiss Med Wkly 132:27-37). Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) desempeñan una función central en el enfisema experimental, como se documentó por la resistencia de los ratones carentes de metaloelastasa macrofágica contra el enfisema causado por inhalación crónica de CS (Hautamaki, y otros: Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. Science 277:2002-2004). Además, la sobreexpresión pulmonar de la interleucina-13 en ratones transgénicos resulta en enfisema dependiente de MMP y catepsina (Zheng, T., y otros 2000. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. J Clin Invest 106:1081-1093). Trabajos recientes describen la implicación de la apoptosis de la célula septal en la destrucción del tejido pulmonar lo que conduce al enfisema (Rangasami T, y otros . Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Submitted to Journal of Clinical Investigation.; Tuder RM y otros. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor blockade. Am J Respir Cell Mol Biol, 29:88-97; 2003; Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A, Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. Chest. 2004 feb;125(2): 626-32.; Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A., Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 mayo;28(5):555-62.).

50

Entre los mecanismos que soportan ambas rutas de destrucción del pulmón en el enfisema, la formación excesiva de especies de oxígeno reactivas (ROS) debe ser la primera de todas las mencionadas. Está bien establecido que el desbalance prooxidante/antioxidante existe en la sangre y en el tejido pulmonar de los fumadores (Hulea SA, y otros: Cigarette smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stress: a case-control study. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 1995;14(3-4):173-80.; Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. Am J Physiol. 1999 dic;277(6 Pt 1):L1067-88; MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. Chest. 2000 mayo;117(5 Suppl 1):303S-17S.; Marwick JA, Kirkham P, Gilmour PS, Donaldson K, MacNEE W, Rahman I. Cigarette smoke- induced oxidative stress and TGF-beta1 increase p21waf1/cip1 expression in alveolar epithelial cells. Ann N Y Acad Sci. 2002 nov;973:278-83.; Aoshiba K, Koinuma M, Yokohori N, Nagai A. Immunohistochemical evaluation of oxidative stress in murine lungs after cigarette smoke exposure. Inhal Toxicol. 2003 sep;15(10):1029-38.; Dekhuijzen PN. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J. 2004 abr;23(4):629-36.; Tuder RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, Voelkel NF, and Flores SC. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor blockade. Am J Respir Cell Mol Biol, 29:88-97; 2003.).

65

Después de una hora de exposición de los ratones a CS, existe un aumento dramático de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) en las células del epitelio alveolar, particularmente de tipo II (ver Inhal Toxicol. 2003 sep;15(10):1029-38. anteriormente).

5 Las especies de oxígeno reactivas superproducidas se conocen por su actividad citotóxica, las que provienen de un efecto directo que daña el ADN y de la activación de las rutas de transducción de la señal apoptótica (Takahashi A, Masuda A, Sun M, Centonze VE, Herman B. La apoptosis inducida por el estrés oxidativo se asocia con alteraciones en la actividad caspasa mitocondrial y las alteraciones dependientes de Bcl-2 en el pH mitocondrial (pHm). Brain Res Bull. 2004 feb 15;62(6):497-504.; Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and
10 cellular mecanismos. Hypertension. 2003 dic;42(6):1075-81. Epub 2003 oct 27.; Higuchi Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. Biochem Pharmacol. 2003 oct 15;66(8):1527-35.; Punj V, Chakrabarty AM. Redox proteins in mammalian cell death: an evolutionarily conserved function in mitochondria and prokaryotes. Cell Microbiol. 2003 abr;5(4):225-31.; Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. Redox control of cell death. Antioxid Redox Signal. 2002 jun;4(3):405-14.).

15 Las ROS no solo son citotóxicas *per se* sino que son además estímulos proinflamatorios, y son prominentes activadores de los factores de transcripción sensibles al redox NFkB y AP-1 (revisado en Rahman I. Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2002 sep;1(3):291-315.). Ambos factores de transcripción están, a su vez, fuertemente implicados en
20 estimular la transcripción de las citocinas proinflamatorias (revisado en Renard P, Raes M. The proinflammatory transcription factor NFkappaB: a potential target for novel therapeutical strategies. Cell Biol Toxicol. 1999;15(6):341-4.; Lentsch AB, Ward PA. The NFkappaB/IkappaB system in acute inflammation. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2000;48(2):59-63) y las proteinasas degradantes de la matriz (Andela VB, Gordon AH, Zotalis G, Rosier RN, Goater JJ, Lewis GD, Schwarz EM, Puzas JE, O'Keefe RJ. NFkappaB: a pivotal transcription factor in prostate cancer metastasis to
25 bone. Clin Orthop. 2003 oct;(415 Suppl):S75-85.; Fleenor DL, Pang IH, Clark AF. Involvement of AP-1 in interleukin-1alpha-stimulated MMP-3 expression in human trabecular meshwork cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 ago;44(8):3494-501.; Ruhul Amin AR, Senga T, Oo ML, Thant AA, Hamaguchi M. Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1beta: a role for the dual signalling pathways, Akt and Erk. Genes Cells. 2003 jun;8(6):515-23.). Las citocinas proinflamatorias, a su vez, sirven como atrayentes de las células inflamatorias que además segregan las enzimas degradantes de la matriz, citocinas y especies de oxígeno reactivas. Así, parece que el factor patogénico, como, por ejemplo, CS, desencadena una red patológica donde las especies de oxígeno reactivas actúan como principal mediador de la destrucción del pulmón.

35 Las especies de oxígeno reactivas (ROS) del humo de cigarrillo inhalado y aquellas formadas endógenamente por las células inflamatorias contribuyen a una carga aumentada de oxidante intrapulmonar.

Un factor patogénico adicional con respecto a la patogénesis de la COPD es la expresión de VEGF y VEGFR11 disminuida observada en los pulmones de los pacientes con enfisema (Yasunori Kasahara, Rubin M. Tuder, Carlyne D. Cool, David A. Lynch, Sonia C. Flores, and Norbert F. Voelkel. Endothelial Cell Death and Decreased Expression of
40 Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Emphysema. Am J Respir Crit Care Med Vol 163. pp 737-744, 2001). Además, la inhibición de la señalización de VEGF usando inhibidor químico de VEGFR conduce al endotelio del septo alveolar y después a la apoptosis de la célula epitelial, probablemente debido a la disrupción de la conexión íntima estructural/funcional de los dos tipos de células dentro de los alveolos (Yasunori Kasahara, Rubin M. Tuder, Laimute Taraseviciene-Stewart, Timothy D. Le Cras, Steven Abman, Peter K. Hirth, Johannes Waltenberger, and Norbert F. Voelkel. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and
45 emphysema. J. Clin. Invest. 106:1311-1319 (2000).; Voelkel NF, Cool CD. Pulmonary vascular involvement in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J Suppl. 2003 nov; 46:28s-32s).

50 **Degeneración macular**

La causa más común de la disminución de la visión mejor corregida en los individuos mayores de 65 años en los Estados Unidos es el trastorno de la retina conocido como degeneración macular relacionada con la edad (AMD). Cuando la AMD progresa, la enfermedad se caracteriza por pérdida de la visión central, aguda. El área del ojo afectado
55 por la AMD es la mácula - una área pequeña en el centro de la retina, compuesta fundamentalmente de células fotorreceptoras. La llamada AMD "seca", representa aproximadamente 85% - 90% de los pacientes con AMD, involucra alteraciones en la distribución de pigmentos en los ojos, pérdida de los fotorreceptores y disminuye la función de la retina debido a la atrofia general de las células. La llamada AMD "húmeda" involucra la proliferación de vasos coroideos anormales lo que conduce a coágulos o cicatrices en el espacio sub-retinal. Así, la aparición de la AMD húmeda ocurre
60 debido a la formación de una red neovascular coroidea anormal (neovascularización coroidea, CNV) debajo de la retina neural. Los vasos sanguíneos formados nuevamente son excesivamente débiles. Esto conduce a la acumulación de fluido subretinal y sangre conduciendo a la pérdida de la agudeza visual. Eventualmente, hay pérdida total de la retina funcional en la región involucrada, ya que se forma una gran cicatriz disciforme que involucra la corioide y la retina. Mientras que los pacientes con AMD seca pueden mantener una visión de calidad decreciente, la AMD húmeda
65 frecuentemente resulta en la ceguera. (Hamdi & Age-related Macular degeneration - a new viewpoint, Frontiers in Bioscience, e305-314, mayo 2003). La CNV ocurre no solamente en la AMD húmeda sino también en otras patologías

oculares tales como el síndrome de histoplasmosis ocular, estrías angioides, rupturas en la membrana de Bruch, degeneración miope, tumores oculares y algunas enfermedades degenerativas de la retina.

5 Varios estudios conducidos han determinado los factores de riesgo severo para la AMD, tales como fumar, el envejecimiento, la historia familiar (Milton, Am J Ophthalmol 88, 269 (1979); Mitchell y otros, Ophthalmology 102, 1450-1460 (1995); Smith y otros, Ophthalmology 108, 697-704 (2001)) el sexo (7 veces de probabilidad más alta en mujeres: Klein y otros, Ophthalmology 99, 933-943 (1992) y la raza (los blancos son más susceptibles). Los factores de riesgo adicionales pueden incluir las características del ojo tales como hipermetropía (hyperopia) y ojos de color claro, así como la enfermedad cardiovascular y la hipertensión. También se ha documentado evidencia de la implicación genética en el inicio del progreso de la enfermedad (ver Hamdi & Kenney anteriormente).

10 Dos compañías, Acuity Pharmaceuticals y ARNip Therapeutics, presentaron recientemente un IND para moléculas de ARNip inhibitoras de VEGF y VEGF-R1 (Fit-1), respectivamente, para el tratamiento de la AMD. Esas moléculas se llaman inhibidor Cand5 e inhibidor 027 respectivamente.

15

Trastornos microvasculares

Los trastornos microvasculares se componen de un amplio grupo de afecciones que afectan principalmente los capilares microscópicos y linfáticos y están, por lo tanto, fuera del alcance de la intervención quirúrgica directa. La enfermedad microvascular puede agruparse ampliamente en la vasoespástica, la vasculitis y oclusiva linfática. Además, muchas de las afecciones vasculares conocidas tienen un elemento microvascular en ellas.

20 ■ **Enfermedad vasoespástica**- Las enfermedades vasoespásticas son un grupo de afecciones relativamente comunes donde, por razones desconocidas, los reflejos vasoconstrictivos periféricos son hipersensibles. Esto resulta en una vasoconstricción inapropiada e isquemia del tejido, aún al punto de la pérdida del tejido. Los síntomas vasoespásticos se relacionan generalmente con la temperatura o el uso de maquinaria vibradora pero puede ser secundario a otras afecciones.

25 ■ **Enfermedad vasculítica** - Las enfermedades vasculíticas son aquellas que involucran un primario proceso inflamatorio en la microcirculación. La vasculitis es generalmente un componente de un trastorno autoinmune o del tejido conectivo y generalmente no es susceptible de tratamiento quirúrgico pero requiere tratamiento inmunosupresivo si los síntomas son severos.

30 ■ **Enfermedad oclusiva linfática** - El hinchamiento crónico de los miembros inferior o superior (linfoedema) es el resultado de la oclusión linfática periférica. Esto es una afección relativamente rara que tiene un gran número de causas, algunas heredadas, algunas adquiridas. El pilar principal del tratamiento son las prendas de compresión correctamente ajustadas y el uso de dispositivos de compresión intermitentes.

35

Patologías microvasculares asociadas con la diabetes

La diabetes es la causa principal de la ceguera, la causa número uno de amputaciones e impotencia, y una de las enfermedades crónicas de la niñez que más frecuentemente ocurre. La diabetes es además la causa principal de la enfermedad renal en etapa final en los Estados Unidos, con una tasa de prevalencia de 31 % comparado con otras enfermedades renales. La diabetes es además la indicación más frecuente para trasplante de riñón, llegando al 22% de todas las operaciones de trasplante.

40

45 En general, las complicaciones diabéticas pueden clasificarse ampliamente como enfermedad microvascular o macrovascular. Las complicaciones microvasculares incluyen neuropatía (daño de los nervios), nefropatía (enfermedad del riñón) y trastornos de la visión (por ejemplo, retinopatía, glaucoma, cataratas y trastornos de la córnea). En la retina, los glomérulos, y los vasos sanguíneos que nutren los nervios, rasgos patofisiológicos similares caracterizan la enfermedad microvascular específica de la diabetes.

50 Las patologías microvasculares asociadas con la diabetes se definen como una enfermedad de los vasos sanguíneos más pequeños (capilares) que puede ocurrir, por ejemplo, en personas que han tenido diabetes por mucho tiempo. Las paredes de los vasos se hacen anormalmente gruesas pero débiles. Ellas, por lo tanto, sangran, pierden proteína y reducen el flujo de sangre a través del cuerpo.

55 Los datos del modelo clínico y animal indican que la hiperglicemia crónica es el factor de iniciación central de todos los tipos de enfermedad microvascular diabética. La duración y magnitud de la hiperglicemia están fuertemente correlacionados con la extensión y velocidad de progreso de la enfermedad microvascular diabética. Aunque todas las células diabéticas se exponen a niveles elevados de glucosa en plasma, el daño hiperglicémico se limita a aquellos tipos de células (por ejemplo, células endoteliales) que desarrollan hiperglicemia intracelular. Las células endoteliales desarrollan hiperglicemia intracelular debido, a diferencia de otras muchas células, a que ellas no pueden regular descendientemente el transporte de glucosa cuando se exponen a hiperglicemia extracelular. Que la hiperglicemia intracelular es necesaria y suficiente para el desarrollo de la patología diabética se demuestra además por el hecho de que la sobreexpresión del transportador de glucosa GLUT1 en las células mesangiales cultivadas en un medio de glucosa normal imita el fenotipo diabético, induciendo a que aumente la expresión génica de fibronectina, colágeno tipo IV, y colágeno tipo I como la hiperglicemia diabética.

60

Función de la célula endotelial anormal: Temprano en el curso de la diabetes mellitus, antes que los cambios estructurales sean evidentes, la hiperglicemia causa anormalidades en el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular en la retina, glomérulo, y vasos sanguíneos del nervio periférico. Se piensa que el aumento del flujo sanguíneo y la presión intracapilar refleja la producción disminuida de óxido nítrico (NO) inducida por la hiperglicemia en lado eferente de los lechos capilares, y posiblemente una sensibilidad aumentada de la angiotensina II. Como consecuencia del aumento de la presión intracapilar y la disfunción de la célula endotelial, los capilares de la retina exhiben una fuga aumentada de fluoresceína y los capilares glomerulares tienen una tasa de excreción de albúmina (AER) elevada. Cambios comparables ocurren en los vasos sanguíneos del nervio periférico. Temprano en el curso de la diabetes, la permeabilidad incrementada es reversible; cuando el tiempo pasa, sin embargo, se hace irreversible.

Acumulación aumentada de proteínas en la pared del vaso

El rasgo patofisiológico común de la enfermedad microvascular diabética es el estrechamiento progresivo y la eventual oclusión de la luz vascular, lo que resulta en una perfusión y función inadecuada del tejido afectado. La hipertensión microvascular temprana inducida por hiperglicemia y el aumento de la permeabilidad vascular contribuyen a la oclusión irreversible de los microvasos por tres procesos:

- El primero es una fuga anormal de ácido periódico-Schiff (PAS)-positiva, proteínas plasmáticas que contienen carbohidrato, que se depositan en la pared capilar y que pueden estimular las células perivasculares tales como los pericitos y células mesangiales para elaborar los factores de crecimiento y la matriz extracelular.
- El segundo es la extravasación de los factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), que estimula directamente la sobreproducción de componentes de la matriz extracelular, y puede inducir apoptosis en ciertos tipos de células relevantes a complicaciones.
- El tercero es la estimulación inducida por la hipertensión de la expresión génica patológica por células endoteliales y células de soporte, que incluyen transportadores de glucosa glut-1, factores de crecimiento, receptores del factor de crecimiento, componentes de la matriz extracelular, y moléculas de adhesión que pueden activar los leucocitos circulantes. La observación que la reducción unilateral en la gravedad de la enfermedad microvascular diabética ocurre en el lado con estenosis arterial oftálmica o renal es consistente con este concepto.

Pérdida de células microvasculares y oclusión del vaso

El estrechamiento progresivo y la oclusión de la luz microvascular diabética se acompañan además de la pérdida de células microvasculares. En la retina, la diabetes mellitus induce la muerte celular programada de las células de Müller y las células ganglionares, pericitos, y células endoteliales. En el glomérulo, el declive de la función renal se asocia con la oclusión capilar generalizada y la pérdida de podocito, pero los mecanismos que subyacen a la pérdida de células glomerulares no se conocen todavía. En los vasos sanguíneos que nutren los nervios ocurre la degeneración del pericito y la célula endotelial, y estos cambios microvasculares parecen anteceder el desarrollo de la neuropatía periférica diabética. La distribución multifocal de la degeneración axonal en diabetes soporta una función causal para la oclusión microvascular, pero las disminuciones en las neurotrofinas inducidas por la hiperglicemia pueden contribuir previniendo la reparación axonal normal y la regeneración.

Otra característica común de la enfermedad microvascular diabética se conoce como *memoria hiperglicémica*, o la persistencia o progresión de alteraciones microvasculares inducidas por la hiperglicemia durante periodos posteriores de la homeostasis glucosa normal. El ejemplo más notable de este fenómeno es el desarrollo de retinopatía severa en ojos histológicamente normales de perros diabéticos que ocurrió completamente durante un período de 2,5 años de glucosa sanguínea normalizada que siguió 2,5 años de hiperglicemia. El aumento inducido por la hiperglicemia en la transcripción del gen de la matriz seleccionado persiste además por semanas después del restablecimiento de la normoglicemia in vivo, y una prolongación menos pronunciada, pero cualitativamente similar, de aumento inducido por hiperglicemia en la transcripción del gen de la matriz seleccionado ocurre en células endoteliales cultivadas.

Para más información, ver "Shared pathophysiologic features of microvascular complications of diabetes" (Larsen: Williams Textbook of Endocrinology, 10ma ed., Copyright © 2003 Elsevier).

Las complicaciones microvasculares ocurren no solamente en diabetes declarada sino también debido a la tolerancia deficiente a la glucosa (IGT). Las complicaciones microvasculares de IGT: neuropatía, retinopatía, y microproteinuria renal.

Neuropatía diabética

Las neuropatías diabéticas son trastornos neuropáticos (daño de los nervios periféricos) que se asocian con la diabetes mellitus. Estas condiciones usualmente resultan de lesión microvascular diabética que involucra vasos sanguíneos pequeños que suministran a los nervios (vasa nervorum). Las afecciones relativamente comunes que pueden asociarse con la neuropatía diabética incluyen parálisis del tercer nervio; mononeuropatía; mononeuropatía múltiple; amiotrofia diabética; una polineuropatía dolorosa; neuropatía autonómica; y neuropatía toracoabdominal y la forma más común, la neuropatía periférica, que afecta principalmente los pies y piernas. Existen cuatro factores involucrados en el desarrollo de la neuropatía diabética: la enfermedad microvascular, los productos finales de la glucosilación avanzada, la proteína quinasa C, y la ruta del poliol.

Enfermedad microvascular en la neuropatía diabética

Las enfermedades vasculares y neurales se relacionan estrechamente y se entrelazan. Los vasos sanguíneos dependen de la función normal de los nervios, y los nervios dependen del flujo sanguíneo adecuado. El primer cambio patológico en la microvasculatura es la vasoconstricción. Cuando la enfermedad progresa, la disfunción neuronal se correlaciona estrechamente con el desarrollo de anomalías vasculares, tales como engrosamiento de la membrana del basamento capilar e hiperplasia endotelial, que contribuye a hipoxia y tensión de oxígeno disminuida. La isquemia neuronal es una característica de la neuropatía diabética bien establecida. Los agentes vasodilatadores (por ejemplo, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina, antagonistas alfa 1) pueden conducir a mejoras sustanciales en el flujo sanguíneo neuronal, con mejoras correspondientes en las velocidades de conducción nerviosa. Así, la disfunción microvascular ocurre temprano en la diabetes, paralela al progreso de la disfunción neural, y puede ser suficiente para soportar la gravedad de los cambios estructurales, funcionales, y clínicos observados en la neuropatía diabética. La neuropatía periférica (piernas), la neuropatía sensorimotora es un componente significativo en la patogénesis de la úlcera de las piernas en la diabetes.

La neuropatía es una complicación común de la diabetes que ocurre en el tiempo en más de la mitad de los pacientes con diabetes tipo 2. Los estudios de conducción nerviosa demuestran que la neuropatía está presente ya en 10-18% de los pacientes al momento del diagnóstico de la diabetes, lo que sugiere que lesión del nervio periférico ocurre en estadios tempranos de la enfermedad y con desregulación glicémica más leve. El concepto de que la neuropatía es un signo clínico temprano de la diabetes fue propuesto hace > 40 años, y estudios más recientes reportan una asociación entre IGT y la neuropatía. La mayoría de los pacientes con IGT y neuropatía asociada tienen una polineuropatía sensorial distal simétrica con dolor neuropático prominente. La neuropatía IGT (Microvascular complications of impaired glucose tolerance - Perspectives in Diabetes, J. Robinson Singleton, en Diabetes Diciembre 1, 2003) es fenotípicamente similar a la neuropatía diabética temprana, que causa además síntomas sensoriales, que incluyen dolor, y disfunción autonómica. En un reconocimiento de 669 pacientes con neuropatía diabética temprana, los síntomas sensoriales se presentan en > 60%, impotencia en casi 40%, y otras implicaciones autonómicas en 33%, pero la evidencia de implicación motora es solamente 12%. Estos hallazgos clínicos sugieren la implicación temprana prominente de las fibras nerviosas amielínicas pequeñas que portan el dolor, la temperatura, y las señales autonómicas. La cuantificación directa de las fibras nerviosas intraepidérmicas amielínicas de las biopsias de piel muestra pérdida de fibra y morfología alterada similar en pacientes con neuropatía asociada a IGT y diabetes temprana .

La disfunción autonómica, particularmente la disfunción eréctil y la respuesta vagal cardíaca alterada, son rasgos comunes tempranos de la lesión neuropática en la diabetes. El trabajo con los pacientes IGT sugiere además la disautonomía vagal prevalente: estudios separados han encontrado una recuperación del ritmo cardíaco anormal después del ejercicio, variabilidad del intervalo R-R como para una respiración profunda, y expiración reducida para una relación de inspiración (todas las mediciones de la disautonomía vagal) en una fracción mayor de pacientes IGT que los sujetos control normoglicémicos que coinciden en edad.

El daño de los nervios en diabetes afecta las fibras motoras, sensoriales, y autonómicas. La neuropatía motora causa debilidad muscular, atrofia, y paresis. La neuropatía sensorial conduce a la pérdida de las sensaciones protectoras del dolor, presión, y calor. La ausencia de dolor conduce a muchos problemas en el pie insensible, que incluyen ulceración, trauma desapercibido, y neuroartropatía de Charcot. El paciente puede no buscar tratamiento hasta después que la herida ha avanzado. Una combinación de la disfunción sensorial y motora puede causar que el paciente coloque tensiones anormales en el pie, resultando en trauma, que puede llevar a la infección. La neuropatía simpática autonómica causa vasodilatación y sudoración disminuida, que resulta en pies demasiado secos, calientes que son particularmente propensos a roturas de la piel, así como alteraciones funcionales en el flujo microvascular. La disfunción autonómica (y denervación de las estructuras dérmicas) resulta además en la pérdida de la integridad de la piel, lo que proporciona un sitio ideal para la invasión de microbios. El pie neuropático no se ulcera espontáneamente; sino que es la combinación de alguna forma de trauma acompañado de neuropatía.

La disfunción microvascular ocurre temprano en la diabetes, paralelo al progreso de la disfunción neural, y puede ser suficiente para soportar la gravedad de los cambios estructurales, funcionales y clínicos observados en la neuropatía diabética.

Los productos finales de la glucosilación avanzada - Niveles intracelulares elevados de glucosa causan un enlace covalente no enzimático con las proteínas, lo que altera su estructura y destruye su función. Algunas de estas proteínas glicosiladas están implicadas en la patología de la neuropatía diabética y otras complicaciones a largo plazo de la diabetes.

La proteína quinasa C (PKC) - PKC está implicada en la patología de la neuropatía diabética. Los niveles aumentados de glucosa causan un incremento en el diacilglicerol intracelular, que activa la PKC. Los inhibidores de PKC en modelos animales aumentará la velocidad de conducción nerviosa mediante el aumento del flujo sanguíneo neuronal.

Polineuropatía sensorimotora

5 Las fibras nerviosas más largas se afectan en un mayor grado que las más cortas, debido a que la velocidad de conducción nerviosa es más lenta en proporción a la longitud del nervio. En este síndrome, la sensación disminuida y la pérdida de reflejos ocurre primero en los dedos bilateralmente, y después se extiende ascendentemente. Se describe generalmente como una distribución guante-calcetín de adormecimiento, pérdida sensorial, disestesia y dolor nocturno. El dolor puede sentirse como una quemadura, sensación de pinchazo, doloroso o punzante. La sensación de alfileres y agujas es común. La pérdida de la propiocepción, o sea, el sentido de donde está un miembro en el espacio, se afecta tempranamente. Estos pacientes no pueden sentir cuando pisan un cuerpo extraño, como una astilla, o cuando están desarrollando un callo por un zapato que no le queda bien. En consecuencia, están en riesgo de desarrollar úlceras e infecciones en los pies y piernas, que puede llevar a la amputación. De manera similar, estos pacientes pueden tener múltiples fracturas de la rodilla, tobillo o pies, y desarrollan una articulación de Charcot. La pérdida de la función motora resulta en contracturas de la dorsiflexión de los dedos, llamada dedos en martillo. Estas contracturas no solamente ocurren en los pies sino también en las manos.

15 **Neuropatía autonómica**

20 El sistema nervioso autonómico se compone de nervios que sirven al corazón, tracto GI y sistema urinario. La neuropatía autonómica puede afectar cualquiera de estos sistemas de órganos. La disfunción autonómica más comúnmente reconocida en los diabéticos es la hipotensión ortoestática, o la incómoda sensación de desvanecimiento cuando un paciente se levanta. En el caso de neuropatía autonómica diabética, se debe al fallo del corazón y las arterias para ajustar apropiadamente los latidos del corazón y el tono vascular para mantener la sangre fluyendo continua y completamente al cerebro. Este síntoma se acompaña generalmente por una pérdida de la variación del seno respiratorio, o sea, el cambio usual de los latidos del corazón observada con la respiración normal. Cuando estos dos descubrimientos están presentes, la neuropatía autonómica cardiaca está presente.

30 Las manifestaciones del tracto GI incluyen vaciamiento gástrico retardado, gastroparesis, náusea, sangramiento, y diarrea. Ya que muchos diabéticos toman medicación oral para su diabetes, la absorción de estas medicinas se afecta mucho por el vaciamiento gástrico retardado. Esto puede llevar a la hipoglicemia cuando un agente diabético oral se toma antes de una comida y no se absorbe hasta horas, o algunos días después, cuando existe ya azúcar en sangre normal o baja. El movimiento lento del intestino delgado puede causar un crecimiento bacteriano excesivo, que se empeora por la presencia de la hiperglicemia. Esto lleva al sangramiento, gas y diarrea.

35 Los síntomas urinarios incluyen frecuencia urinaria, urgencia, incontinencia y retención. Otra vez, debido a la retención de la orina dulce, las infecciones del tracto urinario son frecuentes. La retención urinaria puede llevar a divertículo en la vejiga, piedras, nefropatía por reflujo.

Neuropatía craneal

40 Cuando los nervios del cráneo se afectan, son más comunes las neuropatías del 3er nervio oculomotor. El nervio oculomotor controla todos los músculos que mueven los ojos con excepción de los músculos oblicuo superior y recto lateral. Además sirve para encoger la pupila y abrir el párpado. La aparición de una parálisis diabética del tercer nervio es usualmente abrupta, comenzando con dolor frontal o periorbital y después diplopia. Todos los músculos oculomotor que se inervan por el tercer nervio pueden afectarse, excepto por aquellos que controlan el tamaño de la pupila. El sexto nervio, el nervio abducens, que inerva el músculo recto lateral de los ojos (mueve el ojo lateralmente), se afectará además comúnmente pero la implicación del cuarto nervio, el nervio troclear, (inerva el músculo oblicuo superior, que mueve el ojo hacia abajo) es unusual. Las mononeuropatías de los nervios torácico o los nervios espinales lumbares puede ocurrir y conduce a síndromes dolorosos que simulan el infarto del miocardio, colecistitis o apendicitis. Los diabéticos tienen una incidencia mayor de neuropatías por compresión, tales como síndrome del túnel carpiano.

50 **Isquemia del miembro diabético y úlceras del pie diabético**

55 La diabetes y la presión pueden afectar la circulación microvascular y conducir a cambios en la piel en las extremidades inferiores, lo que a su vez, puede conducir a la formación de úlceras e infección posterior. Los cambios microvasculares conducen a microangiopatía muscular de los miembros, así como a predisposición para desarrollar isquemia periférica y una respuesta compensatoria a la angiogénesis reducida a eventos isquémicos. La patología microvascular exagera la enfermedad vascular periférica (PVD) (o enfermedad arterial periférica (PAD) o enfermedad arterial de las extremidades inferiores (LEAD)- una complicación MACROvascular - estrechando las arterias en las piernas debido a la aterosclerosis. La PVD ocurre temprano en los diabéticos, es más severa y diseminada, y frecuentemente involucra problemas microcirculatorios intercurrentes que afectan las piernas, ojos, y riñones.

65 Las úlceras del pie y gangrena son afecciones comorbidas frecuentes de la PAD. La neuropatía periférica concurrente con sensación disminuida hace el pie susceptible a traumas, ulceración, e infección. El progreso de la PAD en la diabetes se compone de tal comorbilidad como neuropatía periférica e insensibilidad del pie y las extremidades inferiores al dolor y trauma. Con la circulación disminuida y la sensación disminuida, ocurre la ulceración y la infección. El progreso a la osteomielitis y la gangrena puede necesitar amputación.

Las personas con diabetes tienen hasta 25 veces más probabilidad que las personas no diabéticas de sufrir una amputación de los miembros inferiores, enfatizando la necesidad de prevenir las úlceras del pie y la pérdida posterior del miembro.

5

Las úlceras del pie diabético pueden ocurrir no solamente en conjunto con la PAD sino que pueden asociarse además con la neuropatía, insuficiencia venosa (venas varicosas), trauma, e infección. La PAD contribuye a esas otras afecciones produciendo o precipitando úlceras del pie. Las úlceras del pie no necesariamente representan el progreso de la PAD, ya que ellas pueden ocurrir en presencia de una perfusión arterial periférica clínica adecuada. Los estudios basados en el paciente indican un riesgo aumentado de ulceración del pie en pacientes diabéticos que tienen neuropatía periférica y una alta presión del pie plantar. La prevalencia de una historia de úlceras o llagas en el pie o los tobillos fue 15% de todos los pacientes diabéticos en el estudio basado en la población en Wisconsin del sur. La prevalencia fue superior para los individuos diabéticos diagnosticados a la edad de <30 años, fue ligeramente mayor en hombres (16%) que en mujeres (13%), y fue mayor en pacientes diabéticos tratados con insulina (17%) que en pacientes que no se administran insulina (10%). La prevalencia aumentó con la edad, especialmente en pacientes diabéticos diagnosticados a la edad de <30 años. En los estudios de paciente de Europa, la prevalencia de úlceras del pie en pacientes diabéticos fue 3% en aquellos de <50 años de edad, 7% en aquellos de <60 años, y 14% en aquellos de <80 años. La prevalencia fue mayor en hombres que en mujeres a la edad de 70 años.

10

15

20

En pacientes diabéticos, la isquemia del pie y la infección son acontecimientos serios e incluso amenazantes para la vida; sin embargo, la neuropatía es la afección más difícil de tratar. La literatura médica y quirúrgica concerniente a todos los aspectos de las manifestaciones clínicas y patológicas del pie diabético es abrumadora. La neuropatía, angiopatía, retinopatía, y nefropatía, sola o en conjunto y en grados variables de severidad, pueden influenciar el tratamiento del pie diabético.

25

Cada año, 82,000 amputaciones de miembros se realizan en pacientes con diabetes mellitus. La mayoría de esas amputaciones se realizan en la población anciana. Las amputaciones resultantes de la diabetes pueden surgir a partir de múltiples etiologías, que incluyen úlceras del pie, isquemia, úlceras de piernas venosas (es decir, aquellas secundarias al reflujo venoso), y úlceras del talón (es decir, las que resultan de úlceras por presión no tratadas en el talón). La mayoría de estas amputaciones se originan de las úlceras. La prevalencia de úlceras del pie entre los pacientes con diabetes es 12%. Adicionalmente, la incidencia acumulativa de 20 años de úlceras de las extremidades inferiores en pacientes con diabetes tipo 1 es 9,9%. La amputación de los miembros inducida por la diabetes resulta en una tasa de mortalidad en 5 años de 39% a 68% y se asocian con un riesgo aumentado de amputaciones adicionales. La duración de la estancia hospitalaria es aproximadamente 60% mayor entre los pacientes con úlceras del pie diabético, comparado con aquellos sin úlceras.

30

35

La neuropatía diabética afecta el reflejo del nervio axón que depende de la función saludable del nociceptor de fibra C y causa vasodilatación local en respuesta a los estímulos dolorosos. Esta afección compromete además la respuesta presente en condiciones de tensión, tales como lesión o inflamación, en el pie neuropático diabético. Esta deficiencia puede explicar parcialmente por qué algunas úlceras en el pie neuropático diabético son lentas para cicatrizar o no se curan para nada, a pesar de una revascularización exitosa de la extremidad inferior.

40

La ruta causal más común para la ulceración del pie diabético puede identificarse así como la combinación de neuropatía (pérdida sensorial), deformidad (por ejemplo, prominente cabezas metatarsales), y trauma (por ejemplo, calzado mal ajustado).

45

La mayoría de los cirujanos prefiere realizar la derivación de la arteria poplítea o tibial debido a tasas inferiores de rescate y permeabilidad los miembros comparado con más procedimientos proximales. Si la derivación de la arteria poplítea o tibial es incapaz de restaurar un pulso palpable en el pie, se reportó que la derivación podal proporciona un procedimiento de rescate de los miembros más efectivo y duradero para pacientes con heridas del pie isquémico y diabetes]. Incluso, la enfermedad oclusiva multisegmento extensiva en pacientes con diabetes no presenta un impedimento para el rescate del pie. Aunque las complicaciones de una herida seria pueden tener resultados desastrosos, estas no son comunes después del injerto de derivación podal. El control adecuado de una infección del pie preexistente y la canalización con injerto cuidadoso han demostrado ser efectivas para evitar complicaciones adicionales. La angioplastia en la extremidad inferior progresivamente se utiliza más. Sin embargo, se debe enfatizar que para que la angioplastia sea efectiva, debe hacerse patente un vaso distal o vaso de alimentación si se realiza la angioplastia más proximal.

50

55

Aunque las úlceras diabéticas / patologías de los miembros puede manejarse en algunos pacientes (por desbridamiento, tratamiento antibiótico, uso de preparaciones para estimular el tejido de granulación (nuevo colágeno y angiogénesis) y reducción de la carga bacteriana en la herida), sería beneficioso tener una composición farmacéutica que pudiera tratar mejor estas afecciones y/o aliviar los síntomas.

60

Para más información, ver American Journal of Surgery, volumen 187 • Número 5 Suppl 1 • mayo 1, 2004, Copyright© 2004 Elsevier.

65

Disfunción microvascular coronaria en la diabetes

La correlación entre la histopatología y disfunción de la microcirculación en la diabetes es bien conocida a partir de antiguos estudios experimentales y de la autopsia, donde el engrosamiento de la membrana basal, la fibrosis perivascolar, el enrarecimiento vascular, y la hemorragia capilar se encuentran frecuentemente. Es difícil confirmar estos datos in vivo, aunque un estudio reciente demostró una correlación entre la patología y la disfunción microvascular ocular (Am J Physiol 2003;285). Una gran cantidad de estudios clínicos, sin embargo, indican que no sólo la diabetes manifiesta sino también el deterioro del control metabólico pueden afectar la microcirculación coronaria (Hypert Res 2002;25:893). Werner aludió al importante estudio de Sambuceti y otros, (Circulation 2001; 104:1129) que muestra la persistencia de la disfunción microvascular en los pacientes después de una exitosa reapertura de la arteria relacionada con el infarto, y que puede explicar el aumento de la morbilidad y la mortalidad cardiovascular en estos pacientes. Existe evidencia creciente a partir de grandes estudios de reperfusión aguda de que la morbilidad y la mortalidad no están relacionadas con la reapertura de la arteria relacionada con el infarto, sino que dependen mucho más del flujo TIMI flow +/- enrojecimiento miocárdial (Stone 2002; Feldmann, Circulación 2003). Herrmann indicó, entre otros, que la integridad de la microcirculación coronaria es probablemente el factor clínico y pronóstico más importante en este contexto (Circulation 2001). El efecto neutro de los dispositivos de protección (ningún cambio relevante para el flujo TIMI, para la resolución de ST, o para MACE) puede indicar que un deterioro funcional de la microcirculación es el determinante principal del pronóstico. También existe evidencia creciente de que la disfunción microvascular coronaria desempeña un papel importante en la CAD no obstructiva. La disfunción endotelial coronaria es un factor de predicción de pronóstico fuerte en estos pacientes.

Nefropatía diabética (disfunción renal en pacientes con diabetes)

La nefropatía diabética abarca la microalbuminuria (un efecto de la enfermedad microvascular), la proteinuria y la enfermedad renal terminal. La diabetes es la causa más común de insuficiencia renal, responsable de más del 40 por ciento de los nuevos casos. Incluso cuando los medicamentos y la dieta pueden controlar la diabetes, la enfermedad puede conducir a nefropatía e insuficiencia renal. La mayoría de las personas con diabetes no desarrollan una nefropatía suficientemente grave para causar insuficiencia renal. Aproximadamente 16 millones de personas en los Estados Unidos tienen diabetes, y cerca de 100.000 personas tienen insuficiencia renal como resultado de la diabetes.

Retinopatía diabética

En el estado diabético, la hiperglucemia conduce a una disminución del flujo sanguíneo retiniano, la hiper-permeabilidad retiniana, retrasos en la conducción del nervio foto-receptor, y la muerte celular de la neurona retiniana. En la diabetes de corta duración, la muerte celular neuronal se identificó dentro de la capa nuclear interna de la retina. Específicamente, la apoptosis se localizó en las células gliales tales como las células de Mueller y los astrocitos y se demostró que se produce en un 1 mes de la diabetes en el modelo de diabetes en rata inducida por STZ. La causa de estos eventos es multi-factorial lo que incluye la activación de la vía de diacilglicerol/PKC, el estrés oxidativo y la glucosilación no enzimática. La combinación de estos eventos deja la retina hipóxica y en última instancia, conduce al desarrollo de la retinopatía diabética. Una posible conexión entre la isquemia de la retina y los cambios tempranos en la retina diabética es la producción de factores de crecimiento como el VEGF inducidos por la hipoxia. El regulador maestro de la respuesta hipóxica se identificó como el factor-1 inducible por hipoxia (HIF-1), el cual controla los genes que regulan la proliferación celular y la angiogénesis. Estudios anteriores demostraron que la inhibición de la ubiquitinación de HIF-1 conduce a la unión con elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) y la producción del ARNm de VEGF.

La retinopatía diabética se define como la disfunción progresiva de la vasculatura de la retina causada por la hiperglucemia crónica. Las principales características de la retinopatía diabética incluyen los microaneurismas, las hemorragias retinianas, los exudados de lípidos retinianos, las manchas algodonosas, la no perfusión capilar, el edema macular y la neovascularización. Las características asociadas incluyen la hemorragia vítrea, el desprendimiento de la retina, el glaucoma neovascular, las cataratas prematuras y la parálisis de los nervios craneales.

Hay 16 millones de personas en los Estados Unidos con diabetes Tipo 1 y diabetes Tipo 2. En 15 años, el 80% de los pacientes de Tipo 1 desarrollan retinopatía diabética mientras que el 84% de los pacientes diabéticos de Tipo 2 desarrollan retinopatía en 19 años. Estas cifras constituyen un mercado significativo para los agentes terapéuticos dirigidos a las enfermedades oculares de la neovascularización. El desarrollo de la retinopatía diabética es dependiente del tiempo. A pesar del control óptimo del azúcar en la sangre, se puede esperar que los pacientes con enfermedad de larga duración eventualmente desarrollen alguna forma de retinopatía. La National Society to Prevent Blindness, estimó que de 4 a 6 millones de diabéticos en los Estados Unidos tienen retinopatía diabética. La incidencia anual estimada de nuevos casos de *retinopatía diabética proliferativa* y *de edema macular diabético* son 65.000 y 75.000, respectivamente, con una prevalencia de 700.000 y 500.000, respectivamente. La retinopatía diabética causa entre 12.000 y 24.000 nuevos casos de ceguera en los Estados Unidos cada año. La retinopatía se trata por métodos quirúrgicos, eficaces en la reducción de la pérdida grave de la visión, pero las porciones de la retina tratadas con láser se destruyen irreversiblemente. No existen tratamientos farmacológicos disponibles.

Una enfermedad microvascular que afecta principalmente a los capilares, la diabetes mellitus afecta el ojo por la

destrucción de la vasculatura en la conjuntiva, la retina y el sistema nervioso central. Los pacientes pueden presentarse con antecedentes de conjuntiva bulbar inyectada por mucho tiempo junto con quejas sistemáticas de pérdida de peso a pesar de un apetito mayor de lo normal (polifasia), sed anormal (polidipsia) y orina anormalmente frecuente (poliuria).

5 La agudeza visual fluctuante secundaria al azúcar en sangre inestable es un signo ocular común. La inflamación en los lentes del cristalino resulta en grandes cambios repentinos en la refracción, así como en la formación prematura de cataratas. Los cambios en la agudeza visual dependerán de la gravedad y etapa de la enfermedad.

10 En la retina, el debilitamiento de las arteriolas y capilares puede resultar en la apariencia característica de hemorragias intrarretiniana en forma de puntos y manchas, exudados, anomalías microvasculares intrarretinianas (IRMA), microaneurismas, edema e infartos algodanosos. La retinopatía diabética proliferativa es el resultado de un compromiso vascular severo y es visible como la neovascularización del disco (NVD), la neovascularización en otra parte (NVE) y la neovascularización del iris (NVI, o la rubeosis del iris). Las complicaciones neurológicas incluyen parálisis de los nervios craneales tercero, cuarto y sexto, así como la papilitis diabética y la parálisis del nervio facial.

15 La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades influenciadas genéticamente que comparten la intolerancia a la glucosa. Se caracteriza como un trastorno de la regulación metabólica como resultado de la deficiencia o el mal funcionamiento de la insulina o de la deficiencia o el mal funcionamiento de los receptores celulares de la insulina.

20 La bioquímica que implica la formación del sorbitol juega un papel en la destrucción de los pericitos, los cuales son células que soportan el endotelio vascular. A medida que los pericitos de apoyo perecen, el endotelio capilar se pone en peligro, lo que resulta en la fuga vascular de sangre, proteínas y lípidos. Esto, en combinación con la sangre espesada, cargada de glucosa, produce insuficiencia vascular, no perfusión capilar, hipoxia retiniana, estructura alterada y disminución de la función. La formación y liberación de factores vasoproliferativos que desempeñan un papel en la

25 génesis de la neovascularización de la retina son poco conocidos.

La mayoría de las secuelas de la diabetes que no amenazan la visión se resuelven espontáneamente en el transcurso de semanas o meses después de un control médico. En los casos en los que hay grandes cambios en la refracción, los pacientes pueden requerir una receta de lentes temporales hasta que la refracción se estabilice. Cuando la retinopatía amenaza la mácula o cuando nuevos vasos sanguíneos proliferan, el paciente se puede remitir para una fotocoagulación con láser. El estudio de la retinopatía diabética (DRS) demostró concluyentemente que la fotocoagulación panretiniana tuvo éxito en la reducción del riesgo de pérdida severa de la visión en pacientes de alto riesgo. Se definen las características de alto riesgo como: (1) la neovascularización del disco óptico (NVD) de un cuarto a un tercio del diámetro de un disco en tamaño y (2) la neovascularización en otra parte (NVE) con cualquier hemorragia

30 vítrea.

35

Edema macular diabético (DME)

40 El DME es una complicación de la retinopatía diabética, una enfermedad que afecta a los vasos sanguíneos de la retina. La retinopatía diabética produce múltiples anomalías en la retina, lo que incluye engrosamiento de la retina y edema, hemorragias, flujo de sangre obstaculizado, fuga excesiva de líquido de los vasos sanguíneos y, en las últimas etapas, el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos. Este crecimiento de los vasos sanguíneos puede causar grandes hemorragias y daño severo de la retina. Cuando la fuga de los vasos sanguíneos de la retinopatía diabética causa hinchazón de la mácula, se conoce como DME. El síntoma principal del DME es una pérdida de la visión central. Los

45 factores de riesgo asociados con el DME incluyen niveles de glucosa en sangre mal controlados, presión arterial alta, función renal anormal que causa la retención de líquidos, niveles altos de colesterol y otros factores sistémicos generales.

Según la Organización Mundial de la Salud, la retinopatía diabética es la principal causa de ceguera en adultos en edad laboral y la principal causa de pérdida de visión en los diabéticos. La American Diabetes Association informa que hay aproximadamente 18 millones de diabéticos en los Estados Unidos y aproximadamente 1,3 millones de casos nuevos diagnosticados de diabetes en los Estados Unidos cada año. La Prevent Blindness America y el National Eye Institute estiman que en los Estados Unidos hay más de 5,3 millones de personas mayores de 18 años con retinopatía diabética, lo que incluye aproximadamente 500.000 con DME. El CDC estima que hay aproximadamente 75.000 nuevos casos de

50 DME en los Estados Unidos cada año.

55

Neuropatías adicionales

60 Además de la diabetes, las causas comunes de la neuropatía son la infección por herpes zoster, trauma crónico o agudo (lo que incluye la cirugía) y varias neurotoxinas. El dolor neuropático es común en el cáncer como resultado directo del cáncer en los nervios periféricos (por ejemplo, la compresión por un tumor) y como un efecto secundario de muchos fármacos quimioterapéuticos.

65 *Enfermedad microvascular* - Las enfermedades vasculares y neurales están estrechamente relacionadas y entrelazadas. Los vasos sanguíneos dependen de la función normal de los nervios, y los nervios dependen del flujo sanguíneo adecuado. El primer cambio patológico en la microvasculatura es la vasoconstricción. Cuando la enfermedad

5 progresa, la disfunción neuronal se correlaciona estrechamente con el desarrollo de anomalías vasculares, tales como engrosamiento de la membrana del basamento capilar e hiperplasia endotelial, que contribuye a hipoxia y tensión de oxígeno disminuida. Los agentes vasodilatadores (por ejemplo, los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, α 1-antagonistas) pueden conducir a mejoras sustanciales en el flujo sanguíneo neuronal, con las correspondientes mejoras en las velocidades de conducción nerviosa.

Manifestaciones clínicas

10 La neuropatía afecta a todos los nervios periféricos: fibras de dolor, neuronas motoras, nervios autonómicos. Por lo tanto, necesariamente puede afectar a todos los órganos y sistemas ya que todos están inervados. Hay varios síndromes distintos en dependencia de los sistemas de órganos y miembros afectados, pero estos no son de ninguna manera exclusivos. Un paciente puede tener una neuropatía sensoriomotora y autonómica o cualquier otra combinación.

15 A pesar de los avances en la comprensión de las causas metabólicas de la neuropatía, los tratamientos destinados a interrumpir estos procesos patológicos se limitan por los efectos secundarios y la falta de eficacia. Por lo tanto, los tratamientos son sintomáticos y no abordan los problemas subyacentes. Los agentes para el dolor que causa la neuropatía sensoriomotora incluyen antidepresivos tricíclicos (TCA), inhibidores de la recaptación de la serotonina (SSRI) y fármacos antiepilépticos (AED). Ninguno de estos agentes revoca los procesos patológicos que conducen a la neuropatía diabética y no alteran el curso incesante de la enfermedad. Por lo tanto, sería útil tener una composición farmacéutica que pudiera tratar mejor estas condiciones y/o aliviar los síntomas.

Retinopatías adicionales

Microvasculopatía retiniana (retinopatía del SIDA)

25 La microvasculopatía retiniana se ve en el 100% de los pacientes con SIDA. Se caracteriza por hemorragias intrarretinianas, microaneurismas, manchas de Roth, manchas algodinosas (microinfartos de la capa de las fibras nerviosas) y revestimiento perivascular. La etiología de la retinopatía se desconoce aunque se piensa que se debe a inmuno-complejos circulantes, la liberación local de sustancias citotóxicas, hemorreología anormal, y la infección por VIH de las células endoteliales. La retinopatía del SIDA es ahora tan común que las manchas algodinosas en un paciente sin diabetes o hipertensión, pero en riesgo de contraer el VIH debe inducir al médico a considerar la prueba viral. No existe un tratamiento específico para la retinopatía del SIDA pero su presencia continua puede inducir a un médico a re-examinar la eficacia de la terapia contra el VIH y el cumplimiento del paciente.

Retinopatía por trasplante de médula ósea (BMT)

40 La retinopatía por trasplante de médula ósea se reportó por primera vez en 1983. Típicamente ocurre en seis meses, pero puede ocurrir tan tarde como 62 meses después del BMT. Los factores de riesgo como la diabetes y la hipertensión pueden facilitar el desarrollo de la retinopatía por BMT por realzar la microvasculopatía isquémica. No hay predilección conocida de edad, género o raza para el desarrollo de la retinopatía por BMT. Los pacientes presentan disminución de la agudeza visual y/o déficit en el campo visual. Los resultados del segmento posterior son típicamente bilaterales y simétricos. Las manifestaciones clínicas incluyen múltiples manchas algodinosas, telangiectasias, microaneurismas, edema macular, exudados duros y hemorragias retinianas. La angiografía con fluoresceína demuestra la no perfusión capilar y el goteo, anomalías microvasculares intrarretinianas, microaneurismas y edema macular. Aunque la etiología exacta de la retinopatía por BMT no se ha elucidado, parece afectarse por varios factores: toxicidad de la ciclosporina, irradiación corporal total (TBI), y agentes quimioterapéuticos. La ciclosporina es un potente agente inmunomodulador que suprime la respuesta inmune injerto-contra-hospedero. Puede conducir a daño celular endotelial y efectos neurológicos secundarios, y como resultado, se ha sugerido como la causa de la retinopatía por BMT. Sin embargo, la retinopatía por BMT se puede desarrollar en ausencia del uso de la ciclosporina, y no se demostró que la ciclosporina cause la retinopatía por BMT en los receptores de médula ósea autólogos o singénicos. La ciclosporina, por lo tanto, no parece ser la única causa de la retinopatía por BMT. La irradiación corporal total (TBI) también se implicó como causa de la retinopatía por BMT. La radiación daña la microvasculatura retiniana y conduce a la vasculopatía isquémica. Variables tales como la dosis total de radiación y el intervalo de tiempo entre la radiación y la ablación de la médula ósea parecen ser importantes. Sin embargo, la retinopatía por BMT puede ocurrir en pacientes que no recibieron TBI, y la retinopatía por BMT no se observa en los receptores de trasplantes de órganos sólidos que recibieron dosis similares de radiación. Por lo tanto, la TBI no es la única causa, pero es otro factor que contribuye al desarrollo de la retinopatía por BMT. Los agentes quimioterapéuticos se sugirieron como un factor potencial que contribuye a la retinopatía por BMT. Medicamentos tales como el cisplatino, la carmustina y la ciclofosfamida pueden causar efectos secundarios oculares, lo que incluye edema de la papila, neuritis óptica, déficit en el campo visual y la ceguera cortical. Se sugirió que estos fármacos quimioterapéuticos pueden predisponer a los pacientes a los daños retinianos inducidos por la radiación y aumentar el efecto nocivo de la radiación. En general, los pacientes con retinopatía por BMT tienen un buen pronóstico. La retinopatía por lo general se resuelve en dos a cuatro meses después de suspender o disminuir la dosis de ciclosporina. En un informe, el 69 por ciento de los pacientes experimentaron una resolución completa de los resultados de la retina, y el 46 por ciento de los pacientes recuperó completamente su agudeza visual basal. Debido al pronóstico favorable y la naturaleza relativamente no progresiva de la retinopatía por BMT, una intervención agresiva no suele ser necesaria.

Afecciones isquémicas

La isquemia se puede dividir en dos categorías: la primera implica la aterosclerosis acelerada que ocurre comúnmente en pacientes con diabetes, es decir, en las arterias femoral, poplítea y tibial posterior. Estos vasos, a menudo solamente 1 o 2 cm de diámetro, pueden desarrollar la placa aterosclerótica, que disminuye seriamente el flujo de sangre. Después de que los grandes vasos se ocluyen completamente, pueden ocurrir, accidente cerebro vascular, infarto de miocardio, isquemia, y úlceras del pie diabético que no cicatrizan. Esta forma de isquemia es esencialmente una enfermedad de grandes vasos.

Demencia post-accidente cerebro vascular

El 25% de las personas tienen demencia después de un accidente cerebro vascular, con muchos otros que desarrollan demencia en los siguientes 5 a 10 años. Además, muchos individuos experimentan deterioros más sutiles de sus funciones superiores del cerebro (por ejemplo las habilidades de planificación y la velocidad de procesamiento de la información) y tienen un riesgo muy alto de desarrollar posteriormente demencia. Accidentes cerebro vascular muy pequeños en las partes profundas del cerebro en este proceso (que se llama enfermedad microvascular) parecen ser esenciales en el proceso que conduce a un patrón identificado de atrofia cerebral específico para la demencia post-accidente cerebro vascular.

Síndrome isquémico ocular

Los pacientes que sufren de síndrome de isquemia ocular (OIS) son generalmente mayores, con edades en el intervalo entre los 50 a los 80. Los varones se afectan dos veces más frecuentemente que las mujeres. El paciente es sólo raramente asintomático. La disminución de la visión se produce en la presentación en el 90 por ciento de los casos, y el 40 por ciento de los pacientes tiene dolor concomitante en los ojos. También puede haber una historia concomitante o antecedente de ataques isquémicos transitorios o amaurosis fugaz. Los pacientes también tienen enfermedad sistémica significativa conocida o desconocida en el momento de la presentación. Las enfermedades sistémicas que se encuentran más comúnmente son la hipertensión, la diabetes, la enfermedad cardíaca isquémica, el accidente cerebro vascular, y la enfermedad vascular periférica. En menor medida, los pacientes manifiestan OIS como resultado de la arteritis de células gigantes (GCA).

Los hallazgos unilaterales se presentan en el 80 por ciento de los casos. Hallazgos comunes pueden incluir catarata unilateral avanzada, inflamación del segmento anterior, reacción asintomática de la cámara anterior, edema macular, venas retinianas dilatadas pero no tortuosas, hemorragias media-periféricas en forma de puntos y manchas, manchas algodonosas, exudados, y neovascularización del disco y de la retina. También puede haber pulsación arterial espontánea, presión intraocular elevada, y la neovascularización del iris y el ángulo con glaucoma neovascular (NVG). Mientras que el paciente puede presentar neovascularización del segmento anterior, la hipotonía ocular puede ocurrir debido a la baja perfusión arterial al cuerpo ciliar. Ocasionalmente, hay embolia retiniana visible (placas Hollenhorst).

Los hallazgos en el OIS son causados por la ulceración ateromatosa de la arteria carótida interna y la estenosis en la bifurcación de la arteria carótida común. El cinco por ciento de los pacientes con intervalo de estenosis de la arteria desarrollan el OIS. Sin embargo, el OIS sólo se produce si el grado de estenosis supera el 90 por ciento. La estenosis de la arteria carótida reduce la presión de perfusión en el ojo, lo que resulta en los fenómenos isquémicos antes mencionados. Una vez que la estenosis alcanza el 90 por ciento, la presión de perfusión en la arteria central de la retina (CRA) sólo desciende al 50 por ciento. A menudo, la presión arterial reducida se manifiesta como una pulsación espontánea del CRA. Los hallazgos son variables y pueden incluir cualquiera o todos los hallazgos anteriores.

Los pacientes con OIS tienen una enfermedad sistémica significativa que se debe evaluar. La muerte cardíaca es la causa principal de mortalidad en pacientes con OIS- la tasa de mortalidad a los cinco años es del 40 por ciento. Por esta razón, los pacientes con OIS deben remitirse a un cardiólogo para una serología completa, EKG, ECG y evaluación de la carótida.

Enfermedades microvasculares de los riñones

El riñón está implicado en un número de afecciones clínico-patológicas discretas que afectan la microvasculatura sistémica y renal. Algunas de estas afecciones se caracterizan por lesiones primarias a las células endoteliales, tales como:

- *Síndrome urémico hemolítico (HUS) y púrpura trombocitopénica trombótica (TTP)*. HUS y TTP son enfermedades estrechamente relacionadas que se caracterizan por la anemia hemolítica microangiopática y el deterioro de órganos variables. Tradicionalmente, el diagnóstico de HUS se hace cuando la insuficiencia renal es una característica predominante del síndrome, como es común en los niños. En los adultos, el deterioro neurológico predomina frecuentemente y el síndrome entonces se conoce como TTP. La microangiopatía trombótica es la lesión patológica subyacente en ambos síndromes, y los hallazgos clínicos y de laboratorio en pacientes con HUS o TTP se superponen en gran medida. Esto llevó a algunos investigadores a considerar a los dos síndromes como un continuo de una sola enfermedad. Patogenia: Los datos experimentales sugieren fuertemente que la lesión celular endotelial es el evento

primario en la patogénesis de HUS/TTP. El daño endotelial dispara una cascada de eventos que incluyen la coagulación intravascular local, la deposición de fibrina y la activación y agregación de plaquetas. El resultado final es el hallazgo histopatológico de microangiopatía trombótica común a las diferentes formas del síndrome de HUS/TTP. Si HUS/TTP se dejan sin tratamiento, la tasa de mortalidad se acerca al 90%. La terapia de apoyo- que incluye la diálisis, medicamentos antihipertensivos, transfusiones de sangre, y el manejo de las complicaciones neurológicas- contribuye a la mejora de la supervivencia de los pacientes con HUS/TTP. El equilibrio adecuado de líquidos y reposo intestinal son importantes en el tratamiento del HUS típico asociado con la diarrea.

■ *Nefritis por radiación* - Las consecuencias a largo plazo de la irradiación renal que excede los 2500 rad se pueden dividir en cinco síndromes clínicos:

(i) La nefritis aguda por radiación ocurre en aproximadamente el 40% de los pacientes después de un período de latencia de 6 a 13 meses. Se caracteriza clínicamente por la aparición súbita de hipertensión, proteinuria, edema y falla renal progresiva que en la mayoría de los casos conducen a riñones en etapa terminal.

(ii) La nefritis crónica por radiación, por el contrario, tiene un período de latencia que varía entre los 18 meses y los 14 años después de la lesión inicial. Es insidiosa en el inicio y se caracteriza por hipertensión, proteinuria, y la pérdida gradual de la función renal.

(iii) El tercer síndrome se manifiesta 5 a 19 años después de la exposición a la radiación como proteinuria benigna con función renal normal

(iv) Un cuarto grupo de pacientes exhibe sólo la hipertensión benigna 2-5 años más tarde y pueden tener proteinuria variable. La hipertensión maligna tardía surge 18 meses a 11 años después de la irradiación en pacientes ya sea con nefritis crónica por radiación o hipertensión benigna. La eliminación del riñón afectado revocó la hipertensión. Se informó el daño a las arterias renales inducido por radiación con la subsecuente hipertensión renovascular.

(v) Un síndrome de insuficiencia renal análoga a la nefritis aguda por radiación se observó en los pacientes con trasplante de médula ósea (BMT) que se trataron con irradiación corporal total (TBI).

Se informó que la irradiación causa la disfunción endotelial, pero no afecta a las células vasculares del músculo liso en la fase temprana después de la radiación. La radiación directa podría dañar el ADN, lo que da lugar a disminución de la regeneración de estas células y la degradación de la membrana basal en los capilares glomerulares y túbulos. No está claro cómo esta lesión inicial, eventualmente conduce a la glomérulo-esclerosis, atrofia tubular y fibrosis intersticial. Se postula que la degeneración de la capa de células endoteliales puede provocar trombosis intravascular en los capilares y las arteriolas más pequeñas. Esta angiopatía intrarrenal entonces explicaría la fibrosis renal progresiva y la hipertensión que caracterizan la nefritis por radiación. Un estudio reciente de riñones de ratón irradiados mostró un aumento dependiente de la dosis en los leucocitos en la corteza renal, lo que sugiere un papel para los procesos inflamatorios en la nefritis inducida por radiación.

En otras enfermedades renales, la microvasculatura del riñón está involucrada en trastornos autoinmunes, como la esclerosis sistémica (esclerodermia). La afectación renal en la esclerosis sistémica se manifiesta como una enfermedad renal crónica de lenta progresión o como una crisis de esclerodermia renal (SRC), la cual se caracteriza por hipertensión maligna y azotemia aguda. Se postula que la SRC se produce por un fenómeno de tipo Raynaud en el riñón. El vasoespasmo severo conduce a la isquemia cortical y una mayor producción de renina y angiotensina II, la cual a su vez perpetúa la vasoconstricción renal. Los cambios hormonales (embarazo), el estrés físico y emocional, o la temperatura fría pueden desencadenar el vasoespasmo arterial de tipo Raynaud. El papel del sistema renina-angiotensina en la perpetuación de la isquemia renal se subraya por el importante beneficio de los inhibidores de ACE en el tratamiento del SRC. En los pacientes con SRC que progresan a insuficiencia renal severa a pesar del tratamiento antihipertensivo, la diálisis se convierte en una necesidad. Tanto la diálisis peritoneal como la hemodiálisis se han empleado. El informe de la End-Stage Renal Disease (ESRD) Network en 311 pacientes con ESRD inducida por esclerosis sistémica dializados entre 1983 y 1985 reveló una tasa de supervivencia del 33% a los 3 años.

La microcirculación renal también puede afectarse en la enfermedad de células falciformes, a la que el riñón es particularmente susceptible a causa de la baja tensión de oxígeno que se alcanza en los vasos profundos de la médula renal como resultado de la transferencia de oxígeno en contracorriente a lo largo de los vasos rectos. Las arterias renales más pequeñas y las arteriolas también pueden ser el sitio de la lesión tromboembólica a partir de material que contiene colesterol que se desplaza de las paredes de los grandes vasos.

Al considerarlos como un grupo, las enfermedades que causan oclusión transitoria o permanente de la microvasculatura renal resultan uniformemente en la interrupción de la perfusión glomerular, y por lo tanto de la tasa de filtración glomerular, por lo que constituyen una seria amenaza para la homeostasis sistémica.

Insuficiencia renal aguda (ARF)

La ARF puede ser causada por la enfermedad microvascular o macrovascular (oclusión importante de la arteria renal o enfermedad severa de la aorta abdominal). Las enfermedades microvasculares clásicas a menudo se presentan con hemólisis microangiopática e insuficiencia renal aguda que ocurre a causa de trombosis u oclusión de los capilares glomerulares, frecuentemente con trombocitopenia adjunta. Ejemplos típicos de estas enfermedades incluyen:

- a) Púrpura trombocitopénica trombótica – La péntada clásica en la púrpura trombocitopénica trombótica incluye fiebre, alteraciones neurológicas, insuficiencia renal, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia.
- b) El síndrome urémico hemolítico- El síndrome urémico hemolítico es similar a la púrpura trombótica trombocitopénica, pero no se presenta con alteraciones neurológicas.
- c) El síndrome HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y plaquetas bajas). El síndrome HELLP es un tipo de síndrome urémico hemolítico que se produce en las mujeres embarazadas con la adición de las elevaciones de transaminasas.

La insuficiencia renal aguda se puede presentar en todos los entornos médicos, pero se adquiere predominantemente en los hospitales. Esta afección se desarrolla en el 5 por ciento de los pacientes hospitalizados, y aproximadamente el 0.5 por ciento de los pacientes hospitalizados requiere diálisis. Durante los últimos 40 años la tasa de supervivencia de la insuficiencia renal aguda no mejoró, sobre todo porque los pacientes afectados son ahora mayores y tienen más condiciones comórbidas. Las infecciones producen el 75 por ciento de las muertes en pacientes con insuficiencia renal aguda y las complicaciones cardio-respiratorias son la segunda causa más común de muerte. En dependencia de la severidad de la insuficiencia renal, la tasa de mortalidad puede variar desde el 7 por ciento hasta tan alta como el 80 por ciento. La insuficiencia renal aguda se puede dividir en tres categorías: ARF prerrenal, intrínseca y postrenal. La ARF intrínseca se subdivide en cuatro categorías: enfermedad tubular, enfermedad glomerular, enfermedad vascular (incluye microvascular) y enfermedad intersticial.

Enfermedad renal progresiva

Hay evidencia de que la enfermedad renal progresiva se caracteriza por una pérdida progresiva de la microvasculatura. La pérdida de la microvasculatura se correlaciona directamente con el desarrollo de cicatrices glomerulares y tubulointersticiales. El mecanismo es mediado, en parte, por una reducción en la respuesta proliferativa endotelial, y esta discapacidad en la reparación capilar es mediada por la alteración en la expresión local tanto de factores angiogénicos (factor de crecimiento endotelial vascular) como anti-angiogénicos (trombospondina 1) en el riñón. La alteración en el equilibrio de los factores de crecimiento angiogénicos es mediada tanto por las citoquinas asociadas a macrófagos (interleucina-1 β) como por mediadores vasoactivos. Finalmente, existe evidencia intrigante de que la estimulación de la angiogénesis y / o la reparación capilar puede estabilizar la función renal y enlentecer la progresión y que este beneficio se produce independientemente de los efectos sobre la BP o la proteinuria.

Para más información ver Brenner & Rector's The Kidney, 7ma ed., Copyright-© 2004 Elsevier: Capítulo 33 - Microvascular diseases of the kidney y también Tiwari y Vikrant Journal of Indian Academy of Clinical Medicine Vol.5, núm.1 Review Article- Sepsis and the Kidney.

En conclusión, los modos actuales de terapia para la prevención y/o tratamiento de las COPD, la degeneración macular y las enfermedades microvasculares son insatisfactorios y existe por lo tanto una necesidad, de desarrollar nuevos compuestos para este fin. Todas las enfermedades y las indicaciones que se describen anteriormente en la presente, así como otras enfermedades y afecciones que se describen en la presente tales como MI también se pueden tratar con los nuevos compuestos de esta invención.

RTP801

El gen RTP801, se reportó primero por el cesionario de la presente solicitud. Las patentes de Estados Unidos núms. 6455674, 6555667, y 6740738, todas asignadas al cesionario de la presente solicitud, describen y reivindican *per se* el polinucleótido y polipéptido RTP801, y los anticuerpos dirigidos hacia el polipéptido. RTP801 representa un único objetivo génico para el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) que puede regular la patogénesis inducida por hipoxia independiente de los factores de crecimiento tal como VEGF.

El inventor de la presente invención ha hecho descubrimientos que conducen al nuevo concepto de inhibir el gen RTP801 con el propósito de mejorar varios trastornos respiratorios.

Las siguientes solicitudes de patente y publicaciones proporcionan aspectos de información de soporte.

WO 2001070979 se refiere a marcadores de ácido nucleico que son sobreexpresados en células de cáncer ovárico.

US 6673549 describe una combinación que comprende ADNc que se expresan diferencialmente en respuesta al tratamiento con esteroides.

La solicitud de Estados Unidos 2003165864 se refiere a los ADNc que se expresan diferencialmente en las células tratadas con un agente desmetilante del ADN.

5 La solicitud de Estados Unidos 2003108871 se refiere a una composición que comprende varios ADNc que se expresan diferencialmente en cultivos de células de hígado C3A humano tratados, supuestamente útil para el tratamiento de trastornos hepáticos.

10 La solicitud de Estados Unidos 2002119463 describe una nueva composición, útil para el tratamiento y diagnóstico del cáncer de próstata, dicha composición comprende ADNc humanos que se expresan diferencialmente en el cáncer de próstata.

WO 2004018999 describe un método para evaluar, caracterizar, monitorear, prevenir y tratar el cáncer cervical.

15 EP 1394274 se refiere a un método de prueba para el asma bronquial o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica mediante la comparación del nivel de expresión de un gen marcador en una muestra biológica de un sujeto con el nivel de expresión del gen en una muestra de un sujeto saludable.

20 WO 2002101075 se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada útil para detectar, caracterizar, prevenir y tratar los cánceres cervicales humanos.

WO 2003010205 se refiere a inhibir la angiogénesis para tratar la curación de heridas, retinopatía, isquemia, inflamación, microvasculopatía, cura de huesos e inflamación de la piel.

25 WO 2002046465 se refiere a la identificación de un gen involucrado en la enfermedad para tratar las afecciones reguladas por la hipoxia.

WO 2002031111 se refiere a supuestamente nuevos polipéptidos y sus proteínas codificantes, y se proporcionan muchos usos de estos.

30

WO 2001012659 se refiere a ácidos nucleicos útiles en metodologías de ADN recombinante.

WO 2001077289 describe seiscientos veintitrés polinucleótidos derivados de una variedad de fuentes de tejido humano.

35 WO 2003101283 se refiere a una combinación que comprende muchos ADNc y proteínas que supuestamente se expresan diferencialmente en los trastornos respiratorios.

JP 2003259877 se refiere a muchos marcadores de la enfermedad de fibrosis hepática.

40 WO2004/035615 describe la identificación de PRF1 (RTP801) como un factor metastásico involucrado en la ruta de la cinasa PI - 3. Los inhibidores se describen, e incluyen los ARNip.

45 Tzipora Shoshani, y otros. Identification of a Novel Hypoxia-Inducible Factor 1-sensible Gene, RTP801, Involved in Apoptosis. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, abr. 2002, p. 2283-2293; este documento, que es de la co-autoría del inventor de la presente invención, detalla el descubrimiento del gen RTP801 (un nuevo gen dependiente de HIF-1).

50 Anat Brafman, y otros. Inhibition of Oxygen-Induced Retinopathy in RTP801-Deficient Mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004 oct; 45 (10): 3796-805; también de la co-autoría del inventor de la presente invención, este documento demuestra que en ratones knock out RTP801, la hiperoxia no causa degeneración de la red capilar de la retina.

55 Leif W. Ellisen, y otros REDD1, a Developmentally Regulated Transcriptional Target of p63 and p53, Links p63 to Regulation of Reactive Oxygen Species. Molecular Cell, Vol. 10, 995-1005, noviembre, 2002; este documento demuestra que la sobreexpresión de RTP801 (referida en la misma como REDD1) conduce a un aumento de la producción de especies de oxígeno reactivas.

Richard DR, Berra E, y Pouyssegur J. Non-hypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha in vascular smooth muscle cells. J Biol. Chem. 2000, sep1; 275(35): 26765-71 este documento demuestra que la transcripción dependiente de HIF-1 puede ser inducida por la producción excesiva de especies de oxígeno reactivas.

60 Rangasami T, y otros, Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Presentado en el Diario de Investigación Clínica. Este trabajo se refiere a ratones con una defensa antioxidante comprometida (debido a la inactivación de la línea germinal de RTP801, en la misma denominado Nrf2).

SUMARIO DE LA INVENCION

65

La presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones para tratar trastornos microvasculares, degeneración macular, trastornos respiratorios, y lesión o enfermedad de la médula espinal.

5 En una modalidad, se proporcionan nuevas moléculas que inhiben RTP801 y que pueden usarse para tratar varias enfermedades e indicaciones.

10 La presente descripción describe un método para tratar un paciente que padece de un trastorno microvascular, degeneración macular o un trastorno respiratorio, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de RTP801.

15 Otro aspecto de la presente descripción concierne un método para tratar un paciente que padece de COPD, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801. En un aspecto, el inhibidor es una molécula ARNip, una molécula antisentido, un anticuerpo (tal como un anticuerpo neutralizante), un péptido negativo dominante o una ribozima.

20 Otro aspecto de la presente descripción concierne un método para tratar un paciente que padece de degeneración macular, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801. En un aspecto, el inhibidor es una molécula ARNip, una molécula antisentido, un anticuerpo (tal como un anticuerpo neutralizante), un péptido negativo dominante o una ribozima.

La invención se dirige a los compuestos ARNip que tienen la estructura de hebra doble:

5' (N)_x -Z 3' (cadena antisentido)
3' Z'-(N')_y 5' (cadena sentido),

25 donde cada N y N' es un ribonucleótido que puede estar modificado o no modificado en su residuo azúcar y cada uno de (N)_x y (N')_y es un oligómero en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' por un enlace covalente; en donde cada uno de x y y es un entero entre 19 y 40; en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente es dTdT y está covalentemente unido al terminal 3' de la hebra en la cual está presente; y en donde la secuencia de (N)_x comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos que tiene una cualquiera de las siguientes secuencias:

35 AGCUGCAUCAGGUUGGCAC (sec. con núm. de ident.:66);
UUCUAGAUGGAAGACCCAG (sec. con núm. de ident.:74);
UUGAACAUCAAGUGUAUUC (sec. con núm. de ident.:75);
AAAAAUUUGCAUAGGUCU (sec. con núm. de ident.:77);
UACUUGAACAUCAAGUGUA (sec. con núm. de ident.:79); y
AACUCAUUGAGCUUCCUGG (sec. con núm. de ident.:91),

40 y la secuencia de (N')_y comprende un segundo tramo de los nucleótidos contiguos, y en donde la estructura de hebra doble se genera por apareamiento de bases entre el primer tramo y el segundo tramo.

45 Otro aspecto de la presente descripción concierne un método para tratar un paciente que padece de un trastorno microvascular, que comprende que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801. En un aspecto, el inhibidor es una molécula ARNip, una molécula antisentido, un anticuerpo (tal como un anticuerpo neutralizante), un péptido negativo dominante o una ribozima.

50 Una modalidad adicional de la presente invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 para la preparación de un medicamento para promover la recuperación en un paciente que padece de un trastorno respiratorio. En una modalidad, el trastorno respiratorio es COPD. El inhibidor es un ARNip de la invención.

55 Una modalidad adicional de la presente invención proporciona proporciona el uso de una dosis terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 para la preparación de un medicamento para promover la recuperación en un paciente que padece de degeneración macular. En una modalidad, la degeneración macular es AMD. El inhibidor es un ARNip de la invención.

60 Una modalidad adicional de la presente invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 para la preparación de un medicamento para promover la recuperación en un paciente que padece de un trastorno microvascular. En una modalidad, el trastorno microvascular es la retinopatía diabética. El inhibidor es un ARNip de la invención.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

65

La presente invención, en algunas de sus modalidades, concierne la inhibición del gen RTP801 o polipéptido para el tratamiento de las enfermedades oculares, trastornos respiratorios y trastornos microvasculares, *entre otros*. Como se describe en la presente descripción los inhibidores a usarse con la presente invención son moléculas biológicas.

5 Sin estar atados a una teoría, los inventores de la presente invención encontraron que RTP801 está involucrado en varios estados de enfermedad que incluyen trastornos microvasculares, enfermedades oculares, trastornos respiratorios, y lesión y enfermedad de la médula espinal, y sería beneficioso inhibir RTP801 para tratar cualquiera de dichas enfermedades o trastornos. Los métodos, moléculas y composiciones que inhiben RTP801 se discuten en la presente descripción con detalle, y cualquiera de dichas moléculas y/o composiciones pueden emplearse
10 beneficiosamente en el tratamiento de un paciente que padece de cualquiera de dichas afecciones.

La invención se dirige a los compuestos ARNip que tienen la estructura de hebra doble:

15 5' (N)_x -Z 3' (cadena antisentido)
3' Z'-(N')_y 5' (cadena sentido),

en donde cada N y N' es un ribonucleótido que puede estar modificado o no modificado en su residuo azúcar y cada uno de (N)_x y (N')_y es un oligómero en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' por un enlace covalente; en donde cada uno de x y y es un entero entre 19 y 40; en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero
20 si está presente es dTdT y está covalentemente unido al terminal 3' de la hebra en la cual está presente; y en donde la secuencia de (N)_x comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos que tiene una cualquiera de las siguientes secuencias:

25 AGCUGCAUCAGGUUGGCAC (sec. con núm. de ident.:66);
UUCUAGAUGGAAGACCCAG (sec. con núm. de ident.:74);
UUGAACAUCAAGUGUAUUC (sec. con núm. de ident.:75);
AAAAUAUUGCAUAGGUCU (sec. con núm. de ident.:77);
UACUUGAACAUCAAGUGUA (sec. con núm. de ident.:79); and
30 AACUCAAUGAGCUUCCUGG (sec. con núm. de ident.:91),

y la secuencia de (N')_y comprende un segundo tramo de los nucleótidos contiguos, y en donde la estructura de hebra doble se genera por apareamiento de bases entre el primer tramo y el segundo tramo.

35 La presente descripción describe métodos y composiciones para inhibir la expresión del gen RTP801 *in vivo*. Generalmente, el método incluye administrar oligoribonucleótidos, tal como el los ARN interferentes pequeños (es decir, ARNip) que se dirigen a un ARNm particular e hibridan para este, o material de ácido nucleico que puede producir ARNip en una célula, en una cantidad suficiente para regular descendientemente la expresión de un gen objetivo por un mecanismo de interferencia del ARN. Particularmente, los ARNip sujetos pueden usarse para inhibir la expresión del gen RTP801 para el tratamiento de trastornos respiratorios, trastornos microvasculares o enfermedades oculares.

40 Así, en una modalidad la presente invención proporciona un ARNip sujeto para tratar un paciente que padece de un trastorno microvascular, una enfermedad ocular o un trastorno respiratorio, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de RTP801 en una cantidad terapéuticamente efectiva para de ese modo tratar al paciente. La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un ARNip
45 sujeto para tratar un paciente que padece de un trastorno microvascular, una enfermedad ocular o trastorno respiratorio, para administrar al paciente, en una dosificación y durante un período de tiempo suficiente para promover la recuperación. La enfermedad ocular puede ser degeneración macular tal como degeneración macular relacionada con la edad (AMD), *entre otros*. El trastorno microvascular puede ser retinopatía diabética o Insuficiencia renal aguda, *entre otros*. El trastorno respiratorio puede ser enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfisema, bronquitis crónica, asma y cáncer de pulmón, *entre otros*.

50 La presente descripción describe además un método para tratar un paciente que padece de degeneración macular, COPD o retinopatía diabética, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 que comprende un polinucleótido que que hibrida específicamente para el ARNm transcrito del gen RTP801 y / o regula descendientemente la expresión del gen RTP801 para de ese modo tratar al paciente. El polinucleótido puede ser un ARNip que comprende nucleótidos consecutivos que tienen una secuencia idéntica a una cualquiera de las secuencias que se exponen en las Tablas A-C (sec. con núms. de ident.:3-344) y particularmente, ARNip núms: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 y 50 de la Tabla A.

60 Más aún, un aspecto adicional de la presente descripción describe un método para tratar un paciente que padece de un trastorno microvascular, un trastorno respiratorio o una enfermedad ocular, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 que comprende una molécula ARNip, opcionalmente una molécula ARNip detallada en cualquiera de las Tablas A-C, en una dosificación y durante un período de tiempo para de ese modo tratar al paciente.

65 Para tratar un paciente que padece de un trastorno microvascular, un trastorno respiratorio o una enfermedad ocular se

proporciona una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva de un ARNip sujeto, particularmente ARNip núms: 14, 22, 23, 25, 27 o 39 de la Tabla A, a administrar al paciente en una dosificación y durante un período de tiempo para de ese modo tratar al paciente.

5 La presente descripción describe además un método para tratar un paciente que padece de un trastorno respiratorio, un trastorno microvascular o una enfermedad ocular o cualquiera de las afecciones descritas en la presente descripción, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva de una molécula ARNip que dirige el gen RTP801 del ARNm, opcionalmente una molécula ARNip detallada en las Tablas A-C, en una dosificación y durante un período de tiempo para de ese modo tratar al paciente. Más aun, la enfermedad ocular puede ser degeneración macular tal como degeneración macular relacionada con la edad (AMD); el trastorno microvascular puede ser retinopatía diabética o Insuficiencia renal aguda; el trastorno respiratorio puede ser COPD y los aspectos de COPD a ser tratados pueden comprender, pero sin limitarse a, enfisema, bronquitis crónica, o ambos.

15 "Tratar una enfermedad" se refiere a administrar una sustancia terapéutica efectiva para mejorar los síntomas asociados con una enfermedad, para disminuir la severidad o curar la enfermedad, o para prevenir que ocurra la enfermedad.

Una "dosis terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto o composición farmacéutica que es efectiva para alcanzar una mejora en un paciente o su sistema fisiológico que incluyen, pero sin limitarse a, mejora de la tasa de supervivencia, recuperación más rápida, o mejora o eliminación de los síntomas, y otros indicadores seleccionados como medidas de determinación adecuadas por aquellos con experiencia en la materia.

20 Los métodos para tratar las enfermedades descritas en la presente descripción pueden incluir administrar un inhibidor de RTP801 en conjunto con un inhibidor de RTP801 adicional, una sustancia que mejora las propiedades farmacológicas del ingrediente activo como se detalla más abajo, o un compuesto adicional conocido por ser efectivo en el tratamiento de la enfermedad a tratar, tales como degeneración macular, COPD, ARF, DR, *entre otros*. Por "en conjunto con" se entiende antes de, simultáneamente o posteriormente a. Otros detalles de las terapias conjuntas ilustrativas se dan más abajo.

30 En otra modalidad, la presente invención proporciona el uso de una dosis terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 para la preparación de un medicamento para promover la recuperación en un paciente que padece de degeneración macular, COPD, ARF, DR, o cualquier otra enfermedad ocular, afección microvascular o respiratoria como se detalla anteriormente, y el uso de una dosis terapéuticamente efectiva de un ARNip sujeto para la preparación de un medicamento para tratar dichas enfermedades y afecciones. En esta modalidad, el inhibidor de RTP801 comprende un polinucleótido que comprende nucleótidos consecutivos que tienen una secuencia que comprende una secuencia antisentido para la secuencia que se expone en la Figura 1 (sec. con núm. de ident.: 1). Además, el inhibidor de RTP801 puede ser un vector de expresión que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia que es una secuencia antisentido para la secuencia que se expone en la Figura 1 (sec. con núm. de ident.:1). Además, el inhibidor de RTP801 es un ARNip, opcionalmente, ARNip núms: 14, 22, 23, 25, 27; 39, de la Tabla A.

40 Así, de acuerdo con la información descrita en la presente descripción, el inhibidor de RTP801 a usarse con cualquiera de los métodos descritos en la presente, en cualquiera de los usos descritos en la presente y en cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, pueden seleccionarse del grupo que consiste en una molécula ARNip, un vector que comprende una molécula ARNip, un vector que puede expresar una molécula ARNip y cualquier molécula que se procese endógenamente en una molécula ARNip. Como se detalla en la presente, dicha molécula ARNip es preferentemente un ARNip que comprende nucleótidos consecutivos con una secuencia idéntica a una cualquiera de las secuencias sec. con núm. de ident.: 66, 74, 75, 77, 79 y 91 que se exponen en la Tabla A y particularmente, los ARNip núms:14, 22, 23, 25, 27, 39, de la Tabla A.

50 "Trastorno respiratorio" se refiere a las afecciones, enfermedades o síndromes del sistema respiratorio que incluyen pero sin limitarse a trastornos pulmonares de todo tipo incluyendo la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfisema, bronquitis crónica, asma y cáncer de pulmón, *entre otros*. El enfisema y la bronquitis crónica pueden ocurrir como parte de la COPD o independientemente.

55 "Trastorno microvascular" se refiere a cualquier afección que afecte los capilares microscópicos y linfáticos, particularmente las enfermedades vasoespásticas, enfermedades vasculíticas y enfermedades oclusivas linfáticas. Los ejemplos de trastornos microvasculares incluyen, entre otros: enfermedades oculares tales como Amaurosis Fugax (embólicas o secundarias a SLE), síndrome apla, deficiencia de Prot CS y ATIII, patologías microvasculares causadas por el uso del fármaco IV, disproteinemia, arteritis temporal, neuropatía óptica isquémica anterior, neuritis óptica (primaria o secundaria a enfermedades autoinmunes), glaucoma, síndrome de von hippel lindau, trastornos de la córnea, rechazo al trasplante de córnea, cataratas, enfermedad de Eales, angiitis en rama escarchada, operación de cerclaje, uveitis que incluye pars planitis, melanoma coroideo, hemangioma coroideo, aplasia del nervio óptico; afecciones de la retina tales como oclusión de la arteria de la retina, oclusión de la vena de la retina, retinopatía del prematuro, retinopatía por HIV, retinopatía de Purtscher, retinopatía de vasculitis sistémica y enfermedades autoinmunes, retinopatía diabética, retinopatía hipertensiva, retinopatía por radiación, oclusión de la vena o arteria retinal ramal, vasculitis retinal idiopática, aneurismas, neuroretinitis, embolización retinal, necrosis retinal aguda,

retinocoroidopatía de Birdshot, desprendimiento de la retina de larga duración; afecciones sistémicas tales como Diabetes mellitus, retinopatía diabética (DR), patologías microvasculares relacionadas con la diabetes (como se detalla en la presente), síndromes de hiperviscosidad, síndromes del arco aórtico y síndromes isquémicos oculares, fístula carótido-cavernosa, escleritis múltiple, lupus eritematoso sistémico, arteriolitis con autoanticuerpo SS-A, vasculitis hemorrágica multifocal aguda, vasculitis resulante de la infección, vasculitis resultante de la enfermedad de Behçet, sarcoidosis, coagulopatías, neuropatías, nefropatías, enfermedades microvasculares del riñón, y afecciones microvasculares isquémicas, entre otras

Los trastornos microvasculares pueden comprender un elemento neovascular. El término "trastorno neovascular" se refiere a aquellas afecciones donde la formación de los vasos sanguíneos (neovascularización) es nociva para el paciente. Los ejemplos de neovascularización ocular incluyen: enfermedades de la retina (retinopatía diabética, edema macular diabético, glaucoma crónico, desprendimiento de la retina, y retinopatía de células falciformes); rubeosis iridis; vitreo-retinopatía proliferativa; enfermedades inflamatorias; uveitis crónica; neoplasmos (retinoblastoma, pseudoglioma y melanoma); iridociclitis heterocrómica de Fuchs; glaucoma neovascular; neovascularización de la cornea (hipoplasia inflamatoria, de trasplante y de desarrollo del iris); neovascularización después de una vitrectomía y lensectomía combinada; enfermedades vasculares (isquemia de la retina, insuficiencia coroideo vascular, trombosis coroidea y isquemia de la arteria carótida); neovascularización del nervio óptico; y neovascularización debido a la penetración del ojo o lesión ocular contundente. Todas estas afecciones neovasculares pueden tratarse usando los compuestos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

"Enfermedad ocular" se refiere a las afecciones, enfermedades o síndromes de los ojos que incluyen pero sin limitarse a cualquier afección que involucre la neovascularización coroidea (CNV), AMD húmeda y seca, síndrome de histoplasmosis ocular, estrías angioides, rupturas en la membrana de Bruch, degeneración miope, tumores oculares, enfermedades degenerativas de la retina y oclusión de la vena de la retina (RVO). Algunas afecciones descritas en la presente, tal como DR, que pueden tratarse con los compuestos ARNip de la presente invención se han considerado como un trastorno microvascular y una enfermedad ocular, o ambos, bajo las definiciones presentadas en la presente.

"Gen RTP801" se refiere al marco de lectura abierto de la secuencia que codifica RTP801, como se muestra en la Figura 1 (sec. con núm. de ident.:1), o cualquier secuencia homóloga de esta preferentemente con al menos 70% de identidad, mas preferentemente 80% de identidad, aún con mayor preferencia 90% o 95% de identidad. Esto abarca cualquier secuencia derivada de la sec. con núm. de ident.:1 la que se sometió a mutaciones, alteraciones o modificaciones como se describe en la presente. Así, en una modalidad preferida el RTP801 es codificado por una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1. Está además dentro de la presente invención que los ácido nucleicos de acuerdo con la presente invención son sólo complementarios e idénticos, respectivamente, a una parte del ácido nucleico que codifica para RTP801 cuando, preferentemente, el primer tramo y la primera hebra es típicamente más corta que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Debe conocerse además que basado en la secuencia de aminoácido de RTP801 cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácido puede ser percibida por una persona con experiencia en la técnica basado en el código genético. Sin embargo, debido al modo de acción asumido de los ácido nucleicos de acuerdo con la presente invención, es más preferido que el ácido nucleico que codifica para RTP801, preferentemente el ARNm de este, es uno presente en el organismo, tejido y/o célula, respectivamente, donde la expresión de RTP801 se va a reducir.

"Polipéptido RTP801" se refiere al polipéptido del gen RTP801, y se entiende que incluye, para los propósitos de la presente invención, los términos "RTP779", "REDD1", "Ddit4", "FLJ20500", "Dig2", y "PRF1", derivados de cualquier organismo, opcionalmente el hombre, variantes y fragmentos de empalme de estos que mantienen una actividad biológica, y homólogos de estos, preferentemente con al menos 70%, con mayor preferencia al menos 80%, aún con mayor preferencia al menos 90% o 95% de homología a estos. Adicionalmente, se entiende que este término abarca los polipéptidos resultantes de alteraciones menores en la secuencia codificante de RTP801, tales como, *entre otros*, mutaciones puntuales, sustituciones, deleciones e inserciones que pueden causar una diferencia en unos pocos aminoácidos entre el polipéptido resultante y el RTP801 de de origen natural. Los polipéptidos codificados por las secuencias de ácido nucleico que se unen a la secuencia codificante o secuencia genómica de RTP801 bajo condiciones de hibridación muy rigurosas, que se conocen bien en la materia (por ejemplo, Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988), actualizado en 1995 y 1998), son abarcadas también por este término. El RTP801 químicamente modificado o los fragmentos de RTP801 químicamente modificados se incluyen además en el término, siempre que la actividad biológica se mantenga. El RTP801 tiene o comprende preferentemente una secuencia de aminoácido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 2. Se conoce que pueden haber diferencias en la secuencia de aminoácidos entre varios tejidos de un organismo y entre diferentes organismos de una especie o entre diferentes especies a las cuales el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede aplicarse en varias modalidades de la presente invención. Sin embargo, basado en la enseñanza técnica proporcionada en la presente, la secuencia respectiva puede tomarse en consideración correspondientemente cuando se diseña cualquiera de los ácido nucleicos de acuerdo con la presente invención. Los fragmentos particulares de RTP801 incluyen los aminoácidos 1-50, 51-100, 101-150, 151-200 y 201-232 de la secuencia mostrada en la Figura 2. Otros fragmentos particulares de RTP801 incluyen los aminoácidos 25-74, 75-124, 125-174, 175-224 y 225-232 de la secuencia mostrada en la Figura 2.

RTP801 como se usa en la presente es una proteína descrita, entre otros, en WO 99/09046. RTP801 la cual se refiere además como RTP801, ha sido descrita como un objetivo transcriptional de HIF-1 α por Shoshani T y otros (Shoshani y otros, 2002, Mol Cell Biol, 22, 2283-93). Además, el estudio de Ellisen y otros (Ellisen y otros, Mol Cell, 10, 995-1005) identificó a RTP801 como un gen de respuesta al daño del ADN dependiente de p53 y como un gen dependiente de p63 involucrado en la diferenciación epitelial. Además, el RTP801 imita el patrón específico de tejido del miembro p63 de la familia p53, es efectivo similar a o adicionalmente a TP 63, es un inhibidor para la diferenciación *in vitro*, y está involucrado en la regulación de especies de oxígeno reactivas. Además de eso, RTP801 es sensible al factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) del factor de transcripción sensible a la hipoxia y típicamente se regula ascendentemente durante la hipoxia *in vitro* e *in vivo* en un modelo animal de accidente cerebro vascular isquémico. El RTP801 parece funcionar en la regulación de especies de oxígeno reactivas (ROS) y los niveles de ROS y la sensibilidad reducida al estrés oxidativo aumentan después de la expresión ectópica de RTP801 (Ellisen y otros 2002, supra; Soshani y otros 2002, supra). Preferentemente, RTP801 es una proteína RTP801 biológicamente activa que exhibe preferentemente al menos una de esas características, preferiblemente dos o más y con la máxima preferencia todas y cada una de esas características.

Un gen relacionado con RTP801 es RT801L, referido además como "REDD2", fue descubierto por los inventores de la presente invención. El RTP801L es homólogo a RTP801, y reacciona de manera similar al estrés oxidativo; y así, RTP801L posee probablemente algunas funciones similares a RTP801.

Sin estar atados a una teoría, RTP801 es una proteína inducible por estrés (que responde a la hipoxia, estrés oxidativo, estrés térmico, estrés ER) es un factor que actúa en sintonía con la respuesta de la célula al desbalance de energía. Como tal, es *un objetivo* adecuado para el tratamiento de cualquier enfermedad donde las células deben rescatarse de la apoptosis debido a las condiciones estresantes (por ejemplo, enfermedades acompañadas por la muerte de células normales) o donde las células, que se adaptan a las condiciones estresantes debido a los cambios en la expresión de RTP801 (por ejemplo, células de cáncer), deben eliminarse. En el último caso, RTP801 puede ser observado como un factor de supervivencia para las células de cáncer y sus inhibidores pueden tratar el cáncer como una monoterapia o como fármacos sensibles en combinación con quimioterapia o radioterapia.

El término "polinucleótido" se refiere a cualquier molécula compuesta por nucleótidos de ADN, nucleótidos de ARN o una combinación de los dos tipos, es decir, que comprende dos o más bases guanidina, citosina, timidina, adenina, uracilo o inosina, *entre otros*. Un polinucleótido puede incluir nucleótidos naturales, nucleótidos químicamente modificados y nucleótidos sintéticos, o análogos químicos de estos. El término incluye los "oligonucleótidos" y abarca los "ácido nucleicos".

El término "aminoácido" se refiere a una molécula que consiste en uno cualquiera de los 20 aminoácidos de de origen natural, aminoácidos que han sido químicamente modificados (ver más abajo), o aminoácidos sintéticos.

El término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta por dos o más residuos de aminoácidos. El término incluye péptidos, polipéptidos, proteínas y peptidomiméticos.

Un "peptidomimético" es un compuesto que contiene elementos estructurales no peptídicos que es capaz de imitar las acciones biológicas de un péptido parental natural. Algunas características del péptido clásico tales como enlaces peptídicos enzimáticamente escindible no están presentes normalmente en un peptidomimético.

Por el término "péptido negativo dominante" se entiende un polipéptido codificado por un fragmento de ADNc que codifica para una parte de una proteína (ver Herskowitz I.: Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. Nature. 1987 sep 17-23;329(6136):219-22. Review; Roninson IB y otros, Genetic suppressor elements: new tools for molecular oncology--thirteenth Cornelius P. Rhoads Memorial Award Lecture. Cancer Res. 1995 sep 15;55(18):4023). Este péptido puede tener una función diferente de la proteína de la que se deriva. Este puede interactuar con la proteína completa e inhibe su actividad o puede interactuar con otras proteínas e inhibir su actividad en respuesta a la proteína de longitud completa (parental). Dominante negativo significa que el péptido es capaz de superar la proteína natural parental e inhibir su actividad para dar a la célula una característica diferente, tal como resistencia o sensibilización a la muerte o cualquier fenotipo celular de interés. Por intervención terapéutica el péptido en sí mismo puede suministrarse como el ingrediente activo de una composición farmacéutica, o el ADNc se puede suministrar a la célula utilizando métodos conocidos.

Preparación de péptidos y polipéptidos

Los polipéptidos se pueden producir mediante varios métodos, por ejemplo:

1) Sintéticamente:

Los polipéptidos sintéticos se pueden preparar por medio del uso de una máquina comercialmente disponible, por medio del uso de la secuencia conocida de RTP801 o una porción de la misma.

2) Métodos recombinantes:

Un método preferido de fabricación de los polipéptidos RTP801 de fragmentos de los mismos es clonar un polinucleótido que comprende el ADNc del gen de RTP801 en un vector de expresión y cultivar la célula que alberga el vector de manera que exprese el polipéptido codificado, y después purificar el polipéptido resultante, todo lo cual se lleva a cabo usando métodos conocidos en la materia como se describe en, por ejemplo, Marshak y otros, "Strategies for Protein Purification and Characterization. A laboratory course manual." CSHL Press (1996). Además, ver Bibl Haematol. 1965;23:1165-74 Appl Microbiol. 1967 jul;15(4):851-6; Can J Biochem. 1968 may; 46(5): 441-4; Biochemistry. 1968 jul; 7(7):2574-80; Arch Biochem Biophys. 1968 sep 10;126(3): 746-72; Biochem Biophys Res Commun. 1970 feb 20; 38(4): 825-30.).

El vector de expresión puede incluir un promotor para controlar la transcripción del material heterólogo y puede ser un promotor constitutivo o inducible para permitir la transcripción selectiva. Se pueden incluir opcionalmente potenciadores que pueden requerirse para obtener los niveles de transcripción necesarios. El vehículo de expresión también puede incluir un gen de selección.

Los vectores se pueden introducir en células o tejidos por cualquiera de una variedad de métodos que se conocen dentro de la materia. Tales métodos se pueden encontrar generalmente descritos en Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, Baltimore, Maryland (1989), Vega y otros, Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor, MI (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston MA (1988) y Gilboa y otros. (1986).

3) Purificación a partir de fuentes naturales:

El polipéptido RTP801, o fragmentos de este de origen natural, se pueden purificar a partir de fuentes naturales (tales como tejidos) por medio del uso de muchos métodos conocidos por alguien con experiencia ordinaria en la materia, tales como por ejemplo: inmuno-precipitación con un anticuerpo anti-RTP801, o cromatografía de afinidad con cualquier molécula que se conoce se une a RTP801 unida a una matriz.

La purificación de proteínas se practica como se conoce en la materia como se describe en, por ejemplo, Marshak y otros, "Strategies for Protein Purification and Characterization. A laboratory course manual." CSHL Press (1996).

Por "efecto biológico de RTP801" o "actividad biológica de RTP801" se entiende el efecto de RTP801 en los trastornos de las vías respiratorias, que puede ser directo o indirecto, e incluye, sin limitarse por la teoría, el efecto de RTP801 sobre la apoptosis de las células alveolares que se induce por condiciones de hipoxia o hiperoxia. El efecto indirecto incluye, pero no se limita a, RTP801 que se une a o tiene un efecto sobre una de varias moléculas, las cuales se involucran en una cascada de transducción de la señal que resulta en la apoptosis.

"Apoptosis" se refiere a un tipo fisiológico de muerte celular que resulta de la activación de algunos mecanismos celulares, es decir, la muerte es controlada por la maquinaria de la célula. La apoptosis puede ser, por ejemplo, el resultado de la activación de la maquinaria de la célula por un desencadenante externo, por ejemplo, una citoquina o un anticuerpo anti-FAS, lo que conduce a la muerte celular o por una señal interna. El término "muerte celular programada" también se puede usar de manera intercambiable con "apoptosis".

"Enfermedad relacionada con la apoptosis" se refiere a una enfermedad cuya etiología está relacionada, ya sea total o parcialmente con el proceso de la apoptosis. La enfermedad puede causarse por un mal funcionamiento del proceso de apoptosis (tal como en el cáncer o una enfermedad autoinmune) o por la sobreactividad del proceso de apoptosis (tal como en ciertas enfermedades neurodegenerativas). Muchas enfermedades que implican el RTP801 son enfermedades relacionadas con la apoptosis. Por ejemplo, la apoptosis es un mecanismo importante en la AMD seca, en la cual tiene lugar la atrofia lenta de las células fotorreceptoras y del epitelio de pigmento, principalmente en la región central de la retina (macular). La apoptosis neurorretiniana es también un mecanismo importante en la retinopatía diabética.

Un "inhibidor" es un compuesto que es capaz de inhibir la actividad de un gen o del producto de dicho gen en un grado suficiente para conseguir un efecto biológico o fisiológico deseado. Un "inhibidor de RTP801" es un compuesto que es capaz de inhibir la actividad del gen RTP801 o del producto génico RTP801, particularmente del gen RVP801 o del producto génico humano. Tales inhibidores incluyen sustancias que afectan la transcripción o traducción del gen, así como sustancias que afectan la actividad del producto génico. Un inhibidor de RTP801 también puede ser un inhibidor del promotor RTP801. Los ejemplos de tales inhibidores pueden incluir, *entre otros*: polinucleótidos tales como fragmentos AS, ARNip o vectores que los contienen; polipéptidos tales como los negativos dominantes, anticuerpos y enzimas; ARN catalíticos, tales como ribozimas, y moléculas químicas con un bajo peso molecular por ejemplo un peso molecular inferior a 2000 daltons. Los inhibidores específicos de RTP801 se dan más abajo.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que tiene la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogos en una célula ajena. Muchos vectores de expresión en procariontes y eucariotes se conocen y/o están comercialmente disponibles. La selección de vectores de expresión apropiados está dentro del conocimiento de los que tienen experiencia en la materia.

Los términos "compuesto químico", "molécula pequeña", "molécula química", "molécula química pequeña" y "compuesto

químico pequeño" se usan indistintamente en la presente y se entiende que se refieren a porciones químicas de cualquier tipo particular que pueden producirse sintéticamente u obtenerse a partir de fuentes naturales y usualmente tienen un peso molecular de menos de 2000 daltons, menos de 1000 daltons o incluso menos de 600 daltons.

5 La presente invención también se refiere a ácidos nucleicos funcionales que comprenden una estructura de hebra doble, su uso para la fabricación de un medicamento, una composición farmacéutica que comprende tales ácidos nucleicos funcionales y un método para el tratamiento de un paciente.

La hipoxia se reconoce como un elemento clave en el mecanismo patogénico de un buen número de enfermedades tales como el accidente cerebro vascular, el enfisema y el infarto las cuales se asocian con disponibilidad de oxígeno sub-óptima y respuestas a las condiciones de hipoxia que dañan los tejidos. En los tejidos de crecimiento rápido, que incluyen el tumor, una disponibilidad de oxígeno sub-óptima se compensa por una neo-angiogénesis indeseada. Por lo tanto, al menos en caso de enfermedades de cáncer, el crecimiento de la vasculatura no es deseado.

15 En vista de esto, la inhibición de la angiogénesis y el crecimiento vascular, respectivamente, se somete a intensa investigación. Ya hoy algunos compuestos están disponibles los cuales inhiben la angiogénesis y el crecimiento vascular indeseados. Algunos de los compuestos más destacados son los que inhiben el VEGF y el receptor del VEGF. En ambos casos, el efecto de VEGF se evita por el bloqueo del VEGF como tal, por ejemplo, usando un anticuerpo dirigido contra el VEGF tal como el buscado por Genentech's AVASTIN (AB monoclonal específico para VEGF) (Ferrara N.; Endocr Rev. 2004 ago;25(4):581-611), o bloqueando el receptor correspondiente, es decir, el receptor VEGF (Traxler P; Cancer Res. 2004 jul 15;64(14):4931-41; o Stadler WM y otros, Clin Cancer Res. 2004 may 15;10(10):3365-70).

25 Sin embargo, como la angiogénesis y el crecimiento de la vasculatura es un proceso muy básico y vital en cualquier animal y ser humano, el efecto de este tipo de compuesto tiene que enfocarse al sitio particular donde la angiogénesis y el crecimiento vascular no se desea realmente lo que hace adecuado dirigir o suministrar un asunto crítico en relación con este tipo de aproximación terapéutica.

Es así un objetivo de la presente invención proporcionar otros medios para el tratamiento de enfermedades que involucran el crecimiento indeseado de la vasculatura y la angiogénesis, respectivamente.

30 Por "ARN interferente pequeño " (ARNip) se entiende una molécula de ARN que disminuye o silencia (previene) la expresión de un gen/ ARNm de su contraparte celular endógena. El término se entiende que abarca el "ARN de interferencia" (ARNi). El ARN de interferencia (ARNi) se refiere al proceso de silenciamiento génico post transcripcional específico de secuencia en mamíferos mediado por los ARN interferentes pequeños (ARNip) (Fire y otros, 1998, Nature 391, 806). El proceso correspondiente en plantas se refiere comúnmente como silenciamiento génico post transcripcional específico o silenciamiento de ARN y se refiere además como extinción en hongos. La respuesta del ARN de interferencia puede caracterizar un complejo de endonucleasa que contiene un ARNip, comúnmente referido como un complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que media la escisión del ARN de cadena sencilla que tiene la secuencia complementaria a la cadena antisentido del ARNip bicatenario. La escisión del ARN objetivo puede tener lugar en el medio de la región complementaria a la cadena antisentido del ARNip bicatenario. (Elbashir y otros 2001, Genes Dev., 15, 188). Para información reciente de estos términos y mecanismos propuestos, ver Bernstein E., Denli AM., Hannon GJ: The rest is silence. RNA. 2001 nov;7(11):1509-21; y Nishikura K.: A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. Cell. 2001 nov 16;107(4):415-8. Los ejemplos de moléculas de ARNip se dan en las Tablas A-C.

45 Durante los años recientes, el ARNi emergió como uno de los métodos más eficientes para la inactivación de genes (Nature Reviews, 2002, v.3, p.737-47; Nature, 2002, v.418,p.244-51). Como un método, se basa en la capacidad de las especies de ARNbc de entrar a un complejo de proteína específico, donde este se dirige después al ARN celular complementario y lo degrada específicamente. Con más detalle, los ARNbc se digieren en ARN inhibidores (ARNip) cortos (17-29 bp) por las ARNsas de tipo III (DICER, Drosha, etc) (Nature, 2001, v.409, p.363-6; Nature, 2003, 425, p.415-9). Estos fragmentos y ARNm complementario son reconocidos por el complejo de proteína RISC específico. El proceso completo culmina por la escisión de la endonucleasa del ARNm objetivo (Nature Reviews, 2002, v.3, p.737-47; Curr Opin Mol Ther. 2003 jun;S(3):217-24).

55 Para la descripción de cómo diseñar y preparar ARNip para genes conocidos ver, por ejemplo, Chalk AM, Wahlestedt C, Sonnhammer EL. Improved and automated prediction of effective siRNA Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004 jun 18;319(1):264-74; Sioud M, Leirdal M., Potential design rules and enzymatic synthesis of siRNAs, Methods Mol Biol.2004;252:457-69; Levenkova N, Gu Q, Rux JJ.: Gene specific ARNip selector Bioinformatics. 2004 feb 12;20(3):430-2. y Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K., Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference Nucleic Acids Res. 2004 feb 9;32(3):936-48. Ver además Liu Y, Braasch DA, Nulf CJ, Corey DR. Efficient and isoform-selective inhibition of cellular gene expression by peptide nucleic acids Biochemistry, 2004 feb 24;43(7):1921-7. Ver además las publicaciones PCT WO 2004/015107 (Atugen) y WO 02/44321 (Tuschl y otros), y además Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis, RNA 2003 sep;9(9):1034-48 y las patentes de Estados Unidos núms.5898031 y 6107094 (Crooke) para la producción de ARNip modificados/ más estables.

5 Se han desarrollado vectores basados en el ADN capaces de generar un ARNip dentro de las células. El método generalmente involucra la transcripción de ARN de horquilla corta que son eficientemente procesados para formar el ARNip dentro de las células. Paddison y otros PNAS 2002, 99:1443-1448; Paddison y otros Genes & Dev 2002, 16:948-958; Sui y otros PNAS 2002, 8:5515-5520; y Brummelkamp y otros Science 2002, 296:550-553. Estos reportes describen métodos para generar los ARNip capaces de dirigir específicamente numerosos genes expresados endógena y exógenamente.

10 Para suministrar ARNip, ver, por ejemplo, Shen y otros (FEBS letters 539: 111-114 (2003)), Xia y otros, Nature Biotechnology 20: 1006-1010 (2002), Reich y otros, Molecular Vision 9: 210-216 (2003), Sorensen y otros (J.Mol.Biol. 327: 761-766 (2003), Lewis y otros, Nature Genetics 32: 107-108 (2002) y Simeoni y otros, Nucleic Acids Research 31, 11: 2717-2724 (2003). Recientemente el ARNip se usó exitosamente para la inhibición en primates; para más detalles ver Tolentino y otros, Retina 24(1) febrero 2004 pp 132-138.

15 **ARNip de la presente invención**

Especificaciones generales de los ARNip de la presente invención

20 Generalmente, los ARNip que se usan en la presente invención comprenden un ácido ribonucleico que comprende una estructura de hebra doble, donde la estructura de hebra doble comprende una primera hebra y una segunda hebra, donde la primera hebra comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos y en el que dicho primer tramo es al menos parcialmente complementario a un ácido nucleico objetivo, y la segunda hebra comprende un segundo tramo de nucleótidos contiguos y donde dicho segundo tramo es al menos parcialmente idéntico a un ácido nucleico objetivo, por lo cual dicha primera hebra y / o dicha segunda hebra comprenden un pluralidad de grupos de nucleótidos modificados que tienen una modificación en la posición 2' por lo cual dentro de la hebra cada grupo de nucleótidos modificados está flanqueado en uno o ambos lados por un grupo de nucleótidos flanqueadores en el cual los nucleótidos flanqueadores que forman el grupo de nucleótidos flanqueadores es o bien un nucleótidos sin modificar o un nucleótido que tiene una modificación distinta de la modificación de los nucleótidos modificados. Además, dicha primera hebra y/o dicha segunda hebra puede comprender dicha pluralidad de nucleótidos modificados y puede comprender dicha pluralidad de grupos de nucleótidos modificados.

35 El grupo de nucleótidos modificados y/o el grupo de nucleótidos flanqueadores puede comprender un número de nucleótidos donde el número se selecciona del grupo que comprende un nucleótido a 10 nucleótidos. En relación con cualquier intervalo especificado en la presente se entiende que cada intervalo describe cualquier número entero individual entre las cifras respectivas que se usan para definir el intervalo lo que incluye dichas dos cifras que definen dicho intervalo. En el presente caso, el grupo comprende por tanto un nucleótido, dos nucleótidos, tres nucleótidos, cuatro nucleótidos, cinco nucleótidos, seis nucleótidos, siete nucleótidos, ocho nucleótidos, nueve nucleótidos y diez nucleótidos.

40 El patrón de nucleótidos modificados de dicha primera hebra puede ser el mismo que el patrón de nucleótidos modificados de dicha segunda hebra, y puede alinearse con el patrón de dicha segunda hebra. Adicionalmente, el patrón de dicha primera hebra se puede cambiar por uno o más nucleótidos en relación con el patrón de la segunda hebra.

45 Las modificaciones que se discuten anteriormente se pueden seleccionar del grupo que comprende amino, flúor, metoxi, alcoxi y alquilo.

50 La estructura de hebra doble de los ARNip puede ser de extremos romos, en uno o ambos lados. Más específicamente, la estructura de hebra doble puede ser de extremos romos en el lado de la estructura de hebra doble, la cual se define por el extremo 5' de la primera hebra y el extremo 3' de la segunda hebra, o la estructura de hebra doble puede ser de extremos romos en el lado de la estructura de hebra doble, que se define por el extremo 3' de la primera hebra y el extremo 5' de la segunda hebra.

55 Adicionalmente, al menos una de las dos hebras puede tener un saliente de al menos un nucleótido en el extremo 5'; el saliente puede consistir en al menos un desoxirribonucleótido. Al menos una de las hebras también puede opcionalmente tener un saliente de al menos un nucleótido en el extremo 3'.

60 La longitud de la estructura de hebra doble del ARNip es típicamente de aproximadamente 17 a 21 y con mayor preferencia de 18 o 19 bases. Además, la longitud de dicha primera hebra y/o la longitud de dicha segunda hebra pueden independientemente una de la otra seleccionarse del grupo que comprende los intervalos de desde aproximadamente 15 a aproximadamente 23 bases, bases 17 a 21 y 18 o 19 bases.

65 Adicionalmente, la complementariedad entre dicha primera hebra y el ácido nucleico objetivo puede ser perfecta, o el dúplex que se forma entre la primera hebra y el ácido nucleico objetivo puede comprender al menos 15 nucleótidos donde hay una falta de coincidencia o dos faltas de coincidencia entre dicha primera hebra y el ácido nucleico objetivo que forma dicha estructura de hebra doble.

En algunos casos, tanto la primera hebra como la segunda hebra comprenden cada una al menos un grupo de nucleótidos modificados y al menos un grupo de nucleótidos flanqueadores, en el que cada grupo de nucleótidos modificados comprende al menos un nucleótido y en el que cada grupo de nucleótidos flanqueadores comprende al menos un nucleótido con cada grupo de nucleótidos modificados de la primera hebra que se alinean con un grupo de nucleótidos flanqueadores en la segunda hebra, por lo cual la mayoría de los nucleótidos 5' terminales de la primera hebra es un nucleótido del grupo de nucleótidos modificados, y la mayoría de los nucleótidos 3' terminales de la segunda hebra es un nucleótido del grupo de nucleótidos flanqueadores. Cada grupo de nucleótidos modificados puede consistir en un solo nucleótido y/o cada grupo flanqueador de nucleótidos puede consistir en un solo nucleótido.

Adicionalmente, es posible que en la primera hebra el nucleótido que forma el grupo flanqueador de nucleótidos es un nucleótido no modificado que está dispuesto en dirección 3' con respecto al nucleótido que forma el grupo de nucleótidos modificados, y en la segunda hebra el nucleótido que forma el grupo de nucleótidos modificados es un nucleótido modificado que está dispuesto en dirección 5' con respecto al nucleótido que forma el grupo de nucleótidos flanqueadores.

Además la primera hebra del ARNip puede comprender ocho a doce, preferentemente de nueve a once, grupos de nucleótidos modificados, y la segunda hebra puede comprender de siete a once, preferentemente ocho a diez, grupos de nucleótidos modificados.

La primera hebra y la segunda hebra pueden estar unidas por una estructura de bucle, que puede estar compuesta por un polímero de ácido no-nucleico, tales como, *entre otros*, polietilenglicol. Alternativamente, la estructura de bucle puede estar compuesta por un ácido nucleico.

Además, el extremo 5' de la primera hebra del ARNip puede estar unido con el extremo 3' de la segunda hebra, o el extremo 3' de la primera hebra puede estar unido con el extremo 5' de la segunda hebra, donde dicho enlace es a través de un conector de ácido nucleico que tiene típicamente una longitud de entre 10-2000 nucleobases.

Especificaciones particulares de los ARNip de la presente invención

La invención proporciona un compuesto que tiene la estructura de hebra doble (estructura A):

$$\begin{array}{l} 5' (N)_x - Z 3' \text{ (cadena antisentido)} \\ 3' Z'-(N')_y 5' \text{ (cadena sentido)} \end{array}$$

donde cada N y N' es un ribonucleótido que puede estar modificado o no modificado en su residuo azúcar y (N)_x y (N')_y es un oligómero en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' por un enlace covalente; en donde cada uno de x e y es un entero entre 19 y 40;

en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente es dTdT y está covalentemente unido al

terminal 3' de la hebra en la cual está presente;

y en donde la secuencia de (N)_x comprende un primer tramo de los nucleótidos contiguos que tienen una de las siguientes secuencias: AGCUGCAUCAGGUUGGCAC (sec. con núm. de ident.:66); UUCUAGAUGGAAGACCCAG (sec. con núm. de ident.:74); UUGAACAUCAAGUGUAUUC (sec. con núm. de ident.:75); AAAAAUUAUGCAUAGGUCU (sec. con núm. de ident.:77); UACUUGAACAUCAAGUGUA (sec. con núm. de ident.:79); y AACUCAUAGAGCUUCCUGG (sec. con núm. de ident.:91), y la secuencia de (N')_y comprende un segundo tramo de los nucleótidos contiguos, y en donde la estructura de hebra doble se genera por apareamiento de bases entre el primer tramo y el segundo tramo.

Particularmente, la invención proporciona el compuesto anterior en donde el enlace covalente es un enlace fosfodiéster, en donde x = y, preferentemente en donde x = y = 19, en donde Z y Z' están ausentes, en donde al menos un ribonucleótido se modifica en su residuo azúcar en la posición 2', en donde la porción en la posición 2' es metoxi (2'-O-metilo) en donde ribonucleótidos alternos se modifican en la cadena antisentido y sentido en donde los ribonucleótidos en los terminales 5' y 3' de la cadena antisentido se modifican en sus residuos azúcar, y los ribonucleótidos en los terminales 5' y 3' de la cadena sentido no se modifican en sus residuos azúcar.

Más aún, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la estructura (A) anterior (que tiene cualquiera de los específicos mencionados anteriormente) en una cantidad terapéuticamente efectiva, para tratar un paciente que padece de un trastorno respiratorio, una enfermedad ocular, un trastorno microvascular, o una lesión o enfermedad de la médula espinal. Además, la invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de la estructura (A) anterior (que tiene cualquiera de los específicos mencionados anteriormente) para la preparación de un medicamento para promover la recuperación en un paciente que padece de un trastorno respiratorio, una enfermedad ocular, un trastorno microvascular o lesión o enfermedad de la médula espinal.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la estructura (A) anterior para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades y afecciones mencionadas en la presente.

5

Más aún, este aspecto proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más compuestos de la estructura (A) anterior para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades y afecciones mencionadas en la presente, con lo cual dichos compuestos pueden mezclarse físicamente en la composición farmacéutica en cantidades que generan una actividad igual o de cualquier otra forma beneficiosa, o pueden estar covalentemente o no-covalentemente enlazados, o unidos juntos por un enlazador de ácido nucleico de una longitud en el intervalo de 2-100, preferentemente 2-50 o 2-30 nucleótidos. Tales moléculas de ARNip están por lo tanto compuestas de una estructura de ácido nucleico de hebra doble como se describió en la presente, con lo cual dos secuencias de ARNip seleccionadas de la Tabla A, ID núms: 14, 22, 23, 25, 27, 39, están covalentemente o no-covalentemente enlazadas o unidos por un enlazador para formar una molécula ARNip en tándem. Tales moléculas ARNip en tándem que comprende dos secuencias de ARNip pudieran ser típicamente de 38-150 nucleótidos de longitud, con mayor preferencia 38 o 40- 60 nucleótidos de longitud, y mayores en consecuencia si más de dos secuencias ARNip se incluyen en la molécula en tándem. Una molécula en tándem más larga compuesta por dos o más secuencias más largas que codifican el ARNip producido por vía del procesamiento celular interno, por ejemplo, ARNbc largo, también está considerada, ya que es una molécula en tándem que codifica dos o más ARNhc. Tales moléculas en tándem se consideran además una parte de la presente invención, y más información concerniente a ellas se da más abajo.

10

15

20

Dichas estructuras combinadas o en tándem tienen la ventaja de que la toxicidad y/o los efectos fuera de cada ARNip se minimizan, mientras que la eficacia aumenta

25

30

35

Particularmente el ARNip usado en los Ejemplos se modificó de manera que un grupo 2' O-Me estaba presente en el primer, tercer, quinto, séptimo, noveno, oncenno, decimotercer, decimoquinto, decimoséptimo y decimonoveno nucleótidos de la cadena antisentido, con lo cual una modificación muy similar, es decir, un grupo 2'-O-Me estaba presente en el segundo, cuarto, sexto, octavo, décimo, duodécimo, decimocuarto, decimosexto y decimoctavo nucleótidos de la cadena sentido. Además, debe notarse que en el caso de estos ácidos nucleicos particulares de acuerdo con la presente invención el primer tramo es idéntico a la primera hebra y el segundo tramo es idéntico a la segunda hebra y estos ácidos nucleicos son además de extremos romos. El ARNip se fosforiló pero se consideró que una versión no fosforilada puede ser más simple para preparar a gran escala y se encontró que dicho REDD14 no fosforilado, llamado REDD-14NP es tan biológicamente activo como REDD-14 en un modelo CNV (ver el Ejemplo 6). La secuencia de este ARNip usado en los experimentos en los Ejemplos 6- 8 es la de REDD14, es decir, la secuencia que tiene la referencia interno núm. 14 (ver la Tabla A).

La región terminal de los oligonucleótidos se refiere a las bases 1-4 y/o 16-19 en las secuencias 19-mer (Tablas A y B más abajo) y a las bases 1-4 y/o 18-21 en las secuencias 21-mer (Tabla C más abajo).

40

45

50

55

60

65

Además, los ARNip usados en la presente invención son oligoribonucleótidos en donde una hebra comprende nucleótidos consecutivos que tiene de 5' a 3', la secuencia que se expone en las sec. con núms. de ident.: 66, 74, 75, 77, 79 y 91 (cadenas antisentido) o un homólogo de esta en donde hasta en 2 de los nucleótidos en cada región terminal se altera una base. Así, en aspectos particulares el oligonucleótido comprende una estructura de hebra doble, con lo cual dicha estructura de hebra doble comprende una primera hebra y una segunda hebra, en donde la primera hebra comprende un primer tramo de los nucleótidos contiguos y la segunda hebra comprende un segundo tramo de los nucleótidos contiguos, con lo que el primer tramo es complementario o idéntico a una secuencia de ácido nucleico que codifica para el gen RTP801 y en donde el segundo tramo es idéntico o complementario a una secuencia ácido nucleico que codifica para RTP801. Dicho primer tramo comprende al menos 14 nucleótidos, preferentemente al menos 18 nucleótidos y aún con mayor preferencia 19 nucleótidos o aun al menos 21 nucleótidos. En una modalidad el primer tramo comprende de aproximadamente 14 a 40 nucleótidos, preferentemente aproximadamente 18 a 30 nucleótidos, con mayor preferencia de aproximadamente 19 a 27 nucleótidos y con la máxima preferencia de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos. En una modalidad el segundo tramo comprende de aproximadamente 14 a 40 nucleótidos, preferentemente aproximadamente 18 a 30 nucleótidos, con mayor preferencia de aproximadamente 19 a 27 nucleótidos y con la máxima preferencia de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos o aun aproximadamente 19 a 21 nucleótidos. En una modalidad el primer nucleótido del primer tramo corresponde a un nucleótido de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801, en donde el último nucleótido del primer tramo corresponde a un nucleótido de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801. En una modalidad el primer tramo comprende una secuencia de al menos 14 nucleótidos contiguos de un oligonucleótido, donde tal oligonucleótido se selecciona del grupo que comprende los oligoribonucleótidos que tiene la secuencia de cualquiera de los números de serie 14, 22, 23, 25, 27, 39, en la Tabla A. Las especificaciones adicionales de las moléculas de ARNip usadas en la presente invención pueden proporcionar un oligoribonucleótido en donde el dinucleótido dTdT está covalentemente unido al terminal 3', y/o en al menos un nucleótido un residuo azúcar se modifica, posiblemente con una modificación que comprende una modificación 2'-O-metilo. Más aún, el grupo 2' OH puede reemplazarse por un grupo o porción seleccionada del grupo que comprende -H, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂ CH₃, -NH₂, y F. Más aún, los compuestos preferibles de la presente invención como los descritos anteriormente pueden ser fosforilados o no fosforilados.

Además, el ARNip usado en la presente invención puede ser un oligoribonucleótido donde en los nucleótidos alternos los azúcares modificados se localizan en las dos hebras. Particularmente, el oligoribonucleótido puede comprender una de las cadenas sentido en donde el azúcar no está modificado en los nucleótidos del terminal 5' y 3', o una de las cadenas antisentido en donde el azúcar está modificado en los nucleótidos del terminal 5' y 3'.

Además, otros ácidos nucleicos a usarse en la presente invención comprenden al menos 14 nucleótidos contiguos de cualquiera de las sec. con nums. de ident.: 66, 74, 75, 77, 79, y 91 y con mayor preferencia 14 pares de base de nucleótidos contiguos en cualquier extremo de la estructura de hebra doble comprendida del primer tramo y el segundo tramo como se describió anteriormente. Una persona con experiencia en la técnica entenderá que dada la longitud potencial del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y particularmente de los tramos individuales que forman tal ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, algunos cambios con relación a la secuencia codificante del gen RTP801 como se detalla en la sec. con núm. de ident.:1 a cada lado es posible, donde tales cambios pueden ser hasta 1, 2, 3, 4, 5 y 6 nucleótidos en ambas direcciones, y por el que las moléculas de ácido nucleico así generadas de hebra doble estarán además dentro de la presente invención.

Un aspecto adicional de la presente descripción concierne un ácido nucleico funcional que comprende una estructura de hebra doble, donde tal estructura de hebra doble comprende

una primera hebra y una segunda hebra, en donde

la primera hebra comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos y la segunda hebra comprende un segundo tramo de los nucleótidos contiguos, en donde

el primer tramo es complementario o idéntico a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 y en donde el segundo tramo es idéntico o complementario a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801.

En un aspecto, el ácido nucleico es RTP801 de regulación descendente, por lo que la regulación descendente de RTP801 se selecciona del grupo que comprende la regulación descendente de la función de RTP801, regulación descendente de la proteína RTP801 y regulación descendente de la expresión del ARNm RTP801.

En un aspecto, el primer tramo comprende al menos 14 nucleótidos, preferentemente al menos 18 nucleótidos y aún con mayor preferencia 19 nucleótidos.

En un aspecto, el primer tramo comprende de aproximadamente 14 a 40 nucleótidos, preferentemente aproximadamente 18 a 30 nucleótidos, con mayor preferencia de aproximadamente 19 a 27 nucleótidos y con la máxima preferencia de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos.

En un aspecto, el segundo tramo comprende de aproximadamente 14 a 40 nucleótidos, preferentemente aproximadamente 18 a 30 nucleótidos, con mayor preferencia de aproximadamente 19 a 27 nucleótidos y con la máxima preferencia de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos.

En un aspecto, el primer nucleótido del primer tramo corresponde a un nucleótido de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801, en donde el último nucleótido del primer tramo corresponde a un nucleótido de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801.

En un aspecto, un tramo comprende una secuencia de al menos 14 nucleótidos contiguos de una secuencia de ácido nucleico, en donde tal secuencia de ácido nucleico se selecciona de las secuencias descritas en las Tablas A-C, preferentemente del grupo que comprende la sec. con núms. de identi.: 53, 66, 67, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 91, 92, 93, 94, 96, 101 y 102, con mayor preferencia seleccionados del grupo que comprende la sec. con núms. de identi.: 66, 75, 79, 91, 94, 101 y 102, y con la máxima preferencia seleccionados del grupo que comprende la sec. con núms. de ident.: 66, 74, 75 y 79.

En un aspecto, el otro tramo comprende una secuencia de al menos 14 nucleótidos contiguos de una secuencia de ácido nucleico, en donde tal secuencia de ácido nucleico se selecciona de las secuencias descritas en las Tablas A-C, preferentemente del grupo que comprende la sec. con núms. de identi.: 3, 16, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 51 y 52, con mayor preferencia seleccionados del grupo que comprende la sec. con núms. de ident.:16, 24, 25, 29, 41, 44, 51, y 52, y con la máxima preferencia seleccionados del grupo que comprende la sec. con núms. de ident.: 16, 24, 25 y 29.

En un aspecto

el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 53 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 3;

el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 66 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:16;

- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 67 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 17;
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 72 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 22;
- 5 el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 73 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 23;
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 74 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 24;
- 10 el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 75 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 25;
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 76 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 26;
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 77 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 27;
- 15 el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 79 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 29;
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 91 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 41;
- 20 el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 92 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:42;
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 93 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 43;
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 94 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 44;
- 25 el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:95 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 45;
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 96 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:46;
- 30 el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 101 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 51; y
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 102 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 52.
- 35 En un aspecto, el primer tramo tiene una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que comprende la sec. con núm. de ident.: 53, 66, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 101 y 102.
- Se entenderá que aunque los términos "primer" y "segundo" tramo se usan en relación con los ácidos nucleicos de la presente invención, ellos se usan por razones de conveniencia solamente, y cualquier molécula de ácido nucleico de la invención que se describe con un primer tramo con la secuencia X y un segundo tramo con la secuencia Y, pudiera igualmente ser descrito también teniendo un primer tramo con la secuencia Y y un segundo tramo con la secuencia X, siempre que se entienda que un tramo está comprendido en la cadena antisentido, el cual debe ser antisentido para una porción de la secuencia codificante del gen RTP801, y el otro tramo está comprendido en la cadena sentido, que debe ser complementaria (aunque no 100% complementaria) a la cadena antisentido, todo de acuerdo a las definiciones y especificaciones presentadas en la presente.
- 40
- 45
- En un aspecto, la primera y/o la segunda hebra comprenden al menos un nucleótido saliente en el extremo 3' que es complementario o idéntico al nucleótido correspondiente de una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801.
- 50 En un aspecto, la primera y/o la segunda hebra comprenden de 1 a 15 nucleótidos salientes en el extremo 3', preferentemente la primera y/o la segunda hebra comprende de 1 a 10 nucleótidos salientes en el extremo 3', con mayor preferencia la primera y/o la segunda hebra comprende de 1 a 5 nucleótidos salientes en el extremo 3', y con la máxima preferencia la primera y/o la segunda hebra comprende de 1 a 2 nucleótidos salientes en el extremo 3'.
- 55 En un aspecto, la primera y/o la segunda hebra comprenden al menos un nucleótido saliente que es diferente de los nucleótidos correspondientes de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801.
- En un aspecto, la primera hebra comprende dos nucleótidos salientes que son diferentes de los nucleótidos correspondientes de una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801.
- 60 En un aspecto, la primera hebra consiste en el primer tramo solamente.
- En un aspecto, la segunda hebra consiste en el segundo tramo solamente.
- En un aspecto, el primer tramo y/o la primera hebra comprende(n) ribonucleótidos.
- 65 En un aspecto, el segundo tramo y/o la segunda hebra comprende(n) ribonucleótidos.

- En un aspecto, el primer tramo y/o la segunda hebra consiste(n) en ribonucleótidos.
- 5 En un aspecto algunos o todos los nucleótidos se modifican.
- En un aspecto preferido tal modificación se relaciona con la porción de nucleobase de los nucleótidos, con la porción azúcar de los nucleótidos y/o con la porción fosfato de los nucleótidos.
- 10 En un aspecto más preferido la modificación es una modificación de una porción azúcar y la modificación es una modificación en la posición 2', donde el grupo 2' OH se reemplaza con un grupo o porción seleccionado del grupo que comprende -H-OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂ CH₃, -NH₂, y -F.
- 15 En un aspecto, la modificación es una modificación de la porción de nucleobase y la modificación o la nucleobase modificada se selecciona del grupo que comprende inosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo, 2-propilo y otros alquiladeninas, 5-halo uracilo, 5-halocitosina, 5-halo citosina, 6-azacitosina, 6-aza timina, pseudo-uracilo, 4-tiouracilo, 8-halo adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol adenina, 8-tioalquil adeninas, 8-hidroxil adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-halo guaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8-tioalquil guanina, 8-hidroxilguanina y otras guaninas sustituidas, otros aza- y deaza adeninas, otros aza- y deaza guaninas, 5-trifluorometil uracilo y 5-trifluoro citosina.
- 20 En un aspecto, la modificación es una modificación de la porción fosfato, en donde la porción fosfato modificada se selecciona del grupo que comprende fosfotioato.
- En un aspecto, el primer tramo y/o el segundo tramo comprende una pluralidad de grupos de nucleótidos modificados que tienen una modificación en la posición 2', donde dentro del tramo cada grupo de nucleótidos modificados es flanqueado en uno o ambos lados por un grupo de flanqueo de nucleótidos, donde los nucleótidos flanqueadores que forman el grupo de flanqueo de los nucleótidos son nucleótidos no modificados o un nucleótido que tiene una modificación diferente de la modificación de los nucleótidos modificados.
- 25 En un aspecto preferido, el primer tramo y/o el segundo tramo consisten en ribonucleótidos.
- 30 En un aspecto más preferido, el primer y el segundo tramo comprenden una pluralidad de grupos de nucleótidos modificados.
- 35 [En un aspecto, el primer tramo comprende dicha pluralidad de grupos de nucleótidos modificados.
- En un aspecto, el segundo tramo comprende dicha pluralidad de grupos de nucleótidos modificados.
- En un aspecto cada grupo de nucleótidos modificados y/o cada grupo de nucleótidos flanqueadores comprende un número de nucleótidos, donde el número se selecciona del grupo que comprende un nucleótido a diez nucleótidos.
- 40 En un aspecto, el primer tramo comprende un primer patrón de nucleótidos modificados y el segundo tramo comprende un segundo patrón de nucleótidos modificados.
- 45 En un aspecto, el primer patrón es el mismo patrón que el segundo patrón.
- En otro aspecto, el primer patrón se alinea con el segundo patrón.
- En un aspecto preferido, el primer patrón cambia en uno o más nucleótidos con relación al segundo patrón.
- 50 En un aspecto, cada uno de los grupos de nucleótidos modificados consiste en un nucleótido modificado y cada uno de los grupos de nucleótidos flanqueadores consiste en un nucleótido no modificado o un nucleótido que tiene una modificación que es diferente de la modificación de los nucleótidos modificados.
- En un aspecto preferido, el nucleótido modificado tiene un grupo -OMe en la posición 2'.
- 55 En un aspecto preferido, el nucleótido flanqueador es un ribonucleótido que tiene un grupo 2' OH.
- En un aspecto, el primer tramo comienza con un nucleótido modificado en el extremo 5' y cada nucleótido del tramo es además un nucleótido modificado, mientras que un segundo nucleótido comienza desde el extremo 5' y cada nucleótido es un nucleótido no modificado o un nucleótido que tiene una modificación que es diferente de la modificación del(de los) nucleótido(s) modificados(s).
- 60 En un aspecto, el primer tramo es en orientación antisentido a la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801.
- 65 Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención y/o un vector de acuerdo con el segundo aspecto de

la presente invención y preferentemente un portador farmacéuticamente aceptable; dicha composición opcionalmente es para la administración sistémica o local.

5 En una modalidad, la composición es para el tratamiento de una enfermedad, donde la enfermedad se selecciona del grupo que comprende enfermedades tumorales.

10 En un aspecto adicional, el problema esencial de la presente invención se resuelve mediante el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o el vector de acuerdo con la presente invención y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para usar en la prevención y/o tratamiento de un paciente con necesidad de tal prevención y/o tratamiento.

15 En una modalidad adicional, un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o un vector de acuerdo con la presente invención se usan para la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad, donde tal enfermedad se selecciona del grupo que comprende enfermedades tumorales. La enfermedad tumoral puede seleccionarse del grupo que comprende tumores sólidos, tumores metastásicos que incluyen tumores PTEN negativos, tumores que son resistentes a los fármacos y tumores donde se puede usar la inhibición de RTP801 para la sensibilización. Más aun, la enfermedad tumoral puede ser una enfermedad tumoral en etapa terminal, o puede involucrar células que son supresores tumorales negativos; dicho supresor tumoral puede ser PTEN.

20 Un aspecto adicional de la presente descripción es un método para diseñar o seleccionar un ácido nucleico que es adecuado para la regulación descendente de RTP801, que comprende las siguientes etapas:

- 25 a) diseñar o seleccionar un ácido nucleico que es adecuado para la regulación descendente de RTP801;
 b) evaluar el efecto de un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la presente invención; y
 c) comparar el efecto del ácido nucleico de la etapa a) con el efecto del ácido nucleico de la etapa b).

30 En un aspecto, el efecto es la regulación descendente de RTP801.

35 Un aspecto adicional de la presente descripción es el uso de un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención como un sensibilizador, en particular como un sensibilizador en el tratamiento de una enfermedad, por lo que dicha enfermedad se selecciona preferentemente del grupo que comprende tumores y más particularmente los tumores que son resistentes a un tratamiento con agentes quimioterapéuticos y/o radioterapéuticos. Se describen en la presente otras enfermedades para las cuales un ácido nucleico de la presente invención puede servir como sensibilizador.

40 Esta solicitud describe que un ácido nucleico que comprende una estructura de hebra doble la cual es específica para RTP801 es un medio adecuado de inhibir la angiogénesis/crecimiento de la vasculatura y la fuga vascular, (ambos de la vasculatura existente y de la vasculatura en crecimiento). Adicionalmente, esta solicitud describe (sin estar atados por la teoría) que RTP801 que es una proteína inducible por el estrés (inducida por hipoxia, estrés oxidativo, estrés térmico, estrés ER), es un factor que actúa en el ajuste fino de la respuesta celular al desbalance de la energía. Así, la inhibición de RTP801 por dicha hebra doble de ácido nucleico es adecuada para el tratamiento de cualquier enfermedad donde las células se deben rescatar de la apoptosis debido a condiciones de estrés (por ejemplo, las enfermedades
 45 acompañadas por la muerte de las células normales) o donde las células adaptadas a condiciones de estrés debido a los cambios en la expresión de RTP801, se deben matar (por ejemplo, las células tumorales). En este último caso, tras la inhibición de RTP801 a través de dicho ácido nucleico de hebra doble, este factor de supervivencia con función anti-apoptótica en las células hipóxicas, más particularmente en las células cancerosas hipóxicas, se hace ineficaz lo que permite de este modo, conducir a la apoptosis a las células que carecen de la protección mediada por RTP801. Esto
 50 adicionalmente se puede producir cuando otros factores promotores de la apoptosis están presentes. Tales otros factores promotores de la apoptosis incluyen, entre otros, la quimioterapia y la radioterapia. En otras palabras, el ácido nucleico de hebra doble de acuerdo con la presente invención puede ser eficaz solo (monoterapia) en el tratamiento del cáncer y también como una terapia complementaria.

55 Tal estructura de hebra doble comprende una primera hebra y una segunda hebra, por lo que la primera hebra comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos y la segunda hebra comprende un segundo tramo de nucleótidos contiguos, por lo que el primer tramo es o bien idéntico o complementario a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 y por lo cual el segundo tramo es o bien idéntico o complementario a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801. Por medio del uso particular de RTP801 como un objetivo para dicho tipo de ácido
 60 nucleico de hebra doble, es por tanto posible dirigir inmediatamente un objetivo en la cascada implicada en el crecimiento y el desarrollo de la vasculatura y la angiogénesis, respectivamente, y de este modo, de una manera diferente comparada a la vía usada por los inhibidores de VEGF, tales como los anticuerpos VEGF. Sin desear estar atados por ninguna teoría, los presentes inventores asumen que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede ejercer su función en aquellas células que proporcionan un fondo que está implicado o se observa en relación con que se produzca cualquier enfermedad indeseada, particularmente la angiogénesis inducida por hipoxia y/o el
 65 crecimiento o desarrollo de la vasculatura. Esta interpretación se apoya en el hallazgo de que los ratones knock-out para

RTP801 no presentan ningún fenotipo distinto del de los ratones de tipo salvaje bajo condiciones no hipóxicas. Sólo tras de la inducción de la hipoxia como se observa en un estado de enfermedad tal como, por ejemplo, el crecimiento del tumor, el knock-out relacionado con RTP801 resulta en una patología similar a la observada en los humanos que sufren de este tipo de enfermedad.

5

Se entenderá que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es preferentemente un ácido nucleico funcional. Tal como se usa en la presente, el término ácido nucleico funcional significa preferentemente un ácido nucleico cuya función es diferente de ser activo en la célula como un molde para la transcripción de cualquier ARNhc, ARNm, o cualquier otro producto de la transcripción, por lo que o bien dicho ARNhc, ARNm o cualquier otro producto de la transcripción, respectivamente, o el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención está sujeto a un proceso de traducción, preferentemente un proceso de traducción celular, que resulta en una proteína RTP801 biológicamente activa. Es necesario reconocer que un ácido nucleico funcional tal como se usa preferentemente en la presente es capaz de reducir la expresión de un ácido nucleico objetivo. Con mayor preferencia, dicha reducción se basa en un proceso post-transcripcional de silenciamiento génico del ácido nucleico objetivo. Aún con mayor preferencia, dicha reducción se basa en la interferencia de ARN. Con la máxima preferencia, una forma del ácido nucleico funcional es una molécula de ARNip o cualquier otra molécula que tiene el mismo efecto que una molécula de ARNip. Tal molécula adicional se selecciona del grupo que comprende los ARNip, los ARNip sintéticos, los ARNhc y los ARNhc sintéticos. Como se usa en la presente los ARNip pueden comprender adicionalmente los vectores de expresión derivados de ARNip, por lo que el vector de expresión es en una modalidad preferida, un virus tal como el adenovirus, los virus adeno-asociados, el virus del herpes y los lentivirus. Como se usa en la presente, ARNhc significa preferentemente ARN de horquilla corta. Tal ARNhc se puede fabricar sintéticamente o se puede generar usando los sistemas de vectores de expresión codificados, preferentemente usando los promotores de la ARN polimerasa III. En relación con esto, es necesario reconocer que la funcionalidad del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención está dirigida a RTP801 al cual también preferentemente se hace referencia en la presente como el objetivo y el ácido nucleico que codifica para dicho objetivo como el ácido nucleico objetivo.

25

Como se usa preferentemente en la presente, la estructura de hebra doble del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprende cualquier estructura de hebra doble, por lo que dicha estructura de hebra doble se genera preferentemente por el primer tramo y el segundo tramo lo proporciona el ácido nucleico que tiene el diseño básico. La estructura de hebra doble puede comprender uno o varios desajustes. Dicha estructura de hebra doble está formada por el apareamiento de bases Watson-Crick y/o el apareamiento de bases Hoogsteen y/o mecanismos similares de apareamiento de bases. En base al diseño básico del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, se prefiere que un tramo se encuentre en orientación antisentido con respecto a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 o una parte de este, mientras que el otro tramo está en la orientación sentido con una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 o una parte de este. Debido a esto, un tramo es complementario a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 o una parte de este, y el otro tramo es idéntico a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 o una parte de este. En relación con esto, es preciso reconocer que el término idéntico, por supuesto, significa también parcialmente idénticos, por lo que la identidad, expresada como homología, es al menos 80%, preferentemente 90%, con mayor preferencia 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. Similar a la definición de identidad, la complementariedad se puede definir en términos de homología, por lo que dicha homología está en el mismo intervalo que la identidad si la hebra complementaria se tradujera en la hebra idéntica de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases Watson-Crick. En una modalidad alternativa, un tramo es idéntico a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 o una parte de este y el otro tramo es complementario a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 o una parte de este.

45

En una modalidad preferida, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención regula de forma descendente la función de RTP801. La regulación descendente de la función de RTP801 preferentemente sucede por la reducción en el nivel de expresión a nivel de proteínas y/o el nivel de ARNm, con lo cual un menor nivel de expresión, preferentemente a nivel de proteínas, puede ser tan pequeño como 5% y ser tan alto como 100%, con referencia a una expresión bajo condiciones en donde el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención no se administra o no es funcionalmente activo. Tales condiciones son, preferentemente, las condiciones de o como presente en un sistema de expresión, preferentemente un sistema de expresión para RTP801. Tal sistema de expresión es preferentemente un sistema de traducción que puede ser un sistema de traducción in vitro, con mayor preferencia una célula, órgano y/u organismo. Con mayor preferencia el organismo es un organismo multicelular, con mayor preferencia un mamífero, en el que dicho mamífero se selecciona preferentemente del grupo que comprende el hombre, mono, ratón, rata, conejillo de indias, conejo, gato, perro, oveja, vaca, caballo, ganado vacuno y porcino. En relación con la regulación descendente, es preciso reconocer que dicha regulación descendente puede ser una función del tiempo, es decir, el efecto de regulación descendente no se observa necesariamente inmediatamente después de la administración o la activación funcional de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, pero puede estar diferida en el tiempo, así como en el espacio, es decir, en diversas células, tejidos y/u órganos. Dicho aplazamiento puede variar de 5% -100%, preferentemente de 10 a 50%. Será reconocido por aquellos con experiencia en la materia que una reducción del 5% para un período de tiempo más largo podría ser tan eficaz como una reducción del 100% en un período de tiempo más corto. Aquellos con experiencia en la materia también reconocerán que dicho aplazamiento depende fuertemente de la funcionalidad del ácido nucleico particular que se use realmente, así como en la población de células objetivo y, por tanto, en última instancia, de la enfermedad a tratar y/o prevenir de acuerdo a la enseñanza técnica de la presente solicitud. En tanto, una reducción de 5% en un período de tiempo más largo podría ser tan eficaz como el 100% de

65

reducción durante un período de tiempo más corto. También aquellos con experiencia en la materia reconocerán que el aplazamiento puede ocurrir a cualquier nivel como se describió anteriormente, es decir, un aplazamiento en función, por lo que dicha función es cualquier función exhibida por RTP801, un aplazamiento en la expresión de proteína o un aplazamiento en el nivel de expresión del ARNm.

5 El primer tramo comprende al menos 14 nucleótidos contiguos. Aquellos con experiencia en la materia reconocerán que el primer tramo debe tener una longitud que sea adecuada para permitir direccionar específicamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 y más específicamente el ácido nucleico que codifica para RTP801 presente en el sistema de traducción, cuando la expresión de RTP801 se va a reducir. Nuevamente, sin querer limitarse por ninguna teoría o cualquier modo de acción del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, parece que hay una interacción entre el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801, preferentemente a nivel de la transcripción, es decir, tras la generación de un ARNm a partir de la correspondiente secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801. Debido a la probabilidad de que cualquier secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención sea idéntica o complementaria a una secuencia contenida en el genoma o transcriptoma del sistema de traducción, la longitud del primer tramo por lo tanto debe ser tan largo como para asegurarse que, bajo el supuesto de que algún tipo de apareamiento de bases entre el ácido nucleico que codifica para RTP801 y una de las hebras del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se produce realmente, sólo la secuencia que codifica para RTP801 pero no otra secuencia de codificación, preferentemente ningún otra secuencia de codificación esencial, del genoma o el transcriptoma está dirigida para o por dicho apareamiento de bases. Mediante esta longitud, la aparición de efectos fuera del objetivo puede reducirse y preferentemente eliminarse. Para aumentar la rigurosidad de este modo de direccionar específicamente RTP801 y la secuencia de ácido nucleico que codifica éste, el primer tramo tiene preferentemente una longitud de al menos 18 o 19 nucleótidos. El límite superior para la longitud del primer tramo es preferentemente menor que 50 nucleótidos, sin embargo, la longitud puede ser significativamente más larga y puede comprender 100, 200 o incluso 500 nucleótidos o cualquier longitud entre estas. Aparte de esto, alguien con experiencia en la materia prefiere tener un primer tramo más bien corto, tan corto como sea la secuencia, particularmente en el caso de que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se sintetiza químicamente, menos tiempo y material de consumo de la síntesis de éste y menor será la velocidad a la que los nucleótidos incorrectos se insertan en la secuencia respectiva. Otro factor que se debe tener en cuenta en relación con la fijación de la longitud del primer tramo es el hecho de que, típicamente a una longitud más allá de 50 o más nucleótidos, se puede observar una respuesta inespecífica al interferón. Depende de la afección particular a tratar si este tipo de respuesta inespecífica al interferón se puede tolerar o no. Por ejemplo, una respuesta al interferón se podría tolerar si la respuesta al interferón y/o la expresión de los genes del interferón se pueden limitar a las células patológicas.

35 En vista de esto, las longitudes más preferidas del primer tramo son de aproximadamente 14 a 40 nucleótidos, 18 a 30 nucleótidos, 19 a 27 nucleótidos, 21 a 25 nucleótidos y 19 a 23 nucleótidos.

40 Las mismas consideraciones mencionadas anteriormente para el primer tramo son aplicables al segundo tramo, el cual puede comprender por tanto cualquier longitud como se describe en la presente en relación con el primer tramo. Está también dentro de la presente invención que la longitud del primer tramo es diferente de la longitud del segundo tramo, sin embargo, se prefiere que ambos tramos tengan la misma longitud.

45 De acuerdo con el diseño básico del ácido nucleico, el primer tramo y el segundo tramo son partes de la primera hebra y la segunda hebra, respectivamente, del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Se reconocerá que en cualquier extremo, es decir, en el extremo 5', así como el extremo 3' la primera hebra y/o la segunda hebra pueden comprender uno o varios nucleótidos, preferentemente nucleótidos adicionales, en cualquier combinación.

50 En relación con lo mismo, es necesario reconocer que los nucleótidos de la hebra individual que van más allá del(de los) extremo(s) del tramo correspondiente a la hebra respectiva se pueden usar para contribuir adicionalmente a la complementariedad e identidad, respectivamente, del tramo y, por tanto el direccionamiento específico de la secuencia del ácido nucleico que codifica para RTP801.

55 Se reconocerá que, básicamente, sobre la base de la enseñanza técnica que se proporciona en la presente, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede dirigirse a cualquier parte de la secuencia del ácido nucleico que codifica para RTP801, preferentemente codifica para RTP801 en el sistema de traducción, cuando la expresión de RTP801 se va a reducir. En tanto, la presente invención comprende cualquier ácido nucleico que tiene las características como las definidas en la presente, por lo cual las hebras y tramos complementarios e idénticos del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, básicamente, pueden comenzar desde cualquier nucleótido de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801. Por consiguiente, bajo la condición de que el primer tramo de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es complementario a la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801, es decir, es la cadena antisentido de esta, o está en la misma orientación antisentido, el primer nucleótido de dicho tramo, es decir, el nucleótido más al terminal 5' corresponde, es decir, se alinea con el último nucleótido de la secuencia que codifica para RTP801 en el extremo 3'. En una modalidad adicional dicho nucleótido más al terminal 5' corresponde al penúltimo nucleótido del ácido nucleico que codifica para RTP801 y así sucesivamente hasta que se alcanza la última posición la cual, dada la longitud del tramo antisentido, aún permite que la cadena antisentido del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención sea complementaria a la secuencia de ácido nucleico que codifica para

5 RTP801. En tanto, cualquier ácido nucleico de acuerdo con la presente invención está dentro de la presente invención que se podría generar mediante el escaneo de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 a partir del nucleótido más al terminal 5' de éste y, por encima del diseño básico del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y la realización de las características de dicho ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Las mismas consideraciones se aplican a las modalidades descritas en la presente donde la complementariedad y la identidad del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se proporciona no sólo por el primer tramo y el segundo tramo, respectivamente, pero tal complementariedad e identidad también implican uno o más nucleótidos más allá del primer tramo y del segundo tramo, respectivamente, luego, son parte de la primera hebra y la segunda hebra, respectivamente.

10 De los diferentes ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención como se describe en la presente, se prefieren particularmente aquellos con números de referencia interna 14, 22, 23, 25, 27, 39, (ver la Tabla A). En relación con la misma, es de señalar que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención que se pueden usar en humanos y un modelo animal tal como rata y/o ratón son particularmente útiles. La ventaja sorprendente de estos ácidos nucleicos particulares de acuerdo con la presente invención reside en el hecho de que son eficaces tanto en humanos y en un modelo animal lo cual significa que los resultados obtenidos de las pruebas en el modelo animal se pueden transferir inmediatamente a partir del modelo animal al ser humano y más particularmente sin la necesidad de realizar ningún cambio en la secuencia humana lo cual sería de otro modo necesario en caso de que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se diseñara de tal manera que comprende (una) secuencia (s) que difiere(n) entre las especies, más particularmente de las especies que se usan para las de prueba en modelos animales y el hombre como los organismos preferidos finales o el paciente. Se prefiere adicionalmente que estos ácidos nucleicos tengan un patrón de modificación tal como también se describe en los ejemplos.

25 Sin embargo, también está dentro de la presente descripción que cualquiera de las secuencias de acuerdo con las sec. con núms. de ident. 3, 16-17, 22-27, 29, 41-46, 51-53, 66-67, 72-77, 79, 91-96 y 101-102 y las combinaciones respectivas que resulten en las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente descripción que tienen números de referencia internos 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 y 50, que están sólo parcialmente contenidas en un ácido nucleico adicional de acuerdo con la presente descripción. Preferentemente, los ácidos nucleicos adicionales de acuerdo con la presente descripción comprenden al menos 14 nucleótidos contiguos de las sec. con núms. de ident. 3, 16-17, 22-27, 29, 41-46, 51-53, 66-67, 72-77, 79, 91-96 y 101-102, y más preferentemente 14 pares de bases de nucleótidos contiguos en cualquier extremo de la estructura de hebra doble que comprende el primer tramo y el segundo tramo como se indica en la tabla anterior. Aquellos con experiencia en la materia entenderán que, dada la longitud potencial del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y particularmente de los tramos individuales que forman dicho ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, algunos cambios a cada lado respecto a la secuencia que codifica RTP801 es posible, por lo que tales cambios pueden ser de hasta 1, 2, 3, 4, 5 y 6 nucleótidos en ambas direcciones, y mediante el cual las moléculas de ácido nucleico de hebra doble que se generan así, también deberán estar dentro de la presente invención.

40 En una modalidad preferida de la presente invención, el primer tramo y la primera hebra tienen la misma longitud. Del mismo modo, se prefiere que la segunda hebra tenga la misma longitud que el segundo tramo, por lo que es incluso más preferido que el primer tramo y el segundo tramo tengan la misma longitud. En una modalidad aún más preferida, la primera hebra sólo comprende el primer tramo y la segunda hebra comprende sólo el segundo tramo. En una modalidad incluso más preferida ni el primer tramo, y por lo tanto la primera hebra, ni el segundo tramo, y por lo tanto la segunda hebra, comprenden un saliente. En otras palabras, está también dentro de la presente invención que los ácidos nucleicos de hebra doble de acuerdo con la presente invención sean de extremos romos, preferentemente en cada extremo de la estructura de hebra doble de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Tal estructura de extremos romos se puede realizar en relación con cualquier otra modalidad de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, particularmente aquellas modalidades en la que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención tienen un patrón de modificación, con mayor preferencia un patrón de modificación como se describe en la presente.

55 En un aspecto adicional, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención tiene por lo tanto un diseño básico, que proporciona extremos romos en ambos extremos de la estructura del ácido nucleico de hebra doble de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, también está dentro de la presente invención que existe un saliente, es decir, un tramo de uno o más nucleótidos que sobresalen de la estructura de hebra doble. El saliente puede ser, en principio, en el extremo 5' de la cadena antisentido, en el extremo 3' de la cadena antisentido, en el extremo 5' de la cadena sentido y/o el extremo 3' de la cadena sentido. Es de señalar que la realización de cualquiera de dichas opciones sola, así como cualquier combinación de estas, está dentro de la presente invención. Es más preferida una combinación, donde el saliente está situado en el extremo 3' de la cadena antisentido y en el extremo 3' de la cadena sentido. Está también dentro de la presente invención que el saliente está en el extremo 5' de la cadena antisentido y en el extremo 5' de la cadena sentido. Adicionalmente, está dentro de la presente invención que el saliente está situado solamente en la cadena antisentido de la estructura de hebra doble, con mayor preferencia en el extremo 3' de la cadena antisentido de la estructura de hebra doble.

65 En relación con los salientes, es de señalar que el saliente más el tramo forman preferentemente la hebra y las longitudes previstas para los tramos en la presente se aplican también a estas modalidades. El saliente individual

5 puede, independiente de su ubicación, consistir en al menos un nucleótido. Sin embargo, el saliente individual puede comprender tanto como 10 y es preferentemente dos nucleótidos de largo. Está dentro de la presente invención que el respectivo nucleótido(s) que forma el saliente(s) es/son también complementario a la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 en el caso de que la primera hebra es complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801, y el saliente está en el extremo 3' o 5' de la cadena antisentido, o que el saliente(s) es/son idénticos a la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 en caso de que la primera hebra es idéntica a la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801. Lo mismo se aplica a cualquier saliente situado en el segundo tramo del diseño básico del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, por lo que es preciso reconocer que el diseño del saliente en el segundo tramo puede ser independiente del diseño del saliente del primer tramo.

10 Está también dentro de la presente invención que los nucleótidos que forman el saliente no son ni complementarios ni idénticos a los nucleótidos correspondientes de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801. Como se usa en la presente, y preferentemente en esta modalidad, "correspondiente" se refiere a los nucleótidos respectivos que siguen en el extremo 5' y/o el extremo 3' del tramo que tiene un nucleótido homólogo en el ácido nucleico que codifica para RTP801.

15 Preferentemente, la primera hebra comprende en su extremo 3' dos nucleótidos, preferentemente desoxinucleótidos y con mayor preferencia dos TT y/o este tipo de nucleótidos también en el extremo 3' de la segunda hebra, por lo cual con mayor preferencia, la longitud del primer tramo y el segundo tramo es de 19 nucleótidos. De este modo las hebras comprenden el tramo y el saliente. En esta modalidad, la estructura de hebra doble consiste de 19 pares de bases y un saliente de dos nucleótidos en cada extremo del extremo 3' del tramo individual.

20 En una modalidad preferida, el primer tramo y/o la primera hebra comprenden ribonucleótidos, por lo que se prefiere particularmente que el primer tramo consista en su totalidad de ribonucleótidos. Lo mismo se aplica para el segundo tramo y la segunda hebra, respectivamente. En relación con la misma, sin embargo, cada uno y cualquiera de los nucleótidos del primer tramo y segundo tramo, respectivamente, se modifican en una modalidad preferida. Lo mismo se aplica a la primera hebra y la segunda hebra, respectivamente. Particularmente los nucleótidos terminales, tanto si se trata de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, pueden tener un grupo OH que como tal se puede modificar. Tal grupo OH puede provenir de cualquier porción de azúcar del nucleótido, con mayor preferencia de la posición 5' en el caso del grupo 5' OH y/o de la posición 3' en el caso del grupo 3' OH o a partir de un grupo fosfato unido al porción de azúcar del nucleótido terminal respectivo. El grupo fosfato puede, en principio, estar unido a cualquier grupo OH del porción de azúcar del nucleótido. Preferentemente, el grupo fosfato está unido al grupo 5' OH del porción de azúcar en el caso del grupo 5' OH libre y/o con el grupo 3' OH del porción de azúcar en el caso del grupo 3' OH libre que todavía proporciona lo que se denomina en la presente como grupo 5' o 3' OH libre.

25 Como se usa en la presente con cualquier estrategia para el diseño del ARNi o cualquier modalidad de ARNi descrita en la presente, el término modificación del extremo significa una entidad química añadida nucleótido más 5' o 3' de la primera y/o segunda hebra. Los ejemplos de tales modificaciones del extremo incluyen, pero sin limitarse a, fosfato 3' o 5', abásicos (deoxi) invertidos, amino, fluoro, cloro, bromo, CN, CF, metoxi, imidazol, caboxilato, tioato, alquilo inferior de C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo, OCF₃, OCN, O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂, N₃; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo aminoalquilamino; polialquilamino o sililo sustituido, entre otros, como se describe en las patentes Europeas EP 0 586 520 B1o EP 0 618 925 B1.

30 Como se usa en la presente, alquilo o cualquier término que comprende "alquilo" preferentemente significa cualquier cadena de átomos de carbono que comprende 1 a 12, preferentemente 1 a 6 y más, preferentemente 1 a 2 átomos de C.

35 Una modificación del extremo adicional es un grupo biotina. Tal grupo biotina puede preferentemente estar unido al nucleótido más 5' o al más 3' de la primera y/o segunda hebra o a ambos extremos. En una modalidad más preferida el grupo biotina se acopla a un polipéptido o una proteína. Está además dentro del alcance de la presente invención que el polipéptido o proteína esté unida a través de cualquiera de otras modificaciones del extremo antes mencionadas. El polipéptido o proteína puede conferir otras características a las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Entre otros el polipéptido o proteína puede actuar como un ligando para otra molécula. Si dicha otra molécula es un receptor, la función y la actividad del receptor pueden activarse por el ligando de unión. El receptor puede mostrar una actividad de internalización que permite una transfección efectiva de las moléculas de ácido nucleico unidas al ligando de acuerdo con la presente invención. Un ejemplo de ligando que se acopla a la molécula de ácido nucleico inventiva es VEGF y el receptor correspondiente es el receptor VEGF.

40 Varias posibles modalidades del ARNi de la presente invención con diferentes tipos de modificación(es) del extremo se presentan en la siguiente tabla 1.

TABLA 1: VARIAS MODALIDADES DEL ÁCIDO RIBONUCLEICO INTERFERENTE DE ACUERDO CON LA PRESENTE INVENCION

1 ^{ra} hebra./1 ^{er} tramo	2 ^{da} hebra/2do tramo
--	---------------------------------

	1 ^{ra} hebra./1 ^{er} tramo	2 ^{da} hebra/2do tramo
1.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	OH libre	OH libre
2.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	modificación del extremo	modificación del extremo
3.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	OH libre	modificación del extremo
4.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	modificación del extremo	OH libre
5.) extremo 5'	OH libre	modificación del extremo
extremo 3'	OH libre	OH libre
6.) extremo 5'	OH libre	modificación del extremo
extremo 3'	modificación del extremo	OH libre
7.) extremo 5'	OH libre	modificación del extremo
extremo 3'	OH libre	modificación del extremo
8.) extremo 5'	OH libre	modificación del extremo
extremo 3'	modificación del extremo	modificación del extremo

- 5 Las distintas modificaciones del extremo como se describen en la presente se localizan preferentemente en la porción de ribosa de un nucleótido del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Más particularmente, la modificación del extremo puede estar unida a o reemplazar cualquier grupo OH de la porción de ribosa, que incluyen pero sin limitarse a la posición 2'OH, 3'OH y 5'OH, siempre que el nucleótido así modificado sea un nucleótido terminal. Los abásicos invertidos son nucleótidos, tanto desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos que no tienen una porción de nucleobase. Este tipo de compuesto se describe, entre otros, en Sternberger, M., Schmiedeknecht, A., Kretschmer, A., Gebhardt, F., Leenders, F., Czauderna, F., Von Carlowitz, I., Engle, M., Giese, K., Beigelman, L. & Klippel, A. (2002).
- 10 Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 12, 131-43
Cualquiera de las modificaciones del extremo anteriores puede usarse en relación con las distintas modalidades de ARNi representadas en la Tabla 1; cabe destacar que las modificaciones del extremo 5' mencionadas anteriormente están presentes generalmente sólo en la cadena sentido de la molécula ARNip.
- 15 Otras modificaciones pueden relacionarse con la porción de nucleobase, la porción azúcar o la porción fosfato del nucleótido individual.
- 20 Dicha modificación de la porción de nucleobase puede ser tal que los derivados de adenina, guanina, citosina y timidina y uracilo, respectivamente, se modifican. Las nucleobases modificadas particularmente preferidas se seleccionan del grupo que comprende inosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo, 2-propilo y otras alquiladeninas, 5-halo uracilo, 5-halocitosina, 5-halo citosina, 6-azacitosina, 6-aza timina, pseudo-uracilo, 4-tiouracilo, 8-halo adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol adenina, 8-tioalquil adeninas, 8-hidroxil adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-halo guaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8-tioalquil guanina, 8-hidroxilguanina y otras guaninas sustituidas, otros aza- y deaza adeninas, otros aza- y deaza guaninas, 5-trifluorometil uracilo y 5-trifluoro citosina.
- 25 En otra modalidad preferida, la porción azúcar del nucleótido está modificada, en donde dicha modificación es preferentemente en la posición 2' de la porción de ribosa y desoxiribosa, respectivamente, del nucleótido. Con mayor preferencia, el grupo 2' OH se reemplaza con un grupo o porción seleccionada del grupo que comprende amino, fluoro, alcoxi y alquilo. Preferentemente, el alcoxi es metoxi o etoxi. Además preferentemente alquilo significa metilo, etil, propilo, isobutilo, butilo e isobutilo. Es aún más preferido que, no obstante el tipo de modificación, el nucleótido sea preferentemente un ribonucleótido.
- 30 La modificación de la porción fosfato es preferentemente seleccionada del grupo que comprende fosfotioatos.
- 35 Será de conocimiento de una persona con experiencia en la técnica que el ácido nucleico de la presente invención que consiste en una multitud de nucleótidos pueda formarse así por los nucleótidos que están enlazados a través de un enlace fosfodiéster o a través de un enlace fosfotioato, o una combinación de ambos a lo largo de la longitud de la secuencia de nucleótidos de la hebra individual y estiramiento, respectivamente.

Una forma adicional de los nucleótidos usados puede ser realmente ARNip que se describe, entre otros, en la solicitud de patente internacional WO 03/070918.

5 Los nucleótidos que forman el primer tramo y la primera hebra, respectivamente, del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, por lo cual el nucleótido individual modificado tiene una modificación que es preferentemente una modificación como se describe en la presente. Además de la modificación en particular, la modificación puede ser o comprender algún tipo de etiqueta, por lo que la etiqueta se selecciona del grupo de las etiquetas quimioluminiscentes, las etiquetas fluorescentes y las radioetiquetas. Aquellos con experiencia en la materia conocen este tipo de etiquetas y, por ejemplo, se describen en Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, Baltimore, Maryland, 1998. El ácido nucleico marcado de este modo, también se puede usar de acuerdo con la presente invención para propósitos de diagnóstico o para controlar el sitio de acción, así como para organizar cualquier tratamiento, preferentemente en relación con cualquiera de las enfermedades descritas en la presente.

15 En una modalidad preferida, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se modifica de modo que los nucleótidos de pirimidina en el tramo o cadena sentido son nucleótidos 2' O-metil pirimidina y, ya sea adicionalmente o alternativamente, los nucleótidos de purina en el tramo o cadena sentido son nucleótidos 2'-desoxi purina. En una modalidad adicional, los nucleótidos de pirimidina presentes en el tramo sentido o cadena sentido son nucleótidos 2'-desoxi-2'-fluoro pirimidina.

20 En una modalidad alternativa, la modificación no se basa en la química de los nucleótidos, es decir, la modificación depende de si el nucleótido a modificarse es o bien un nucleótido de purina o un nucleótido de pirimidina, pero predominantemente se basa en la disposición espacial del nucleótido individual en el conjunto de la estructura de hebra doble del diseño básico del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

25 Más particularmente, ya sea la primera hebra y el primer tramo, respectivamente, o la segunda hebra y el segundo tramo, respectivamente, muestran un patrón espacial de modificación de los nucleótidos que forman dichos tramos y las hebras, respectivamente.

30 Centrándose en el primer tramo primero, hay un patrón de grupos de nucleótidos modificados y grupos de nucleótidos no modificados. Estos grupos de nucleótidos no modificados también se refieren en la presente como grupos de nucleótidos flanqueadores. Con mayor preferencia, el patrón consiste de grupos de nucleótidos modificados y nucleótidos no modificados. Aún con mayor preferencia, el patrón es un patrón regular y aún con mayor preferencia un patrón alternante a lo largo de la longitud del primer tramo del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El grupo de nucleótidos modificados o bien puede consistir de uno o de varios nucleótidos los cuales se modifican y son, preferentemente, los nucleótidos que están modificados en la posición 2', es decir tienen una modificación en el porción de azúcar. Con mayor preferencia, esta modificación es una modificación 2'-O-Me.

35 El grupo de nucleótidos no modificados puede consistir en uno o de varios nucleótidos, los cuales son no modificados, con lo que los nucleótidos no modificados son preferentemente ribonucleótidos, o los nucleótidos no modificados son nucleótidos que tienen una modificación, en donde dicha modificación es diferente de la modificación mostrada por los nucleótidos que forman el grupo de nucleótidos modificados. Aún con mayor preferencia, los nucleótidos no modificados son ribonucleótidos. Es de señalar que el término no modificado y nucleótido no modificado se usan de manera intercambiable si no se indica lo contrario. El primer tramo del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comenzar con un grupo de nucleótidos modificados o comenzar con un grupo de nucleótidos no modificados tal como se define en la presente. Sin embargo, se prefiere que el primer tramo comience con un grupo de nucleótidos modificados. Con la máxima preferencia, el grupo de nucleótidos modificados consiste de un solo nucleótido. En relación con esta modalidad, el primer tramo está preferentemente en orientación antisentido al ácido nucleico que codifica para RTP801. Está también dentro de la presente invención que la modificación según la que presentan los nucleótidos que forman el grupo de nucleótidos modificados es la misma para todos los grupos de nucleótidos modificados presentes en el primer tramo. Sin embargo, también está dentro de la presente invención que algunos grupos de nucleótidos modificados tengan una modificación diferente de uno o varios grupos de nucleótidos modificados presentes en el primer tramo.

40 En la segunda hebra del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, un patrón como se describe para el primer tramo se puede realizar también. Las mismas características que las descritas en relación con el primer tramo se pueden realizar en una modalidad en el segundo tramo también, por lo que se prefiere que, bajo la condición de que el segundo tramo está en orientación sentido con relación a la secuencia del ácido nucleico que codifica para RTP801, la segunda hebra del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comienza con un grupo de nucleótidos no modificados.

45 El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que comprende una estructura de hebra doble puede comprender un primer tramo que tiene el patrón de modificación como se describe en la presente. Alternativamente, el ácido nucleico de hebra doble de acuerdo con la presente invención puede comprender un segundo tramo que tiene el patrón de modificación como se describió anteriormente. Es, sin embargo, lo máximo preferido que el ácido nucleico de

hebra doble de acuerdo con la presente invención consista de un primer tramo y un segundo tramo, en el que tanto el primer tramo y el segundo tramo tienen un patrón de modificación espacial, como se describe en la presente.

5 Está dentro de la presente invención que las características del patrón de modificación espacial es el mismo en ambos tramos en términos de tamaño de los grupos de nucleótidos modificados y grupos de nucleótidos no modificados y el tipo de modificaciones que realmente se usan. Preferentemente, el patrón espacial de modificación en el primer tramo se cambia de tal manera que un grupo de nucleótidos modificados en el primer tramo se opone a un grupo de nucleótidos no modificados en el segundo tramo y viceversa. Sin embargo, está también en la presente invención que los patrones están alineados exactamente, es decir, que un grupo de nucleótidos modificados en el primer tramo se opone a un grupo de nucleótidos no modificados en el segundo tramo y un grupo de nucleótidos no modificados en el primer tramo se opone a un grupo de nucleótidos no modificados en el segundo tramo. Está todavía dentro de la presente invención que el patrón espacial de modificación en el primer tramo y el segundo tramo se cambia respecto al otro de modo que sólo una primera parte de un grupo de nucleótidos modificados en un único tramo se opone a una parte de un grupo de nucleótidos no modificados en el otro tramo, mientras que la segunda parte del grupo de nucleótidos modificados se opone a otro grupo de nucleótidos modificados. Está dentro de la presente invención que la descripción que se proporciona en la presente sobre el patrón de modificación espacial del(de los) tramo(s) de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se aplica también a la(s) hebra(s) de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, se prefiere que los tramos de ácido nucleico comprendan el patrón de modificación espacial y las hebras comprendan tales tramos y uno o más salientes como se describe en la presente. Se prefiere particularmente que el saliente sea un grupo fosfato en el extremo 3' de cualquier cadena antisentido, o la cadena sentido o ambas hebras, con lo cual es más preferido que el grupo fosfato esté en el extremo 3' tanto de la cadena antisentido y la cadena sentido. En una modalidad aún más preferida, el grupo fosfato es un grupo fosfato como se define en la presente.

25 Está también dentro de la presente invención que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede presentar un enlazador que conecta la primera y la segunda hebra. Tal enlazador es preferentemente un polímero. El polímero puede ser cualquier polímero sintético o natural. Los posibles enlazadores sintéticos son, entre otros, PEG o un polinucleótido. Tal enlazador se diseña preferentemente de tal manera que permita el repliegue parcial o completo del primer tramo sobre el segundo tramo, y viceversa.

30 Por último, está dentro de la presente invención que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es sintético, uno sintetizado químicamente, uno aislado, o uno derivado de las fuentes naturales tales como, por ejemplo, preparado por medio de la tecnología recombinante. En relación con la preparación de cualquier ácido nucleico de acuerdo con la presente invención cualquier modificación como se describe en la presente se puede introducir ya sea antes, durante o después de la preparación del ácido nucleico respectivo de acuerdo con la presente invención como conocen aquellos con experiencia en la materia.

40 El vector de acuerdo con la presente invención comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Adicionalmente, el vector puede incluir elementos para controlar la orientación, la expresión y la transcripción de dicho ácido nucleico en una célula de manera selectiva, como se conoce en la materia. El plásmido puede incluir un promotor para controlar la transcripción del material heterólogo, es decir, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, y puede ser tanto un promotor constitutivo o inducible para permitir la transcripción selectiva. Se pueden incluir opcionalmente los potenciadores que puedan ser necesarios para obtener los niveles de transcripción necesarios. Los potenciadores son generalmente cualquier secuencia de ADN no traducida que trabaja contiguamente con la secuencia de codificación, por lo tanto en cis, para cambiar el nivel de la transcripción basal dictada por el promotor. Aquellos con experiencia en la materia conocen la expresión de tales construcciones y pueden hacerlo, por ejemplo, mediante el suministro de una respectiva construcción en tándem o al tener diferentes promotores para la transcripción de la primera y segunda hebra y el primer y segundo tramo, respectivamente, del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

50 Cuando el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se fabrica o se expresa, preferentemente se expresa *in vivo*, con mayor preferencia en un paciente con necesidad del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, dicha fabricación o expresión usa preferentemente un vector de expresión, preferentemente un vector de expresión de mamífero. Los vectores de expresión se conocen en la materia y comprenden preferentemente los plásmidos, los cósmidos, los sistemas de expresión viral. Los sistemas de expresión viral preferidos incluyen, pero sin limitarse a, adenovirus, retrovirus y lentivirus.

60 En la materia se conocen los métodos para introducir los vectores en las células o tejidos. Tales métodos se pueden encontrar generalmente descritos en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbour Laboratory, Nueva York (1983, 1992), o en Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons., Baltimore, Maryland, 1998.

65 Los métodos adecuados incluyen, entre otros, la transfección, la lipofección, la electroporación y la infección con vectores virales recombinantes. En relación con la presente invención, una característica adicional del vector en una modalidad es una característica limitante de la expresión tal como un promotor y un elemento regulador, respectivamente, que son específicos para el tipo celular deseado de modo que permiten la expresión de la secuencia

del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención sólo en cuanto se proporcione el fondo que permite la expresión deseada.

5 En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o un vector de acuerdo con la presente invención y, opcionalmente, un portador, diluyente o adyuvantes u otro(s) vehículo(s) farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, dicho portador, diluyentes, adyuvantes y vehículos son inertes, y no tóxicos. La composición farmacéutica en sus diversas modalidades está adaptada para la administración de varias maneras. Tal administración comprende la administración sistémica y local, así como la oral, la subcutánea, la parenteral, la intravenosa, la intraarterial, la intramuscular, la intraperitoneal, la intranasal, y la intratecal.

15 Aquellos con experiencia en la materia conocerán que la cantidad de la composición farmacéutica y del ácido nucleico respectivo y del vector, respectivamente, depende de la condición clínica del paciente individual, el sitio y el método de administración, el esquema de administración, la edad, el sexo, el peso corporal y otros factores del paciente conocidos por los médicos. La cantidad farmacéuticamente efectiva para los fines de prevención y/o tratamiento está determinada por tales consideraciones como las que se conocen en la materia médica. Preferentemente, la cantidad es eficaz para conseguir una mejora que incluye pero no se limita a mejorar el estado de la enfermedad o para proporcionar una recuperación más rápida, mejoría o eliminación de los síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas por aquellos con experiencia en la materia médica.

20 En una modalidad preferida, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender otros compuestos farmacéuticamente activos. Preferentemente, tales compuestos farmacéuticamente activos se seleccionan del grupo que comprende compuestos que permiten la entrega a las células para la captación intracelular, los compuestos que permiten la liberación endosomal, los compuestos que permiten mayor tiempo de circulación y los compuestos que permiten la orientación a las células endoteliales o células patogénicas. Los compuestos preferidos para la liberación endosomal son la cloroquina, y los inhibidores de las bombas de H⁺ dependientes de ATP.

La composición farmacéutica se formula preferentemente para proporcionar una administración de dosis única o una administración de múltiples dosis.

30 Se reconoció que la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede usar para cualquier enfermedad que implica el desarrollo o crecimiento no deseado de la vasculatura que incluye la angiogénesis, así como cualquiera de las enfermedades y las afecciones descritas en la presente. Preferentemente, este tipo de enfermedades son enfermedades tumorales. Entre las enfermedades tumorales, los siguientes tumores son los más preferidos: el cáncer de endometrio, los carcinomas colorrectales, los gliomas, el cáncer de endometrio, los adenocarcinomas, las hiperplasias endometriales, el síndrome de Cowden, el carcinoma colorrectal no poliposo hereditario, el síndrome de Li-Fraumene, el cáncer de mama, de ovario, el cáncer de próstata (Ali, I.U, Journal of the National Cancer Institute, Vol. 92, núm. 11, 07 de junio del 2000, página 861 - 863), el síndrome Bannayan-Zonana, el LDD (síndrome de Lhermitte-Duklos) (Macleod, K., supra) las enfermedades macrocefalia-hamartoma que incluye la enfermedad de las vacas (CD) y el síndrome Bannayan-Ruvalcaba-Riley (BRR), las lesiones mucocutáneas (por ejemplo trichilemmomas), la macrocefalia, el retraso mental, el hamartomas gastrointestinal, los lipomas, los adenomas tiroideos, la enfermedad fibroquística de la mama, el gangliocitoma displásico cerebeloso y las neoplasias malignas de mama y tiroides (Vazquez, F., Sellers, W.R, supra).

45 Es preciso reconocer que cualquiera de las enfermedades tumorales a tratar con la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es preferentemente una enfermedad tumoral en la etapa tardía. En otra modalidad, la enfermedad tumoral implica a las células que son supresores negativos del tumor, con lo que más preferentemente el supresor de tumores es PTEN.

50 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención también se puede usar en un método para prevenir y/o tratar una enfermedad como se describe en la presente, donde el método comprende la administración de un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, un vector de acuerdo con la presente invención o una composición farmacéutica o medicamento de acuerdo con la presente invención para cualquiera de las enfermedades descritas en la presente.

55 En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un método para el diseño o detección de un ácido nucleico que es adecuado para la regulación descendente de RTP801, más particularmente para la regulación descendente de la función de RTP801. Este método comprende el uso de una secuencia de ácido nucleico como se describe en la presente y la evaluación de dicho ácido nucleico en un ensayo adecuado. Tal ensayo se conoce en la materia y, por ejemplo, se describe en la parte de ejemplo, de esta solicitud. En una etapa adicional, se diseña un ácido nucleico de hebra doble, preferentemente de acuerdo con los principios de diseño tal como se establece en la presente, lo cual es adecuado para la regulación descendente de RTP801, preferentemente en relación con un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional, tal como el ARN de interferencia. También el que se obtiene de este modo, es decir, el ácido nucleico diseñado o detectado, se evalúa en el ensayo respectivo y el resultado se compara, es decir, el efecto tanto del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, así como del ácido nucleico recién diseñado o detectado en tal ensayo. Preferentemente, el ácido nucleico que se diseña o se detecta es más adecuado en caso de que o bien es más estable o más eficaz, preferentemente ambos. Se reconoce que el método será particularmente

eficaz si cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención se usa como punto de partida. Por lo tanto, está dentro de la presente descripción que las nuevas moléculas de ácido nucleico se diseñarán en base a los principios descritos en la presente, en el que la secuencia objetivo en el ARNm de RTP801 se cambia ligeramente con respecto a la secuencia objetivo en el ARNm de RTP801 para el ácido nucleico correspondiente según la presente invención. Preferentemente, el ácido nucleico nuevo se cambiará al menos en uno o más nucleótidos en relación con el tramo en el ARNm objetivo, ya sea en la dirección 5' o 3' del ARNm que codifica para RTP801. Sin embargo, está dentro de la presente descripción que el cambio se produce en ambas direcciones simultáneamente lo que significa que el nuevo ácido nucleico incorpora el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que se usa como punto de partida. Está también dentro de la presente descripción que el alargamiento del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y que se usa como punto de partida se desvía ya sea al extremo 3' o el extremo 5'. En el caso de esta tendencia, ya sea el extremo 3' o el extremo 5' del nuevo ácido nucleico es más largo, es decir, más extendido que el otro extremo. Cuando la nueva molécula de ácido nucleico que se genera mediante la extensión ya sea del extremo 3' o del extremo 5' de la cadena antisentido y/o la cadena sentido, la secuencia de etapas siguiente se aplica típicamente. Si el cambio es al extremo 5' del ARNm de RTP801, el extremo 3' de la cadena antisentido tiene que extenderse por el número de los nucleótidos por el cual se cambia el extremo 5' del ARNm de RTP801. El(los) nucleótido(s) para añadir de este modo al extremo 3' de la cadena antisentido del nuevo ácido nucleico es/son complementarios a los siguientes nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia objetivo en el ARNm de RTP801 que se usa para la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que se usa como punto de partida. Lo mismo tiene que hacerse a la cadena sentido. Sin embargo, los nucleótidos que se añaden a la cadena sentido tienen que corresponder, es decir, ser complementarios a los nucleótidos recién añadidos al extremo 3' de la cadena antisentido lo cual significa que se tienen que añadir al extremo 5' de la cadena sentido. La última etapa en la cadena sentido, sin embargo se tiene que hacer sólo en la medida en que, separado de la cadena antisentido también la cadena sentido se cambia, que es el caso en los aspectos preferidos de la presente descripción. Aunque este cambio se puede realizar hasta un cierto punto definido por aquellos con experiencia en la materia, con mayor preferencia el cambio se realiza de tal manera que también el ácido nucleico nuevo todavía contiene un tramo de al menos 14 nucleótidos, preferentemente 14 nucleótidos contiguos como se presenta en cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente.

La síntesis de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente está dentro del conocimiento de la persona con experiencia en la materia. Tal síntesis, se describe, entre otros, en Beaucage SL y Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-2311, Beaucage SL y Iyer RP, Tetrahedron 1993, 49: 6123-6194 y Caruthers MH y otros, Methods Enzymol. 1987; 154: 287-313, la síntesis de los tioatos, se describe, entre otros, en Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 1985; 54: 367-402, la síntesis de las moléculas de ARN se describe en Sproat B., en Humana Press 2005 Editado por Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 y los procesos posteriores respectivos se describen, entre otros, en Pingoud A. y otros, en la IRL Press 1989 Editado por Oliver RWA, Kap. 7: 183-208 y Sproat B., en Humana Press 2005 Editado por Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 (supra).

El ARNip para RTP801 se puede hacer usando los métodos conocidos en la materia como se describió anteriormente, en base a la secuencia conocida de RTP801 (sec. con núm. de ident.: 1), y se puede hacer estable por diversas modificaciones como se describió anteriormente. Para información adicional, ver el Ejemplo 9.

Adicionalmente, en relación con los métodos descritos en la presente, se pueden usar con dichos métodos moléculas de ARN adicionales, por ejemplo, moléculas de ARN inhibitoras incluyen los oligorribonucleótidos de hebra simple preferentemente que comprenden tramos de al menos 7-10 nucleótidos consecutivos presentes en las secuencias detalladas en las Tablas A- C, dichos oligorribonucleótidos son capaces de formar [y/o comprender] regiones de hebra doble, en particular conformaciones que reconocen los complejos intracelulares, que conducen a la degradación de dichos oligorribonucleótidos en pequeñas moléculas de ARN que son capaces de ejercer la inhibición de sus correspondientes genes endógenos, y las moléculas de ADN que codifican tales moléculas de ARN. El gen endógeno correspondiente es preferentemente el gen 801 y, adicionalmente, puede ser el gen de VEGF y/o el gen de VEGF-R1. La descripción también proporciona una composición que comprende el anterior oligorribonucleótido de hebra simple en un portador, preferentemente un portador farmacéuticamente aceptable.

Además, la presente invención proporciona la terapia combinada para todas las condiciones descritas en la presente y en condiciones particulares que impliquen la neovascularización coroidea. En dicha terapia combinada, tanto el gen de RTP801 y de VEGFR se inhiben con el fin de mejorar los síntomas de la enfermedad a tratar. Estos genes se pueden inhibir con una combinación de ARNip o anticuerpos (se incluyen los anticuerpos de aptámeros) o ambos. La presente invención por lo tanto proporciona también una nueva composición farmacéutica que comprende un inhibidor de RTP801 y un inhibidor de VEGF o el VEGFR-1, el inhibidor de RTP801 es un ARNip, con mayor preferencia los ARNip núms.: 14, 22, 23, 25, 27, 39, de la Tabla A, y el inhibidor de VEGF/VEGFR-1 opcionalmente es un anticuerpo o un aptámero. El uso combinado de dichos compuestos (es decir, RTP801 ARNip y los anticuerpos VEGF o cualquier otro ejemplo combinado descrito en la presente) en la preparación de un medicamento es también parte de la presente invención.

Así, los ARNip de RTP801 tales como los ARNip núms.: 14, 22, 23, 25, 27, 39, de la Tabla A se pueden administrar en combinación con los agentes que se dirigen al VEGF o los receptores de VEGF 1 (VEGFR1). Dichos agentes actualmente existen en el mercado o en las distintas etapas de aprobación y trabajo a través de diferentes mecanismos. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos tales como el ranibizumab (Lucentis, Genentech) se pegan al VEGF liberado para inhibir la unión de VEGF a tales receptores activos. Un aptámero que puede actuar como un

- ligando/anticuerpo (Macugen, Eyetech/Pfizer, aprobado recientemente por la FDA para la AMD húmeda) es también una posibilidad. Macugen une al VEGF extracelular para bloquear su actividad. Estos fármacos se administran localmente mediante inyección intravítrea. Los compuestos a base del ARNip de anti-VEGF (como el Cand5 de Acuity inhibidor de VEGF o el ARNip 027 inhibidor de VEGFR-1) están también disponibles. Además, la Escualamina, pequeña molécula de aminosterol (Genaera), que se administra sistémicamente, según se informa, interfiere en múltiples facetas del proceso angiogénico, que incluyen la inhibición de VEGF y otro factor de crecimiento de señalización en las células endoteliales.
- La administración conjunta de un inhibidor de RTP801, preferentemente un ARNip, y cualquiera de los anteriores agentes inhibidores de VEGF/VEGFR-1 pueden tener un efecto sinérgico con lo que dicho tratamiento combinado es más eficaz que el tratamiento de cualquiera de estas composiciones individuales, independientemente de la dosis en la opción de tratamiento único. Este efecto sinérgico también está respaldado por los resultados preliminares obtenidos por el cesionario, tal como se detalla en el Ejemplo 6.
- El RTP801i tiene un mecanismo de acción diferente y es potencialmente sinérgico con los inhibidores de VEGF-VEGFR. Un estudio en ratones KO para RTP801 indica que el fenotipo de protección en los ratones KO persiste a pesar del hecho de que la expresión de ARNm de VEGF en el ojo es tan alta como en los ratones WT. Nuestros datos preliminares adicionales indican que la inhibición de RTP801 puede ser sinérgica con la inhibición de VEGF-VEGFR del eje regulador en el tratamiento de la patología retinal. Los inventores de la presente invención encontraron en experimentos adecuados que la administración de ARNip contra RTP801 en el modelo de AMD (ver el Ejemplo 6 más abajo) no sólo conduce a la regulación negativa del mismo RTP801, sino también, como consecuencia, a la regulación ascendente del PEDF factor antiangiogénico y neuroprotector, así como la regulación descendente de la expresión de MCP1, una proteína quimiotáctica de macrófagos. Así, la inhibición de RTP801 simultáneamente confiere efectos antiangiogénicos, neuroprotectores y anti-inflamatorios.
- Se ha de entender que, en el contexto de la presente invención, cualquiera de las moléculas de ARNip que se describe en la presente, o cualquiera de las grandes moléculas de ARN de hebra doble (típicamente de 25-500 nucleótidos de longitud) que procesan los complejos celulares endógenos (tales como DICER - ver anteriormente) para formar las moléculas de ARNip descritas en la presente, o las moléculas que comprenden las moléculas de ARNip descritas en la presente, se pueden emplear en el tratamiento de las enfermedades o trastornos descritos en la presente.
- Los trastornos adicionales que se pueden tratar con las moléculas y las composiciones de la presente invención incluyen todos los tipos de neovascularización coroidea (NVC), que se producen no sólo en la AMD húmeda, sino también en otras patologías oculares tales como el síndrome de histoplasmosis ocular, las estrías angiodes, las rupturas en la membrana de Bruch, la degeneración miópica, los tumores oculares y algunas enfermedades degenerativas de la retina.
- Un aspecto adicional de la presente invención proporciona los ARNip en cuestión para tratar una enfermedad relacionada con la apoptosis. Su uso para la terapia de enfermedades o trastornos asociados con el crecimiento celular patológico, incontrolado, por ejemplo, el cáncer, la psoriasis, las enfermedades autoinmunes, *entre otras*, y se proporcionan los métodos para la terapia de las enfermedades asociadas con la isquemia y la falta de flujo sanguíneo apropiado, por ejemplo, el infarto de miocardio (MI) y el accidente cerebrovascular. "Cáncer" o "tumor" se refiere a una masa creciente incontrolada de células anormales. Estos términos incluyen tanto los *tumores primarios*, que pueden ser benignos o malignos, así como los *tumores secundarios* o las *metástasis*, las cuales se extienden a otros sitios en el cuerpo. Los ejemplos de enfermedades de tipo cáncer incluyen, entre otras: carcinoma (por ejemplo: de mama, colon y pulmón), leucemia, tal como la leucemia de células B, linfoma, tal como el linfoma de células B, blastoma, tal como el neuroblastoma y melanoma.
- La invención también proporciona una composición que comprende uno o más de los compuestos de la invención en un portador, preferentemente un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede comprender una mezcla de dos o más ARNip de genes diferentes o diferentes ARNip del mismo gen. Está prevista una composición que comprende ARNip para el gen RTP801 y ARNip para el gen de VEGF y/o el gen de VEGF-R1.
- Otro compuesto de la invención comprende el compuesto anterior de la invención (estructura A) unido covalentemente o no covalentemente a uno o más compuestos de la invención (estructura A). Este compuesto se puede suministrar en un portador, preferentemente un portador farmacéuticamente aceptable, y los complejos celulares endógenos lo pueden procesar intracelularmente para producir uno o más ARNip de la invención. Otro compuesto de la invención comprende el compuesto anterior de la invención (estructura A) unido covalentemente o no covalentemente a un ARNip para otro gen, especialmente el gen de VEGF y/o el gen de VEGF-R1.
- Esta descripción también describe una entidad química nueva que es un inhibidor de RTP801, preferentemente un ARNip, químicamente unido, covalentemente o no covalentemente, a cualquiera de los anteriores agentes inhibidores de VEGF/VEGFR-1. Una entidad química particular prevista es un ARNip inhibidor de RTP801 unido covalentemente a un anticuerpo contra el VEGF o los receptores de VEGF-1. Aquellos con experiencia en la materia conocen los métodos de producción de tales entidades químicas nuevas.

Esta invención también comprende una estructura de hebra doble en tándem que comprende dos o más secuencias de ARNip, que se procesan intracelularmente para formar dos o más ARNip diferentes, uno que inhibe el 801 y un segundo que inhibe el VEGF/VEGFR-1. En un aspecto relacionado, esta invención también comprende una estructura de hebra doble en tándem que comprende dos o más secuencias de ARNip, que se degradan intracelularmente para formar dos o más diferentes ARNip, ambos inhiben el 801.

En particular, se prevé que un oligonucleótido largo (típicamente aproximadamente 80 a 500 nucleótidos de longitud) comprende uno o más tallos y estructuras de lazo, donde las regiones del tallo que comprenden las secuencias de los oligonucleótidos de la invención, se pueden administrar en un portador, preferentemente un portador farmacéuticamente aceptable, y los complejos celulares endógenos lo pueden procesar intracelularmente (por ejemplo, por Drosha y Dicer como se describió anteriormente) para producir uno o más pequeños oligonucleótidos de hebra doble (ARNip) que son oligonucleótidos de la invención. Este oligonucleótido se puede denominar una construcción de ARNhc en tándem. Se prevé que este oligonucleótido largo es un oligonucleótido de hebra simple que comprende uno o más estructuras de tallos y lazos, donde cada región del tallo comprende una secuencia de ARNip sentido y la correspondiente antisentido de un gen 801. En particular, se prevé que este oligonucleótido comprende las secuencias de ARNip sentido y antisentido como se representa en cualquiera de las Tablas A a C. Alternativamente, la construcción de ARNhc en tándem puede comprender la secuencia de ARNip sentido y la correspondiente antisentido de un gen 801 y, adicionalmente, la secuencia de ARNip sentido y la correspondiente antisentido de un gen diferente, tal como el VEGF o el VEGF-R1.

Como se mencionó en la presente, el ARNip contra RTP801 puede ser el principal componente activo en una composición farmacéutica, o puede ser un componente activo de una composición farmacéutica que contiene dos o más ARNip (o moléculas que codifican o endógenamente producen dos o más ARNip, ya sea una mezcla de moléculas o una o más moléculas en tándem que codifican dos o más ARNip), dicha composición farmacéutica adicionalmente comprende una o más moléculas de ARNip adicionales que se dirigen a uno o más genes adicionales. La inhibición simultánea de RTP801 y dicho gen adicional(s) probablemente tendrá un efecto aditivo o sinérgico para el tratamiento de las enfermedades descritas en la presente, de acuerdo a lo siguiente:

Insuficiencia renal aguda (ARF) y otros trastornos microvasculares: la composición farmacéutica para el tratamiento de la ARF puede comprender las combinaciones de los compuestos siguientes: 1) ARNip de RTP801 y dímeros de ARNip de p53; 2) dímeros de ARNip de RTP801 y Fas; 3) dímeros de ARNip de RTP801 y Bax; 4) dímeros de ARNip de p53 y Fas; 5) dímeros de ARNip de Bax y RTP801; 6) dímeros de ARNip de RTP801 y Noxa; 7) dímeros de ARNip de RTP801 y Puma; 8) dímeros de ARNip de RTP801 (REDD1) y RTP801L (REDD2); 9) ARNip de RTP801, ARNip de Fas y cualquiera de ARNip de RTP801L, ARNip de p53, ARNip de Bax, ARNip de Noxa, o ARNip de Puma para formar trímeros o polímeros (por ejemplo, las moléculas en tándem que codifican tres ARNip).

Degeneración macular (MD), retinopatía diabética (DR), lesión de la médula espinal: las composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la MD, la DR y la lesión de la médula espinal pueden comprender las combinaciones de compuestos siguientes: 1) ARNip de RTP801 combinado con cualquiera de ARNip de VEGF, ARNip de VEGF-R1, ARNip de VEGF R2, ARNip de PKCbeta, ARNip de MCP1, ARNip de eNOS, ARNip de KLF2, ARNip de RTP801L (ya sea mezclado físicamente o en una molécula en tándem); 2) ARNip de RTP801 en combinación con dos o más ARNip de la lista anterior (mezclado físicamente o en una molécula en tándem que codifica tres ARNip, o una combinación de éstos).

COPD y trastornos respiratorios: la composición farmacéutica para el tratamiento de los trastornos respiratorios puede comprender las combinaciones de los compuestos siguientes: ARNip de RTP801 combinado con ARNip contra uno o más de los siguientes genes: elastasas, metaloproteasas de matriz, fosfolipasas, caspasas, esfingomielinasa y ceramida sintasa.

Adicionalmente, el ARNip de RTP801 o cualquier molécula de ácido nucleico que comprende o codifica el ARNip de RTP801 se puede unir (covalentemente o no covalentemente) a los anticuerpos, con el fin de lograr una mayor orientación para el tratamiento de las enfermedades descritas en la presente, de acuerdo a lo siguiente:

ARF: anticuerpo anti-Fas (preferentemente anticuerpos neutralizantes).
 Degeneración macular, retinopatía diabética, lesión de la médula espinal: anticuerpo anti-Fas, anticuerpo anti-MCP1, anticuerpo anti-VEGFR1 y anti-VEGFR2. Los anticuerpos deben ser preferentemente anticuerpos neutralizantes.

Son particularmente deseables moléculas tales como, por ejemplo, las moléculas de ADN antisentido que comprenden las secuencias de ARNip descritas en la presente (con las modificaciones apropiadas de los ácidos nucleicos) y se pueden usar en la misma capacidad que los correspondientes ARNip para todos los usos y métodos descritos en la presente.

La descripción también describe un método de tratamiento de un paciente que sufre de un trastorno tal como los trastornos descritos en la presente, que comprende administrar al paciente la composición anterior o el compuesto en una dosis terapéuticamente eficaz para de ese modo tratar al paciente.

Se notará que todos los polinucleótidos que se usan en la presente invención pueden sufrir modificaciones con el fin de poseer propiedades terapéuticas mejoradas. Las modificaciones o los análogos de los nucleótidos se pueden introducir para mejorar las propiedades terapéuticas de los polinucleótidos. Las propiedades mejoradas incluyen un aumento de la resistencia a las nucleasas y/o aumento de la capacidad para penetrar las membranas celulares. La resistencia a las nucleasas, cuando sea necesario, se proporciona por cualquier método conocido en la materia que no interfiera con la actividad biológica de la AS polinucleótido, el ARNip, el ADNc y/o las ribozimas tan necesarias para el método de uso y entrega (Iyer y otros, 1990; Eckstein, 1985; Spitzer y Eckstein, 1988; Woolf y otros, 1990; Shaw y otros, 1991). Las modificaciones que se pueden hacer a los oligonucleótidos con el fin de aumentar la resistencia a las nucleasas incluyen modificar el heteroátomo de fósforo o de oxígeno en el esqueleto de fosfato. Estas incluyen preparar los metil fosfonatos, los fosforotioatos, los fosforoditioatos y los oligómeros de morfolino. En una modalidad, se proporciona por tener enlaces fosforotioato que enlazan las cuatro a seis bases del extremo 3' de los nucleótidos. Alternativamente, los enlaces fosforotioato enlazan todas las bases de los nucleótidos. Otras modificaciones conocidas en la materia se pueden usar donde se conserve la actividad biológica, pero la estabilidad a las nucleasas aumente sustancialmente.

Todos los análogos de, o modificación a, un polinucleótido se puede emplear con la presente invención, siempre que dicho análogo o modificación no afecte sustancialmente la función del polinucleótido. Los nucleótidos se pueden seleccionar de bases modificadas de origen natural o sintético. Las bases de origen natural incluyen adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. Las bases modificadas de nucleótidos incluyen inosina xantina, hipoxantina, 2 - amino adenina, 6-metilo, 2-propilo y otras adeninas de alquilo, 5-halo uracilo, 5-halo citosina, citosina 6-aza y timina 6-aza, pseudo uracilo, 4 - tiuracilo, 8-halo adenina, 8-amino adenina, 8-tiol adenina, 8-tioalquilo adeninas, 8-hidroxilo adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-halo guaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8 -tioalquilo guaninas, 8 - hidroxilo guanina y otras guaninas sustituidas, otras aza y deaza adeninas, otras aza y deaza guaninas, 5-trifluorometil uracilo y 5 - trifluoro citosina.

Además, los análogos de los polinucleótidos se pueden preparar donde que la estructura del nucleótido se altera fundamentalmente y se adaptan mejor como reactivos terapéuticos o experimentales. Un ejemplo de un análogo de nucleótido es un ácido nucleico peptídico (PNA) en el que la desoxirribosa (o ribosa) del esqueleto de fosfato en el ADN (o ARN se sustituye con un esqueleto de poliamida el cual es similar al encontrado en los péptidos. Se demostró que los análogos de PNA son resistentes a la degradación por enzimas y tienen vidas extendidas in vivo e in vitro. Adicionalmente, se demostró que los PNA se unen más fuerte a una secuencia de ADN complementaria que a una molécula de ADN. Esta observación se atribuye a la falta de repulsión de carga entre la hebra de PNA y la hebra de ADN. Otras modificaciones que se pueden hacer a los oligonucleótidos incluyen esqueletos de polímeros, esqueletos cíclicos, o esqueletos acíclicos.

Los polipéptidos empleados en la presente invención también se pueden modificar, opcionalmente modificar químicamente, con el fin de mejorar su actividad terapéutica. "Químicamente modificados" - cuando se hace referencia a los polipéptidos, significa un polipéptido, donde al menos uno de sus residuos de aminoácidos se modifica ya sea por procesos naturales, tales como procesamiento u otras modificaciones postraduccionales, o mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la materia. Entre las numerosas modificaciones típicas conocidas, los ejemplos no exclusivos incluyen: acetilación, acilación, amidación, ribosilación de ADP, glicosilación, formación de anclaje GPI, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, metilación, miristilación, pegilación, prenilación, fosforilación, ubiquitinación, o cualquier otro proceso similar.

Las posibles modificaciones de polipéptidos adicionales (tales como las que resultan de la alteración de la secuencia del ácido nucleico) incluyen los siguientes:

"Sustitución conservadora" - se refiere a la sustitución de un aminoácido en una clase por un aminoácido de la misma clase, donde una clase se define por las propiedades fisicoquímicas comunes de la cadena lateral del aminoácido y las altas frecuencias de sustitución en polipéptidos homólogos encontrados en la naturaleza, como se determinó, por ejemplo, mediante un patrón de la matriz Dayhoff de frecuencia de intercambio o matriz BLOSUM. Seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos se han clasificado e incluyen: la clase I (Cys); la clase II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); la clase III (Asn, Asp, Gln, Glu); la clase IV (His, Arg, Lys); la clase V (Ile, Leu, Val, Met) y la clase VI (Phe, Tyr, Trp). Por ejemplo, la sustitución de un Asp por otro residuo de la clase III tal como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservadora. "Sustitución no conservadora" - se refiere a la sustitución de un aminoácido en una clase con un aminoácido de otra clase, por ejemplo, la sustitución de una Ala, un residuo de la clase II, con un residuo de la clase III tal como Asp, Asn, Glu o Gln.

"Supresión" - es un cambio en cualquiera de las secuencias de nucleótidos o aminoácidos en la que uno o más nucleótidos o residuos de aminoácidos, respectivamente, están ausentes.

"Inserción" o "adición" - es ese cambio en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos que ha resultado en la adición de uno o más nucleótidos o residuos de aminoácidos, respectivamente, en comparación con la secuencia de origen natural.

"Sustitución" - reposición de uno o más nucleótidos o aminoácidos por diferentes nucleótidos o aminoácidos, respectivamente. En cuanto a las secuencias de aminoácidos la sustitución puede ser conservadora o no conservadora.

En un aspecto adicional de la presente descripción, el polipéptido o polinucleótido RTP801 se puede usar para diagnosticar o detectar la degeneración macular en un sujeto. Un método de detección comprendería típicamente el ensayo del ARNm de RTP801 o el polipéptido RTP801 en una muestra derivada de un sujeto.

"Detección" - se refiere a un método de detección de una enfermedad. Este término se puede referir a la detección de una predisposición a una enfermedad, o a la detección de la gravedad de la enfermedad.

Por "homólogo/homología", tal como se usa en la presente invención, se entiende al menos aproximadamente 70%, preferentemente al menos aproximadamente 75% de homología, ventajosamente al menos aproximadamente 80% de homología, con mayor ventaja al menos aproximadamente 90% de homología, incluso con mayor ventaja al menos aproximadamente 95%, por ejemplo, al menos aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente el 99% o incluso aproximadamente 100% de homología. La invención también comprende que estos polinucleótidos y polipéptidos se pueden usar de la misma manera que los polinucleótidos y polipéptidos en la presente o antes mencionados.

Alternativa o adicionalmente, "homología", con respecto a las secuencias, se puede referir al número de posiciones con nucleótidos o residuos de aminoácidos idénticos, dividido por el número de nucleótidos o residuos de aminoácidos en la más corta de las dos secuencias, donde la alineación de la dos secuencias se puede determinar de acuerdo con el algoritmo de Wilbur y Lipman ((1983) Proc Natl Acad Sci., Estados Unidos, 80:726); por ejemplo, usando una ventana de tamaño de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, y una penalización por hueco de 4, el análisis asistido por computadora y la interpretación de los datos de secuencia, que incluyen la alineación, se pueden realizar convenientemente usando los programas disponibles comercialmente (por ejemplo, Intelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc., CA). Cuando las secuencias de ARN se dice que son similares, o que tienen un grado de identidad o de homología de secuencia con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN. Las secuencias de ARN dentro del alcance de la invención se pueden derivar de secuencias de ADN o sus complementos, mediante la sustitución de timidina (T) en la secuencia de ADN con uracilo (U).

Adicionalmente o alternativamente, la similitud u homología de la secuencia de aminoácido puede determinarse, por ejemplo, usando el programa BlastP (Altschul y otros, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402) y disponible en el NCBI. Las siguientes referencias proporcionan algoritmos para comparar la identidad u homología relativa de los residuos de aminoácido de dos polipéptidos, y adicionalmente o alternativamente, con respecto a lo anterior, las enseñanzas en estas referencias pueden usarse para determinar el porcentaje de homología: Smith y otros, (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith y otros, (1983) Nucl. Acids Res. 11:2205-2220; Devereux y otros, (1984) Nucl. Acids Res. 12:387-395; Feng y otros, (1987) J. Molec. Evol. 25:351-360; Higgins y otros, (1989) CABIOS 5:151-153; and Thompson y otros, (1994) Nucl. Acids Res. 22:4673-4680.

"Que tiene al menos X% de homología" - con respecto a dos secuencias de aminoácido o nucleótidos, se refiere al porcentaje de residuos que son idénticos en las dos secuencias cuando las secuencias se alinean óptimamente. Así, 90% identidad de secuencia de aminoácidos significa que 90% de los aminoácidos en dos o más secuencias de polipéptidos óptimamente alineadas son idénticas.

Una modalidad adicional de la presente invención concierne una composición farmacéutica que comprende un inhibidor RTP801 en una cantidad terapéuticamente efectiva como un ingrediente activo y un portador farmacéuticamente aceptable. El inhibidor es un ARNip sujeto como se describió anteriormente, y puede ser en particular, ARNip núms: 22, 23, 25, 27, 39, de la Tabla A).

Los ingredientes activos de la composición farmacéutica pueden incluir oligonucleótidos que son resistentes a la nucleasa necesarios para la práctica de la invención o un fragmento de estos que muestran tener el mismo efecto dirigido contra la(s) secuencia(s) adecuada(s) y/o ribozimas. Las combinaciones de ingredientes activos que se describen en la presente invención pueden usarse, e incluyen combinaciones de secuencias antisentido.

Una modalidad adicional de la presente invención proporciona el uso de una dosis terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 para la preparación de un medicamento para promover la recuperación en un paciente que padece de enfermedad o lesión de la médula espinal.

El inhibidor de RTP801 es un ARNip sujeto como se describió anteriormente.

La invención se ha descrito de manera ilustrativa, y se entenderá que la terminología usada pretende ser de la naturaleza de las palabras de la descripción y no una limitación.

Obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores. Se entiende, por lo tanto, que dentro del alcance de las reivindicaciones anexas, la invención puede practicarse de cualquier otra forma que como la específicamente descrita.

A través de toda esta solicitud, se citan referencias de varias publicaciones, que incluyen patentes de Estados Unidos por autores, por año y por número de patente. La divulgación de estas publicaciones y patentes y solicitudes de patente en su totalidad se citan por este medio en esta aplicación para describir más completamente el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- La Fig. 1** detalla la secuencia codificante del gen RTP801 (sec. con núm. de ident.:1);
- La Fig. 2** detalla la secuencia de aminoácido del polipéptido RTP801 (sec. con núm. de ident.:2);
- La Fig.3** es un diagrama que representa los exones, CDS, SNP humanos y la posición de varias moléculas de ácido nucleico que son humano específicas o específicas para humanos, ratón y rata en paralelo;
- La Fig. 4A-H** representa un panel de los resultados del análisis de membrana de Western obtenidos con la aplicación de varios ácidos nucleicos de hebra doble ejemplos y ejemplos comparativos de de acuerdo con la presente invención y ejemplos comparativos de una primera línea celular humana, donde el experimento se realizó dos veces, referidos como experimento 1 y experimento 2, y en donde el nivel de expresión de p110a y p85 se representa como controles de carga y la intensidad (densidad) de la banda RTP801 es una medida de la actividad inhibidora del ácido nucleico de hebra doble particular aplicado;
- La Fig. 5A-F** representa un panel de los resultados del análisis de membrana de Western obtenidos con la aplicación de varios ácidos nucleicos de hebra doble de acuerdo con la presente invención y los ejemplos comparativos para una segunda línea celular humana, donde el experimento se realizó dos veces, referidos como experimento 1 y experimento 2, y en donde el nivel de expresión de p110a y p85 se representa como controles de carga y la densidad de la banda RTP801 es una medida de la actividad inhibidora del ácido nucleico de hebra doble particular aplicado;
- La Fig. 6A-C** representa un panel de los resultados del análisis de membrana de Western obtenidos con la aplicación de varios ácidos nucleicos de hebra doble de acuerdo con la presente invención y ejemplos comparativos para la primera línea celular humana a diferentes concentraciones, específicamente 10 nM (5A), 5 nM (5B) y 1 nM (5C), donde el experimento se realizó dos veces, referidos como experimento 1 y experimento 2, y en donde el nivel de expresión de p110a y p85 se representa como controles de carga y la densidad de la banda RTP801 es una medida de la actividad inhibidora del ácido nucleico de hebra doble particular aplicado;
- La Fig.7** representa un panel de los resultados del análisis de membrana de Western obtenidos con la aplicación de varios ácidos nucleicos de hebra doble de acuerdo con la presente invención y ejemplos comparativos para una línea celular de ratón, donde el experimento se realizó dos veces, referidos como experimento 1 y experimento 2, y en donde el nivel de expresión de p110a y p85 se representa como controles de carga y la densidad de la banda RTP801 es una medida de la actividad inhibidora del ácido nucleico de hebra doble particular aplicado;
- La Fig. 8** muestra los resultados de experimentos en un sistema de modelo AMD de ratón;
- La Fig. 9** muestra los resultados de experimentos adicionales en un sistema de modelo AMD de ratón;
- La Fig. 10** muestra los resultados de experimentos en un sistema de modelo AMD de primate no humano;
- La Fig. 11A-B** muestra los resultados de experimentos adicionales en un sistema de modelo AMD de primate no humano;
- La Fig. 12A-B** muestra los resultados de otros experimentos adicionales en un sistema de modelo AMD de primate no humano;
- La Fig. 13A-B** representa un análisis de los resultados experimentales alcanzados en un modelo AMD de primate no humano;
- La Fig. 14** representa un análisis adicional de los resultados experimentales alcanzados en un modelo AMD de primate no humano.
- La Fig. 15 A-C** muestra los resultados de un experimento que involucra la instilación intratraqueal de un plásmido que expresa RTP801 en ratones;
- La Fig. 16 A-C** muestra los resultados de un modelo de humo de cigarrillo a corto plazo (7 días) en ratones KO y WT RTP801;

- La Fig. 17 A-C muestra los resultados de un modelo de humo de cigarrillo a corto plazo en ratones WT instilados con anti-RTP801 activo (REDD14) y ARNip control (REDD8).
- 5 La Fig 18 muestra los resultados de experimentos con ratones KO RTP801 en un modelo CS a largo plazo;
- La Fig. 19 muestra los resultados de experimentos en un sistema de modelo ARF de ratón;
- La Fig. 20 muestra los resultados de experimentos en un sistema de modelo retinopaía diabética de ratón;
- 10 La Fig. 21 muestra los resultados de experimentos adicionales en un sistema de modelo retinopaía diabética de ratón;
- La Fig. 22 muestra los resultados de otros experimentos adicionales en un sistema de modelo retinopaía diabética de ratón;
- 15 La Fig. 23 muestra los resultados de experimentos de inhibición RTP801 / VEGF combinados en un sistema de modelo CNV de ratón;
- La Fig. 24 muestra los resultados de experimentos de inhibición RTP801 / VEGF combinados adicionales en un sistema de modelo CNV de ratón;
- 20 La Fig. 25 muestra los resultados de experimentos que estudian el efecto del ARNip RTP801 en la expresión génica en la retina neural y RPE;
- 25 La Fig. 26 A-B muestran los resultados adicionales de experimentos que estudian el efecto del ARNip RTP801 en la expresión génica en la retina neural y RPE; y
- La Fig. 27 muestra los resultados de experimentos que demuestran que RT801NP es tan activo como RTP801.
- 30

EJEMPLOS

35 Se cree que una persona con experiencia en la técnica puede, sin experimentación adicional y usando la descripción anterior, utilizar la presente invención en toda su extensión. Las siguientes modalidades preferidas específicas son, por lo tanto, construidas meramente como ilustrativas, y de ninguna manera limitativas de la invención reivindicada.

40 Los protocolos estándar de biología molecular conocidos en la técnica no descritos específicamente en la presente generalmente se siguen prácticamente como en Sambrook y otros, *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), y en Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988).

45 Los protocolos estándar de síntesis orgánica conocidos en la técnica no descritos específicamente en la presente generalmente se siguen prácticamente como en *Organic syntheses: Vol.1- 79*, editors vary, J. Wiley, Nueva York, (1941 - 2003); Gewert y otros, *Organic synthesis workbook*, Wiley-VCH, Weinheim (2000); Smith & March, *Advanced Organic Chemistry*, Wiley-Interscience; 5ta edición (2001).

50 Los métodos estándar de química medicinal conocidos en la técnica no descritos específicamente en la presente generalmente se siguen prácticamente como en las series "*Comprehensive Medicinal Chemistry*", de varios autores y editores, publicadas por Pergamon Press.

Las características de la presente invención descritas en la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos pueden, separadamente o en cualquier combinación de estas ser material para realizar la invención en varias formas.

55 Ejemplo 1

Materiales y métodos generales

60 Si no se indica lo contrario, los siguientes materiales y métodos se usaron en los Ejemplos 1-5:

Cultivo de células

65 La primera línea celular humana, concretamente, las células HeLa (Colección Americana de Cultivos Tipo) se cultivaron tal como sigue: las células HeLa (Colección Americana de Cultivos Tipo) se cultivaron como se describe en Czauderna F y otros (Czauderna, F., Fechtner, M., Aygun, H., Arnold, W., Klippel, A., Giese, K. & Kaufmann, J. (2003). *Nucleic Acids Res*, 31, 670-82).

La segunda línea celular humana fue una línea celular humana de queratinocitos la cual se cultivó de la siguiente manera: Los queratinocitos humanos se cultivaron a 37 °C en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía 10% de FCS.

5 La línea celular de ratón fue la B16V (Colección Americana de Cultivos Tipo) que se cultivó a 37 °C en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía 10% de FCS. Las condiciones de cultivo fueron las descritas en Methods Find Exp Clin Pharmacol. 1997 mayo; 19(4):231-9:

10 En cada caso, las células se sometieron a los experimentos como se describe en la presente a una densidad de aproximadamente 50.000 células por pocillo y el ácido nucleico de hebra doble de acuerdo con la presente invención o se añadió un ácido nucleico de hebra doble comparativo a 20 nM, por lo que el ácido nucleico de hebra doble se acomplejó usando 1 µg/ml de un lípido registrado.

15 *Inducción de una condición similar a la hipoxia*

Las células se trataron con CoCl₂ para inducir una condición similar a la hipoxia de la siguiente manera: las transfecciones de ARNip se llevaron a cabo en placas de 10-cm (30-50% de confluencia) como se describe por (Czudema y otros, 2003; Kretschmer y otros, 2003). E resumen, los ARNip se transfectaron mediante la adición de un complejo preformado concentrado 10x de GB y lípidos en medio libre de suero a las células en medio completo. El volumen total de la transfección fue de 10 ml. La concentración lipídica final fue de 1,0 µg/ml, la concentración final de ARNip fue 20 nM a menos que se indique lo contrario. La inducción de las respuestas hipóxicas se llevó a cabo mediante la adición de CoCl₂ (100µM) directamente al medio de cultivo de tejidos 24 h antes de la lisis.

25 *Preparación de extractos celulares e inmunotransferencia*

La preparación de los extractos celulares y el análisis de inmunotransferencia se realizaron prácticamente como es descrito por Klippel y otros (Klippel, A., Escobedo, M.A., Wachowicz, M.S., Apell, G., Brown, T.W., Giedlin, M.A., Kavanaugh, W.M. & Williams, L.T. (1998). Mol Cell Biol, 18,5699-711; Klippel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, W.M., Apell, G., Escobedo, M.A. & Williams, L.T. (1996). Mol Cell Biol, 16, 4117-27). Los anticuerpos policlonales contra el RTP801 de longitud completa se generaron por medio de la inmunización de conejos con la proteína recombinante RTP801 producida en bacterias a partir del vector de expresión pET19-b (Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Alemania). Los anticuerpos monoclonales murinos anti-P110a y anti-p85 se describieron por Klippel y otros (supra).

35 **Ejemplo 2**

Reducción de la expresión de RTP801 en una primera línea celular humana

Se prepararon varios ácidos nucleicos de hebra doble. Su ubicación en relación con el ARNm y CDS, así como SNPs humano en el ácido nucleico que codifica para RTP801 humano (núm. de acceso en el banco de datos NM_019058) se representa en la Figura 3. La primera línea celular humana se puso en contacto con dichos ácidos nucleicos de hebra doble como se describió en el Ejemplo 1. Tras la inducción de una condición similar a la hipoxia y el tratamiento con dichos ácidos nucleicos de hebra doble las células se lisaron y los lisados celulares se sometieron a inmunotransferencia. La p110a, que es una unidad catalítica de la quinasa PI3, y la p85 se usaron como controles de carga. La intensidad de la banda RTP801 como se visualizó usando anticuerpos policlonales RTP801 es una medida de la actividad de los ácidos nucleicos de hebra doble individuales en términos de reducir el nivel de expresión de RTP801.

50 Todos y cada uno de los ácidos nucleicos de hebra doble se modificaron de tal manera que un grupo 2'-O-Me estaba presente en los nucleótidos primero, tercero, quinto, séptimo, noveno, undécimo, decimotercero, decimoquinto, decimoséptimo y decimonoveno de la cadena antisentido, por lo que la misma modificación, es decir, un grupo 2'-O-Me estaba presente en los nucleótidos segundo, cuarto, sexto, octavo, décimo, duodécimo, decimocuarto, decimosexto y decimoctavo de la cadena sentido. Además, es de señalar que en el caso de estos ácidos nucleicos particulares de acuerdo con la presente invención, el primer tramo es idéntico a la primera hebra y el segundo tramo es idéntico a la segunda hebra y estos ácidos nucleicos son también de extremos romos..

55 Los experimentos se llevaron a cabo dos veces y los resultados individuales se muestran en las Figuras. 4A a H, en donde se designaron como Experimento 1 y Experimento 2, respectivamente.

60 Las representaciones h, hr y hmr en las Figuras. 4A a H indican que el respectivo ácido nucleico de hebra doble se diseñó tal como para dirigirse a una sección del ARNm de RTP801 el cual es específico para el ARNm de RTP801 humano (h), para dirigirse a una sección del ARNm de RTP801 el cual es específico para el ARNm de RTP801 de humanos y ratas (hr) y para dirigirse a una sección del ARNm de RTP801 el cual es específico para el ARNm de RTP801 de humanos, ratón y rata (hmr). El ácido nucleico de hebra doble referido como el núm. 40.1 se usó como control positivo y las células sin tratar (UT +) se usaron como control negativo.

65 De acuerdo con los resultados, los siguientes ácidos nucleicos de hebra doble se arreglaron para ser particularmente

útiles en la regulación descendente de la expresión de RTP801: núm. 14, núm. 15, núm. 20, núm. 21, núm. 22, núm. 23, núm. 24, núm. 25, núm. 27, núm. 39, núm. 40, núm. 41, núm. 42, núm. 43, núm. 44, núm. 49 y núm. 50 (ver la Tabla A).

Ejemplo 3

5 **Reducción de la expresión de RTP801 en una segunda línea celular humana**

Los experimentos tal como se describieron en relación con el Ejemplo 2 se repitieron usando la segunda línea celular humana tal como se especificó en el Ejemplo 1 y los resultados se muestran en las Figuras. 5A a F.

10 Como se puede deducir de estas figuras, los resultados tal como se obtuvieron en relación con los experimentos descritos en el Ejemplo 2, se confirmaron usando esta segunda línea celular humana.

Ejemplo 4

15 **Efecto de la dosis de los ácidos nucleicos de hebra doble específicos de RTP801**

En este experimento, se investigó el efecto de la dosificación de los ácidos nucleicos de hebra doble específicos de RTP801.

20 Para ello, las células HeLa se trataron como en relación con los Ejemplos 2 y 3, por lo que la concentración del ácido nucleico de hebra doble en el caldo de cultivo fue de 10 nM, 5 nM y 1 nM. Como control positivo se usó el ácido nucleico de hebra doble núm. 40.1, como control negativo, las células sin tratar (UT +). La lectura fue la misma que se describió en relación con los Ejemplos 2 y 3. Los ácidos nucleicos de hebra doble particulares que se usaron fueron aquellos con números de referencia interna 14, 22, 23 y 27 los cuales están dirigidos a tramos en el ARNm de RTP801, los cuales
25 comparten los humanos, ratones y ratas, y los ácidos nucleicos de hebra doble con los números de referencia interna 39 y 42 los cuales están dirigidos a tramos del ARNm de RTP801 específicos para RTP801 humano.

Los resultados se muestran en la Figura. 6A a C. A partir de dichas figuras se puede considerar que existe una clara
30 dependencia de la concentración del efecto de los ácidos nucleicos de hebra doble específicos para RTP801, por lo cual fueron particularmente eficaces las moléculas de ácido nucleico que tenían los números de referencia interna 1, 15, 20, 21, 24, 40, 41, 43, 44, 22, 23, 27, 39, 42, 40.1, 44.1, y 14, preferentemente 22, 23, 27, 39, 42, 40.1 y 44.1 y con mayor preferencia 14, 23 y 27 y preferentemente cada una de dichas moléculas de ácido nucleico tiene el patrón de modificación particular como se describió para ellas en la parte de ejemplo de la presente.

35 **Ejemplo 5**

Especificidad de especies del ácido nucleico de hebra doble específico de RTP801

40 Los ácidos nucleicos de doble cadena de acuerdo con la presente invención se diseñaron contra los tramos del ARNm de RTP801, que son el mismo o diferente en diversas especies. Para probar si había una especificidad de especie de un ácido nucleico de hebra doble específico de RTP801, los ácidos nucleicos de hebra doble con los números de referencia interna 14, 22, 23 y 27 que se dirigían a un tramo del ARNm de RTP801 que era conservado entre el ARNm de RTP801 de humano, ratón y rata, y los ácidos nucleicos de hebra doble con los números de referencia interna 39 y
45 42 y el ácido nucleico de hebra doble comparativo el cual estaba dirigido a un tramo del ARNm de RTP801 que era específico para el ARNm de RTP801 humano, es decir, el ácido nucleico de hebra doble y el comparativo dirigidos a un tramo que, como tal, no estaba presente en el ratón o rata, se compararon en términos de regulación descendente de RTP801 usando el mismo enfoque y lectura tal como se especificó en los Ejemplos 1 y 2.

50 Aunque todos los ácidos nucleicos de hebra doble usados eran en principio activos contra el ARNm humano y, como se mostró en los ejemplos anteriores, también eran adecuados para regular de forma descendente la expresión de RTP801, al hacer uso de una línea celular de ratón, solamente aquellos ácidos nucleicos de hebra doble que también eran específicos para el ARNm de RTP801 de ratón, redujeron efectivamente la expresión de RTP801, concretamente, los ácidos nucleicos de hebra doble núms. 14, 22, 23 y 27.

55 A partir de este resultado se pudo concluir que era posible diseñar ácidos nucleicos de hebra doble dirigidos a RTP801, los cuales fueran específicos para una o varias especies. Esto permite el uso de la misma molécula en modelos animales así como en el hombre.

60 **Ejemplo 6**

Modelos experimentales, métodos y resultados relacionados con la degeneración macular

65 Los compuestos de la presente invención se probaron en los siguientes, un modelo animal de neovascularización coroidea (CNV). Esta característica de la AMD húmeda se indujo en los modelos animales por tratamiento con láser.

A) MODELO DE RATÓN

Inducción de neovascularización coroidea (CNV)

5 La neovascularización coroidea (CNV), una característica de la AMD húmeda, se desencadenó mediante la fotocoagulación con láser (532 nm, 200 mW, 100 ms, 75 μ m) (OcuLight GL, Iridex, Mountain View, CA) que se llevó a cabo en ambos ojos de cada ratón el día 0 por un solo individuo al que se le ocultó la asignación del grupo de fármacos. Los puntos de láser se aplicaron de una manera estandarizada alrededor del nervio óptico, usando un sistema de administración de lámpara de hendidura y un cubreobjetos como una lente de contacto.

10

Grupos de tratamiento

La CNV se indujo en los siguientes grupos de ratones (machos 6-8 semanas de edad):

15

(1) 12 ratones WT;

(2) 12 ratones knock-out para RTP801;

(3) 12 ratones WT inyectados con 0,25 μ g de ARNip anti-RTP801 activo estabilizado sintético (REDD14) en un ojo y ARNip anti-RTP801 inactivo (REDD8 - control negativo) en el ojo contralateral, en los días 0 y 7;

20

(4) 12 ratones WT inyectados con 0,25 μ g de ARNip anti-RTP801 activo estabilizado sintético (REDD14) en un ojo y ARNip anti-GFP inactivo (control negativo) en el ojo contralateral en los días 0 y 7;

(5) 12 ratones WT inyectados con 0,1 μ g de ARNip anti-RTP801 activo estabilizado sintético (REDD14) en un ojo y PBS (control negativo) en el ojo contralateral en los días 0 y 7;

(6) 12 ratones WT inyectados con 0,05 μ g de ARNip anti-RTP801 activo estabilizado sintético (REDD14) en un ojo y PBS (control negativo) en el ojo contralateral en los días 0 y 7.

25

Ambos ojos de cada ratón se trataron con láser. El volumen que se inyectó fue de 2 μ l.

Evaluación

30

1. El experimento se terminó en el día 14. Para la evaluación, los ojos se enuclearon y se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 30 min a 4°C. La retina neurosensorial se separó y se cortó del nervio óptico. El restante complejo RPE-coroideas-esclera se montó en la superficie plana en el Immu-Mount (medio de montaje Vectashield, Vector) y el cubreobjetos. Los montajes planos se examinaron con un microscopio confocal de barrido láser (TCS SP, Leica, Alemania). Los vasos se visualizaron mediante la excitación con láser de argón azul. Las secciones ópticas horizontales (paso de 1 μ m) se obtuvieron de la superficie del complejo RPE-coroideas-esclera. El plano focal más profundo en el cual el entorno de la red vascular coroidea se conectaba a la lesión, que se pudo identificar, se consideró que era el piso de la lesión. Cualquier vaso en el área tratada con láser y superficial a este plano de referencia se consideró como CNV. Las imágenes de cada sección se almacenaron digitalmente. El área de la fluorescencia relacionada con CNV se midió por análisis computerizado de imagen usando software Leica TCS SP. La suma de toda la zona de fluorescencia en cada sección horizontal se usó como un índice para el volumen de CNV.

35

40

2. Los ratones WT separados (5 ojos por grupo) se usaron para evaluar la expresión de ARNm de RTP801 en CNV (así como la expresión de otros genes relevantes a AMD) (no tratados y tratados con siARN) usando la PCR en tiempo real sobre el ARN extraído de RPE/coroideas, o de la retina neural.

45

Resultados

1. Los ratones KO para RTP801 mostraron 30% menos de fuga de los vasos sanguíneos en comparación con los ratones WT después de la inducción de CNV; ver la Figura 8.

50

2. El ARNip sintético estabilizado contra RTP801, REDD14, produjo una reducción dependiente de la dosis del volumen de CNV. Un máximo de inhibición de ~ 70% en comparación con los ojos inyectados con PBS se logró a una dosis de 0,25 μ g de REDD14 por ojo (secuencia núm. 14 en la Tabla 1, sec. con núm. de ident.: 16 (sentido) y 66 (antisentido)). A la misma dosis, ambos ARNip de control negativo, REDD8 y ARNip anti-GFP, mostraron sólo 27% y 33% de reducción de volumen de CNV respectivamente, lo que apoyaba tanto la eficacia superior de REDD14 y también la especificidad de su efecto.

55

B) MODELO PRIMATE NO HUMANO

Inducción de CNV

60

Ocho monos cynomolgus machos (*Macaca fascicularis*) 2-6 años de edad se usaron para el estudio. La neovascularización coroidea (CNV) se indujo por el tratamiento con láser perimacular de ambos ojos antes de la administración de la dosis. Se localizaron nueve lesiones en la mácula con un láser [foto coagulador láser OcuLight GL (532 nm) con un adaptador de lámpara portátil de hendidura IRIS Medical®], y los puntos de láser en el ojo derecho fueron el reflejo de la colocación en el ojo izquierdo. Los parámetros aproximados del láser fueron los siguientes: tamaño de punto: 50-100 μ m de diámetro; potencia del láser: 300-700 milivatios; tiempo de exposición: 0,1 segundos.

65

Tratamiento

5 Inmediatamente después del tratamiento con láser, ambos ojos de todos los animales se sometieron a una única inyección intravítrea. El ojo izquierdo se dosificó con 350 ug de ARNip sintético estabilizado contra RTP801 (el mismo utilizado en el estudio de ratón) en el volumen final de 50 ul, mientras que el ojo contralateral recibió 50 ul de PBS (vehículo).

Evaluación

- 10 1. Todos los animales se sometieron a examen diario de mediciones del consumo de alimentos y de peso corporal.
- 15 2. Se sacrificaron 2 monos en el día 6 después de la inducción de CNV. Sus ojos se enuclearon y el polo posterior se aplanó. Después la región fóvea se extirpó y se separó en coroides y neuroretina las cuales se congelaron en nitrógeno líquido por separado (para cada animal) para su uso posterior para la extracción de ARN y la evaluación de la expresión de RTP801 por la PCR en tiempo real..
- 20 3. Los angiogramas de fluoresceína se llevaron a cabo antes del estudio, y al final de las semanas 1, 2 y 3 después de la inducción de CNV. Las fotografías se tomaron, usando de una cámara de fondo de ojo (TRC-50EX Retina Camera). Las imágenes se capturaron usando el sistema Topcon IMAGEnet™. El colorante de fluoresceína (10% fluoresceína sódica, aproximadamente 0,1 ml/kg) se inyectó a través de puertos de acceso vascular. Las fotografías se tomaron en diferentes puntos de tiempo después de la inyección del tinte, para incluir la fase arterial, la fase arteriovenosa temprana y varias fases arteriovenosas tardías con el fin de evaluar la neovascularización y para controlar la fuga de la fluoresceína asociada con las lesiones de CNV. La interpretación y el análisis de los angiogramas de fluoresceína se llevaron a cabo de forma independiente por dos oftalmólogos.

25 *La neovascularización (NV) se evaluó en los angiogramas tempranos y cada punto se clasificó de acuerdo con el siguiente esquema:*

0	- sin signos de NV
0,5	- punto sospechoso
1	- punto "caliente"
2	- NV en la quemadura con láser
3	- NV evidente

30 *Las fugas se evaluaron de acuerdo con el siguiente esquema:*

0	- ninguna fuga
0,5	- punto sospechoso
1	- fuga evidente de pequeño punto
2	- fuga creciente con el tiempo
3	- fuga mayor que las límites anteriores (evidentemente)

Además, el tamaño de cada punto se comparó entre los angiogramas tempranos y tardíos usando las mediciones morfológicas, y se calculó el aumento en el tamaño del punto resultante de la fuga.

35 4. Los electroretinogramas (ERG) se registraron usando un electroretinógrafo Epic 2000 según los SOP de Sierra y el estudio específico de SOP, que incluyó el uso del aparato Ganzfield, en el pre-estudio y al final de la semana 3. Un oftalmólogo veterinario evaluó los datos de ERG tabulados.

El estudio se terminó en el día 21 después de la inducción de CNV. La necropsia y el examen histológico se realizaron en los órganos y tejidos, se incluyeron los ojos.

Resultados

- 45 1. El ARNip contra RTP801 redujo la expresión de RTP801 en el RPE/coroides de los animales tratados con láser, según se midió el día 6 después de la inducción de CNV por la PCR en tiempo real (ver Figura 10)..
- 50 2. La comparación de la clasificación de los puntos para las fugas y la neovascularización entre los ojos contralaterales en cada mono individual reveló que ambas de estas características patológicas estaban disminuidas en los ojos inyectados con el ARNip de RTP801 en comparación con el control (para los resultados de fuga, ver la Figura 11; para los resultados de neovascularización, ver la Figura 12).

3. El cálculo del número total de puntos con los grados mayores de fuga o neovascularización clínicamente relevantes (2 y 3) en todos los ojos inyectados con ARNip en comparación con todos los ojos inyectados con PBS de nuevo reveló que los ojos inyectados con el ARNip eran menos afectados (ver la Figura 13, a+b).

5 4. Los datos de la clasificación general para las fugas de los puntos y la neovascularización se sometió a una evaluación estadística. La existencia de diferencias entre los tratamientos de control y de ARNip se analizaron mediante el cálculo de la delta entre los intervalos de punto medio del ojo de la derecha de control (R) y el ojo izquierdo (L) inyectado con ARNip ($\Delta=R-L$). La significación de la diferencia se calculó usando un método estadístico no paramétrico, la prueba de rango de signo de Wilcoxon - una prueba de una cola. Diferentes fases de los angiogramas (arterial temprana, arterio-venosa y venosa tardía) se analizaron por separado para cada semana (1, 2, y 3).

15 La Tabla 1 muestra el significado (una prueba de una cola) de la diferencia de rango de fugas desde 0 para cada grupo (los valores de $p < 0.05$ están subrayados). Una reducción significativa del rango de fugas se encontró en los ojos izquierdos (tratadas con ARNip) con respecto al derecho (tratado con placebo) en la semana 2 y 3 en los angiogramas tardíos.

Tabla 1

Fuga		Valor-p
Angiogramas	semana	prueba de rango de signo de Wilcoxon
temprano	1	0.2500
	2	0.5000
	3	0.5000
Arterio-venoso	1	0.3438
	2	0.1250
	3	0.2344
tardío	1	0.1250
	2	<u>0.0313</u>
	3	<u>0.0156</u>

20 Nótese que los angiogramas tardíos se usaron normalmente para la evaluación de los parámetros de fuga. La Tabla 2 muestra el significado (la prueba de una cola) de la diferencia de rango de neovascularización (NV) desde 0 para cada grupo (los valores de $p < 0.05$ están subrayados)).

Tabla 2

NV		Valor-p
Angiogramas	semana	prueba de rango de signo de Wilcoxon
temprano	1	0.0781
	2	<u>0.0313</u>
	3	<u>0.0313</u>
Arterio-venoso	1	0.0625
	2	<u>0.0313</u>
	3	0.1563
tardío	1	0.2500
	2	0.3438
	3	0.2500

Una reducción significativa en el rango de NV se encontró en el ojo izquierdo con respecto al derecho en la semana 2 y 3 en el período temprano y en el período arteriovenoso en la semana 2.

5 Nótese que los angiogramas iniciales se usaron normalmente para la evaluación de los parámetros de neovascularización.

10 5. La evaluación morfométrica cuantitativa del aumento en el área de los puntos que se produjeron entre los angiogramas tempranos (fase arterial) y tardíos (fase venosa) debido a la fuga, reveló que este parámetro se redujo significativamente en los puntos de láser dentro de los ojos inyectados con ARNip (ojos izquierdos, OS) en comparación con el control (ojos derechos, OD). Dos ejemplos se mostraron en la Figura 14. Los gráficos demostraron el aumento relativo (en %) en el área de cada punto en el ojo izquierdo y derecho de los animales # 3315 y 3300.

15 Adicionalmente, se observó a lo largo de todos los estudios anteriores que el ARNip de anti RTP-801 no tuvo efectos adversos sobre los electrorretinogramas (ERG), sobre la histología del ojo o sobre la estructura y función de otros órganos y sistemas.

Para resumir los experimentos y resultados anteriores:

20 1. La inhibición del ARNip de la expresión de RTP801 tanto genética (RTP801-/-) y terapéutica en la CNV inducida por láser en el modelo de degeneración macular húmeda relacionada con la edad (AMD húmeda) resultó en la reducción significativa del volumen de CNV.

2. Se obtuvieron resultados positivos en el modelo de ratón y de primate no humano.

25 3. El examen anatomopatológico y ERG en mono no reveló ninguna toxicidad mediada por siARN, ya sea en los ojos o en otros órganos o sistemas.

C) EFICACIA DE LA TERAPIA DE COMBINACIÓN DE ARNip DE RTP801 (REDD14) Y EL ANTICUERPO ANTI-VEGF

La eficacia de la terapia de combinación de ARNip de RTP801 (REDD14) y el anticuerpo anti-VEGF en el tratamiento de enfermedades en las que se produce la CNV se probó en el anterior modelo de CNV de ratón.

30

A) Estudios del volumen de CNV

TEI volumen de la neovascularización coroidea (CNV) 3 semanas después de la lesión con láser se calculó por microscopía de fluorescencia confocal como se describió previamente (Sakurai y otros IOVS 2003;44: 3578-85 & Sakurai y otros IOVS 2003; 44: 2743-2749).

35

En estudios previos se encontró que el anticuerpo (Ac) anti-VEGF-A redujo el volumen de CNV de una manera dependiente de la dosis. Una dosis de 1 ng del Ac. VEGF-A se eligió para los estudios de combinación de REDD14 + Ac VEGF-A porque esta dosis tuvo un efecto inhibitor intermedio: El Ac. VEGF-A (1 ng) redujo el tamaño de la CNV en un 26±6%.

40

Las principales conclusiones del estudio de REDD14 + anticuerpos (Ac) VEGF-A son:

- La adición de REDD14 a la dosis más baja 0,05 µg redujo el tamaño de CNV en un 27±4% en comparación con el Ac. VEGF-A solo.

45

- La adición de REDD14 a la dosis más alta de 0,25 µg redujo el tamaño de CNV en un 55 ± 3% en comparación con el Ac. VEGF-A solo.

B) Estudios de fuga de CNV

50 **Experimento 1**

Este experimento se diseñó con el fin de identificar un potencial efecto terapéutico aditivo o sinérgico de inhibición de VEGF y RTP801 en el modelo de neovascularización coroidea inducida por láser en ratones

55 Materiales:

- REDD14 (RTP801 ARNip.)
- REDD8 (control negativo)
- Anticuerpos anti-VEGF
- IgG no específica (control negativo)

60

La CNV se indujo en el día cero como se describió anteriormente, el material de ensayo se inyectó a los sujetos en el día cero y el día 7.

Los resultados se evaluaron por angiografía con fluoresceína en las semanas 1, 2, 3, y por medición del volumen de CNV en 3 semanas. Cada grupo de prueba se componía de 10 ojos.

65

Grupos experimentales:

- Ac. VEGF 0.5 ng/ojo
- Ac. VEGF 1 ng/ojo
- Ac. VEGF 2 ng/ eye
- Ac. VEGF 4 ng/ojo
- REDD14 0,05 ug/ojo
- REDD 14 0,1 ug/ojo
- REDD14 0,25 ug/ojo
- REDD14 0,05 ug/ojo + Ac. VEGF 1 ng/ojo
- REDD 14 0,1 ug/ojo + Ac. VEGF 1 ng/ojo
- REDD14 0,25 ug/ojo + Ac. VEGF 1 ng/ojo

Grupos controles

- PBS
- IgG no específico 2 ng/ojo
- REDD8 0,1 ug/ojo
- REDD8 0,1 ug/ojo + Ac. VEGF 1 ng/ojo

Resultados

Los resultados del experimento anterior se presentaron en las Figuras 23-24. Estos resultados mostraron que la administración simultánea intravítrea del Ac. VEGF y REDD14 condujo al aumento de la inhibición, dependiente de la dosis, de la neovascularización coroidea y las fugas de los vasos sanguíneos coroideas, tal como se expresó en una menor incidencia de puntos grado 4 y una mayor incidencia de puntos grado 1. Los angiogramas se clasificaron usando una modificación de un régimen de clasificación semicuantitativa (1-4) previamente publicada (Sakurai y otros IOVS 2003; 44: 2743-2749). Las lesiones grado 1 se consideraron como que no se formaron, es decir, equivalente a la prevención completa. Las lesiones de grado 4 se consideraron patológicamente significativas, es decir, el equivalente a las lesiones que se tratarían en los pacientes. El Ac VEGF-A (1 ng) redujo la incidencia de lesiones de grado 4 por ojo en un 38±8% y el aumentó la incidencia de las lesiones de grado 1 por ojo en un 66±43%.

Las principales conclusiones del estudio de fugas de la combinación REDD14 + Ac. VEGF-A son:

- La adición de REDD14 a la dosis más baja 0,05 µg redujo la incidencia de las lesiones de grado 4 en un 66±12% en comparación con el Ac. VEGF-A solo.
- La adición de REDD14 a la dosis más alta 0,25 µg redujo la incidencia de lesiones de grado 4 en un 60±12% en comparación con el Ac. VEGF-A solo.
- La adición de REDD14 a la dosis más alta 0,25 µg duplicó (100±34%), la incidencia de lesiones de grado 1 en comparación con el Ac. VEGF-A solo.

Experimento 2

Este experimento se diseñó con el fin de estudiar el efecto de REDD14 sobre la expresión génica en la retina neural y RPE.

Diseño experimental

Grupos:

- PBS
- REDD14 0,25 mg

El tamaño del grupo fue de 5 ojos. Se indujo CNV por tratamiento con láser como se describió anteriormente en el día cero; el material de ensayo se inyectó también en el día cero, y el efecto se evaluó por análisis mediante la qPCR de la expresión génica en la retina neural y RPE en los días cero y 5.

Resultados

Los resultados del experimento anterior se presentan en la Figura 25. Estos resultados muestran que la administración de REDD14 causa:

- ~40% de regulación descendente de la expresión de RTP801 por debajo de la línea de base, tanto en EPR y en la retina neural (ver también la Figura 26);
- ~ 70% de regulación ascendente de la expresión de PEDF sobre la línea de base en la retina neural (*nota:* en los ojos inyectados con PBS la expresión de PEDF se reguló descendente en un 40% por debajo de la línea de base)
- ~40% de regulación descendente de la expresión VEGF164 por debajo de la línea de base en RPE (*nota:* en los ojos inyectados con PBS la expresión de VEGF164 se reguló descendente en un 20%)
- ~50% de reducción de la expresión de MCP1 en RPE/coroideas (Figura 26)

Conclusiones generales de los dos experimentos:

- 5 ● La inhibición simultánea de RTP801 y VEGF aumentó el efecto inhibitor sobre la neovascularización coroidea y la fuga neovascular.
- La inhibición de la expresión de RTP801 por REDD14 no sólo previno la regulación descendente de PEDF en el modelo de CNV sino aumentó su expresión en comparación con la línea base.
- La inhibición de la expresión de RTP801 condujo a la concomitante regulación descendente de MCP1 el cual debería tener un efecto anti-inflamatorio:
- 10 ● Sin estar limitado por la teoría, el aumento de la expresión de PEDF por REDD14 puede ser la base del efecto cooperativo de inhibición simultánea de VEGF y RTP801 observado (*Nota: El PEDF es un factor antiangiogénico y neuroprotector conocido.*)
- Sin estar limitado por la teoría, la reducción de la expresión de MCP1 por REDD14 también puede ser la base del efecto cooperativo de inhibición simultánea de VEGF y RTP801 observado
- 15 (*Nota: El MCP1 es una quimiocina pro-inflamatoria conocida involucrada en la patogénesis de AMD.*)

Otros modelos de AMD que se pueden usar para probar los métodos de la presente invención:

- 20 ● Animales deficientes en Ccl-2 o Ccr-2 - la deficiencia en cualquiera de estas proteínas causa el desarrollo de algunas de las principales características de AMD. Los animales deficientes en estas proteínas se pueden usar para probar los métodos de la presente invención.

Para más información sobre modelos animales de AMD, ver: Chader, Vision research 42 (2002) 393-399; Ambati y otros, Nature Medicine 9(11) (2003) 1390-1397; Tolentino y otros, Retina 24 (2004) 132-138.

D) Comparación de la actividad del ARNip anti RTP801, REDD14 que posee un grupo fosfato 3' en cada hebra con la misma molécula que carece de fosfatos 3 '(REDD14NP) en el modelo de CNV inducida por láser.

- 30 El experimento en general se realizó y se evaluó como se describió anteriormente. Un ojo de cada ratón (12 por grupo) se inyectaron con 0.25 ug de ARNip REDD14, mientras que en el otro ojo se inyectó ARNip REDD14NP.

Resultados

- 35 Ambos ARNip igualmente redujeron eficazmente el volumen de CNV (Figura 27).

Ejemplo 7**Modelos y resultados relacionados con la EPOC y el enfisema**

- 40 Los compuestos de la presente invención se probaron en los siguientes modelos animales:

- * El modelo de enfisema inducido por el humo del cigarrillo: la exposición crónica al humo del cigarrillo provoca enfisema en varios animales, tales como, *entre otros*, ratón, conejillo de indias.
- * La actividad de la proteasa de pulmón como un desencadenante de enfisema.
- 45 * El modelo de inhibición de VEGFR del enfisema.
- * Instilación bronquial con neutrófilos humanos/elastasa pancreática en roedores.
- * enfisema inducido por la MMP (metaloproteasa de matriz).
- * El enfisema inducido por inflamación.

- 50 Además, los modelos de enfisema se pueden generar a través de medios genéticos (por ejemplo, ratones que portan la mutación *TSK*), y animales enfisematosos se pueden generar por modificadores de la susceptibilidad a enfisema conocidos tales como, *entre otros*, lesión pulmonar, hipoplasia alveolar, hiperoxia, tratamiento con glucocorticoides y nutrición.

- 55 **A. Evaluación de la influencia de la falta de RTP801 en el desarrollo de la enfermedad en modelos de enfisema en ratón (usando ratones knockout para RTP801)**

- (1) **El humo de cigarrillos (CS) inducida por la apoptosis y la inflamación** se inició en 5 ratones machos de 4 meses RTP801 KO y 5 de control tipo salvaje. Los ratones se sometieron a un CS intenso (como se describe en Rangasamy y otros, ver anteriormente) por 7 días. Los ratones no tratados KO y WT, del experimento de inhibición de VEGFR anterior también pueden servir como grupos de control no tratados, para este experimento. Posteriormente, los pulmones se inflaron con agarosa, se fijaron y embebieron en parafina, y el desarrollo del estrés oxidativo en los ratones KO se evaluó mediante:

- 65 a) localización inmunohistoquímica y la cuantificación de 8-oxo-dG en las secciones de pulmón;

b) localización inmunohistoquímica y la cuantificación de la caspasa 3 activa en las secciones de pulmón por medio del uso de anticuerpos específicos, o la evaluación cuantitativa del número de células TUNEL-positivas;

c) medición de la concentración de ceramida en los extractos de pulmón;

d) medición de la actividad caspasa en los extractos de pulmón.

(2) Consumo de cigarrillos a largo plazo en los ratones KO.

6 ratones hembras KO y 6 WT pareados por edad se sometieron al consumo intenso de cigarrillos (5 horas al día) durante un período de 6 meses. Los ratones se sacrificaron a continuación, y el diámetro medio interseptal (un parámetro del enfisema) se evaluó por medio del uso de un enfoque morfométrico.

B. Evaluación de la influencia de la falta de RTP801 en la progresión de la enfermedad en modelos de enfisema en ratón mediante la inhibición de RTP801 endógeno mediante el empleo de la administración intra pulmonar del ARNip de inactivación de RTP801

La inflamación inducida por el CS se indujo por el consumo de 7 días en 2 grupos de ratones C57BL6, 10 ratones por grupo. Grupo 1: CS + administración de ARNip control (REDD8) ARNip; Grupo 2: CS + ARNip de RTP801 (REDD14). Los grupos de ratones de control se instilaron con cualquier tipo de ARNip pero se mantuvieron en condiciones de habitación con aire. Los animales se evaluaron como en el experimento anterior con los ratones knockout.

Métodos

Exposición al consumo de cigarrillos (CS)

La exposición se llevó a cabo (7 h/día, 7 días/semana por la combustión de los cigarrillos 2R4F de referencia (2,45 mg nicotina por cigarrillo; que se adquirieron del Tobacco Research Institute, University of Kentucky, Lexington, KY, Estados Unidos) usando una máquina de humo (Modelo TE-10, Teague Enterprises, Davis, CA, Estados Unidos). Cada cigarrillo encendido se aspiró durante 2 s, una vez cada minuto para un total de ocho bocanadas, a un régimen de flujo de 1,05 l/min, para proporcionar una aspiración estándar de 35 cm³. La máquina de humo se ajustó para producir una mezcla de humo de corriente secundaria (89%) y humo de corriente principal (11%) por la combustión de cinco cigarrillos al mismo tiempo. La atmósfera de la cámara se controló para el total de partículas en suspensión y el monóxido de carbono, con concentraciones de 90 mg/m³ y 350 ppm, respectivamente.

Análisis morfológicos y morfométricos

Después de la exposición de los ratones al CS o la instilación del plásmido que expresaba RTP801, los ratones se anestesiaron con halotano y los pulmones se inflaron con 0,5% de agarosa de bajo punto de fusión a una presión constante de 25 cm como se describió anteriormente⁶. Los pulmones inflados se fijaron en 10% de formalina tamponada y se embebieron en parafina. Las secciones (5 µm) se tiñeron con hematoxilina y eosina. El diámetro medio alveolar, la longitud alveolar, y las intercepciones lineales media se determinaron por morfometría asistida por computadora con el software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos). Las secciones de pulmón en cada grupo se codificaron y las imágenes representativas (15 por sección del pulmón) se obtuvieron, por un investigador al que se le ocultó la identidad de los portaobjetos, con un microscopio Nikon E800, lente 20X.

Lavado broncoalveolar (BAL) y fenotipaje

Tras la exposición al CS o la instilación del plásmido de expresión de RTP801, los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico. El fluido BAL recogido de los pulmones de los ratones, se centrifuga (500 'g a 4°C), y el sedimento celular se resuspende en solución salina tamponada con fosfato. Se determinó el número total de células en el líquido de lavado, y 2 x 10⁴ células se citocentrifugaron (Shandon Southern Products, Pittsburgh, PA, Estados Unidos) en portaobjetos de vidrio y se tiñeron con Wright-Giemsa. El conteo diferencial de células se realizó en 300 células, de acuerdo con técnicas citológicas estándar.

Identificación de poblaciones de células apoptóticas alveolares en los pulmones.

Para identificar los diferentes tipos de células alveolares que experimentaban apoptosis en los pulmones, se realizó una tinción inmunohistoquímica de caspasa 3 en las secciones de pulmón de la habitación con aire (RA), así como de los ratones expuestos al CS. Para identificar las células epiteliales apoptóticas de tipo II en los pulmones, después del etiquetado con la caspasa 3 activa, las secciones de pulmón se incubaron primero con el anticuerpo anti-proteína C tensioactiva (SPC) de ratón y luego con un anticuerpo anti-conejo con rojo Texas. Las células endoteliales apoptóticas se identificaron mediante la incubación de las secciones primero con el anticuerpo anti- CD 31 de ratón y luego con el anticuerpo secundario de conejo biotinilado anti-ratón. Las secciones de pulmón se lavaron en PBS y después se incubaron con el complejo estreptavidina conjugada con rojo Texas. Los macrófagos apoptóticos en los pulmones se identificaron mediante la incubación de las secciones primero con el anticuerpo de rata anti- Mac-3 de ratón y luego con

el anticuerpo anti-rata con rojo Texas. Finalmente, se aplicó DAPI a todas las secciones del pulmón, se incubaron durante 5 minutos, se lavaron y se montaron con el medio de montaje Vectashield HardSet. La fluoresceína y DAPI se visualizaron a 330-380 nm y 465-495 nm, respectivamente. Las imágenes de las secciones de pulmón se obtuvieron con el microscopio Nikon E800, lente de 40X.

5

Localización inmunohistoquímica de la caspasa-3

El ensayo de tinción inmunohistoquímica de caspasa-3 se realizó por medio del uso de los anticuerpos anti-caspasa-3 activa y las células positivas a la caspasa-3 activa se contaron con un macro, por medio del uso del programa Image Pro Plus. Los conteos se normalizaron por la suma de los perfiles alveolares, denominadas en la presente como longitud alveolar y expresada en μm . La longitud alveolar se correlacionó inversamente con la intercepción lineal media, es decir, como los septos alveolares se destruyeron, los interceptos lineales medios aumentaron como la longitud total alveolar, es decir, longitud total septal alveolar disminuyó.

10

15

Ensayo de actividad de la caspasa 3

La actividad de la caspasa-3/7 se midió en extractos de tejido de pulmón por medio del uso de un ensayo fluorométrico de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tejido pulmonar congelado inmediatamente ($n = 3$ por grupo) se homogeneizó con el tampón de ensayo, seguido de sonicación y centrifugación a $800 \times g$. Después de la eliminación de los núcleos y los restos celulares, el sobrenadante ($300 \mu\text{g}$ de proteína) luego se incubó con el sustrato profluorescente a temperatura ambiente durante 1 h y la intensidad de fluorescencia se midió por medio del uso de un Typhoon phosphoimager (Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ, Estados Unidos). Los resultados se expresaron como la velocidad de escisión específica del sustrato de la caspasa-3, expresada en unidades de actividad enzimática de caspasa 3, normalizada por la concentración de proteína total. La caspasa 3 activa recombinante se usó como patrón para el ensayo (0-4 U). Los tejidos lisados sin sustrato, solo tampón de ensayo y los lisados con el inhibidor de la caspasa 3 se usaron como controles negativos.

20

25

Localización inmunohistoquímica de 8-oxo-dG

Para la localización inmunohistoquímica y cuantificación de 8-oxo-dG, las secciones de pulmón de los ratones expuestos al CS o instilados con el plásmido que expresa RTP801 se incubaron con el anticuerpo anti-8-oxo-dG y se tiñeron por medio del uso del kit InnoGenex™ Iso-IHC DAB por medio del uso de anticuerpos de ratón. Las células 8-oxo-dG-positivas se contaron con una macro (por medio del uso de Image Pro Plus), y los conteos se normalizaron por la longitud alveolar tal como se describió.

30

35

Instilación del plásmido de ADN en los pulmones de ratón

El ADN de los plásmidos de los vectores de expresión de RTP801 y el control se prepararon con el kit de aislamiento de ADN libre de endotoxina. Para la instilación intratraqueal, $50 \mu\text{g}$ de ADN de plásmido se suministró en $80 \mu\text{l}$ de perfluorocarbono estéril. Las propiedades de transporte de oxígeno del perfluorocarbono lo hicieron bien tolerable en estos volúmenes, mientras que sus propiedades físico-químicas permitieron la administración pulmonar distal extremadamente eficiente cuando se instiló por vía intratraqueal. Los ratones se anestesiaron mediante una breve exposición a la inhalación de halotano, la lengua se tiró suavemente hacia adelante con los fórceps y la tráquea se instiló con solución de perfluorocarbono aplicada en la base de la lengua a través de un angiocatéter romo.

40

45

Instilación de ARNip en los pulmones del ratón.

Los ratones se anestesiaron con una inyección intra-peritoneal de ketamina/xilacina ($115/22 \text{ mg/kg}$). Se instilaron $50 \mu\text{g}$ de ARNip por vía intranasal en el volumen de $10 \mu\text{l}$ de NaCl al 0,9% medi ante la administración de cinco porciones consecutivas de $10 \mu\text{l}$. Al final de la instilación intranasal, la cabeza del ratón se mantuvo hacia arriba por 1 minuto para asegurar que toda la solución instilada drenase al interior.

50

Para más información, ver: Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa, RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tudor RM, Biswal S. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Submitted to Journal of Clinical Investigation; Yasunori Kasahara, Ruben M. Tudor, Carlyne D. Cool, David A. Lynch, Sonia C. Flores, and Norbert F. Voelkel. Endothelial Cell Death and Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Emphysema. Am J Respir Crit Care Med Vol 163. pp 737-744, 2001; Yasunori Kasahara, Ruben M. Tudor, Laimute Taraseviciene-Stewart, Timothy D. Le Cras, Steven Abman, Peter K. Hirth, Johannes Waltenberger, and Norbert F. Voelkel. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. J. Clin. Invest. 106:1311-1319 (2000); y una revisión del tema: Robin M. Tudor, Sharon McGrath and Enid Neptune, The patológico mecanismos of emphysema models: what do they have in common?, Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 2002.

55

60

Resultados

65

1. La instilación de un plásmido de expresión de RTP801 resulta en un fenotipo similar al enfisema en los pulmones del ratón lo cual es evidente por (1) el aumento en los conteos de células del lavado broncoalveolar (Fig. 15a); (2) la apoptosis de las células pulmonares del septo (Figura 15b) y el aumento del diámetro alveolar (Fig. 15c).

2. La instilación del ARNip de RTP801 (REDD14) resulta en la reducción de la expresión de RTP801 en los pulmones (Fig. 17b).

3. Los ratones KO para RTP801 estaban protegidos de desarrollo de enfisema tras 6 meses de consumo de cigarrillos como se evidenció por la falta de ampliación del diámetro alveolar. (Fig. 18).

4. Los ratones KO para RTP801 estaban protegidos de la inflamación inducida por el hábito de fumar cigarrillos, como se evidenció por la reducción del número de células inflamatorias broncoalveolares después de 1 semana de consumo de cigarrillos (Figura 16, a-b).

5. Los ratones KO para RTP801 estaban protegidos de la apoptosis de las células pulmonares septales inducida por el consumo de cigarrillos como se evidenció por la tinción de la sección de pulmón para la caspasa activada (Fig. 16c).

6. Los ratones instilados con REDD14 estaban parcialmente protegidos de la inflamación inducida por el hábito de fumar cigarrillos, como se evidenció por la reducción del número de células inflamatorias broncoalveolares después de 1 semana de consumo de cigarrillos (Figura 17a).

7. Los ratones instilados con REDD14 estaban parcialmente protegidos de la apoptosis de las células del septales del pulmón inducida por el consumo de cigarrillos como se evidenció por la tinción de la sección de pulmón para la caspasa activa y mediante la inmunotransferencia de extractos de pulmón con anticuerpos anti-caspasa 3 activa ((Fig. 17c)

Ejemplo 8.

Modelos y resultados relacionados con los trastornos microvasculares

Los compuestos de la presente invención se probaron en modelos animales de una variedad de trastornos microvasculares como se describe más abajo.

1. Retinopatía diabética

El RTP801 promueve la apoptosis de las células neuronales y la generación de especies reactivas de oxígeno in vitro. El inventor de la presente invención también encontró que en ratones knockout (KO) para RTP801 sometidos al modelo de retinopatía del prematuro (ROP), la neovascularización patológica NV se redujo bajo condiciones de hipoxia, a pesar de las elevaciones de VEGF, mientras que la ausencia de este gen no influyó en la NV fisiológica retinal neonatal. Además, en este modelo, la falta de RTP801 fue también protectora contra la apoptosis neuronal hipóxica y la vaso-obliteración hiperóxica.

Experimento 1

La diabetes se indujo en ratones de la misma camada de 8 semanas KO para RTP801 y C57/129sv tipo salvaje (WT) por inyección intraperitoneal de STZ. Después de 4 semanas, el ERG (único destello blanco, 1.4×10^4 ftc, 5 ms) se obtuvo del ojo izquierdo después de 1 hora de adaptación a la oscuridad. El RVP se evaluó de ambos ojos por medio del uso de la técnica de la permeabilidad a la albúmina con azul de Evans.

Resultados

La glucosa en sangre no fue diferente entre los diabéticos (DM) WT y los DM KO (495 ± 109 contra 513 ± 76 mg/dl), los no diabéticos (NDM) WT y los KO (130 ± 10 contra 135 ± 31 mg/dl, respectivamente). Se incrementó RVP en el grupo DM WT un 138% ($51,2 \pm 37,9$ μ l/g/h, n = 8) en comparación con NDM WT ($21,5 \pm 18,8$ μ l/g/h, n=9, p=0,055). En contraste, RVP se redujo en un 80% en DM KO ($9,5 \pm 8,5$ μ l/g/h, n=6, p= 0,023) en comparación con los ratones DM WT, que resultó en una disminución del 140% del RVP inducido por diabetes. En ratones DM WT, hubo una prolongación (p<0.05) de los tiempos implícitos de los potenciales oscilatorios para OP2 (11%), OP3 (12%), & OP4 (14%) y para la onda B (23%) comparado con NDM WT. La onda A no cambió significativamente. Estos cambios se normalizaron ~100% en los ratones DM KO para OP3 & OP4 y 65% para la onda B comparado con NDM KO. **Conclusión:** El knockout de RTP801 atenuó RVP inducido por diabetes y las anomalías del ERG en ratones, lo que sugirió que este gen inducible por hipoxia puede desempeñar un importante papel en la patogénesis de la enfermedad temprana de la retina diabética.

Experimento 2

Se indujo la diabetes en ratones knockout para RTP801 y en el control de tipo salvaje con el fondo genético emparejado. Además, se indujo en ratones C57B16, que se usaron posteriormente para la inyección intravítrea de los ARNip anti-RTP801 y control. Para la inducción de diabetes, los ratones se inyectaron con estreptozotocina (STZ 90 mg/kg/d durante 2 días después de ayuno durante la noche). La fisiología del animal se controló durante todo el estudio para los cambios en la glucosa en sangre, el peso corporal, y el hematocrito. Los ratones inyectados con el vehículo sirvieron como controles. Los animales adecuados se trataron mediante inyecciones intravítreas de 1 μ g del ARNip de

anti-RTP801 REDD14 o 1 ug de ARNip anti-GFP control. El ARNip se inyectó dos veces en el curso del estudio - en el día 0, cuando la primera inyección de STZ se llevó a cabo, y en el día 14 después de la inyección de STZ.

La fuga vascular de la retina se midió por medio el uso de la técnica de tinción con azul de Evans-(EB) en los animales después de 4 semanas de duración de la diabetes. Los ratones tenían un catéter implantado en la vena yugular derecha 24 horas antes de las mediciones de azul de Evans (EB). Las mediciones de la permeabilidad de la retina en ambos ojos de cada animal, siguió un protocolo estándar de azul de Evans.

Resultados

1. La fuga de los vasos sanguíneos de la retina se redujo en 70% en los ratones diabéticos KO para RTP801 en comparación con los ratones diabéticos de tipo salvaje (ver Figura 20).

2. El knockout para RTP801 normalizó las anomalías del ERG en ratones: En los ratones DM WT, hubo una prolongación ($p < 0,05$) de los tiempos implícitos de los potenciales oscilatorios para OP2 (11%), OP3 (12%), & OP4 (14%) y para la onda B (23%) en comparación con NDM WT. Una onda A no cambió significativamente. Estos cambios se normalizaron al 100% en los ratones DM KO para RTP801 para OP3 & OP4 y 65% 65% para la onda B en comparación con los NDM KO para RTP801 (ver Figura 21).

3. De manera similar a los resultados en los ratones KO, la fuga de los vasos sanguíneos de la retina se redujo en un 50% en ratones diabéticos que se inyectaron por vía intravítrea con el ARNip contra RTP801 REDD14 en comparación con los ratones diabéticos que se inyectaron por vía intravítrea con el control de ARNip contra GFP (ver la Figura 22).

2. Retinopatía del prematuro

La retinopatía del prematuro se indujo por la exposición de los animales de prueba a condiciones de hipoxia e hiperoxia, y, posteriormente, se probaron los efectos sobre la retina. Los resultados mostraron que los ratones KO para RTP801 estaban protegidos de la retinopatía del prematuro, lo que validó de este modo el efecto protector de la inhibición de RTP801.

3. Infarto de miocardio

La ligadura de la arteria descendente anterior izquierda indujo el infarto de miocardio en ratones, tanto a corto como a largo plazo. Resultados: reducción de los niveles en la sangre de la fracción TnT y CPK-MB a 24 horas después del infarto y mejor ecocardiograma (volumen de la fracción de eyección) a los 28 días después del infarto en ratones KO para RTP801.

4. Afecciones de isquemia microvascular

Los modelos animales para la evaluación de las condiciones de isquemia son:

1. Lesión cerrada en la cabeza (CHI) – La TBI experimental produjo una serie de eventos que contribuyeron a las cascadas neurológicas y neurometabólicas, que estaban relacionadas con el grado y el alcance de los déficits de comportamiento. La CHI se indujo bajo anestesia, mientras que se permitió la caída libre de un peso desde una altura prefijada (Chen y otros, J. Neurotrauma 13, 557, 1996) sobre el cráneo expuesto que abarcaba el hemisferio izquierdo en el plano midcoronal.

2. Oclusión transitoria de la arteria cerebral media (MCAO) - una isquemia focal transitoria de 90 a 120 minutos se llevó a cabo en ratas macho Sprague Dawley, adultas, de 300-370 g. El método que se empleó fue el de la sutura intraluminal MCAO (Longa y otros, Stroke, 30, 84, 1989, y Dogan y otros, J. Neurochem. 72, 765, 1999). En resumen, bajo anestesia con halotano, un material de sutura de nailon 3-0 recubierto con poli-L-lisina se insertó en la arteria carótida interna derecha (ICA) a través de un agujero en la arteria carótida externa. El hilo de nailon se introdujo en la ICA hacia el origen MCA de la derecha (20-23 mm). El hilo se retiró, 90-120 minutos más tarde, el animal se cerró y se dejó recuperar.

3. Oclusión permanente de la arteria cerebral media (MCAO) - la oclusión fue permanente, unilateral, se indujo por electrocoagulación de MCA. Ambos métodos condujeron a la isquemia cerebral focal del lado ipsilateral de la corteza del cerebro y dejaron el lado contralateral intacto (control). La MCA izquierda se expuso a través de una craniectomía temporal, como se describió para ratas por Tamura A. y otros, J Cereb Blood Flow Metab. 1981;1:53-60. La MCA y su rama lenticulostriada se ocluyó proximal al borde medial del tracto olfativo con la coagulación microbipolar. La herida se suturó y los animales regresaron a su jaula de alojamiento en una habitación de 26 ° C a 28° C. La temperatura de los animales se mantuvo todo el tiempo con un termostato automático.

5. Insuficiencia renal aguda (ARF)

La prueba del ARNip activo para el tratamiento de la ARF se puede hacer usando la ARF inducida por sepsis o la ARF inducida por isquemia-reperusión.

1. ARF inducida por sepsis

Dos modelos animales predictivos de ARF inducida por sepsis se describieron por Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, Star RA, 2003, Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice, *Kidney Int. Nov*;64(5):1620-31. Estos dos modelos fueron la administración de lipopolisacárido y la ligadura y punción cecal en ratones, preferentemente en ratones envejecidos.

2. ARF inducida por isquemia-reperfusión

Este modelo animal predictivo es descrito por Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC, 2003 enero. La p53 media la respuesta apoptótica a la depleción de GTP después de la isquemia-reperfusión renal: el papel protector de un inhibidor de p53, *J Am Soc Nephrol.*;14(1):128-38.

La isquemia-reperfusión se indujo en ratas después de 45 minutos de restringir la arteria renal bilateral y la liberación subsiguiente de la pinza para permitir 24 horas de reperfusión. Se inyectaron 250 µg de ARNip REDD14 o GFP (control negativo) en la vena yugular 2 horas antes y 30 minutos después de la restricción. Se les administró 250µg adicionales de ARNip a través de la vena de la cola a las 4 y 8 horas después de la restricción. El ARNip contra GFP sirvió como un control negativo. La progresión de la ARF se supervisó por la medición de los niveles de creatinina en suero antes y 24 h después de la cirugía. Al final del experimento, las ratas se perfundieron a través de una línea permanente femoral con PBS caliente seguido de paraformaldehído al 4%. Los riñones izquierdos se retiraron y se almacenaron en 4% de paraformaldehído para el análisis histológico posterior. La insuficiencia renal aguda se define frecuentemente como un aumento agudo de los niveles de creatinina en suero a partir de la línea base. Un aumento de al menos 0,5 mg por dl o 44,2 µmol por l de creatinina en suero se considera como una indicación para la insuficiencia renal aguda. La creatinina en suero se midió a tiempo cero antes de la cirugía y a las 24 horas después de la cirugía de la ARF.

Para estudiar la distribución del ARNip en el riñón de rata, moléculas de ARNip marcado con Cy3 19-mer de extremo romo (2 mg/kg) que tenían la modificación O-metil alterna en los residuos de azúcar se administraron iv durante 3-5 minutos, después de lo cual se realizaron imágenes in vivo por medio del uso de la microscopía confocal de dos fotones. El análisis por microscopía confocal reveló que la mayoría de los ARNip en los riñones estaba concentrado en el compartimiento endosomal de las células tubulares proximales. Tanto la fluorescencia del ARNip endosomal y citoplasmática se mantuvieron relativamente estables durante las primeras 2 horas después de la administración y desaparecieron a las 24 h.

Como es evidente de la Figura 19, se produjo un incremento de diez veces en el nivel de creatinina en suero después de un tratamiento de 45-min de restricción de la arteria renal bilateral (tratamiento de PBS). Cuatro inyecciones de ARNip 801 (REDD14, sec. con núms. de ident.: 16 y 66) (2 horas antes de la restricción y 30min, 4h y 8h después de la restricción) redujeron significativamente el nivel de creatinina en suero en un 40% (P < 0,02). Estos resultados sugirieron que el ARNip 801 podía proteger el tejido renal de los efectos de la lesión por isquemia-reperfusión y de este modo reducir la gravedad de la ARF.

Ejemplo 9

Preparación de los ARNip

Por medio del uso de algoritmos registrados y la secuencia conocida del gen RTP801 (sec. con núm. de ident.: 1), se generaron las secuencias de muchos siARNs potenciales. Las moléculas de ARNip de acuerdo con las especificaciones anteriores se prepararon esencialmente como se describe en la presente.

Los ARNip de la presente invención se pueden sintetizar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la materia para la síntesis de oligonucleótidos ribonucleicos (o desoxirribonucleico). Por ejemplo, se puede usar una máquina disponible en el mercado (disponible, *entre otros*, por Applied Biosystems); los oligonucleótidos se preparan de acuerdo con las secuencias descritas en la presente. Los pares superpuestos de los fragmentos sintetizados químicamente se pueden ligar por medio del uso de métodos que se conocen bien en la materia (por ejemplo, ver la patente de Estados Unidos núm. 6,121,426). Las hebras se sintetizan separadamente y luego se hibridan entre sí en el tubo. Después, los ARNip de doble cadena se separan por HPLC de los oligonucleótidos de hebra simple que no hibridan (por ejemplo debido al exceso de uno de ellos) por HPLC. En relación con los ARNip o los fragmentos de ARNip de la presente invención, dos o más de tales secuencias se pueden sintetizar y unir entre sí para su uso en la presente invención.

Las moléculas de ARNip de la invención se pueden sintetizar mediante los procedimientos que se conocen en la materia, por ejemplo los procedimientos descritos en Usman y otros, 1987, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 7845; Scaringe y otros, 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18, 5433; Wincott y otros, 1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 2677-2684; y Wincott y otros, 1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59, pueden hacer uso de grupos comunes de protección y acoplamiento de ácidos nucleicos, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5', y fosforamiditas en el extremo 3'. Los nucleótidos modificados (por ejemplo 2'-O-metilado) y nucleótidos no modificados se incorporan según se desee.

Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden sintetizar por separado y unir entre sí después de la síntesis, por ejemplo, mediante ligación (Moore y otros, 1992, *Science* 256, 9923; Draper y otros, *Publicación Internacional PCT* núm. WO93/23569; Shabarova y otros, 1991, *Nucleic Acids Research* 19, 4247; Bellon y

otros, 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16, 951; Bellon y otros, 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204), o por hibridación después de la síntesis y/o desprotección.

5 Las moléculas de ARNip de la invención también se pueden sintetizar a través de una metodología de síntesis en tándem, tal como se describe en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. US2004/0019001 (McSwiggen) en donde ambas hebras de ARNip se sintetizan como un fragmento o hebra de oligonucleótido contiguo simple separadas por un enlazador escindible que se escinde posteriormente para proporcionar fragmentos o hebras separadas de ARNip que se hibridan y permiten la purificación del dúplex de ARNip. El enlazador puede ser un enlazador polinucleótido o un enlazador no nucleotídico.

10 Para más información, ver la publicación PCT núm. WO 2004/015107 (ATUGEN).

15 Como se describió anteriormente, los ARNip de la Tabla A (más abajo) se construyeron de tal manera que los azúcares alternos tenían modificación de nucleótidos 2'-O-metilo es decir nucleótidos alternos se modificaron de este modo. En estas modalidades preferidas, en una hebra del ARNip los nucleótidos modificados fueron los números 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 y en la cadena opuesta de los nucleótidos modificados fueron los números 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18. Así, estos ARNip fueron moléculas de ARN de 19-mer de extremos romos con modificaciones alternas 2-0'-metilo como se describió anteriormente. Los ARNip de las Tablas 2 y 3 (más abajo) también se construyeron de esta manera, los ARNip de la Tabla B son moléculas de ARN de 19-mer de extremos romos con modificaciones alternas 2-0'-metilo; los ARNip de la Tabla C son moléculas de ARN de 21-mer de extremos romos con modificaciones alternas 2-0'-metilo.

20 En la Tabla A se detallan diversas moléculas de ARNip nuevas que se generaron y posteriormente se sintetizaron para el gen RTP801. Las dos columnas finales indican los resultados de dos experimentos realizados para examinar la actividad de las moléculas nuevas. En resumen, las células HeLa o HaCaT se transfectaron con un el ARNip nuevo específico de prueba. La expresión del polipéptido RTP801 se determinó luego mediante la transferencia de tipo Western por medio del uso de un anticuerpo contra el polipéptido RTP801. En referencia a las dos columnas de la derecha de la Tabla A, "-" significa una molécula inactiva o de baja actividad-(que no inhibió sustancialmente la expresión del gen RTP801); "+" significa una molécula de ARNip con alguna actividad inhibidora (de expresión génica de RTP801), "+ +" significa una molécula con una mayor actividad inhibidora, y así sucesivamente.

TABLA A

Núm.	Nombre ID	ORG	Ubicación	POS	CA (5'→3')	CS (5'→3')	HeLaB, 20 nM	HaCaT, 20 nM
1	REDD1	h	5'UTR	128	UAGAAAGCCCGCAGCUAGCGC	GCGCUAGCUGCGGCUUCUA	+	+
2	REDD2	hmr	CDS	337	UCCGAGCUCUCCAGGCUCG	CGAGCCUUGGAGAGCUCGGA	-	-
3	REDD3	hmr	CDS	360	UGCUGCUGUCCAGGGACUC	GAGUCCUGGACAGCAGCA	-	-
4	REDD4	hmr	CDS	478	AGCAGCUGCAUCAGGUUGG	CCAACCUUGAUGCAGCUGCU	-	-
5	REDD5	h	CDS	728	UGAGUCCAGGCGCAGCAGC	CGUGCUGCGCCUGGACUCA	-	-
6	Redd6	hmr	5'UTR	119	CAGCUAGCGCGGUCAGCGGA	UCGCUGACCGCGCUAGCUG	-	-
7	Redd7	hmr	5'UTR	122	CCGCAGCUAGCGCGGUCAG	CUGACCGCGCUAGCUGCGG	-	-
8	Redd8	hmr	5'UTR	125	AAGCCGAGCUAGCGCGGU	ACCGCGCUAGCUGCGGCUU	-	-
3	Redd9	hmr	CDS	339	AGUCCGAGCUCUCCAGGCU	AGCCUGGAGAGCUCGGACU	-	-
10	Redd10	hmr	CDS	341	GCAGUCCGAGCUCUCCAGG	CCUGGAGAGCUCGGACUGC	-	-
11	Redd11	hmr	CDS	363	UGUUGCUGCUGUCCAGGGA	UCCUUGGACAGCAGCAACA	-	-
12	Redd12	hmr	CDS	369	AGCCACUGUUGCUGCUGUC	GACAGCAACAGUGGCUU	-	-
13	Redd13	hmr	CDS	370	AAGCCACUGUUGCUGCUGU	ACAGCAACAGUGGCUU	-	-
14	Redd14	hmr	CDS	475	AGCUGCAUCAGUUGGCAC	GUGCCAACCUUGAUGCAGCU	+++	+++
15	Redd15	hmr	CDS	481	UGCAGCAGCUGCAUCAGGU	ACCUGAUGCAGCUCUGCA	+	+
16	Redd16	hmr	CDS	486	UCUCCUGCAGCAGCUGCAU	AUGCAGCUGCUCAGGAGA	-	-
17	Redd17	hmr	CDS	610	CCCCGCAGGCCGCACGGCU	AGCCUGCGCGCCUCGCGGG	-	-

Núm.	Nombre ID	ORG	Ubicación	POS	CA (5'→3')	CS (5'→3')	HeLaB, 20 nM	HaCaT, 20 nM
18	Redd18	hmr	CDS	750	CCUGGAUCUUUGGGCCAGAG	CUCUGGCCCAAGAUCACCAGG	-	-
19	Redd19	hmr	CDS	809	CAGCGUCAGGGACUUGCCUG	CAGCCAGUCCUCGACGCUG	-	-
20	Redd20	hmr	3'UTR	1097	AUGCUACAGUACUGAGGGG	CCCCUACGUACUGUAGCAU	+	+
21	Redd21	hmr	3'UTR	1419	GUCUGUAAGAUAGCUGCCU	AGGCAGCUAUCUUACAGAC	+	+
22	Redd22	hmr	3'UTR	1617	UUCUAGAUGGAAGACCCAG	CUGGGUCUCCAUUCUAGAA	++	++
23	Redd23	hmr	3'UTR	1670	UUGAACAUCAAGUGUAUUC	GAAUACACUUGAUGUUCAA	++	++
24	Redd24	hmr	3'UTR	1693	AAAUUUGCAUAGGUCUUA	UAGACCUAUGCAAUUUUU	+	+
25	Redd25	hmr	3'UTR	1695	AAAAUUUUGCAUAGGUCU	AGACCUAUGCAAUUUUUUU	++	++
26	Redd26	hmr	CDS	349	AGGGACUCGCAGUCCGAGC	GCUCGGACUJGGAGUCCCU	-	-
27	Redd27	hmr	3'UTR	1673	UACUUGAACAUCAAGUGUA	UACACUUGAUGUUCAAAGUA	++	++
28	Redd28	hmr	3'UTR	1717	AAACAUGUUUUAUUAGAAAA	UUUUUCUAAUAAAACAUGUUU	-	-
29	Redd29	h	5'UTR	99	AACUGCUAAGACAAGUGCG	CGCACUUGUCUUAGCAGUU	-	-
30	Redd30	h	CDS	213	ACGACGACGAGAAAGCGGUC	GACCGCUUCUCGUCGUCGU	-	-
31	Redd31	h	CDS	393	AAGCCGUGUCUJCCUCCGG	CCGGAGGAAGACACGGCUU	-	-
32	Redd32	h	CDS	453	AGUGUUCAUCCUCAGGGUC	GACCCUGAGGAUGAACACU	-	-
33	Redd33	h	CDS	521	AGGGCUCGAGAGCCCCAGC	GCUGGGCUCUCGACGCCCU	-	-
34	Redd34	hr	CDS	535	AUCAGCAGGGCGGCAGGGC	GCCCUJGGCCGUCGUGAU	-	-
35	Redd35	h	CDS	571	AGUUCUUUJGCCACCUCGGC	GCCAGUJGGGCAAAAGAACU	-	-

Núm.	Nombre ID	ORG	Ubicación	POS	CA (5'→3')	CS (5'→3')	HeLaB, 20 nM	HaCaT, 20 nM
36	Redd36	h	CDS	597	ACGGCUCGCUGUAGGCCAG	CUGGCCUACAGCGAGCCGU	-	-
37	Redd37	h	CDS	625	ACGUCCAGCAGGCCCC	GGGGGGCGUCUGGACGU	-	-
38	Redd38	h	CDS	829	AUGACUCGGAAGCCAGUGC	GCACUGGCUUCCGAGUCAU	-	-
39	Redd39	h	3'UTR	1046	AACUCAAUGAGCUUCCUGG	CCAGGAACCUCUAUUGAGUU	++	++
40	REDD40	h	3'UTR	1539	CUCAACUCUGCAGUACAG	CGUGUACUGCAGAGUUAG	+	+
41	Redd41	h	3'UTR	1317	AGAUACACAAAACCUCUCC	GGAGGUGGUUUUGUGUAUCU	+	+
42	Redd42	h	3'UTR	1350	ACAACAAACACACUUGGUC	GACCAAGUGUGUUUGUUGU	++	++
43	Redd43	hmr	CDS	473	CUGCAUCAGGUUGGCACAC	GUGGCCAACCCUGAUGCAG	+	+
44	REDD44	h	3'UTR	955	UCCUGCCUCUAGUCUCCAC	GUGGAGACUAGAGGCAGGA	+	+
45	Redd45	hmr	CDS	476	CAGCUGCAUCAGGUUGGCA	UGCCAACCUGAUGCAGCUG	-	-
46	Redd46	hmr	CDS	479	CAGCAGCUGCAUCAGGUUG	CAACCUGAUGCAGCUCUG	-	-
47	Redd47	hmr	CDS	483	CCUGCAGCAGCUGCAUCAG	CUGAUGCAGCUCUGCAGG	-	-
48	Redd48	hmr	CDS	485	CUCCUGCAGCAGCUGCAUC	GAUGCAGCUCUGCAGGAG	-	-
49	REDD40.1	h	3'UTR	1536	AACUCUGCAGUACACGAUG	CAUCGUGUACUAGCAGAGUU	++	++
50	REDD44.1	h	3'UTR	954	CCUGCCUCUAGUCUCCACC	GGUGGAGACUAGAGGCAGG	++	++

ES 2 390 085 T3

Nótese que en la Tabla A anterior, las cadenas sentido de ARNip 1-50 tienen sec. con núms.de ident.: 3-52, respectivamente, y las cadenas antisentido de ARNip 1-50 tienen sec. con núms.de ident.: 53-102, respectivamente. La molécula designada REDD 14 tiene la sec. con núm. de ident.: 16 (cadena sentido) y 66 (cadena antisentido).

5

TABLA B

Núm.	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref NM_019058.1 (Homosapiens)	gi21312867ref NM_029083.1 (Ratón)	gi18376838ref NM_080906.1 (Rata)	Superpuesta con pet-1 (antisentido)
51	Humano	19	CUAGCCAGUUGGUAGGCCA	DGGCUUACCAACUGGGCUAG	[556-574]	-	-	-
52	Humano	19	UGAUUCCAGUGGUUGGAAA	UUUCCAACCACUGGAAUCA	[984-1002]	-	-	-
53	Humano	19	CCAGUGGUUGGAAAACUGA	UCAGUUUUCCAACCACUGG	[989-1007]	-	-	-
54	Humano	19	GCUUCCGAGUCAUCAAGAA	UUCUUGAUGACUCGGGAAGC	[835-853]	[763-781]	-	-
55	Humano	19	GGAAGCUCUUGAGUUGUG	CACAACUCAUAGAGCUUCC	[1049-1067]	-	-	-
56	Humano, cynomolgus	19	CCAUCUGGGUCUCCAUUCU	AGAUGGAAGACCCAGAUUGG	[1613-1631]	[1569-1583]	[1610-1624]	+
57	Humano, cynomolgus	19	GGAUGUGUGUAGCAUGU	ACAUGCUACACACAUCC	[1152-1170]	-	-	-
58	Humano, cynomolgus	19	ACACAUACCCUCCAGUACU	AGOACOGAGGGGOAOGOGU	[1090-1108]	-	[1081-1098]	-
59	Humano, cynomolgus	19	ACAUACCCUCCAGUACUGO	ACAGUACUGAGGGGUUAUGU	[1092-1110]	-	[1082-1100]	-
60	Humano, cynomolgus	19	CACUGUUCUAGAAUACACU	AGUGUAUUCUAGAACAGUG	[1660-1678]	[1612-1626]	[1652-1666]	+

Núm.	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref NM_019058.1 (Homosapiens)	gi21312867ref NM_029083.1 (Ratón)	gi18376838ref NM_080906.1 (Rata)	Superpuesta con pectin (antisentido)
61	Humano, cynomolgus	19	CCAGCUGGAUGUGUGUGUA	UACACACACAUCACAGCUGG	[1146-1164]	[1099-1114]	[1139-1154]	-
62	Humano, cynomolgus	19	CGGAACAGCUGCUCUAUGA	UCAUAGAGCAGCUGUUCGG	[868-886]	[801-814]	[854-867]	-
63	Humano, cynomolgus	19	GAAGCUCAUUGAGUUGUGU	ACACAACUCAAUAGAGCUUC	[1050-1068]	-	-	-
64	Humano, cynomolgus	19	GGACACAUACCCUCAGUA	UACUGAGGGGUAUGUGUCC	[1088-1106]	-	-	-
65	Humano, cynomolgus	19	GGAUCUUUGACACUUGAAA	UUUCAAGUGUCAAAAGAUCC	[1483-1501]	[1424-1442]	-	-
66	Humano, cynomolgus	19	GUAGCAUGUACCUUUAU	AUAUAAGGUACAUGCUJAC	[1162-1180]	[1112-1128]	-	-
67	Humano, cynomolgus	19	UCAGUACUGUAGCAUGGAA	UUCCAUGCUACAGUACUGA	[1101-1119]	-	[1091-1106]	-
68	Humano, cynomolgus	19	UGUGUAGCAUGUACCUUUAU	AUAAGGUACAUGCUACACA	[1159-1177]	[1111-1127]	[1151-1167]	-
69	Humano, cynomolgus	19	CUGGAUGUGUGUGUAGCAU	AUGCUACACACACAUCAGC	[1150-1168]	-	-	-
70	Humano, cynomolgus, ratón	19	ACACUUGAUGUUAAGUAU	AUACUUGAAACAUAAGUGU	[1674-1692]	[1622-1640]	-	+
71	Humano, cynomolgus, ratón	19	GCAUGAAUGUAAGAGUAGG	CCUACUCUUACAUAUCAGC	[1438-1456]	[1379-1397]	-	-

Núm.	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref NM_019058.1 (Homosapiens)	gi21312867ref NM_029083.1 (Ratón)	gi18376838ref NM_080906.1 (Rata)	Superpuesta con pectin (antisentido)
72	Humano, cynomoglus, ratón	19	AGCAGCAACAGUGGCUUCG	CGAAGCCACUGUUGCUGCU	[372-390]	[300-318]		-
73	Humano, cynomoglus, ratón	19	AUGAAUGUAAGAGUAGGAA	UUCCUACUCUUACAUAUCAU	[1440-1458]	[1381-1399]		-
74	Humano, cynomoglus, ratón	19	CAGCAGCAACAGUGGCUUC	GAAGCACUGUUGCUGCUG	[371-389]	[299-317]		-
75	Humano, cynomoglus, ratón	19	CAUGAAUGUAAGAGUAGGA	UCCUACUCUUACAUAUCAUG	[1439-1457]	[1380-1398]		-
76	Humano, cynomoglus, ratón	19	GAUGUUCAAGUAUUAAGAC	GUCUUAUAUACAUGAACAU	[1680-1698]	[1628-1646]		+
77	Humano, cynomoglus, ratón, rata	19	UGAUGCAGCUGCUGCAGGA	UCCUGCAGCAGCUGCAUCA	[484-502]	[412-430]	[465-483]	-
78	Humano, cynomoglus, ratón, rata	19	GAAUACACUUGAUGUUCAA	UUGAACAUCAAGUGUAUUC	[1670-1688]	[1618-1636]		+
79	Humano, cynomoglus, ratón, rata	19	UGAAUACACUUGAUGUUCA	UGAACAUCAAGUGUAUUCA	[1669-1687]	[1617-1635]	[1657-1675]	+
80	Humano, cynomoglus, ratón, rata	19	AUACACUUGAUGUUC AAGU	ACUUGAACAUCAAGUGUAU	[1672-1690]	[1620-1638]	[1660-1678]	+
81	Humano, cynomoglus, ratón, rata	19	CAUGAAUACACUUGAUGUU	AACAUAAGUGUAUUCAUG	[1667-1685]	[1615-1633]	[1655-1673]	+
82	Humano, cynomoglus, ratón, rata	19	CUGGACAGCAGCAACAGUG	CACUGUUGCUGCUGUCCAG	[366-384]	[294-312]	[347-365]	-

Núm.	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref NM_019058.1 (Homosapiens)	gi21312867ref NM_029083.1 (Ratón)	gi18376838ref NM_080906.1 (Rata)	Superpuesta con pectin (antisentido)
83	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	GUUCAUGAAUACACUUGAU	AUCAAGUGUAUUAUGAAC	[1664-1682]	[1612-1630]	[1652-1670]	+
84	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	UCAUGAAUACACUUGAUGU	ACAUCAAGUGUAUUAUGA	[1666-1684]	[1614-1632]	[1654-1672]	+
85	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	UGGACAGCAGCAACAGUGG	CCACUUGUUGCUGCUGUCCA	[367-385]	[295-313]	[348-366]	-
86	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	UGUGUGCCAAACCUGAUGCA	UGCAUCAGGUUGGCACACA	[472-490]	[400-418]	[453-471]	-
87	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	UUCAUGAAUACACUUGAUG	CAUCAAGUGUAUUAUGAA	[1665-1683]	[1613-1631]	[1653-1671]	+
88	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	AACCUAUGCAGCUGCUGC	GCAGCAGCUGCAUCAGGUU	[480-498]	[408-426]	[461-479]	-
89	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	AGUCCUUGGACAGCAGCAA	UUGCUGCUGUCCAGGGACU	[361-379]	[289-307]	[342-360]	-
90	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	CCCUCAGUACUGUAGCAUG	CAUGCACAGUACUGAGGG	[1098-1116]	[1048-1066]	[1088-1106]	-
91	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	CCUGGACAGCAGCAACAGU	ACUGUUGCUGCUGUCCAGG	[365-383]	[293-311]	[346-364]	-
92	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	UGUGCCAAACCUGAUGCAGC	GUCGCAUCAGGUUGGCACA	[474-492]	[402-420]	[455-473]	-
93	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	AAUACACUUGAUGUUC AAG	CUUGAACAUCAAGUGUAUU	[1671-1689]	[1619-1637]	[1659-1677]	+

Núm.	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref NM_019058.1 (Homosapiens)	gi21312867ref NM_029083.1 (Ratón)	gi18376838ref NM_080906.1 (Rata)	Superpuesta con pectin (antisentido)
94	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	AUGAAUACACUUUGAUUUC	GAACAUCAAGUGUAUUCAU	[1668-1686]	[1616-1634]	[1656-1674]	-
95	Humano, cynomolgus, rata	19	UGAUGCAGCUCGUCGAGGA	UCCUGCAGCAGCUGCAUCA	[484-502]		[465-483]	+
96	Humano, cynomolgus, rata	19	AGAACUGUUUACAUGAAGA	UCUUCAUGUAAAACAGUUCU	[1632-1650]		[1625-1643]	+
97	Humano, cynomolgus, rata	19	AUCUAGAACUGUUUACAUG	CAUGUAAAACAGUUCUJAGAU	[1628-1646]		[1621-1639]	+
98	Humano, cynomolgus, rata	19	CCAUGCCUAGCCUUUUGGGA	UCCCAAAGGCUAGGCAUGG	[196-214]		[186-204]	-
99	Humano, cynomolgus, rata	19	CUAGAACUGUUUACAUGAA	UUCAUGUAAAACAGUUCUJAG	[1630-1648]		[1623-1641]	+
100	Humano, cynomolgus, rata	19	GAACUGUUUACAUGAAGAU	AUCUUCAUGUAAAACAGUUC	[1633-1651]		[1626-1644]	+
101	Humano, cynomolgus, rata	19	GGUCUUCCAUCUAGAACUG	CAGUUCUAGAUGGAAGACC	[1620-1638]		[1613-1631]	+
102	Humano, cynomolgus, rata	19	CCAUCUAGAACUGUUUACA	UGUAAAACAGUUCUAGAUGG	[1626-1644]		[1619-1637]	+
103	Humano, cynomolgus, rata	19	CUUCCAUCUAGAACUGUUU	AAACAGUUCUAGAUGGAAG	[1623-1641]		[1616-1634]	+
104	Humano, cynomolgus, rata	19	DAGAACUGUUUACAUGAAG	CUUCAUGUAAAACAGUUCUA	[1631-1649]		[1624-1642]	+

Núm.	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref NM_019058.1 (Homosapiens)	gi21312867ref NM_029083.1 (Ratón)	gi18376838ref NM_080906.1 (Rata)	Superpuesta con pectoralis (antisentido)
105	Humano, cynomolgus, rata	19	UCUCCAUUAGAACUGUU	AACAGUUCUAGAUGGAAGA	[1622-1640]		[1615-1633]	+
106	Humano, cynomolgus, rata	19	CAUCUAGAACUGUUUACAU	AUGUAAAACAGUUCUJAGAUG	[1627-1645]		[1620-1638]	+
107	Humano, cynomolgus, rata	19	GGGUCUCCAUUCUAGAACU	AGUUCUAGAUGGAAGACCC	[1619-1637]		[1612-1630]	+
108	Humano, cynomolgus, rata	19	UCCAUCUAGAACUGUUUAC	GUAACAGUUCUAGAUGGA	[1625-1643]		[1618-1636]	+
109	Humano, cynomolgus, rata	19	UCUAGAACUGUUUACAUGA	UCAUGUAAAACAGUUCUAGA	[1629-1647]		[1622-1640]	+
110	Humano, cynomolgus, rata	19	UCCAUCUAGAACUGUUUA	UAAACAGUUCUAGAUGGAA	[1624-1642]		[1617-1635]	+
111	Humano, cynomolgus, rata	19	GUCUCCAUUCUAGAACUGU	ACAGUUCUAGAUGGAAGAC	[1621-1639]		[1614-1632]	+
112	Humano, ratón	19	CAAGUUAUAGACCUAUGC	GCAUAGGUCUUAUACUUG	[1686-1704]	[1634-1652]		+
113	Humano, ratón	19	GUAUUAAGACCUAUGCAAU	AUUGCAUAGGUCUUAUACU	[1689-1707]	[1637-1655]		+
114	Humano, ratón	19	AGUAUUAAGACCUAUGCAA	UUGCAUAGGUCUUAUACU	[1688-1706]	[1636-1654]		+
115	Humano, ratón	19	AUGUUAAGUAUUAAGACC	GGUCUUAUACUUAUAGCAU	[1681-1699]	[1629-1647]		+

Núm.	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref NM_019058.1 (Homosapiens)	gi21312867ref NM_029083.1 (Ratón)	gi18376838ref NM_080906.1 (Rata)	Superpuesta con antisentido (antisentido)
116	Humano, ratón	19	CACUUGAUGUUAAGUAUU	AAUACUUGAACAUCAAGUG	[1675-1693]	[1623-1641]		+
117	Humano, ratón	19	CCAAGAUCACAGGGGCGUU	AACAGCCCCUGGAUCUUGG	[757-775]	[685-703]		-
118	Humano, ratón	19	GUUCAAGUAUAAGACCUA	CAUAGGUCUUAUACUUGAAC	[1683-1701]	[1631-1649]		+
119	Humano, ratón	19	UCAAGUAUAAGACCUAUG	CAUAGGUCUUAUACUUGA	[1685-1703]	[1633-1651]		
120	Humano, ratón	19	AAGUAUAAGACCUAUGCA	UGCAUAGGUCUUAUACUU	[1687-1705]	[1635-1653]		+
121	Humano, ratón	19	UGUUCAAGUAAGACCU	AGGUCUUAUACUUGAAC	[1682-1700]	[1630-1648]		+
122	Humano, ratón, rata	19	UGGGUCUCCAUUCUAGAAC	GUUCUAGAUGGAAGACCCA	[1618-1636]	[1570-1588]	[1611-1629]	+

ES 2 390 085 T3

Nótese que en la anterior Tabla B, las cadenas sentido de ARNip 51-122 tienen sec. con núms.de ident.: 103-174, respectivamente, y las cadenas antisentido de ARNip 51-122 tienen sec. con núms.de ident.: 175-246, respectivamente.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

TABLA C

Núm	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip sentido	ARNip antisentido	gi9506686re fNM_019058 .1 (Homo- sapiens)	gi21312867r efNM_02908 3.1 (Mus musculus)	gi18376838r efNM_08090 6.1 (Rattus norv egicus)	Super- puesta con pet- 1(anti sentido)*
123	Humano	21	CCAGGAAGCUCAUUGAGUUGU	ACAACUCAUUGAGCUUCCUGG	[1046-1066]	-	-	-
124	Humano	21	CCAUCUGGGUCUCCAUUCUAG	CUAGAUGGAAGACCCAGAUUG	[1613-1633]	[1569-1585]	[1610-1626]	+
125	Humano	21	GGAUGUGUGUGAGCAUGUAC	GUACAUGCUACACACAUCUCC	[1152-1172]	[1102-1122]	[1142-1161]	-
126	Humano	21	CAAGUGUGUUUGUUUGUUUGU	AACAACAACAACAACACACUUG	[1353-1373]	-	-	-
127	Humano	21	CCUCAGUACUGUAGCAUGGAA	UUCCAUGCUACAGUACUGAGG	[1099-1119]	[1049-1066]	[1089-1106]	-
128	Humano	21	GACCAAGUGUGUUUGUUUGUUU	AAACAACAACAACAACUUGGUC	[1350-1370]	-	-	-
129	Humano	21	GCUUCCGAGUCAUCAAGAAGA	UCUUCUUGAUGACUCGGAAGC	[835-855]	[763-783]	-	-
130	Humano	21	GGAGGUGGGGAAUAGUGUUU	AAACACUJUCCCCCACCUCUCC	[1024-1044]	[976-986]	-	-
131	Humano	21	CAGUACUGUAGCAUGGAACAA	UUGUCCAUUGCUACAGUACUG	[1102-1122]	[1052-1072]	-	-
132	Humano, cyn omoglus	21	GAAUACACUUGAUGUUCAAGU	ACUUGAACAUCAAGUGUJUUC	[1670-1690]	[1618-1638]	[1658-1678]	+

Núm	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip sentido	ARNip antisentido	gi9506686refNM_019058.1 (Homo-sapiens)	gi21312867refNM_029083.1 (Mus musculus)	gi18376838refNM_080906.1 (Rattusnorvegicus)	Superpuesta con pet-1 (anti sentido)*
133	Humano, cyn omoglus	21	CAAGUAAUAAAGACCUAUGCAA	UUGCAUAGGUCUUAUUAUACUUG	[1686-1706]	[1634-1654]	[1674-1694]	+
134	Humano, cyn omoglus	21	GAACUUUUGGGUGGAGACUA	UAGUCUCCACCCCAAAAGUUC	[944-964]	-	-	-
135	Humano, cyn omoglus	21	GGACACAUACCCUCAGUACU	AGUACUGAGGGGUJAUUGUCC	[1088-1108]	[1047-1058]	[1081-1098]	-
136	Humano, cyn omoglus	21	GGAGGUGUUUGUUAUCUUA	UAAGAUACACAAACCACUCC	[1317-1337]	[1256-1268]	-	-
137	Humano, cyn omoglus	21	GGAUCUUUGACACUUGAAAA	UUUUUCAAGUGUCAAAAGAUCC	[1483-1503]	[1424-1442]	-	-
138	Humano, cyn omoglus	21	GGUCUUCCAUCUAGAACUGUU	AACAGUUCUAGAUGGAAGACC	[1620-1640]	[1572-1588]	[1613-1633]	+
139	Humano, cyn omoglus	21	DGUGUAGCAUGUACCUUAUUA	UAAUAAGGUACAUGCUACACA	[1159-1179]	[1111-1128]	[1151-1169]	-
140	Humano, cyn omoglus	21	CAACAAGGCUUCCAGCUGGAU	AUCCAGCUGGAAGCCUUGUUG	[1135-1155]	-	-	-
141	Humano, cyn omoglus	21	CACUUGGGAUCUUUGACACUU	AAGUGUCAAAAGAUCCCAAGUG	[1477-1497]	-	-	-
142	Humano, cyn omoglus	21	CAUCACUACUGACCCUUGUUA	UACAACAGGUCAGUAGUGAUG	[1399-1419]	[1341-1356]	[1383-1398]	-
143	Humano, cyn omoglus	21	GUGUGUGUAGCAUGUACCUUA	UAAGGUACAUGCUACACACAC	[1156-1176]	[1106-1126]	[1146-1166]	-

Núm	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip sentido	ARNip antisentido	gi9506686refNM_019058.1 (Homo-sapiens)	gi21312867refNM_029083.1 (Mus musculus)	gi18376838refNM_080906.1 (Rattusnorvegicus)	Superpuesta con pet-1 (anti sentido)*
144	Humano,cyn omoglus, ratón	21	GCAUGAAUGUAAGAGUAGGAA	UUCCUACUCUUACAUAUUGC	[1438-1458]	[1379-1399]		-
145	Humano,cyn omoglus, ratón	21	GACAGCAGCAACAGUGGCUUC	GAAGCCACUGUUGCUGCUGUC	[369-389]	[297-317]		-
146	Humano,cyn omoglus, ratón, rata	21	UGAUGCAGCUGCUGCAGGAGA	UCUCCUGCAGCAGCUGCAUCA	[484-504]	[412-432]	[465-485]	-
147	Humano,cyn omoglus, ratón, rata	21	UGAAUACACUUGAUGUUC AAG	CUUGAACAUCAAGUGUAUUC A	[1669-1689]	[1617-1637]	[1657-1677]	+
148	Humano,cyn omoglus, ratón, rata	21	CAUGAAUACACUUGAUGUUC A	UGAACAUCAAGUGUAUUC A	[1667-1687]	[1615-1635]	[1655-1675]	+
149	Humano,cyn omoglus, ratón, rata	21	GGACAGCAGCAACAGUGGCUU	AAGCCACUGUUGCUGCUGUCC	[368-388]	[296-316]	[349-369]	-
150	Humano,cyn omoglus, ratón, rata	21	GUUCAUGAAUACACUUGAUGU	ACAUCAAGUGUAUUC A	[1664-1684]	[1612-1632]	[1652-1672]	+
151	Humano,cyn omoglus, ratón, rat	21	UCAUGAAUACACUUGAUGUUC	GAACAUCAAGUGUAUUC A	[1666-1686]	[1614-1634]	[1654-1674]	+
152	Humano,cyn omoglus, ratón, rata	21	UCCUGGACAGCAGCAACAGU	ACUGUUGCUGCUGUCCAGGGA	[363-383]	[291-311]	[344-364]	-
153	Humano,cyn omoglus, ratón, rata	21	AGUCCUGGACAGCAGCAACA	UGUUGCUGCUGUCCAGGGACU	[361-381]	[289-309]	[342-362]	-
154	Humano,cyn omoglus, rata	21	GAAUACACUUGAUGUUC AAGU	ACUUGAACAUCAAGUGUAUUC	[1670-1690]		[1658-1678]	+

Núm	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip sentido	ARNip antisentido	gi9506686refNM_019058.1 (Homo-sapiens)	gi21312867refNM_029083.1 (Mus musculus)	gi18376838refNM_080906.1 (Rattusnorvegicus)	Superpuesta con pet-1(anti sentido)*
155	Humano, cyn omoglus, rata	21	CUAGAACUGUUUACAUGAAGA	UCUUCAUGUAAAACAGUUCUAG	[1630-1650]		[1623-1643]	+
156	Humano, cyn omoglus, rata	21	CCAUCUAGAACUGUUUACAUG	CAUGUAAAACAGUUCUAGAUGG	[1626-1646]		[1619-1639]	+
157	Humano, cyn omoglus, rata	21	CUUCCAUCUAGAACUGUUUAC	GUAAAACAGUUCUAGAUGGAAG	[1623-1643]		[1616-1636]	+
158	Humano, cyn omoglus, rata	21	UCUCCAUCUAGAACUGUUUA	UAAACAGUUCUAGAUGGAAGA	[1622-1642]		[1615-1635]	+
159	Humano, cyn omoglus, rata	21	CAUCUAGAACUGUUUACAUGA	UCAUGUAAAACAGUUCUAGAUG	[1627-1647]		[1620-1640]	+
160	Humano, cyn omoglus, rata	21	GGGUCUCCAUCUAGAACUGU	ACAGUUCUAGAUGGAAGACCC	[1619-1639]		[1612-1632]	+
161	Humano, cyn omoglus, rata	21	UCCAUCUAGAACUGUUUACAU	AUGUAAAACAGUUCUAGAUGGA	[1625-1645]		[1618-1638]	+
162	Humano, cyn omoglus, rat	21	UCUAGAACUGUUUACAUGAAG	CUUCAUGUAAAACAGUUCUAGA	[1629-1649]		[1622-1642]	+
163	Humano, cyn omoglus, rata	21	UUCCAUCUAGAACUGUUUACA	UGUAAAACAGUUCUAGAUGGAA	[1624-1644]		[1617-1637]	+
164	Humano, cyn omoglus, rata	21	GUCUCCAUCUAGAACUGUUU	AAACAGUUCUAGAUGGAAGAC	[1621-1641]		[1614-1634]	+
165	Humano, ratón	21	UGAUGUUAAGUUAUUAAGACC	GGUCUUAUUAUUAAGAACAUCA	[1679-1699]	[1621-1647]		+

Núm	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip sentido	ARNip antisentido	gi9506686re fNM_019058 .1 (Homo- sapiens)	gi21312867r efNM_02908 3.1 (Mus musculus)	gi18376838r efNM_08090 6.1 (Rattusnorv egicus)	Super- puesta con pet- 1(anti sentido)*
166	Humano, ratón	21	GUUCAAGUAUUAAAGACCUAUG	CAUAGGUCUUAAUACUUGAAC	[1683-1703]	[1631-1651]		+
167	Humano, ratón	21	UCAAGUAUUAAAGACCUAUGCA	UGCAUAGGUCUUAAUACUUGA	[1685-1705]	[1633-1653]		+
168	Humano, ratón	21	GAUGUUCAAGUUAUAAAGACCU	AGGUCUUAAUACUUGAACAU	[1680-1700]	[1628-1648]		+
169	Humano, ratón	21	UUCAAGUAUUAAAGACCUAUGC	GCAUAGGUCUUAAUACUUGAA	[1684-1704]	[1632-1652]		+
170	Humano, rata	21	CUGGGUCUCCAUUCUAGAACU	AGUUCUAGAUGGAAGACCCAG	[1617-1637]		[1610-1630]	+
171	Humano, rata	21	UGGGUCUCCAUUCUAGAACUG	CAGUUCUAGAUGGAAGACCCCA	[1618-1638]		[1611-1631]	+

Nótese que en la anterior Tabla C, las cadenas sentido de ARNip 123-171 tienen sec. con núms.de ident.: 247-295, respectivamente, y las cadenas antisentido de ARNip 123-171 tienen sec. con núms. de ident.: 296-344, respectivamente.

5 Ejemplo 10

Farmacología y administración de fármacos

10 Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden administrarse bien directamente o con vectores virales o no virales. Cuando se administran directamente las secuencias generalmente se hacen resistentes a las nucleasas. Alternativamente, las secuencias se pueden incorporar en casetes de expresión o construcciones tales que la secuencia se expresa en la célula como se discute en la presente más abajo. Generalmente, la construcción contiene la adecuada secuencia reguladora o el promotor para permitir que la secuencia se exprese en la célula objetivo.

15 Los compuestos o composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran y se dosifican de acuerdo con la buena práctica médica, que tiene en cuenta el estado clínico del paciente individual, la enfermedad a tratar, el lugar y el método de administración, el esquema de administración, la edad del paciente, el sexo, el peso corporal y otros factores conocidos por los médicos.

20 La "cantidad eficaz" farmacéuticamente para los propósitos en la presente está determinada por consideraciones tales como las conocidas en la materia. La cantidad debe ser eficaz para conseguir una mejora que incluye, pero no se limita a la tasa de supervivencia mejorada o la recuperación más rápida, o la mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas por aquellos con experiencia en la materia..

25 El tratamiento generalmente tiene una longitud proporcional a la longitud del proceso de la enfermedad y la eficacia del fármaco y la especie de paciente que se trata. Cabe señalar que los humanos se tratan generalmente más tiempo que los ratones u otros animales experimentales ejemplificados en la presente.

30 Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por cualquiera de las vías convencionales de administración. Cabe señalar que el compuesto se puede administrar como compuesto o como la sal farmacéuticamente aceptable y puede administrarse solo o como ingrediente activo en combinación con portadores, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos pueden administrarse por vía oral, subcutánea o parenteral se incluye la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, y administración intranasal, así como las técnicas intratecal y de infusión. Los implantes de los compuestos son también útiles. Las formas líquidas se pueden preparar para inyección, el término incluye subcutánea, transdérmica, intravenosa, intramuscular, intratecal, y otras rutas de administración parenteral. Las composiciones líquidas incluyen las soluciones acuosas, con y sin co-disolventes orgánicos, o las suspensiones acuosas o de aceite, las emulsiones con aceites comestibles, así como los vehículos farmacéuticos similares. Adicionalmente, bajo ciertas circunstancias, las composiciones para uso en los tratamientos nuevos de la presente invención se pueden formar como aerosoles, para la administración intranasal y similares. El paciente a tratar es un animal de sangre caliente y, en particular los mamíferos, se incluye el hombre. Los portadores farmacéuticamente aceptables, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos, así como portadores de implante se refieren generalmente a rellenos sólidos o líquidos no tóxicos, inertes, diluyentes o material de encapsulación que no reaccionan con los ingredientes activos de la invención.

45 Cuando se administra el compuesto de la presente invención parenteralmente, se formula generalmente en una unidad de dosificación inyectable (solución, suspensión, emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para reconstitución en soluciones inyectables estériles o dispersiones. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), las mezclas adecuadas de éstos, y aceites vegetales.

55 La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. Los vehículos no acuosos tales como un aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol, o aceite de cacahuete y ésteres, tales como miristato de isopropilo, también se pueden usar como sistemas solventes para las composiciones de compuesto. Adicionalmente, se pueden añadir varios aditivos que mejoran la estabilidad, esterilidad, e isotonicidad de las composiciones, incluyen conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. En muchos casos, es deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio, y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede provocar por el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. De acuerdo con la presente invención, however, cualquier vehículo, diluyente, o aditivo usado tiene que se compatible con los compuestos.

65 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar por la incorporación de los compuestos utilizados en la práctica

de la presente invención en la cantidad requerida del disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes, según se desee.

5 Una formulación farmacológica de la presente invención se puede administrar al paciente en una formulación inyectable que contiene cualquier portador compatible, tal como diversos vehículos, adyuvantes, aditivos, y diluyentes; o los compuestos utilizados en la presente invención pueden administrarse por vía parenteral al paciente en forma de implantes subcutáneos de liberación lenta, o sistemas de administración dirigidos tales como los anticuerpos monoclonales, administración por vectores, matrices iontoforéticas, matrices poliméricas, liposomas y microesferas. Los ejemplos de sistemas de suministro útiles en la presente invención incluyen las patentes de Estados Unidos núms. 10 5,225,182; 5,169,383; 5,167,616; 4,959,217; 4,925,678; 4,487,603; 4,486,194; 4,447,233; 4,447,224; 4,439,196; y 4,475,196. Muchos otros implantes de este tipo, sistemas de suministro, y módulos son bien conocidos por aquellos con experiencia en la materia.

15 Una formulación farmacológica del compuesto utilizado en la presente invención se puede administrar oralmente al paciente. Los métodos convencionales tales como la administración del compuesto en tabletas, suspensiones, soluciones, emulsiones, cápsulas, polvos, jarabes y similares se pueden usar. Se prefieren las técnicas conocidas de administración por vía oral o intravenosa que conservan la actividad biológica. En una modalidad, el compuesto de la presente invento se puede administrar inicialmente por inyección intravenosa para llevar los niveles en sangre a un nivel adecuado. Después se mantienen los niveles del paciente por una forma de dosificación oral, aunque se pueden usar 20 otras formas de administración en dependencia de la condición del paciente y como se indicó anteriormente.

En general, la dosis activa del compuesto para humanos está en el intervalo de 1ng/kg a aproximadamente 20-100 mg/kg peso corporal por día, preferentemente aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 2-10 mg/kg peso corporal por día, en un régimen de una dosis por día o dos o tres o más veces por día por un periodo de 1-2 semanas o más, 25 preferentemente por 24 a 48 h o por infusión continua durante un periodo de 1-2 semanas o más.

Administración de compuestos de la presente invención a los ojos

30 Los compuestos de la presente invención pueden administrarse al ojo por vía tópica o en forma de una inyección, tal como una inyección intravítrea, una inyección sub-retiniana o una inyección bilateral. Más información sobre la administración de los compuestos de la presente invención se puede encontrar en Tolentino y otros, Retina 24 (2004) 132-138; Reich y otros, Molecular vision 9 (2003) 210-216.

Administración pulmonar de compuestos de la presente invención

Las composiciones terapéuticas de la presente invención se administran preferentemente en el pulmón mediante la inhalación de un aerosol que contiene estas composiciones/compuestos, o por la instilación intranasal o intratraqueal de dichas composiciones. La formulación de las composiciones en liposomas puede beneficiar la absorción. 40 Adicionalmente, las composiciones pueden incluir un líquido PFC tal como el perflubron, y las composiciones se pueden formular como un complejo de los compuestos de la invención con polietilenimina (PEI).

Para más información sobre la administración pulmonar de las composiciones farmacéuticas ver Weiss y otros, Human gene therapy 10:2287-2293 (1999); Densmore y otros, Molecular therapy 1:180-188 (1999); Gautam y otros, Molecular therapy 3:551-556 (2001); y Shahiwala & Misra, AAPS PharmSciTech 5 (2004). Formulaciones respiratorias adicionales para el ARNip se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2004/0063654 de Davis y otros. 45

Las formulaciones adicionales para la administración mejorada de los compuestos de la presente invención pueden incluir compuestos no formulados, compuestos unidos covalentemente al colesterol, y compuestos unidos a anticuerpos dirigidos (Song y otros, Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors, Nat Biotechnol. 2005 jun;23(6):709-17). 50

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Quark Biotech, Inc.
Atugen AG
- <120> USOS TERAPÉUTICOS DE LOS INHIBIDORES DE RTP801
- 10 <130> B7132 - CA/CS
- <140> EP05786796.2
<141> 2005-08-16
- 15 <150> EP 04019405.2
<151> 2004-08-16
- <150> US 60/601,983
<151> 2004-08-17
- 20 <150> US 60/604,668
<151> 2004-08-25
- <150> US 60/609,786
<151> 2004-09-14
- 25 <150> US 60/638,659
<151> 2004-12-22
- 30 <150> US 60/664,236
<151> 2005-03-22
- <150> US 60/688,943
<151> 2005-06-08
- 35 <160> 344
- <170> PatentIn versión 3.2
- 40 <210> 1
<211> 1782
<212> ADN
<213> Homo sapiens
- 45 <400> 1
- tttggccctc gaggccaaga attcggcacg agggggggag gtgcgagcgt ggacctggga 60
- cggtctctgg cggtctcgg tggttggcac gggttcgcac acccattcaa gcggcaggac 120
- gcacttgtct tagcagttct cgtgaccgc gctagctgcg gcttctacgc tccggcactc 180
- tgagttcacc agcaaacgcc ctggcgtctg tccctaccat gcctagcctt tgggaccgct 240
- tctcgtcgtc gtccacctcc tcttcgccct cgtccttgcc ccgaactccc accccagatc 300
- ggccgcgcgc ctcagcctgg gggtcggcga cccgggagga ggggtttgac cgctccacga 360
- gcctggagag ctccgactgc gactccctgg acagcagcaa cagtggcttc gggccggagg 420
- aagacacggc ttacctggat ggggtgtcgt tgcccgaact cgagctgctc agtgaccctg 480
- aggatgaaca ctgtgtgccc aacctgatgc agctgctgca ggagagcctg gccccaggcgc 540

ES 2 390 085 T3

ggctgggctc tcgacgccct gcgcgcctgc tgatgcctag ccagttggta agccagggtgg 600
 gcaaagaact actgcgcctg gcctacagcg agccgtgcgg cctgcggggg gcgctgctgg 660
 acgtctgcgt ggagcagggc aagagctgcc acagcgtggg ccagctggca ctgcacceca 720
 gcctgggtgcc caccttccag ctgaccctcg tgctgegcct ggactcacga ctctggccca 780
 agatccaggg gctgttttagc tccgccaaact ctccttctct ccctggcttc agccagtcctc 840
 tgacgctgag cactggcttc cgagtcacca agaagaagct gtacagctcg gaacagctgc 900
 tcattgagga gtgttgaact tcaacctgag ggggccgaca gtgcctcca agacagagac 960
 gactgaactt ttggggtgga gactagaggc aggagctgag ggactgattc ctgtggttgg 1020
 aaaactgagg cagccaccta aggtggaggc gggggaatag tgtttccag gaagctcatt 1080
 gagttgtgtg cgggtgctg tgcatctggg acacataccc ctcagtactg tagcatgaaa 1140
 caaaggctta gggccaaca aggcctccag ctggatgtgt gtgtagcatg taccttatta 1200
 tttttgttac tgacagttaa cagtgtgtg acatccagag agcagctggg ctgctcccg 1260
 cccagcccgg cccagggtga aggaagaggc acgtgctcct cagagcagcc ggaggggagg 1320
 gggaggctcg aggtcgtgga ggtggtttgt gtatcttact ggtctgaagg gaccaagtgt 1380
 gtttgttgtt tgttttgtat cttgtttttc tgatcggagc atcactactg acctgttcta 1440
 ggagctatc ttacagacgc atgaatgtaa gaggtaggaag gggtaggtgt cagggatcac 1500
 ttgggatctt tgacacttga aaaattacac ctggcagctg cgtttaagcc tcccccatc 1560
 gtgtactgca gagttgagct ggcaggggag gggctgagag ggtgggggct ggaaccctc 1620
 cccgggagga gtgccatctg ggtcttccat ctagaactgt ttacatgaag ataagatact 1680
 cactgttcat gaatacactt gatgttcaag tattaagacc tatgcaatat tttttacttt 1740
 tctaataaac atgtttgtta aaacaaaaaa aaaaaaaaa aa 1782

<210> 2
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

10

<400> 2
 Met Pro Ser Leu Trp Asp Arg Phe Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser
 1 5 10 15
 Pro Ser Ser Leu Pro Arg Thr Pro Thr Pro Asp Arg Pro Pro Arg Ser
 20 25 30
 Ala Trp Gly Ser Ala Thr Arg Glu Glu Gly Phe Asp Arg Ser Thr Ser
 35 40 45

ES 2 390 085 T3

Leu Glu Ser Ser Asp Cys Glu Ser Leu Asp Ser Ser Asn Ser Gly Phe
 50 55 60
 Gly Pro Glu Glu Asp Thr Ala Tyr Leu Asp Gly Val Ser Leu Pro Asp
 65 70 75 80
 Phe Glu Leu Leu Ser Asp Pro Glu Asp Glu His Leu Cys Ala Asn Leu
 85 90 95
 Met Gln Leu Leu Gln Glu Ser Leu Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ser Arg
 100 105 110
 Arg Pro Ala Arg Leu Leu Met Pro Ser Gln Leu Val Ser Gln Val Gly
 115 120 125
 Lys Glu Leu Leu Arg Leu Ala Tyr Ser Glu Pro Cys Gly Leu Arg Gly
 130 135 140
 Ala Leu Leu Asp Val Cys Val Glu Gln Gly Lys Ser Cys His Ser Val
 145 150 155 160
 Gly Gln Leu Ala Leu Asp Pro Ser Leu Val Pro Thr Phe Gln Leu Thr
 165 170 175
 Leu Val Leu Arg Leu Asp Ser Arg Leu Trp Pro Lys Ile Gln Gly Leu
 180 185 190
 Phe Ser Ser Ala Asn Ser Pro Phe Leu Pro Gly Phe Ser Gln Ser Leu
 195 200 205
 Thr Leu Ser Thr Gly Phe Arg Val Ile Lys Lys Lys Leu Tyr Ser Ser
 210 215 220
 Glu Gln Leu Leu Ile Glu Glu Cys
 225 230

5
10
15
20
25

<210> 3
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 uagaagccgc agcuagcgc 19
 <210> 4
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 uccgagcucu ccaggcucg 19
 <210> 5
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

ES 2 390 085 T3

	<400> 5	
	ugcugcuguc cagggacuc	19
5	<210> 6 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
10	<400> 6	
	agcagcugca ucagguugg	19
15	<210> 7 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
20	<400> 7	
	ugaguccagg cgcagcacg	19
25	<210> 8 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
30	<400> 8	
	cagcuagcgc ggucagcga	19
35	<210> 9 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
40	<400> 9	
	ccgcagcuag cgcggucag	19
45	<210> 10 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
50	<400> 10	
	aagccgcagc uagcgcggu	19
55	<210> 11 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
60	<400> 11	
	aguccgagcu cuccaggcu	19
65	<210> 12 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 12	
	gcaguccgag cucuccagg	19

ES 2 390 085 T3

<210> 13
 <211> 19
 <212> ARN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 13
 uguugcugcu guccagga 19
 10
 <210> 14
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 14
 agccacuguu gcugcuguc 19
 20
 <210> 15
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 15
 aagccacugu ugcugcugu 19
 30
 <210> 16
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 16
 agcugcauca gguuggcac 19
 40
 <210> 17
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 45 ugcagcagcu gcaucaggu 19
 <210> 18
 <211> 19
 <212> ARN
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 ucuccugcag cagcugcau 19
 55
 <210> 19
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 19
 ccccgaggc cgcaggcu 19
 65 <210> 20
 <211> 19

ES 2 390 085 T3

<212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

5 ccuggaucuu gggccagag 19

<210> 21
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

10

cagcgucagg gacuggcug 19
 <210> 22
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

15

augcuacagu acugagggg 19
 <210> 23
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

20

gucuguaaga uagcugccu 19
 <210> 24
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

25

uucuagaugg aagaccag 19
 <210> 25
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 25

30

uugaacauca aguguauuc 19
 <210> 26
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

35

aaauauugca uaggucuua 19
 <210> 27
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

40

65

ES 2 390 085 T3

<400> 27
 aaaaauauug cauaggucu 19
 5 <210> 28
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 10 agggacucgc aguccgagc 19
 <210> 29
 15 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 20 uacuugaaca ucaagugua 19
 <210> 30
 25 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 30 aaacauguuu auuagaaaa 19
 <210> 31
 <211> 19
 <212> ARN
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 aacugcuaag acaagugcg 19
 40 <210> 32
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 32
 acgacgacga gaagcgguc 19
 <210> 33
 50 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 55 aagccguguc uuccuccgg 19
 <210> 34
 60 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 65 aguguucauc cucaggguc 19

ES 2 390 085 T3

<210> 35
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 35

 agggcgucga gagcccagc 19

 <210> 36
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 10

 <400> 36
 15 aucagcaggc ggcagggc 19

 <210> 37
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20

 <400> 37
 25 aguucuuugc ccaccuggc 19

 <210> 38
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30

 <400> 38
 35 acggcucgcu guaggccag 19

 <210> 39
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40

 <400> 39
 45 acguccagca ggccccc 19

 <210> 40
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 50

 <400> 40
 55 augacucgga agccagugc 19

 <210> 41
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 60

 <400> 41
 65 aacucaauga gcuuccugg 19

 <210> 42
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

ES 2 390 085 T3

<400> 42
 5 cucaacucug caguacacg 19
 <210> 43
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 43
 agauacacaa accaccucc 19
 <210> 44
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 44
 acaacaaaca cacuugguc 19
 <210> 45
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 45
 cugcaucagg uuggcacac 19
 <210> 46
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 46
 uccugccucu agucuccac 19
 <210> 47
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 47
 cagcugcauc agguuggca 19
 <210> 48
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 48
 cagcagcugc aucagguug 19
 <210> 49
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 49
 ccugcagcag cugcaucag 19

ES 2 390 085 T3

<210> 50
 <211> 19
 <212> ARN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 50
 10 cuccugcagc agcugcauc 19
 <210> 51
 <211> 19
 <212> ARN
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 aacucugcag uacacgaug 19
 20 <210> 52
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 52
 ccugccucua gucuccacc 19
 30 <210> 53
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 35 gcgcuagcug cggcuucua 19
 <210> 54
 <211> 19
 <212> ARN
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 45 cgagccugga gagcucgga 19
 <210> 55
 <211> 19
 <212> ARN
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 55
 gagucccugg acagcagca 19
 55 <210> 56
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 56
 ccaaccugau gcagcugcu 19
 65 <210> 57
 <211> 19

ES 2 390 085 T3

<212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 57
 5 cgugcugcgc cuggacuca 19
 <210> 58
 <211> 19
 10 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 15 ucgcugaccg cgcuagcug 19
 <210> 59
 <211> 19
 20 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 59
 25 cugaccgcbc uagcugcgg 19
 <210> 60
 <211> 19
 30 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 60
 accgcbcag cugcggcuu 19
 35 <210> 61
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 61
 agccuggaga gcucggacu 19
 <210> 62
 <211> 19
 45 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 62
 50 ccuggagagc ucggacugc 19
 <210> 63
 <211> 19
 55 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 63
 60 uccuggaca gcagcaaca 19
 <210> 64
 <211> 19
 65 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

ES 2 390 085 T3

	<400> 64	
	gacagcagca acaguggcu	19
5	<210> 65 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
10	<400> 65	
	acagcagcaa caguggcuu	19
15	<210> 66 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
20	<400> 66	
	gugccaaccu gaugcagcu	19
25	<210> 67 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
30	<400> 67	
	accugaugca gcugcugca	19
35	<210> 68 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
40	<400> 68	
	augcagcugc ugcaggaga	19
45	<210> 69 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 69	
	agccgugcgg ccugcgggg	19
50	<210> 70 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
55	<400> 70	
	cucuggccca agauccagg	19
60	<210> 71 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
65	<400> 71	
	cagccagucc cugacgug	19

ES 2 390 085 T3

<210> 72
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 72

 ccccucagua cuguagcau 19
 10 <210> 73
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 73
 15 aggcagcuau cuuacagac 19

 <210> 74
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 74

 25 cugggucuuc caucuagaa 19

 <210> 75
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 75

 35 gaauacacuu gauguuca 19

 <210> 76
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 76

 uaagaccuau gcauuuuu 19
 45 <210> 77
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 77

 agaccuaugc aaauuuuu 19

 <210> 78
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 78

 60 gcucggacug cgaguccu 19

 <210> 79
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 65

ES 2 390 085 T3

<400> 79
 5 uacacuugau guucaagua 19
 <210> 80
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 80
 uuuucuaaua aacauguuu 19
 15 <210> 81
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 81
 cgcacuuguc uuagcaguu 19
 25 <210> 82
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 82
 gaccgcuucu cgucgucgu 19
 35 <210> 83
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 83
 40 ccggaggaag acacggcuu 19
 <210> 84
 <211> 19
 <212> ARN
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 84
 50 gaccugagg augaacacu 19
 <210> 85
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 85
 gcugggcucu cgacgcccu 19
 60 <210> 86
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 65 <400> 86

ES 2 390 085 T3

	gcccugcgcg ccugcugau	19
5	<210> 87 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 87	
10	gccagguggg caaagaacu	19
15	<210> 88 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 88	
20	cuggccuaca gcgagccgu	19
25	<210> 89 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 89	
30	ggggggcgcu gcuggacgu	19
35	<210> 90 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 90	
40	gcacuggcuu ccgagucau	19
45	<210> 91 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 91	
50	ccaggaagcu cauugaguu	19
55	<210> 92 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 92	
60	cguguacugc agaguugag	19
65	<210> 93 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 93	
	ggaggugguu uguguaucau	19

ES 2 390 085 T3

<210> 94
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 94
 gaccaagugu guuuguugu 19
 10 <210> 95
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 95
 15 gugugccaac cugaugcag 19
 <210> 96
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 96
 25 guggagacua gaggcagga 19
 <210> 97
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 97
 35 ugccaaccug augcagcug 19
 <210> 98
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 98
 caaccugaug cagcugcug 19
 <210> 99
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 99
 50 cugaugcagc ugcugcagg 19
 <210> 100
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 100
 60 gaugcagcug cugcaggag 19
 <210> 101
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 65

ES 2 390 085 T3

	<400> 101	
	caucguguac ugcagaguu	19
5	<210> 102 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
10	<400> 102	
	gguggagacu agaggcagg	19
15	<210> 103 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
20	<400> 103	
	cuagccaguu gguaagcca	19
25	<210> 104 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 104	
30	ugauuccagu gguuggaaa	19
	<210> 105 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
35	<400> 105	
	ccagugguug gaaaacuga	19
40	<210> 106 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
45	<400> 106	
	gcuuccgagu caucaagaa	19
50	<210> 107 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
55	<400> 107	
	ggaagcucau ugaguugug	19
60	<210> 108 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 108	
65	ccaucugggu cuuccaucu	19

ES 2 390 085 T3

<210> 109
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 109
 ggaugugugu guagcaugu 19
 10 <210> 110
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 110
 15 acacauacc cucaguacu 19
 <210> 111
 <211> 19
 20 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 111
 25 acauaccu caguacugu 19
 <210> 112
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 112
 35 cacuguucau gaauacacu 19
 <210> 113
 <211> 19
 <212> ARN
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 113
 ccagcuggau gugugua 19
 45 <210> 114
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 114
 cggaacagcu gcucuuga 19
 <210> 115
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 115
 60 gaagcucau gaguugugu 19
 <210> 116
 <211> 19
 <212> ARN
 65 <213> Homo sapiens

ES 2 390 085 T3

<400> 116
 5 ggacacauac cccucagua 19
 <210> 117
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 117
 ggaucuuuga cacuugaaa 19
 15 <210> 118
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 118
 guagcaugua ccuuuuuau 19
 <210> 119
 <211> 19
 25 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 119
 30 ucaguacugu agcauggaa 19
 <210> 120
 <211> 19
 <212> ARN
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 120
 40 uguguagcau guaccuuau 19
 <210> 121
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 121
 cuggaugugu guguagcau 19
 50 <210> 122
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 122
 acacuugaug uucaaguau 19
 60 <210> 123
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 123
 65 gcaugaaugu aagaguagg 19

ES 2 390 085 T3

<210> 124
 <211> 19
 <212> ARN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 124
 10 agcagcaaca guggcuucg 19
 <210> 125
 <211> 19
 <212> ARN
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 125
 augaauguaa gaguaggaa 19

 <210> 126
 <211> 19
 <212> ARN
 20 <213> Homo sapiens

 <400> 126
 25 cagcagcaac aguggcuuc 19

 <210> 127
 <211> 19
 <212> ARN -
 30 <213> Homo sapiens

 <400> 127
 35 caugaaugua agaguagga 19

 <210> 128
 <211> 19
 <212> ARN
 40 <213> Homo sapiens

 <400> 128
 45 gauguucaag uauuaagac 19
 <210> 129
 <211> 19
 <212> ARN
 50 <213> Homo sapiens

 <400> 129
 ugaugcagcu gcugcagga 19

 <210> 130
 <211> 19
 <212> ARN
 55 <213> Homo sapiens

 <400> 130
 60 gaauacacuu gauguuca 19

 <210> 131
 65 <211> 19

ES 2 390 085 T3

<212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 131
 5 ugaauacacu ugauguuca 19
 <210> 132
 <211> 19
 10 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 132
 15 auacacuuga uguucaagu 19
 <210> 133
 <211> 19
 <212> ARN
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 133
 caugaaucacu cuugauguu 19
 25 <210> 134
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 134
 cuggacagca gcaacagug 19
 <210> 135
 <211> 19
 35 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 135
 40 guucaugaau acacuugau 19
 <210> 136
 <211> 19
 45 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 136
 50 guucaugaau acacuugau 19
 <210> 137
 <211> 19
 <212> ARN
 55 <213> Homo sapiens
 <400> 137
 uggacagcag caacagugg 19
 60 <210> 138
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 65

ES 2 390 085 T3

	<400> 138	
	ugugugccaa ccugaugca	19
5	<210> 139 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
10	<400> 139	
	uucaugaaua cacuugaug	19
15	<210> 140 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 140	
20	aaccugaugc agcugcugc	19
25	<210> 141 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 141	
30	agucccugga cagcagcaa	19
35	<210> 142 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 142	
	cccucaguac uguagcaug	19
40	<210> 143 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
45	<400> 143	
	ccuggacagc agcaacagu	19
50	<210> 144 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 144	
55	ugugccaacc ugaugcagc	19
60	<210> 145 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 145	
65	aaucacuug auguugaag	19

ES 2 390 085 T3

<210> 146
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 146
 augaauacac uugauguuc 19
 10 <210> 147
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 147
 ugaugcagcu gcugcagga 19
 <210> 148
 <211> 19
 20 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 148
 25 agaacuguuu acaugaaga 19
 <210> 149
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 149
 35 aucuagaacu guuuacaug 19
 <210> 150
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 150
 ccaugccuag ccuuugga 19
 45 <210> 151
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 151
 cuagaacugu uuacaugaa 19
 <210> 152
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 152
 60 gaacuguuua caugaagau 19
 <210> 153
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 65

ES 2 390 085 T3

<400> 153
 5 ggucuccau cuagaacug 19
 <210> 154
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 154
 ccaucuagaa cuguuuaca 19
 15 <210> 155
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 155
 cuuccaucua gaacuguuu 19
 <210> 156
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 156
 30 uagaacuguu uacaugaag 19
 <210> 157
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 157
 40 ucuuccaucu agaacuguu 19
 <210> 158
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 158
 caucuagaac uguuuacau 19
 50 <210> 159
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 159
 gggucucca ucuagaacu 19
 <210> 160
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 160
 65 uccaucuaga acuguuuac 19

ES 2 390 085 T3

<210> 161
 <211> 19
 <212> ARN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 161
 ucuagaacug uuuacauga 19
 10
 <210> 162
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 162
 uuccaucuag aacuguua 19
 20
 <210> 163
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 163
 gucuuccauc uagaacugu 19
 30
 <210> 164
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 164
 caaguauuaa gaccuaugc 19
 40
 <210> 165
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 165
 guauuaagac cuaugcau 19
 50
 <210> 166
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55
 <400> 166
 aguauuaaga ccuaugcaa 19
 60
 <210> 167
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 65
 <400> 167
 auguuaagu auuaagacc 19
 <210> 168
 <211> 19

ES 2 390 085 T3

<212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 168
 5 cacuugaugu ucaaguauu 19
 <210> 169
 <211> 19
 10 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 169
 15 ccaagaucca ggggcuguu 19
 <210> 170
 <211> 19
 <212> ARN
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 170
 guucaaguau uaagaccua 19
 25 <210> 171
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 171
 ucaaguauua agaccuaug 19
 <210> 172
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 172
 40 aaguauuaag accuaugca 19
 <210> 173
 <211> 19
 <212> ARN
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 173
 uguucaagua uuaagaccu 19
 <210> 174
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 174
 ugggucuucc aucuagaac 19
 <210> 175
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 175
 65

ES 2 390 085 T3

	uggcuuacca acuggcuag	19
	<210> 176	
5	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 176	
10	uuuccaacca cuggaauca	19
	<210> 177	
	<211> 19	
15	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 177	
20	ucaguuuucc aaccacugg	19
	<210> 178	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 178	
30	uucuugauga cucggaagc	19
	<210> 179	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 179	
40	cacaacucua ugagcuucc	19
	<210> 180	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
45	<400> 180	
50	agauggaaga cccagaugg	19
	<210> 181	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 181	
55	acaugcuaca cacacaucc	19
	<210> 182	
	<211> 19	
60	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 182	
65	aguacugagg gguaugugu	19

ES 2 390 085 T3

<210> 183
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 183
 acaguacuga gggguaugu 19
 10 <210> 184
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 184
 aguguauuca ugaacagug 19
 20 <210> 185
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 185
 25 uacacacaca uccagcugg 19
 <210> 186
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 186
 ucaaugagca gcuguuccg 19
 35 <210> 187
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 187
 acacaacuca augagcuuc 19
 45 <210> 188
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 188
 uacugagggg uaugugucc 19
 55 <210> 189
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 189
 60 uuucaagugu caaagaucc 19
 <210> 190
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 65

ES 2 390 085 T3

<400> 190
 5 auaauaaggu acaugcuac 19
 <210> 191
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 191
 uuccaugcua caguacuga 19
 15 <210> 192
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 192
 auaagguaca ugcuacaca 19
 <210> 193
 <211> 19
 25 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 193
 30 augcuacaca cacauccag 19
 <210> 194
 <211> 19
 <212> ARN
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 194
 40 auacuugaac aucaagugu 19
 <210> 195
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 195
 ccuacucuua caucaugc 19
 50 <210> 196
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 196
 cgaagccacu guugcugcu 19
 <210> 197
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 197
 65 uuccuacucu uacauucau 19

ES 2 390 085 T3

<210> 198
 <211> 19
 <212> ARN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 198
 10 gaagccacug uugcugcug 19
 <210> 199
 <211> 19
 <212> ARN
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 199
 uccuacucuu acauucaug 19
 20 <210> 200
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 200
 gucuuauuac uugaacauc 19
 <210> 201
 <211> 19
 30 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 201
 35 uccugcagca gcugcauca 19
 <210> 202
 <211> 19
 <212> ARN
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 202
 uugaacauca aguguauuc 19
 45 <210> 203
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 203
 ugaacaucuaa guguaauca 19
 55 <210> 204
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 204
 acuugaacau caaguguau 19
 <210> 205
 65 <211> 19

ES 2 390 085 T3

<212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 205
 5 aacaucaagu guauucaug 19
 <210> 206
 <211> 19
 10 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 206
 15 cacuguugcu gcuguccag 19
 <210> 207
 <211> 19
 <212> ARN
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 207
 25 aucaagugua uucaugaac 19
 <210> 208
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 208
 acaucaagug uauucauga 19
 <210> 209
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 209
 40 ccacuguugc ugcugucca 19
 <210> 210
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 210
 50 ugcaucaggu uggcacaca 19
 <210> 211
 <211> 19
 <212> ARN
 55 <213> Homo sapiens
 <400> 211
 60 caucaagugu aucaugaa 19
 <210> 212
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 65

ES 2 390 085 T3

	<400> 212	
	gcagcagcug caucagguu	19
5	<210> 213 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
10	<400> 213	
	uugcugcugu ccagggacu	19
15	<210> 214 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
20	<400> 214	
	caugcuacag uacugaggg	19
25	<210> 215 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 215	
30	acuguugcug cuguacagg	19
35	<210> 216 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 216	
	gcugcaucag guuggcaca	19
40	<210> 217 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
45	<400> 217	
	cuugaacauc aaguguauu	19
50	<210> 218 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
55	<400> 218	
	gaacaucaag uguauucau	19
60	<210> 219 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 219	
65	uccugcagca gcugcauca	19

ES 2 390 085 T3

<210> 220
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 220
 ucuucaugua aacaguucu 19
 10 <210> 221
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 221
 cauguaaaca guucuagau 19
 20 <210> 222
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 222
 ucccaaaggc uaggcaugg 19
 <210> 223
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 223
 uucauguaaa caguucuag 19
 35 <210> 224
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 224
 aucuucaugu aaacaguuc 19
 45 <210> 225
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 225
 caguucuaga uggaagacc 19
 55 <210> 226
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 226
 uguaaacagu ucuagaugg 19
 <210> 227
 <211> 19
 <212> ARN
 65 <213> Homo sapiens

ES 2 390 085 T3

	<400> 227	
	aaacaguucu agauggaag	19
5	<210> 228 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
10	<400> 228	
	cuucauguuaa acaguucua	19
15	<210> 229 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
20	<400> 229	
	aacaguucua gauggaaga	19
25	<210> 230 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 230	
30	auguaaacag uucuagaug	19
35	<210> 231 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 231	
	aguucuagau ggaagacc	19
40	<210> 232 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
45	<400> 232	
	guaaacaguu cuagaugga	19
50	<210> 233 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens	
55	<400> 233	
	ucauguuaaac aguucuaga	19
60	<210> 234 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 234	
65	uaaacaguuc uagauggaa	19

ES 2 390 085 T3

<210> 235
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 235 19
 acaguucuag auggaagac 19
 10 <210> 236
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 236
 gc auaggucu uaauacuug 19
 20 <210> 237
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 237
 auugcauagg ucuuaauac 19
 <210> 238
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 238
 35 uugcauaggu cuuaauacu 19
 <210> 239
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 239
 ggucuuaaua cuugaacau 19
 45 <210> 240
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 240
 aa uacuugaa caucaagug 19
 55 <210> 241
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 241
 aacagcccu ggaucuugg 19
 65 <210> 242
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

	<400> 242	
5	uaggucuuaa uacuugaac	19
	<210> 243	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 243	
	cauaggucuu aauacuuga	19
15	<210> 244	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 244	
	ugcauagguc uaaauacuu	19
25	<210> 245	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 245	
30	aggucuuaau acuugaaca	19
	<210> 246	
	<211> 19	
	<212> ARN	
35	<213> Homo sapiens	
	<400> 246	
40	guucuagaug gaagacca	19
	<210> 247	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
45	<400> 247	
	ccaggaagcu cauugaguug u	21
50	<210> 248	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
55	<400> 248	
	ccaucugggu cuuccaucua g	21
60	<210> 249	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 249	
65	ggaugugugu guagcaugua c	21

5	<210> 250 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 250	
10	caaguguguu uguuguuugu u	21
	<210> 251 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
15	<400> 251	
	ccucaguacu guagcaugga a	21
20	<210> 252 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
25	<400> 252	
	gaccaagugu guuuguugu u	21
30	<210> 253 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 253	
35	gcuuccgagu caucaagaag a	21
	<210> 254 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
40	<400> 254	
	ggaggugggg gaauaguguu u	21
45	<210> 255 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
50	<400> 255	
	caguacugua gcauggaaca a	21
55	<210> 256 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
60	<400> 256	
	gaauacacuu gauguucaag u	21
65	<210> 257 <211> 21	

ES 2 390 085 T3

<212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 257
 5 caaguauuaa gaccuaugca a 21
 <210> 258
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 258
 gaacuuuugg gguggagacu a 21
 <210> 259
 15 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 259
 20 ggacacauac cccucaguac u 21
 <210> 260
 25 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 260
 30 ggaggugguu ugugusucuu a 21
 <210> 261
 35 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 261
 40 ggaucuuuga cacuugaaaa a 21
 <210> 262
 45 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 262
 ggucuuccau cuagaacugu u 21
 50 <210> 263
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 263
 uguguagcau guaccuuuu a 21
 <210> 264
 60 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 264
 65 caacaaggcu uccagcugga u 21

	<210> 265	
	<211> 21	
	<212> ARN	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 265	
10	cacuugggau cuuugacacu u	21
	<210> 266	
	<211> 21	
	<212> ARN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 266	
	caucacuacu gaccuguugu a	21
20	<210> 267	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 267	
	guguguguag cauguaccuu a	21
30	<210> 268	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 268	
	gcaugaaugu aagaguagga a	21
40	<210> 269	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 269	
45	gacagcagca acaguggcuu c	21
50	<210> 270	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 270	
55	ugaugcagcu gcugcaggag a	21
60	<210> 271	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 271	
	ugaaauacacu ugauguucaa g	21
65	<210> 272	
	<211> 21	

ES 2 390 085 T3

<212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 272
 5 caugaauaca cuugauguuc a 21
 <210> 273
 <211> 21
 10 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 273
 15 ggacagcagc aacaguggcu u 21
 <210> 274
 <211> 21
 <212> ARN
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 274
 25 guucaugaau acacuugaug u 21
 <210> 275
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 275
 ucaugaauac acuugaugu c 21
 35 <210> 276
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 276
 ucccuggaca gcagcaacag u 21
 <210> 277
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 277 21
 50 agucccugga cagcagcaac a 21
 <210> 278
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 278
 60 gaauacacuu gauguucaag u 21
 <220> 279
 <211> 21
 <212> ARN
 65 <213> Homo sapiens

ES 2 390 085 T3

	<400> 279	
	cuagaacugu uuacaugaag a	21
5	<210> 280 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
10	<400> 280	
	ccaucuagaa cuguuuacau g	21
15	<210> 281 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
20	<400> 281	
	cuuccaucua gaacuguuua c	21
25	<210> 282 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 282	
30	ucuuccaucu agaacuguuu a	21
	<210> 283 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
35	<400> 283	
	caucuagaac uguuuacaug a	21
40	<210> 284 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
45	<400> 284	
	gggucuucca ucuagaacug u	21
50	<210> 285 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
55	<400> 285	
	uccaucuaga acuguuuaca u	21
60	<210> 286 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 286	
65	ucuagaacug uuuacaugaa g	21

ES 2 390 085 T3

<210> 287
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 287
 uuccaucuag aacuguuuac a 21
 10 <210> 288
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 288
 gucuuccauc uagaacuguu u 21
 20 <210> 289
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 289
 ugauguucaa guauuaagac c 21
 30 <210> 290
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 290 21
 35 guucaaguau uaagaccuau g 21
 40 <210> 291
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 291
 ucaaguauua agaccuaugc a 21
 45 <210> 292
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 292
 gauguucaag uauuaagacc u 21
 55 <210> 293
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 293
 60 uucaaguauu aagaccuaug c 21
 65 <210> 294
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

ES 2 390 085 T3

<400> 294
 5 cugggucuuc caucuagaac u 21
 <210> 295
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 295
 ugggucuucc aucuagaacu g 21
 15 <210> 296
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 296
 acaacucaau gagcuuccug g 21
 25 <210> 297
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 297
 cuagauggaa gacccagaug g 21
 <210> 298
 <211> 21
 <212> ARN
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 298
 guacaugcua cacacacauc c 21
 40 <210> 299
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 299
 aacaacaac aaacacacuu g 21
 50 <210> 300
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 300
 uuccaugcua casuacugag g 21
 60 <210> 301
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 65 <400> 301
 aaacaacaaa cacacuuggu c 21

ES 2 390 085 T3

<210> 302
 <211> 21
 <212> ARN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 302

 10 ucuucuugau gacucggaag c 21

 <210> 303
 <211> 21
 <212> ARN
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 303

 aaacacuauu cccccaccuc c 21

 20 <210> 304
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 25 <400> 304

 uuguuccaug cuacaguacu g 21

 <210> 305
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 305
 35 acuugaacau caaguguauu c 21

 <210> 306
 <211> 21
 <212> ARN
 40 <213> Homo sapiens

 <400> 306

 uugcauaggu cuuaauacuu g 21

 <210> 307
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 307

 uagucuccac cccaaaaguu c 21

 <210> 308
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 308

 aguacugagg gguauguguc c 21

 <210> 309
 65 <211> 21

ES 2 390 085 T3

<212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 309
 5 uaagauacac aaaccaccuc c 21
 <210> 310
 <211> 21
 10 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 310
 15 uuuuuaagu gucaaagau c 21
 <210> 311
 <211> 21
 <212> ARN
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 311
 aacaguucua gauggaagac c 21
 25 <210> 312
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 312
 uaauaaggua caugcuacac a 21
 35 <210> 313
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 313
 40 auccagcugg aagccuuguu g 21
 <210> 314
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 314
 aaguguaaaa gauccaagu g 21
 50 <210> 315
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 315
 uacaacaggu caguagugau g 21
 60 <210> 316
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 65

	<400> 316	
	uaagguacau gcuacacaca c	21
5	<210> 317 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
10	<400> 317	
	uuccuacucu uacauucaug c	21
15	<210> 318 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
20	<400> 318	
	gaagccacug uugcugcugu c	21
25	<210> 319 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
30	<400> 319	
	ucuccugcag cagcugcauc a	21
35	<210> 320 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens <400> 320	
	cuugaacauc aaguguauuc a	21
40	<210> 321 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
45	<400> 321	
	ugaacaucaa guguauucau g	21
50	<210> 322 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
55	<400> 322	
	aagccacugu ugcugcuguc c	21
60	<210> 323 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens	
65	<400> 323	
	acaucaagug uauucaugaa c	21

ES 2 390 085 T3

<210> 324
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 324
 gaacaucaag uguauucaug a 21
 10 <210> 325
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 325
 acuguugcug cuguccaggg a 21
 20 <210> 326
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 326
 uguugcugcu guccagggac u 21
 30 <210> 327
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 327
 acuugaacau caaguguauu c 21
 40 <210> 328
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 328
 ucuucaugua aacaguucua g 21
 50 <210> 329
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 329
 cauguaaaca guucuagaug g 21
 60 <210> 330
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 65 <400> 330
 guaaacaguu cuagauggaa g 21
 <210> 331
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

ES 2 390 085 T3

<400> 331
 5 uaaacaguuc uagauggaag a 21
 <210> 332
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 332
 ucauguaaac aguucuagau g 21
 15 <210> 333
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 333
 acaguucuag auggaagacc c 21
 25 <210> 334
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 334
 auguaaacag uucuagaugg a 21
 35 <210> 335
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 335
 40 cuucauguaa acaguucuag a 21
 <210> 336
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 336
 uguaaacagu ucuagaugga a 21
 50 <210> 337
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 337
 aaacaguucu agauggaaga c 21
 60 <210> 338
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 65 <400> 338
 ggucuaaaua cuugaacauc a 21

ES 2 390 085 T3

<210> 339
 <211> 21
 <212> ARN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 339
 10 cauaggucuu aauacuugaa c 21
 <210> 340
 <211> 21
 <212> ARN
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 340
 ugcauagguc uaaauacuug a 21
 20 <210> 341
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 341
 aggucuuauu acuugaacau c 21
 30 <210> 342
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 342
 35 gccauaggucu uaauacuuga a 21
 <210> 343
 <211> 21
 <212> ARN
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 343
 45 aguucuagau ggaagacca g 21
 <210> 344
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 344
 caguucuaga uggaagacc a 21
 55

 60

 65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto ARNip que tiene la estructura de hebra doble:

5 5' (N)_x-Z 3' (cadena antisentido)
3' Z'-(N')_y 5' (cadena sentido),

10 donde cada N y N' es un ribonucleótido que puede estar modificado o no modificado en su residuo azúcar y cada uno de (N)_x y (N')_y es un oligómero en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' por un enlace covalente;

en donde cada uno de x y y es un entero entre 19 y 40; en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente es dTdT y está covalentemente unido al terminal 3' de la hebra en la cual está presente;

15 y en donde la secuencia de (N)_x comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos que tiene una cualquiera de las siguientes secuencias:

20 AGCUGCAUCAGGUUGGCAC (sec. con núm. de ident.:66);
UUCUAGAUGGAAGACCCAG (sec. con núm. de ident.:74);
UUGAACAUCAAGUGUAUUC (sec. con núm. de ident.:75);
AAAAUAUUGCAUAGGUCU (sec. con núm. de ident.:77);
UACUUGAACAUCAAGUGUA (sec. con núm. de ident.:79); y
AACUCAUUGAGCUUCCUGG (sec. con núm. de ident.:91),

25 y la secuencia de (N')_y comprende un segundo tramo de los nucleótidos contiguos, y en donde la estructura de hebra doble se genera por pareamiento de bases entre el primer tramo y el segundo tramo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se modifica un residuo azúcar en al menos un ribonucleótido.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el residuo azúcar se modifica reemplazando un -OH en la posición 2' con -H, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂CH₃, -NH₂, o -F.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el -OH se reemplaza con -OCH₃.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el enlace covalente es un enlace fosfodiéster.; x = y, preferentemente x = y = 19; Z y Z' están ausentes; los ribonucleótidos alternos en cada una de las cadenas antisentido y sentido comprenden una modificación 2' -OCH₃ en sus residuos azúcar; y los ribonucleótidos en los terminales 5' y 3' de la cadena antisentido están modificados y los ribonucleótidos en los terminales 5' y 3' de la cadena sentido no están modificados.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde x = y = 19.

7. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el compuesto es fosforilado o no fosforilado.

8. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 6 y 7, en donde el dinucleótido dTdT está covalentemente unido al terminal 3' de la cadena antisentido o la cadena sentido.

9. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la secuencia de (N)_x comprende la siguiente secuencia: AGCUGCAUCAGGUUGGCAC (sec. con núm. de ident.: 66).

10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y 9 con la estructura:

5' AGCUGCAUCAGGUUGGCAC 3' antisense strand (SEQ ID NO:66)

|||||

3' UCGACGUAGUCCAACCGUG 5' sense strand (SEQ ID NO:16) ,

55 en donde en los ribonucleótidos alternos en las cadenas antisentido y sentido está presente una modificación 2'-OCH₃ en el residuo azúcar de los ribonucleótidos; los ribonucleótidos en los terminales 5' y 3' de la cadena antisentido comprenden la modificación 2'-OCH₃; los ribonucleótidos en los terminales 5' y 3' de la cadena sentido no están modificados; el ribonucleótido en cada uno del terminal 5' y el terminal 3' de la cadena antisentido y la cadena sentido es independientemente fosforilado o no fosforilado; y cada línea vertical representa el pareamiento de bases.

60 11. Un compuesto de la reivindicación 10, en donde las cadenas sentido y antisentido no están fosforiladas en el terminal 3'.

12. Un compuesto de la reivindicación 10, en donde las cadenas sentido y antisentido no están fosforiladas en los terminales 3' y 5'.
- 5 13. Un compuesto de la reivindicación 10, en donde las cadenas sentido y antisentido están fosforiladas en los terminales 3' y 5'.
14. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 15. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para usar en el tratamiento de un trastorno respiratorio, una enfermedad ocular, una trastorno microvascular o una enfermedad o lesión de la médula espinal.
16. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 15, en el tratamiento de una enfermedad ocular.
- 15 17. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la enfermedad ocular es el glaucoma.
18. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la enfermedad ocular es la degeneración macular.
- 20 19. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la enfermedad ocular es la degeneración macular relacionada con la edad (AMD).
- 25 20. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es AMD húmeda.
21. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la enfermedad ocular es secundaria a la diabetes.
- 30 22. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la enfermedad ocular es retinopatía diabética.
23. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la enfermedad ocular es edema macular diabético (DME).
- 35 24. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 15, en el tratamiento de un trastorno microvascular.
25. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el trastorno microvascular es la insuficiencia renal aguda (ARF).
- 40 26. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 15, en el tratamiento de un trastorno respiratorio.
27. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el trastorno respiratorio es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).
- 45 28. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el trastorno respiratorio es asma.
29. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el trastorno respiratorio es el enfisema.
- 50 30. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el trastorno respiratorio es la bronquitis crónica.

Figura 1

El polinucleótido RTP801 humano (sec. con núm. de Ident.: 1)

```

TTTCCCTTC CAGGCGAGA ATTCCGACG AGGCGGAGG CTGGAGGCT GACCTGGA 60
CGGGTCTGGG CGGCTCTGG TGGTTGSCAC GSETTOSAC ACCCATTCAA GCGCGAGAC 120
GGACTTGGCT TAGGAGTCTT GGTTCAGCGG GGTAGCTGGC GCTTCTACCG TCCGGGACTC 180
TGGATTGATC AGCAACGCG CTGGGCTCTG TCTCTACGAT GCTTAGGCTT TCGAGCGCT 240
TCTGGCTCTC GTCGACCTCG TCTTGGCTT GGTCTTGGC CGAAGTGGC AGCCGAGATC 300
GGGGCGCGG CTCGCGCTCG GGTCTGGCGA CCGGGAGGA GGGTCTGAC GGTCCACGA 360
GCTCGAGAG CTCGAGCTCG GACTCCCTGG ACAGCAGCA CAGTGTCTC GCGCGGAGC 420
AAGACAGCG TTACTGGA TGGGCTGCT TGGCGACTT CGAGCTCTC ATGAGCGCTG 480
AGBAGAGCA CTCTGCTCG AACCTGATG AGCTGCTGCA GAGAGCGCTG GCGCAGCGC 540
GCTTGGCTTC TCGAGCTCT GCGCGCTGC TGAAGCTAG CCGTGTGTA AGCCAGGCTG 600
CCAAAGACT ACTCGCTCG GCCAGCAGC AGCGCTGCG CCGCGGCGG GCGCTGCTG 660
ACCTCTGCT CGAGCAGCG AAGAGCTGC ACAGCGTGG CCGCTGCA CTCGACCGC 720
CTCTGCTCG CACTCTCG CTCGAGCTCG TCGTGGCTT GAGCTGCGA CTCGCGCGA 780
AGATCGAGG GCTCTTTCG TCGCGACTT CTGCTTCTT CCGTGGCTT AGCCAGTGC 840
TGAAGCTGAG CACTGCTTC CAGTCTGCA AGAAGAGCT CTAGAGCTCG GACAGCTGC 900
TCAITGAGA GTTCTGACT TCAAGCTGAG GGGCGGCA CTGCTCTCA AGACAGAGC 960
GACTGACTT TCGGGCTGA GACTAGAGC AGGAGCTGAG GACTGACTT CTGCTCTCG 1020
AAACAGAGG CAGCCACTA AGCTGAGGT GGGGCAATG TGTTCGAG GAGCTCTCT 1080
GAGTGAAGT CGCTGCTG TCGATTGGG ACAGTACCG CTCAGTACT TACCTGAAA 1140
GAAAGCTTA GGGCGACA AGGCTTCAG CTGGATGCT GTGTAGCAT TACCTTATA 1200
TTTTGCTC TGACAGTAA CAGTCTGCT ACATCGAGC AGCAGCTCG CTGCTCTCG 1260
CCGAGCGCG CCGAGCTGA AGAAGCGCC AGTCTCTCT CAGAGCAGC GAGGGGAGG 1320
GGAGCTCG AGTCTGGA GGTCTTCTT GATCTTACT GGTCTGAGG GACAGAGT 1380
ATTGCTGCT TTTTCTCA CTGCTTCTT TGAAGAGC ATCACTACT ACCCTGCTA 1440
GCGCTACTT TTAGAGGCT ATGAGTGA GATAGGAG GGGTGGCTT CAGTACTC 1500
TTGGAGCTT TCACTTCA AATATCAC CTGAGAGCT GGTAAAGC TCGCGCTC 1560
GTGACTGCA GATTTAGCT GCGAGGAG GGGCTGAGG GGTGGGCTT GGAAGCTCT 1620
CCCGGAGCA GTCAGCTG GGTCTTCTT CTAGAGCTT TTAGAGAG ATAGGACTT 1680
CACTGCTAT GATTAAGCT GATTTGAG TACTAGAGC TATGCAAT TTTTACTTT 1740
CTAATGAC ATGTTCTGA AAACAAAAA AAAAAAAA RA 1781
    
```

Figura 2

El polipéptido RTP801 humano (sec. con núm. de Ident.: 2)

```
MPSLNDRFSS SSTSSSPSSL PRTPTPORPP RSNWGSATRE EGFDRSTSLR 50  
SSDCESLDSS NSGFQPEEOT AYLDGVSLPO FELLSDPEDE HLCANLMQLL 100  
QESLAQARLG SRRPARLLMP SQLVSOVQKE LLRLAYSEPC GLEGALLDVC 150  
VEQKSKCSV GQLALDPSLV PTFQLTLVLR LOSRLWPKIQ GLPSSANSPP 200  
LPOFSQSLTL STGFRVIKKK LYSSEQLLIE EC 232
```

Figura 3

**Redd-1 humano
(NIM_019058)**

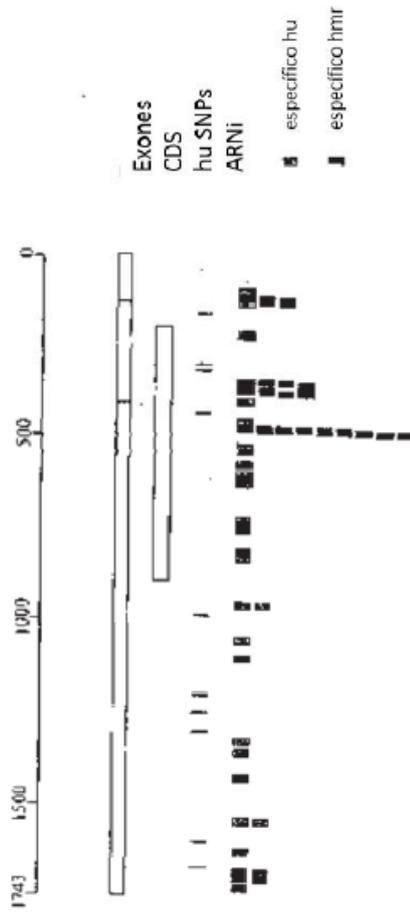


Figura 4 parte I

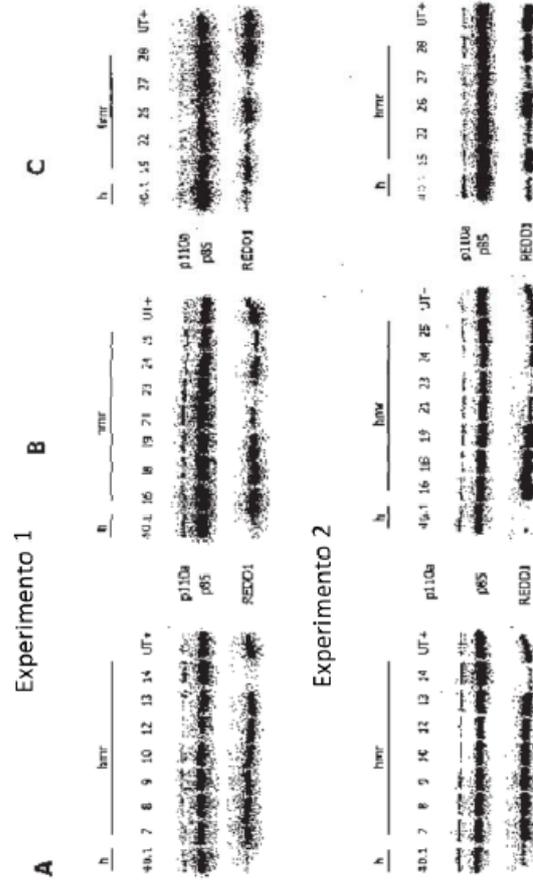


Figura 4 parte II

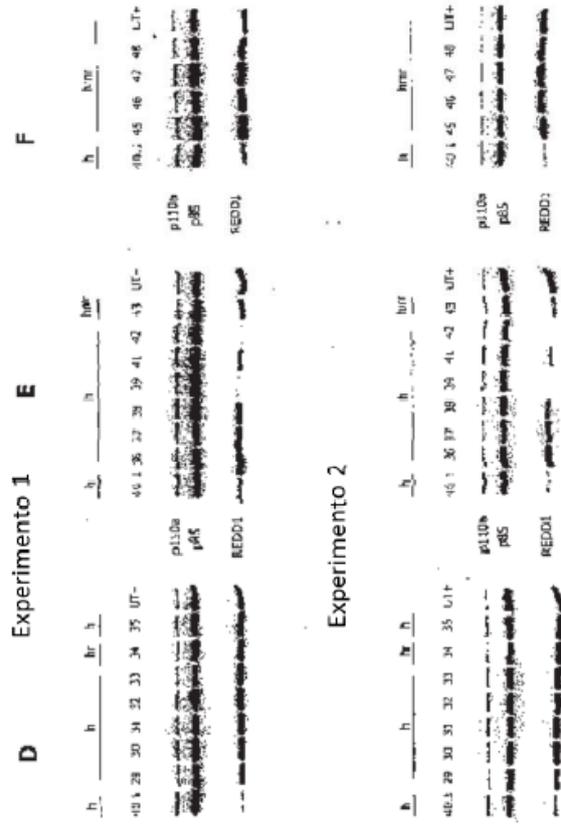


Figura 4 parte III

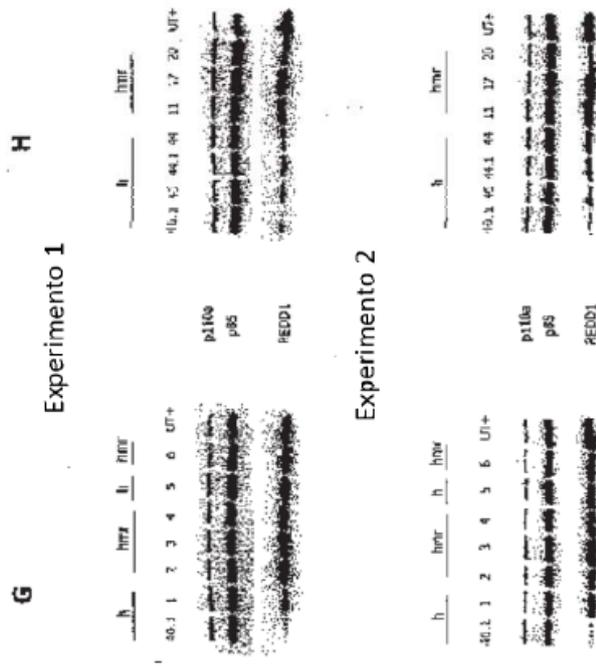


Figura 5 parte I

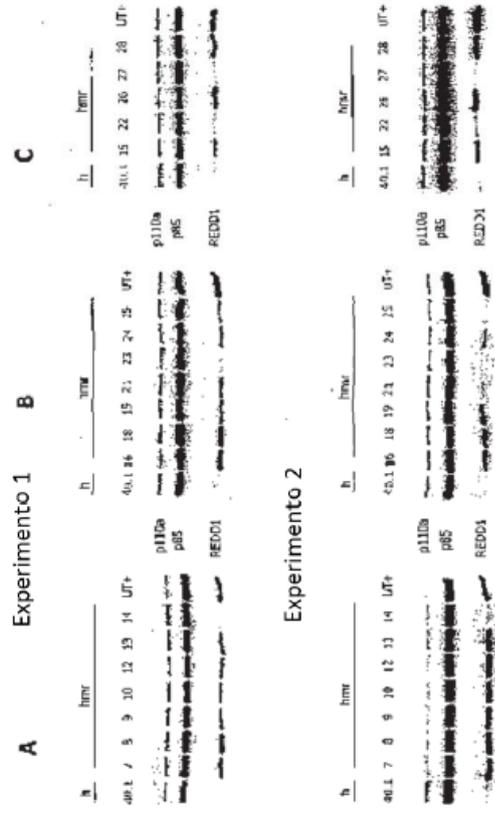


Figura 5 parte II

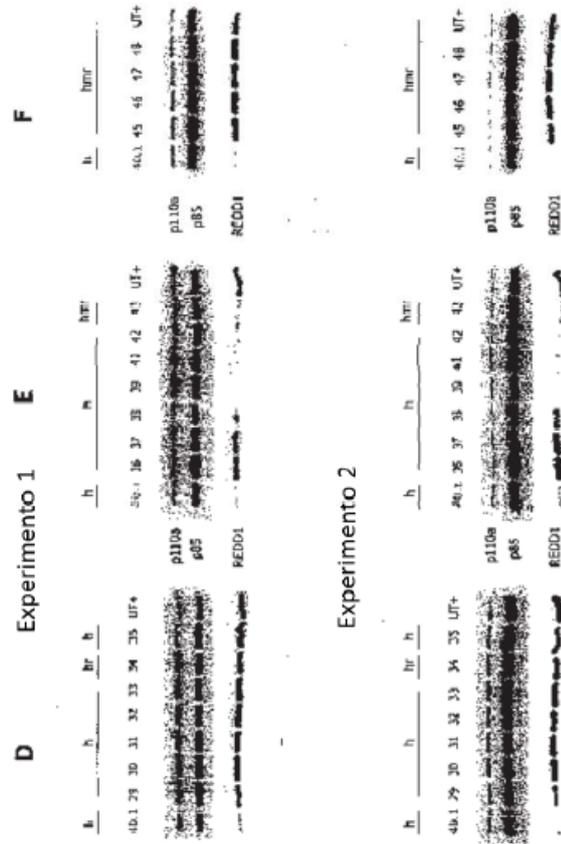


Figura 6

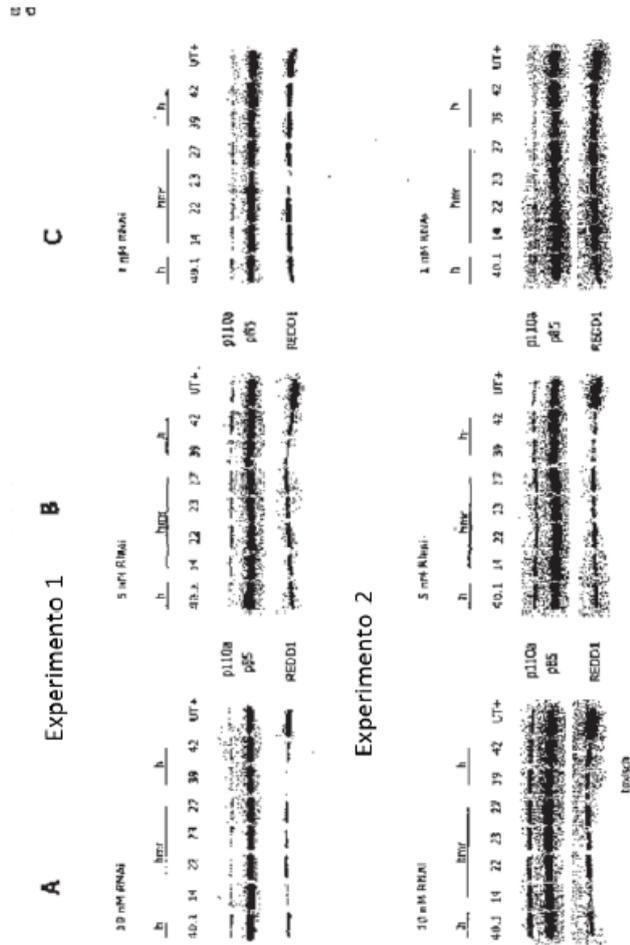
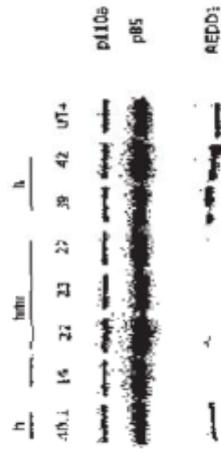


Figura 7

Experimento 1



Experimento 2

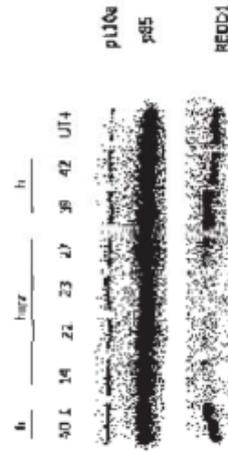


Figura 8

La fuga de los vasos sanguíneos en los ratones KO para RTP801 en comparación al control después de la inducción de CNV

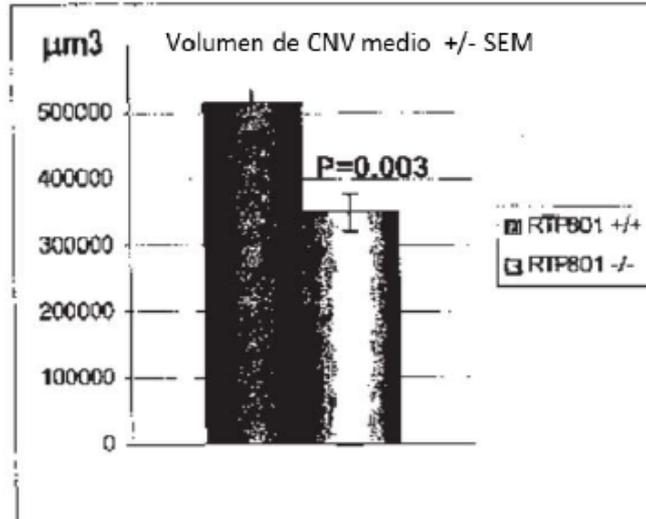


Figura 9

La reducción del volumen de CNV en respuesta a siARN de RTP801 (REDD14) en comparación a los controles

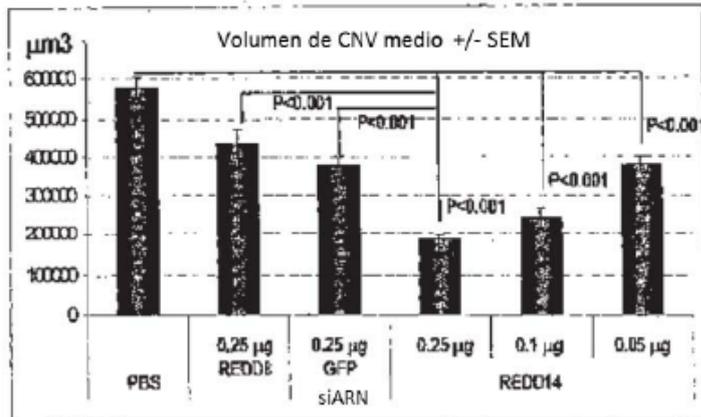


Figura 10

La reducción de la expresión de RTP801 en la coroides de los monos tratados con láser en respuesta al siARN de RTP801 en comparación al control, medido por la PCR en tiempo real

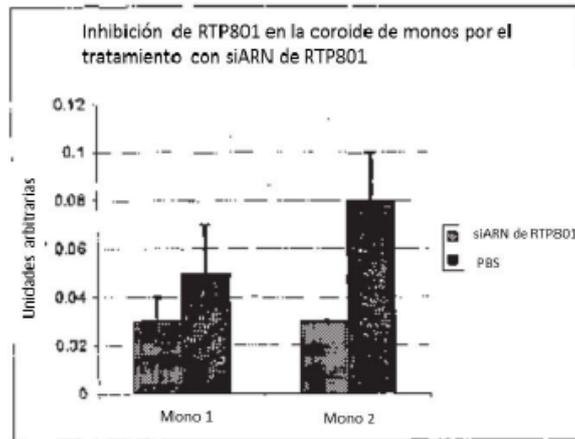
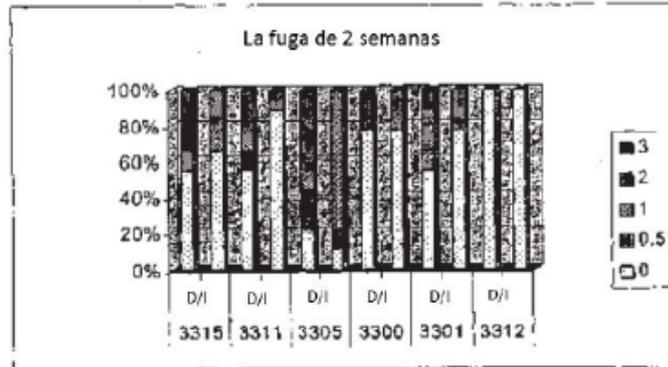


Figura 11

La reducción de la fuga en un modelo de CNV en no-primate en respuesta al siARN de RTP801 en comparación a un control

a)



b)

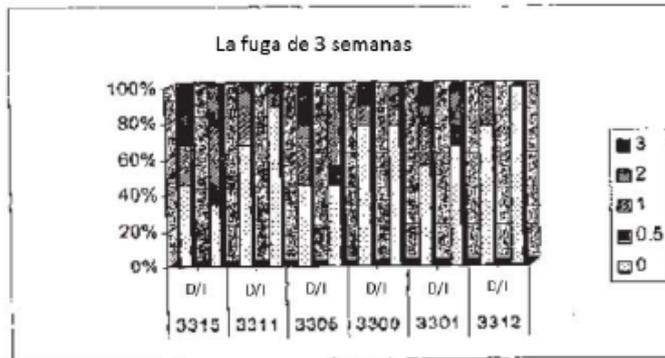
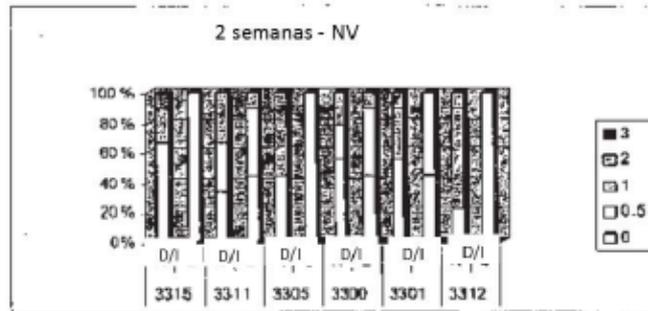


Figura 12

La reducción de la neovascularización en un modelo de CNV en no-primate en respuesta al siARN de RTP801 en comparación a un control

a)



b)

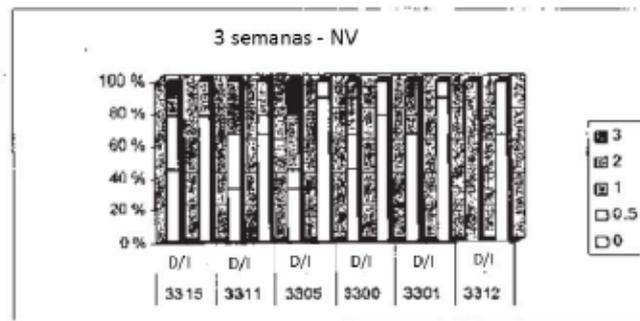


Figura 13

a)



b)

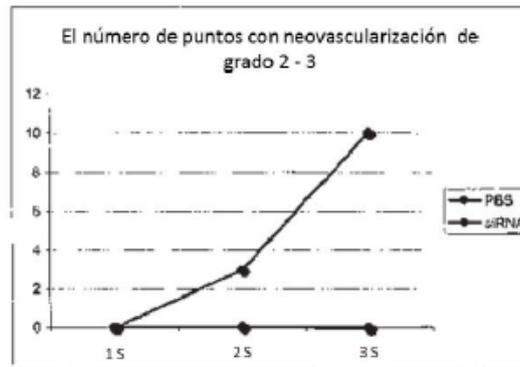


Figura 14

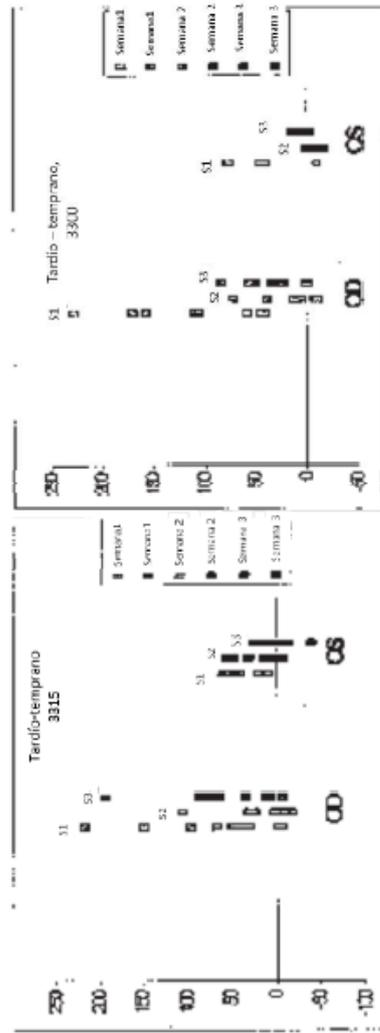


Figura 15

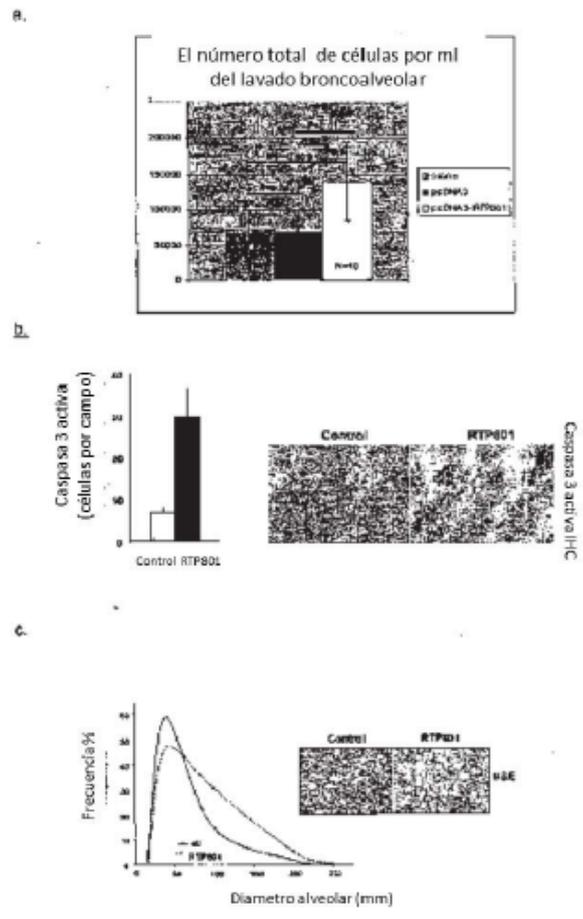


Figura 16

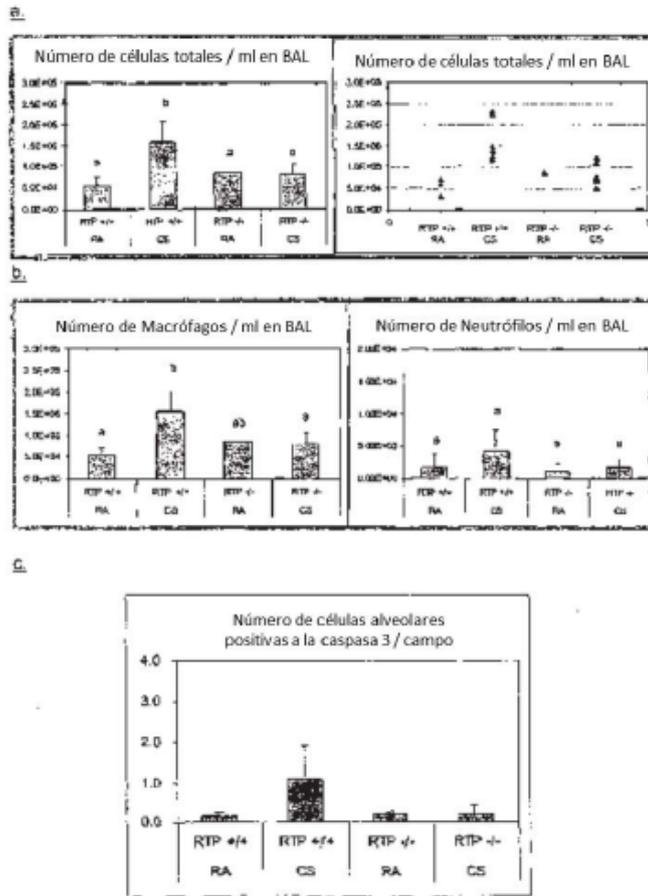
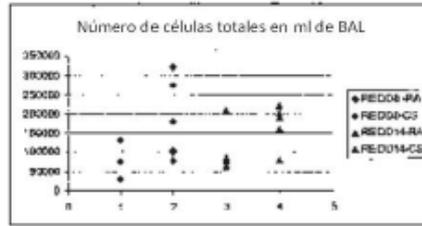
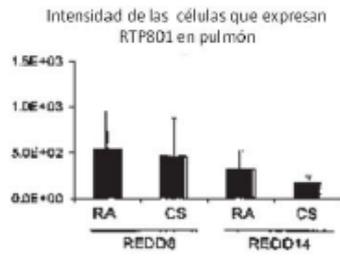


Figura 17

a.



d.



c.

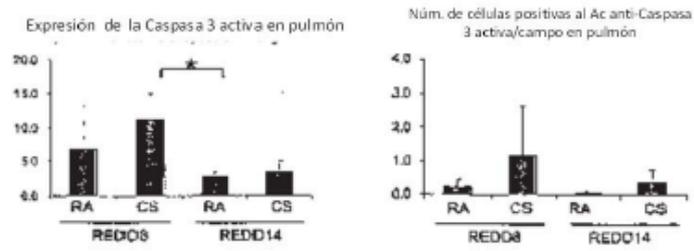


Figura 18

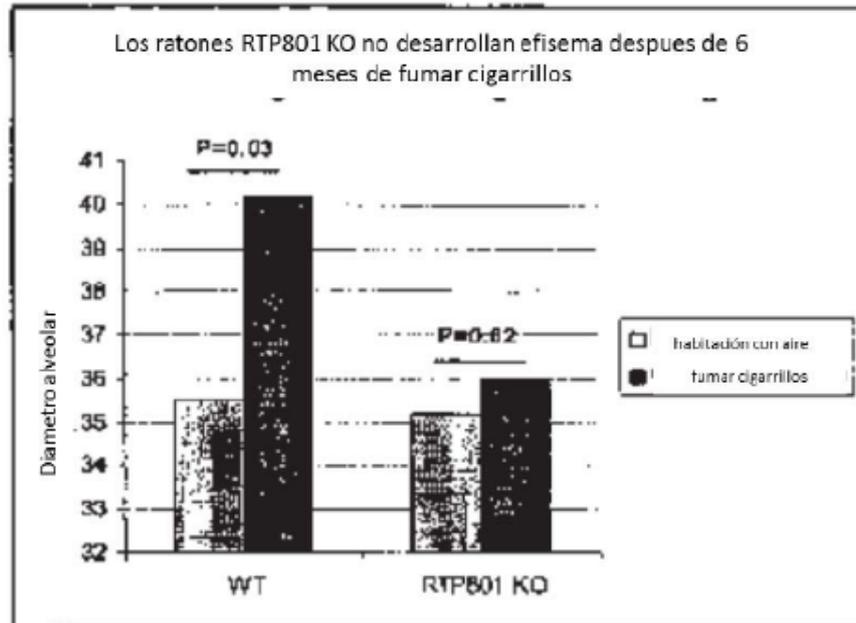


Figura 19

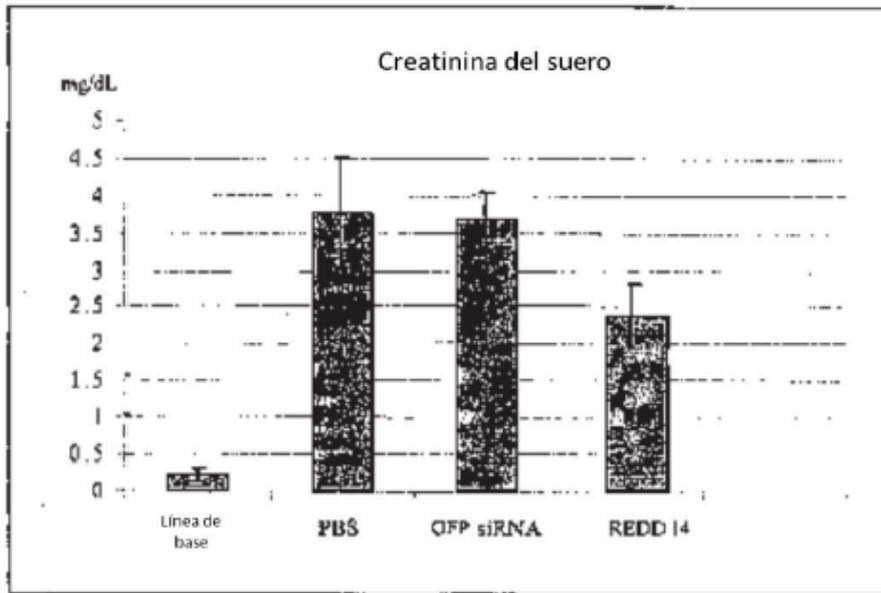


Figura 20

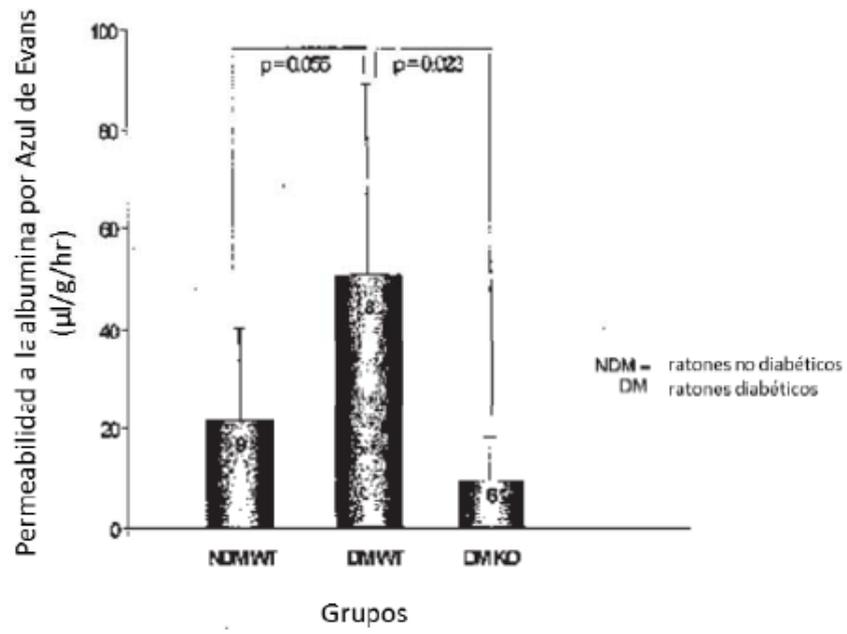


Figura 21

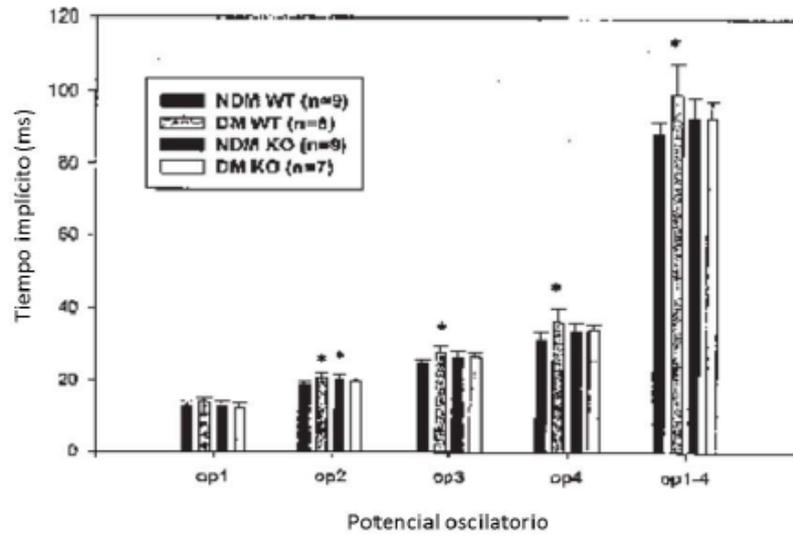


Figura 22

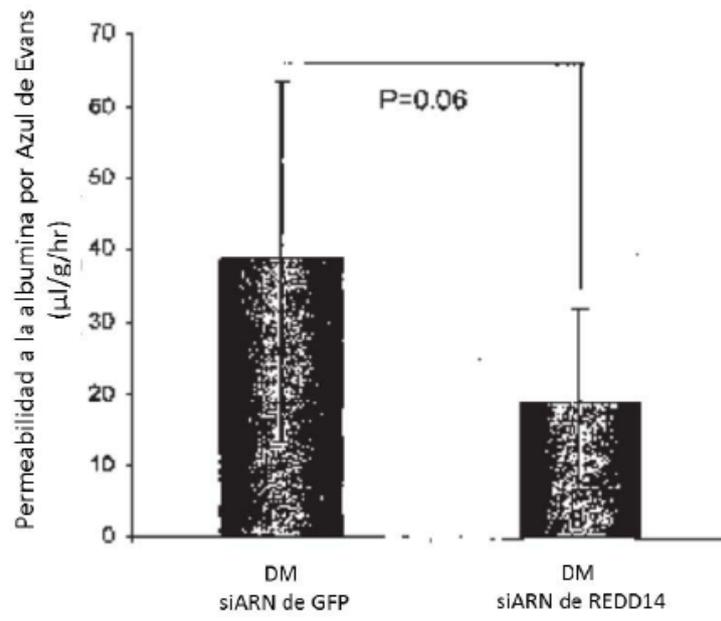


Figura 23

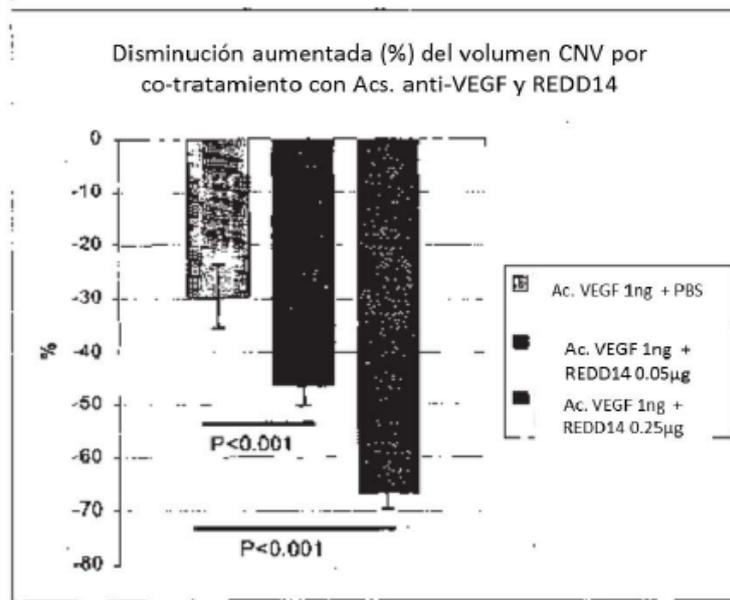


Figura 24

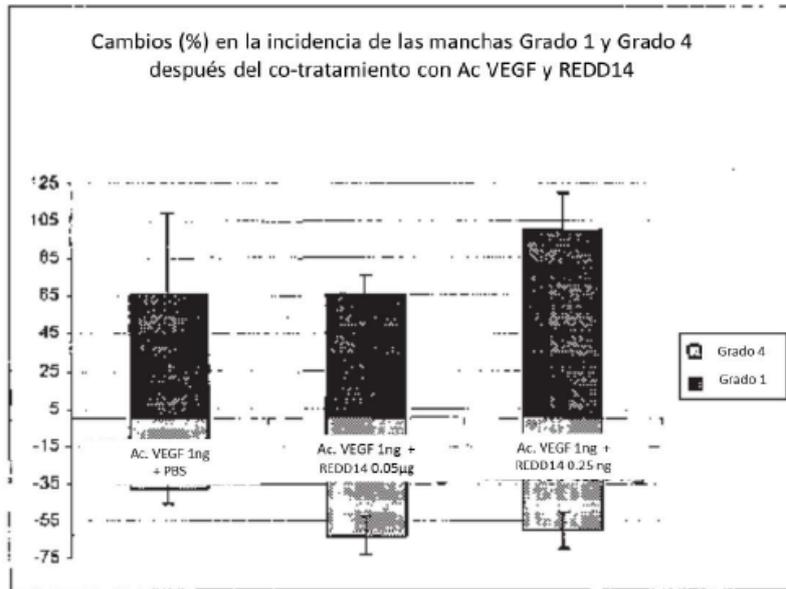


Figura 25

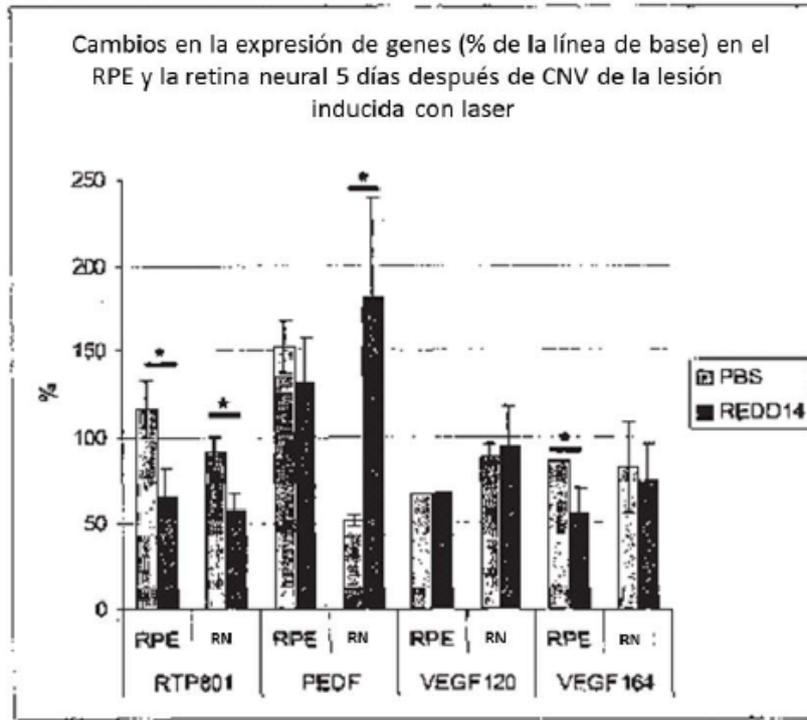
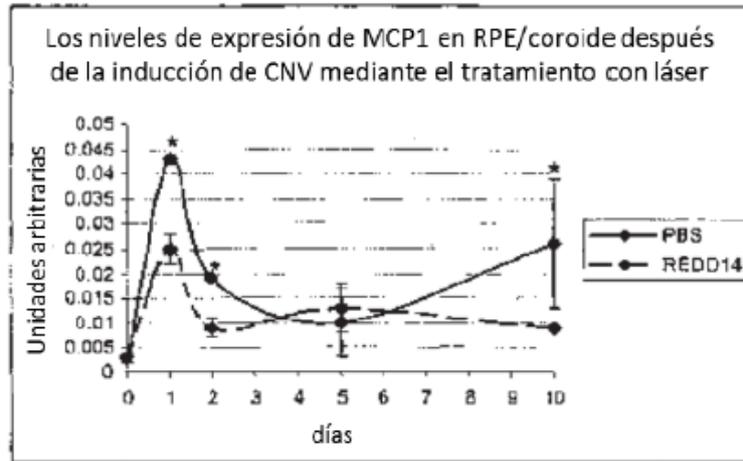


Figura 26

a)



b)

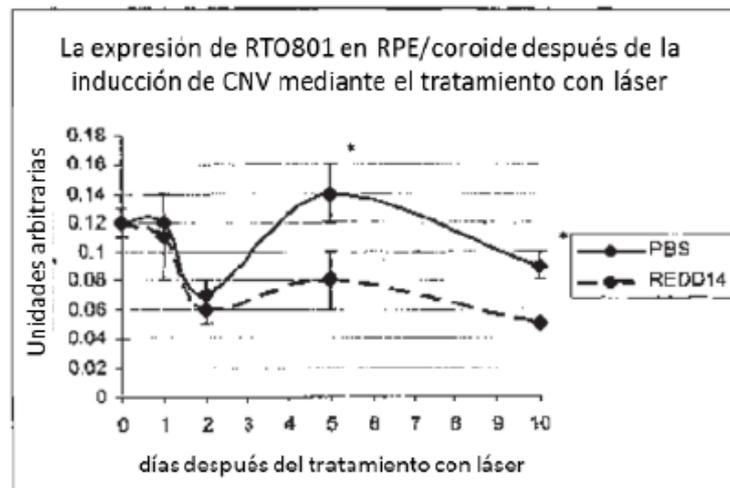


Figura 27

