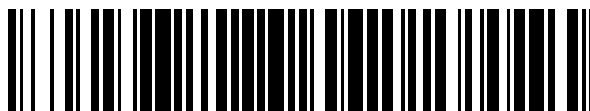


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 499**

51 Int. Cl.:
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07812121 .7**
96 Fecha de presentación: **12.06.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2029746**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2009**

54 Título: **Composiciones y métodos para la inhibición de la angiogénesis por siRNA**

30 Prioridad:
12.06.2006 US 804500 P
08.09.2006 US 824972 P
06.11.2006 US 864440 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.11.2012

73 Titular/es:
OPKO PHARMACEUTICALS, LLC (100.0%)
4400 Biscayne Boulevard
Miami, FL 33137, US

72 Inventor/es:
REICH, SAMUEL, JOTHAM

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 390 499 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

Composiciones y métodos para la inhibición de la angiogénesis por siRNA

FUNDAMENTO DE LA INVENCION.

5 El documento WO 2004/009769 discute el uso de un siRNA (small interference RNA: RNA pequeño de interferencia) contra el factor VEGF para inhibir la angiogénesis y para métodos de inhibir y tratar enfermedades tales como la neovascularización coroidea. La publicación de Adamis et al. (Ophthalmology, enero 2006; 113 (1): 23 - 8) discute cambios en la neovascularización retiniana después de la terapia con pegaptanib en personas diabéticas.

SUMARIO DE LA INVENCION.

10 Las realizaciones de la presente invención proporcionan un siRNA que comprende una cadena de RNA sentido de la SEC ID NO: 77 y una cadena de RNA antisentido de la SEC ID NO: 78 para su uso en el tratamiento del edema macular diabético (DME: diabetic macular edema) en un sujeto humano.

Realizaciones adicionales de la presente invención proporcionan el uso de siRNA que comprende una cadena sentido de RNA de SEC ID NO: 77 y una cadena antisentido de RNA de la SEC ID NO: 78 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del edema macular diabético en una persona.

15 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS.

Para obtener una idea más completa de la naturaleza y las ventajas de la presente invención, debe hacerse una referencia a la descripción detallada que sigue, tomada en relación con los dibujos anexos, en los que:

La **Fig. 1** es un gráfico de los niveles de proteína hVEGF en células 293 transfectadas con siRNAs de VEGF humano, siRNA no específico (siRNA EGFP) o transfecciones simuladas (transfecciones *mock*) sin siRNA.

20 La **Fig. 2** es un gráfico de los estudios de respuesta a la dosis con Cand5, hVEGF nº 1, hVEGF nº 2, hVEGF nº 3, hVEGF nº 4, hVEGF nº 6 y hVEGF nº 7.

25 La **Fig. 3** es un gráfico del cambio medio de la agudeza visual a distancia mejor corregida en sujetos humanos, medida mediante la metodología del estudio de la retinopatía diabética con tratamiento temprano (ETDRS: early treatment diabetic retinopathy study) en cada uno de los tres grupos de estudio que reciben dosis distintas de Cand5.

La **Fig. 4** es un par de histogramas que muestran el porcentaje de personas en cada uno de los grupos de estudio que mostraron estabilización de la agudeza visual a distancia, como se determina por la pérdida de menos de 15 letras en la prueba de ETDRS a las 12 semanas, en comparación con la línea de base, o a las 15 semanas en comparación con 3 semanas.

30 La **Fig. 5** es un gráfico del cambio medio en la agudeza visual próxima mejor corregida en sujetos humanos, medida mediante la metodología del ETDRS en cada uno de los tres grupos de estudio que reciben diferentes dosis de Cand5.

35 La **Fig. 6** es un par de histogramas que muestran el porcentaje de sujetos humanos en cada uno de los grupos de estudio que mostraron estabilización de la agudeza visual próxima determinada por la pérdida de menos de 15 letras en la prueba del ETDRS a las 12 semanas en comparación con la línea base, o a las 15 semanas en comparación con 3 semanas.

40 Las **Figs. 7A y 7B** son un par de gráficos del cambio medio de la agudeza visual a distancia mejor corregida en cada uno de los tres grupos de estudio Cand5 en comparación con el grupo testigo de placebo del estudio TAP relacionado. La Fig. 7B aplica el análisis de la última observación considerada (Last Observed Carried Forward: "LOCF") a los conjuntos de datos.

Las **Figs. 8A y 8B** son un par de gráficos del cambio a partir de la línea de base del tamaño medio de las lesiones de neovascularización coroidea (Choroidal NeoVascularization: CNV) en cada uno de los tres grupos de estudio de Cand5. La Fig. 8B aplica el análisis de LOCF a los juegos de datos.

45 La **Fig. 9** es un gráfico del cambio del espesor foveal, medido mediante tomografía de coherencia ocular (ocular coherence tomography: "OCT") en tres grupos de personas con DME tratadas con diferentes dosis de Cand5.

La **Fig. 10** es un gráfico del cambio en la agudeza visual medido mediante ETDRS en tres grupos de personas con DME tratadas con diferentes dosis de Cand5.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION.

- 5 Antes de describir las presentes composiciones y métodos, se ha de entender que esta invención no está limitada a los procedimientos, las composiciones o las metodologías particulares que se han descrito, ya que estas pueden variar. Se ha de entender también que la terminología usada en la descripción tiene el propósito de describir las versiones o realizaciones en particular solamente, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención, se verá limitado solamente por las reivindicaciones anexas. A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente texto tienen el mismo significado que se entiende de un modo general por un profesional experto en la técnica. Aun cuando puede usarse cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente texto en la práctica o la prueba de realizaciones de la presente invención, se describen ahora los métodos, dispositivos y materiales preferidos.
- 10 También debe observarse que, como se usa en el presente texto y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un" o "una" y "el" o "la" incluyen la referencia plural a menos que el contexto dictamine claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a una "molécula" es una referencia a una o más moléculas y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la técnica, y así siempre.
- 15 Como se usa en el presente texto, el término "aproximadamente" significa más o menos el 10% del valor numérico del número con el cual se está usando. Por consiguiente, aproximadamente el 50% significa que está en el intervalo de 45% a 55%.
- Como se usa en el presente texto, un "sujeto" incluye un ser humano o un animal no humano. Preferentemente el sujeto es un ser humano.
- 20 Como se usa en el presente texto, una "cantidad efectiva" del siRNA es una cantidad suficiente para causar una degradación mediada por RNAi del mRNA diana, o una cantidad suficiente para inhibir el progreso de la angiogénesis en un sujeto.
- 25 Como se usa en el presente texto, "aislado" significa alterado o retirado del estado natural por la intervención humana. Por ejemplo, un siRNA presente naturalmente en un animal vivo no está "aislado", pero un siRNA sintético, o un siRNA parcial o totalmente separado de los materiales coexistentes de su estado natural, está "aislado". Un siRNA aislado puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en un entorno no nativo o natural, tal como, por ejemplo, una célula a la cual ha sido suministrado el siRNA.
- Como se usa en el presente texto, "mRNA diana" significa mRNA de VEGF humano.
- 30 A menos que se indique otra cosa, todas las secuencias de ácido nucleico en el presente texto se dan en la dirección 5' a 3'. También, todos los desoxirribonucleótidos de una secuencia de ácido nucleico están representados por letras mayúsculas (p. ej. desoxitimidina es "T"), y los ribonucleótidos de una secuencia de ácido nucleico están representados por letras minúsculas (p. ej. uridina es "u").
- 35 La angiogénesis, definida como el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos capilares o "neovascularización", juega un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo. En los seres humanos maduros, la capacidad para iniciar la angiogénesis está presente en todos los tejidos, pero se mantiene bajo un riguroso control. Un regulador clave de la angiogénesis es el factor de crecimiento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor: "VEGF"), llamado también factor de permeabilidad vascular (vascular permeability faCTOR: "VPF"). El VEGF existe en al menos cuatro formas de ajuste alternativas diferentes en los seres humanos (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆), todas las cuales ejercen actividades biológicas similares.
- 40 La angiogénesis se inicia cuando el VEGF segregado se une a los receptores Flt-1 y Flk-1/KDR (llamados también receptor 1 de VEGF y receptor 2 de VEGF), que se expresan en la superficie de las células endoteliales. Flt-1 y Flk-1/KDR son proteína tirosina cinasas transmembrana, y la unión de VEGF inicia una cascada de señales celulares que tiene por resultado finalmente la neovascularización del tejido circundante.
- 45 La angiogénesis aberrante, o el crecimiento patológico de nuevos vasos sanguíneos, está implicada en varias condiciones. Entre estas condiciones están la retinopatía diabética, el edema macular diabético (diabetic macular edema: "DME"), la soriasis, la degeneración macular exudativa o "húmeda" relacionada con la edad (age related macular degeneration: "ARMD"), la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias, y la mayor parte de los cánceres. La enfermedades asociadas con estas condiciones manifiestan unos niveles anormalmente elevados de VEGF, y generalmente muestran un alto grado de vascularización o permeabilidad vascular.
- 50 La ARMD en particular es una enfermedad angiogénica clínicamente importante. Esta condición se caracteriza por la neovascularización coroidal en uno o en los dos ojos en individuos de edad, y es la principal causa de ceguera en los países industrializados.
- El edema macular diabético (diabetic macular edema: DME), llamado también retinopatía diabética, es una complication del elevado nivel de azúcar en sangre que afecta a los diabéticos. Está causado por la fuga de los

- vasos sanguíneos de la retina y el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en la retina, el nervio óptico y el iris. Los vasos sanguíneos con fugas tienen por resultado la hinchazón de la retina y la pérdida visual. Los nuevos vasos sanguíneos que crecen en el nervio óptico y en la retina pueden también sangrar, resultando una grave pérdida de visión. Además, los nuevos vasos sanguíneos en el iris obstruyen el drenaje del ojo y pueden producir una presión en el ojo extremadamente elevada acompañada de un intenso dolor y la potencial pérdida del ojo. El DME puede afectar a todo aquél que padezca diabetes. En general, cuanto más tiempo hace que un paciente tiene diabetes, tanto más alto es el riesgo de desarrollar DME. Eventualmente, casi todos aquellos que tienen diabetes de aparición en la edad juvenil desarrollarán algunos síntomas de DME. Los que adquieren la diabetes más tarde tienen también riesgo de DME, aunque es algo más probable que desarrollen DME avanzado.
- Existen varias estrategias terapéuticas para inhibir la angiogénesis aberrante, que tienden a reducir la producción o el efecto del VEGF, llamadas también en el presente texto "antagonistas de VEGF". Por ejemplo, se han desarrollado anticuerpos anti-VEGF o anti-receptor de VEGF, aptámeros anti-VEGF, y trampas de VEGF solubles, que compiten con los receptores de las células endoteliales por la unión de VEGF. También se han propuesto terapias clásicas "antisentido" de VEGF dirigidas contra la expresión del gen de VEGF. Sin embargo, los agentes anti-angiogénicos usados en estas terapias pueden producir solamente una reducción estequiométrica del VEGF o receptor de VEGF, y los agentes son típicamente reprimidos por la producción anormalmente elevada de VEGF por el tejido enfermo. Así pues, los resultados conseguidos con las terapias anti-angiogénicas disponibles han sido insatisfactorias.
- La interferencia del RNA (en adelante "RNAi": RNA interference) es un método de regulación génica post-transcripcional que es conservada por muchos organismos eucarióticos. El RNAi es inducido por moléculas de RNA corto (es decir, < 30 nucleótidos) de RNA de doble cadena (double stranded RNA: "dsRNA") que están presentes en la célula. Estas moléculas cortas de dsRNA, llamado "RNA corto de interferencia" ("short interfering RNA" o "siRNA", provocan la destrucción de los RNAs mensajeros ("mRNAs") que comparten homología de secuencias con el siRNA hasta una resolución de un nucleótido. Se cree que el siRNA y el mRNA dirigido se unen a un "complejo de silenciación inducido por RNA" ("RNA-induced silencing complex" o "RISC"), que segmenta el mRNA dirigido. El siRNA es aparentemente reciclado como una enzima de renovación múltiple, con una molécula de siRNA capaz de inducir la segmentación de aproximadamente 1000 moléculas de mRNA. La degradación de RNAi mediada por siRNA de un mRNA es por tanto más efectiva que las tecnologías actualmente disponibles para inhibir la expresión de un gen diana.
- Por tanto una realización de la presente invención proporciona siRNA aislado que comprende RNA bicatenario corto de la ID de secuencia nº 77 y nº 78, que están dirigidos al mRNA diana. El siRNA comprende una cadena de RNA sentido y una cadena complementaria de RNA antisentido apareadas juntas mediante interacciones de emparejamiento de bases de Watson-Crick estándar (en adelante "de bases emparejadas" o "*base-paired*"). Como se describe con más detalle más adelante, la cadena sentido comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a una secuencia diana contenida dentro del mRNA diana.
- Las cadenas sentido y antisentido del siRNA pueden comprender dos moléculas de RNA de cadena simple complementarias o pueden comprender una sola molécula de RNA en la que dos porciones complementarias son de bases emparejadas y están enlazadas covalentemente, por ejemplo, mediante un lazo en "horquilla" de cadena simple. Sin deseo de vincularse a ninguna teoría, se cree que el lazo en horquilla del último tipo de molécula de siRNA es segmentado intracelularmente por la proteína "Dicer" (o su equivalente) para formar un siRNA de dos moléculas de RNA de bases emparejadas individuales.
- Se conocen variantes alternativas de corte y empalme o ajuste del VEGF humano, entre las que se incluyen VEGF₁₂₁ (SEC ID NO: 2), VEGF₁₆₅ (SEC ID NO: 3), VEGF₁₈₉ (SEC ID NO: 4) y VEGF₂₀₆ (SEC ID NO: 5). El mRNA transcrito a partir de los genes de VEGF humano, Flt-1 (SEC ID NO: 6) o Flk-1/KDR (SEC ID NO: 7) puede ser analizado para otras formas alternativas de corte y empalme usando técnicas bien conocidas en este campo. Tales técnicas incluyen reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), transferencia northern e hibridación *in-situ*. Las técnicas para analizar secuencias de mRNA se describen, por ejemplo, en Busting SA (2000), *J. Mol. Endocrinol.* 25: 169 - 193. También se describen más adelante técnicas representativas para identificar mRNAs con corte y empalme alternativos.
- Por ejemplo, pueden usarse bases de datos que contienen secuencias de nucleótidos relacionadas con un gen de una enfermedad dada para identificar mRNA con corte y empalme alternativo. Tales bases de datos incluyen GenBank, Embase, y la base de datos del Cancer Genome Anatomy Project (CGAP). La base de datos del CGAP, por ejemplo, contiene etiquetas de secuencias expresadas (expressed sequence tags: ESTs) de varios tipos de cánceres humanos. Puede usarse un mRNA o secuencia génica del gen de VEGF para indagar en tal base de datos para determinar si se han encontrado para este gen ESTs que representan mRNAs de corte y empalme alternativo.
- También puede usarse una técnica llamada "protección de RNAsa" para identificar mRNA de VEGF de corte y empalme alternativo. La protección de RNAsa implica la transcripción de una secuencia génica en RNA sintético, que se hidrata con RNA derivado de otras células; por ejemplo, células del tejido que se encuentra en el sitio de la neovascularización o en sus proximidades. El RNA hibridado se incuba después con enzimas que reconocen

discrepancias del híbrido RNA:RNA. Fragmentos más pequeños que los esperados indican la presencia de mRNAs de corte y emplame alternativo. Los mRNAs putativos de corte y emplame alternativo pueden ser clonados y secuenciados por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

5 También puede usarse la RT-PCR para identificar mRNA de VEGF de corte y emplame alternativo. En la RT-PCR, el mRNA del tejido enfermo es convertido en cDNA por la enzima transcriptasa inversa, usando métodos bien conocidos por los profesionales con una experiencia normal en la técnica. La secuencia de codificación entera del cDNA es después amplificada (multiplicada) mediante PCR usando un cebador directo situado en la región no traducida 3', y un cebador inverso situado en la región no traducida 5'. Los productos amplificados pueden ser
10 analizados en relación con las formas alternativas de corte y emplame, por ejemplo comparando el tamaño de los productos amplificados con el tamaño del producto esperado a partir de mRNA de corte y emplame normal, p. ej. mediante electroforesis en gel de agarosa. Cualquier cambio en el tamaño del producto amplificado puede indicar corte y emplame alternativo.

15 El mRNA producido por genes mutantes de VEGF, Flt-1 o Flk-1/KDR puede ser también identificado fácilmente por medio de las técnicas descritas anteriormente para identificar formas alternativas de corte y emplame. Como se usa en el presente texto, gen o mRNA de VEGF "mutante" incluye gen o mRNA de VEGF humano que difiere en secuencia de las secuencias de VEGF expuestas en el presente texto. Así pues, las formas alélicas de estos genes, y el mRNA producido a partir de ellos, se consideran "mutantes" para los fines de la presente invención.

20 Se entiende que el mRNA de VEGF humano puede contener secuencias diana en común con sus correspondientes formas alternativas de corte y emplame, cognados o mutantes. Un siRNA simple que comprende tal secuencia de acceso común puede por consiguiente inducir la degradación mediada por RNAi de tipos diferentes de RNA que contienen la secuencia de acceso común (*targeting sequence*).

25 El siRNA puede comprender RNA parcialmente purificado, RNA sustancialmente puro, RNA sintético, o RNA producido por vía recombinante, así como RNA alterado que difiere del RNA de origen natural por la adición, delección (borrado), sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótido, tal como al extremo o los extremos de siRNA o a uno o más nucleótidos internos del siRNA, incluyendo modificaciones que hacen al siRNA resistente a la digestión con nucleasa.

Una o ambas cadenas del siRNA puede comprender también un saliente 3' (3' *overhang*). Como se usa en el presente texto, un "saliente 3'" se refiere a al menos un nucleótido no emparejado que se extiende desde el extremo 3' de una cadena de RNA en dúplex.

30 Así pues, en una realización, el siRNA comprende al menos un saliente 3' de entre 1 y aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxinucleótidos) de longitud, preferentemente de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, más preferentemente de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud, y de forma particularmente preferente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud.

35 En la realización en la que ambas cadenas de la molécula de siRNA comprenden un saliente 3', la longitud de los salientes pueden ser iguales o diferentes para cada cadena. En una realización que es la más preferida, el saliente 3' está presente en ambas cadenas del siRNA, y es de 2 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada cadena del siRNA puede comprender salientes 3' de ácido ditimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

40 Para mejorar la estabilidad del presente siRNA, los salientes 3' también se pueden estabilizar frente a la degradación. En una realización, los salientes se estabilizan incluyendo nucleótidos de purina, tales como los nucleótidos de adenosina o guanosina. Alternativamente, la sustitución de nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, por ejemplo, la sustitución de los nucleótidos uridina en los salientes 3' con 2'-desoxitimidina, es tolerada y no afecta a la eficacia de la degradación del iRNA. En particular, la ausencia de un 2' hidroxilo en la 2'-desoxitimidina mejora significativamente la resistencia a la nucleasa del saliente 3' en medio de cultivo de tejido.

45 El siRNA de la invención se puede dirigir a cualquier tramo de aproximadamente 19-25 nucleótidos contiguos en cualquiera de las secuencias de mRNA diana (la "secuencia diana"). Las técnicas para seleccionar secuencias diana para siRNA se dan, por ejemplo, en Tuschl T et al., "The siRNA User Guide". Así pues, la cadena sentido del presente siRNA comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a un tramo contiguo de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos en el mRNA diana.

50 Generalmente, una secuencia diana en el mRNA diana se puede elegir entre una secuencia de cDNA dada correspondiente al mRNA diana, preferentemente que comienza de 50 a 100 nt cadena abajo (es decir, en la dirección 3') del codón de inicio. Sin embargo, la secuencia diana se puede localizar en las regiones no traducidas 5' o 3' o en la región cercana al codón de inicio (véanse, por ejemplo, las secuencias diana de SEC ID N°: 73 y 74 en la Tabla 1 más adelante, que están dentro de 100 nt del extremo 5' del cDNA de VEGF₁₂₁).

55 Se describen secuencias de mRNA diana que comprenden no más de cinco (5) purinas o pirimidinas consecutivas. Por ejemplo, una secuencia diana adecuada en la secuencia de cDNA de VEGF₁₂₁ es:

TCATCACGAAGTGGTGAAG (SEC ID N°: 8)

Por tanto, un siRNA de la invención que se dirige a esta secuencia y que tiene salientes de uu 3' en cada cadena (salientes mostrados en negrita) es:

5'-ucaucacgaaguggugaaguu-3' (SEC ID N°: 9)

5 3'-**uu**aguagugcuucaccacuuc-5' (SEC ID N°: 10)

Un siRNA de la invención que se dirige a esta misma secuencia, pero que tiene salientes TT 3' en cada cadena (salientes mostrados en negrita) es:

5'-ucaucacgaaguggugaag**TT**-3' (SEC ID N°: 11)

3'-**TT**aguagugcuucaccacuuc-5' (SEC ID N°: 12)

10 Otras secuencias diana de VEGF₁₂₁ a partir de las cuales se puede derivar el siRNA se dan en la Tabla 1. Se entiende que todas las secuencias diana de VEGF₁₂₁ enumeradas en la Tabla 1 están dentro de esa porción de la forma de empalme alternativa de VEGF₁₂₁ que es común a todas las formas de empalme alternativas del VEGF humano. Así pues, las secuencias diana de VEGF₁₂₁ en la Tabla 1 también se pueden dirigir al mRNA de VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆. Las secuencias diana que se dirigen a una isoforma de VEGF específica también se pueden
15 identificar fácilmente. Por ejemplo, una secuencia diana que se dirige a mRNA de VEGF₁₆₅ pero no a mRNA de VEGF₁₂₁ es AACGTACTTGCAGATGTGACA (SEC ID N°: 13).

TABLA 1 - Secuencias diana de VEGF

Secuencia diana	SEC ID NO:	Secuencia diana	SEC ID NO:
secuencia de mRNA de VEGF cognada	1	GATAGAGCAAGACAAGAAA	26
Secuencia de VEGF ₁₂₁ variante de empalme	2	GACAAGAAAATCCCTGTGG	27
Secuencia de VEGF ₁₆₅ variante de empalme	3	GAAAATCCCTGTGGGCCTT	28
Secuencia de VEGF ₁₈₉ variante de empalme	4	AATCCCTGTGGGCCTTGCT	29
Secuencia de VEGF ₂₀₆ variante de empalme	5	TCCCTGTGGGCCTTGCTCA	30
TCATCACGAAGTGGTGAAG	8	GCATTTGTTTGTACAAGAT	31
ucaucacgaaguggugaaguu	9	GATCCGCAGACGTGTAAT	32
uuaguagugcuucaccacuuc	10	ATGTTCCCTGCAAAAACACA	33
ucaucacgaaguggugaagTT	11	TGTTCCCTGCAAAAACACAG	34
TTaguagugcuucaccacuuc	12	AAACACAGACTCGCGTTGC	35
AACGTACTTGCAGATGTGACA	13	AACACAGACTCGCGTTGCA	36
GTTTCATGGATGICTATCAG	14	ACACAGACTCGCGTTGCAA	37
TCGAGACCCTGGTGGACAT	15	CACAGACTCGCGTTGCAAG	38
TGACGAGGGCCTGGAGTGT	16	GGCGAGGCAGCTTGAGTTA	39
TGACGAGGGCCTGGAGTGT	17	ACGAACGTACTTGCAGATG	40
CATCACCATGCAGATTATG	18	CGAACGTACTTGCAGATGT	41
ACCTCACCAAGGCCAGCAC	19	CGTACTTGCAGATGTGACA	42
GGCCAGCACATAGGAGAGA	20	GTGGTCCCAGGCTGCACCC	43
CAAATGTGAATGCAGACCA	21	GGAGGAGGGCAGAATCATC	44
ATGTGAATGCAGACCAAAG	22	GTGGTGAAGTTTCATGGATG	45
TGCAGACCAAAGAAAGATA	23	AATCATCACGAAGTGGTGAAG	46
AGAAAGATAGAGCAAGACA	24	AAGTTCATGGATGTCTATCAG	47
GAAAGATAGAGCAAGACAA	25	AATCGAGACCCTGGTGGACAT	48
AATGACGAGGGCCTGGAGTGT	49	AATGTTCCCTGCAAAAACACAGAC	65

AACATCACCATGCAGATTATG	50	AAAAACACAGACTCGCGTTGCAA	66
AAACCTCACCAAGGCCAGCAC	51	AAAACACAGACTCGCGTTGCAAG	67
AAGGCCAGCACATAGGAGAGA	52	AAACACAGACTCGCGTTGCAAGG	68
AACAAATGTGAATGCAGACCA	53	AACACAGACTCGCGTTGCAAGGC	69
AAATGTGAATGCAGACCAAAG	54	AAGGCGAGGCAGCTTGAGITAA	70
		A	
AATGCAGACCAAAGAAAGATA	55	AAACGAACGTACTTGCAGATGTG	71
AAAGAAAGATAGAGCAAGACA	56	AACGAACGTACTTGCAGATGTGA	72
AAGAAAGATAGAGCAAGACAA	57	AAGTGGTCCCAGGCTGCACCCAT	73
AAGATAGAGCAAGACAAGAAAA	58	AAGGAGGAGGGCAGAATCATCA	74
T		C	
AAGACAAGAAAATCCCTGTGGGC	59	AAGTGGTGAAGTTCATGGATGTC	75
AAGAAAATCCCTGTGGGCCTTGC	60	AAAATCCCTGTGGGCCTTGCTCA	76
AATCCCTGTGGGCCTTGCTCAGA	61	accucaccaaggccagcacTT	77
AAGCATTGTTTGTACAAGATCC	62	gugcuggccuuggugagguTT	78
AAGATCCGCAGACGTGTAATGT	63	GGCTACGTCCAGCGCACC	79
AAATGTTCTGCAAAAACACAGA	64	AAACCUCACCAAAGCCAGCAC	80

5 La presente invención proporciona un siRNA para el tratamiento del edema macular diabético. En una realización preferida, se proporciona siRNA que comprende una cadena de RNA sentido de la SEC ID NO: 77 y una cadena de RNA antisentido de la SEC ID NO: 78 para la administración a un sujeto en una cantidad efectiva para tratar el edema macular diabético de dicho sujeto.

10 En otra realización de la presente invención, se proporciona un siRNA para tratar el edema macular diabético para la administración al sujeto junto con un agente farmacéutico que es diferente del siRNA, preferentemente un antagonista de VEGF. Se ha desarrollado antagonistas de VEGF que comprenden varias clases farmacéuticas distintas. En una realización, el antagonista de VEGF comprende un anticuerpo monoclonal ue dirige la proteína VEGF, tal como bevacizumab o ranibizumab. En otra realización, el antagonista de VEGF es una trampa de VEGF, tal como aflibercept. En otra realización más, el antagonista de VEGF es un aptámero, tal como pegaptanib. El siRNA administrado con el antagonista de VEGF comprende una cadena de RNA sentido de la SEC ID NO: 77 y una cadena de RNA antisentido de la SEC ID NO: 78.

15 En una realización de la presente invención, la cantidad efectiva del siRNA que dirige VEGF para tratar el edema macular diabético es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg de siRNA. En otra realización, la cantidad efectiva es de aproximadamente 0,2 mg a aproximadamente 10 mg de siRNA que dirige VEGF. En una realización adicional, preferentemente la cantidad efectiva del siRNA es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mg de siRNA que dirige VEGF. Otras realizaciones preferidas proporcionan cantidades efectivas de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 3 mg, incluyendo aproximadamente 1,5 mg, 2,5 mg o aproximadamente 3 mg de siRNA que dirige VEGF. El siRNA que dirige VEGF para administración a un sujeto comprende una cadena de RNA sentido de SEC ID NO: 77 y una cadena de RNA antisentido de SEC ID NO: 78.

25 Una realización de la invención comprende un siRNA para el tratamiento del edema macular diabético en un sujeto, en el que la cantidad efectiva de siRNA es administrada semanalmente. Otra realización de la invención comprende un siRNA para tratar el edema macular diabético en un sujeto, en el que la cantidad efectiva de siRNA es administrada cada dos semanas. Preferentemente, otra realización de la invención comprende un siRNA para el tratamiento del edema macular diabético de un sujeto, en el que la cantidad efectiva de siRNA es administrada cada cuatro semanas. Otras realizaciones preferidas de la presente invención comprenden un tratamiento con siRNA del edema macular diabético de un sujeto, en el que la cantidad efectiva de siRNA es administrada cada ocho semanas, doce semanas, diez y seis semanas o veinte semanas.

30 Otras realizaciones de la presente invención proporcionan una combinación de una cantidad efectiva de un antagonista de VEGF y una cantidad efectiva de un siRNA que comprende una cadena de RNA sentido y una

cadena de RNA antisentido, en donde las cadenas de RNA sentido y antisentido forman un RNA dúplex, y en donde la cadena de RNA sentido comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a una secuencia sentido de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos contiguos en mRNA de VEGF humano para su uso en el tratamiento del edema macular diabético en un sujeto humano. El antagonista de VEGF puede ser administrado antes, después o simultáneamente con el siRNA. La cadena de RNA sentido comprende la SEC ID NO: 77 y la cadena antisentido comprende la SEC ID NO: 78. El siRNA puede ser administrado mediante administración intraocular, tal como administración intravítrea, intrarretinal, subretinal, subtenon, peri- y retro-orbital, trans-corneal y trans-escleral. En tales combinaciones, la cantidad efectiva de dicho siRNA puede ser de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg de siRNA. En otra realización más, la cantidad efectiva es de aproximadamente 0,2 mg a aproximadamente 10 mg de siRNA que dirige VEGF. En una realización adicional, preferentemente cantidad efectiva del siRNA es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mg de siRNA que dirige VEGF. Otras realizaciones preferidas proporcionan cantidades efectivas de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 3 mg, incluyendo aproximadamente 1,5 mg, 2,5 mg o aproximadamente 3 mg de siRNA que dirige VEGF. La cantidad efectiva de dicho siRNA de VEGF es para administración semanal, cada dos semanas, cada cuatro semanas, cada ocho semanas, cada doce semanas, cada diez y seis semanas, o cada veinte semanas. Preferentemente, el siRNA de VEGF se administra cada cuatro semanas.

En ciertas realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo monoclonal que dirige a VEGF humano, tal como, por ejemplo, bevacizumab o ranibizumab. En otras realizaciones, el antagonista de VEGF es una trampa de VEGF, tal como aflibercept. En otras realizaciones, el antagonista de VEGF es un aptámero de VEGF, tal como pegaptanib.

En una realización, tal combinación comprende un siRNA de VEGF, en el que la cadena de RNA sentido comprende la SEC ID NO: 77 y la cadena antisentido comprende la SEC ID NO: 78, y ranibizumab. El siRNA puede ser administrado cada cuatro semanas (es decir, mensualmente) y dicho ranibizumab puede ser administrado cada cuatro semanas (mensualmente). En otra realización más, el ranibizumab puede ser administrado dos semanas antes de la administración de dicho siRNA o sobre una base alternante. Por ejemplo, una realización puede comprender administrar una cantidad efectiva de ranibizumab el día 0, después administrar una cantidad efectiva de siRNA de VEGF la semana 2, después administrar una cantidad efectiva de ranibizumab la semana cuatro, después administrar una cantidad efectiva de siRNA de VEGF la semana seis, después administrar una cantidad efectiva de ranibizumab la semana ocho. Tal administración puede comprender una terapia de iniciación para tratar la degeneración macular relacionada con la edad. En otra realización, la terapia de iniciación puede ir seguida por una terapia de mantenimiento en la que a partir de la semana 12 el siRNA es administrado, por ejemplo, cada ocho semanas o cada doce semanas.

En una realización, tal combinación comprende un siRNA de VEGF para administración, en el que la cadena de RNA sentido comprende la SEC ID NO: 77 y la cadena antisentido comprende la SEC ID NO: 78, and bevacizumab. El siRNA puede ser administrado cada cuatro semanas (es decir mensualmente) y dicho bevacizumab puede ser administrado cada cuatro semanas (mensualmente). En otra realización, el bevacizumab puede ser administrado dos semanas antes de la administración de dicho siRNA sobre una base alternante. Por ejemplo, una realización puede comprender administrar una cantidad efectiva bevacizumab el día 0, después administrar una cantidad efectiva de siRNA de VEGF la semana 2, después administrar una cantidad efectiva de bevacizumab la semana cuatro, después administrar una cantidad efectiva de siRNA de VEGF la semana seis, después administrar una cantidad efectiva de bevacizumab la semana ocho. Tal administración puede comprender una terapia de iniciación para tratar la degeneración macular relacionada con la edad. En otra realización más, la terapia de iniciación puede verse seguida por una terapia de mantenimiento, en la que a partir de la semana 12 se administra el siRNA, por ejemplo cada ocho semanas o cada doce semanas.

En otra realización, tal combinación comprende un siRNA de VEGF, en el que la cadena de RNA sentido comprende la SEC ID NO: 77 y la cadena antisentido comprende la SEC ID NO: 78, y un antagonista de VEGF tal como, por ejemplo, ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib. El siRNA puede ser administrado cada cuatro semanas (es decir mensualmente) y dicho antagonista de VEGF puede ser administrado cada cuatro semanas (mensualmente). En otra realización, el antagonista de VEGF puede ser administrado dos semanas antes de la administración de dicho siRNA sobre una base alternante. Por ejemplo, una realización puede comprender administrar una cantidad efectiva de antagonista de VEGF el día 0, después administrar una cantidad efectiva de siRNA de VEGF la semana 2, después administrar una cantidad efectiva de antagonista de VEGF la semana cuatro, después administrar una cantidad efectiva de VEGF siRNA la semana seis, después administrar una cantidad efectiva de antagonista de VEGF la semana ocho. Tal administración puede comprender una terapia de iniciación to treat the degeneración macular relacionada con la edad. En otra realización más, la terapia de iniciación puede ir seguida por una terapia de mantenimiento, en la que a partir de la semana 12 el siRNA es administrado, por ejemplo, cada ocho semanas o cada doce semanas.

Las realizaciones de la presente invención incluyen también composiciones farmacéuticas que comprenden un siRNA que comprende una cadena de RNA sentido de SEC ID NO: 77 and una cadena de RNA antisentido de SEC ID NO: 78, en las que el siRNA está en una solución de sal equilibrada. En una realización la composición farmacéutica comprende el siRNA que comprende una cadena de RNA sentido SEC ID NO: 77 y una cadena de

RNA antisentido de SEC ID NO: 78 y una solución de sal equilibrada de forma que la composición farmacéutica es adecuada para la administración ocular. Una realización adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un siRNA que comprende una cadena de RNA sentido de SEC ID NO: 77 y una cadena de RNA antisentido de SEC ID NO: 78, y una solución de sal equilibrada, en donde la composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 6,08 a aproximadamente 8,0. Otras realizaciones incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden un siRNA que comprende una cadena de RNA sentido de SEC ID NO: 77 y una cadena de RNA antisentido de SEC ID NO: 78, en donde el siRNA está en una concentración de 0,2 mg/100 mL a aproximadamente 3,0 mg/100 mL. Otras realizaciones de la presente invención son composiciones farmacéuticas que comprenden un siRNA que comprende una cadena de RNA sentido de SEC ID NO: 77 y una cadena de RNA antisentido de SEC ID NO: 78 en donde el siRNA está en una concentración de 1,5 mg/100 mL, 2,5 mg/100 mL o 3,0 mg/100 mL. Otras realizaciones incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden un siRNA que comprende una cadena de RNA sentido of SEC ID NO: 77 y una cadena de RNA antisentido de SEC ID NO: 78 en donde el siRNA está en una concentración de 0,2 mg/50 mL a aproximadamente 3,0 mg/50 mL. Realizaciones adicionales de la presente invención son composiciones farmacéuticas que comprenden un siRNA que comprende una cadena de RNA sentido de SEC ID NO: 77 y una cadena de RNA antisentido de SEC ID NO: 78 en donde el siRNA está en una concentración de 1,5 mg/50 mL, 2,5 mg/50 mL o 3,0 mg/50 mL.

Otra realización es una composición farmacéutica adecuada para administración ocular que comprende un siRNA que comprende una cadena de RNA sentido de SEC ID NO: 77 y una cadena de RNA antisentido de SEC ID NO: 78, acetato sódico (trihidrato), cloruro sódico, citrato sódico (dehidrato tribásico), cloruro potásico, cloruro cálcico (dehidrato), cloruro de magnesio (hexahidrato), ácido clorhídrico, hidróxido sódico y agua.

El siRNA se puede obtener usando varias técnicas conocidas por los expertos en este campo. Por ejemplo, el siRNA se puede sintetizar químicamente o se puede preparar de forma recombinante usando métodos conocidos en la técnica, tales como el sistema *in vitro* de *Drosophila* descrito en la solicitud publicada de los EE.UU. 2002/0086356 de Tuschl et al.

Preferentemente, el siRNA de la invención se sintetiza químicamente usando fosforamiditas de ribonucleósido protegidas apropiadamente y un sintetizador de ADN/ARN convencional. El siRNA se puede sintetizar como dos moléculas de ARN complementarias distintas o como una molécula de ARN única con dos regiones complementarias. Los distribuidores comerciales de moléculas de ARN sintéticas o reactivos de síntesis incluyen Proligo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE.UU.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, EE.UU.), Glen Research (Sterling, VA, EE.UU.), ChemGenes (Ashland, MA, EE.UU.) y Cruachem (Glasgow, RU). El siRNA puede también sintetizarse como moléculas de RNA complementario múltiples, como se describe con más detalle en la solicitud provisional de EE.UU. pendiente en común con la presente N° 60/824.953, que lleva el título "siRNA and Methods of Manufacture" ("siRNA y métodos de preparación") presentada el 8 de septiembre de 2.006.

Alternativamente, el siRNA se puede expresar también a partir de plásmidos de ADN circular o lineal recombinantes, usando cualquier promotor adecuado. Los promotores adecuados para expresar siRNA de la invención a partir de un plásmido incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras pol III de ARN U6 o H1 y el promotor de citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados entra dentro de la experiencia en la técnica. Los plásmidos recombinantes de la invención también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión del siRNA en un tejido en particular o en un entorno intracelular en particular.

El siRNA expresado a partir de plásmidos recombinantes se puede aislar a partir de sistemas de expresión en células cultivadas, mediante técnicas convencionales, o se puede expresar intracelularmente en el área de neovascularización o en sus proximidades *in vivo*. El uso de plásmidos recombinantes para suministrar siRNA a células *in vivo* se analiza con más detalle más adelante.

El siRNA se puede expresar a partir de un plásmido recombinante bien sea como dos moléculas de ARN distintas complementarias o como una única molécula de ARN con dos regiones complementarias.

La selección de plásmidos adecuados para expresar siRNA, los métodos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar el siRNA en el plásmido y los métodos para suministrar el plásmido recombinante a las células de interés, caen dentro de la experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo Tuschl, T. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 446 - 448; Brummelkamp TR et al. (2002), *Science* 296: 550 - 553; Miyagishi M et al. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 497 - 500; Paddison PJ et al. (2002), *Genes Dev.* 16: 948 - 958; Lee NS et al. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 500 - 505; y Paul CP et al. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20: 505 - 508.

Se describe un plásmido que comprende secuencias de ácido nucleico para expresar un siRNA. El plásmido, denominado pAAVsiRNA, comprende una secuencia codificante de cadena de ARN sentido en conexión operativa con una secuencia de terminación poliT bajo el control de un promotor de ARN U6 humano y una secuencia de codificación de cadena de ARN anti-sentido en conexión operativa con una secuencia de terminación poliT bajo el control de un promotor de ARN U6 humano. El plásmido pAAVsiRNA tiene finalmente por objeto su uso en la

producción de un vector viral adeno-asociado recombinante, que comprende las mismas secuencias de ácido nucleico para expresar un siRNA.

5 Como se usa en el presente texto, "en conexión operativa con una secuencia de terminación poliT" significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas sentido o anti-sentido están inmediatamente adyacentes a la señal de terminación poliT en la dirección 5'. Durante la transcripción de las secuencias sentido o anti-sentido a partir del plásmido, las señales de terminación poliT actúan para terminar la transcripción.

Como se usa en el presente texto, "bajo el control" de un promotor significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas sentido o anti-sentido se localizan 3' del promotor, de forma que el promotor puede iniciar la transcripción de las secuencias de codificación sentido o anti-sentido.

10 El siRNA se puede también expresar a partir de vectores virales recombinantes intracelularmente en el área de neovascularización o en sus proximidades *in vivo*. Los vectores virales recombinantes de la invención comprenden secuencias que codifican el siRNA y cualquier promotor adecuado para expresar las secuencias de siRNA. Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras pol III de ARN U6 o H1 y el promotor de citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados cae dentro de la experiencia en la técnica. Los
15 vectores virales recombinantes de la invención también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión de los siRNA en un tejido en particular o en un entorno intracelular en particular. El uso de vectores virales recombinantes para suministrar siRNA a células *in vivo* se analiza con más detalle más adelante.

El siRNA se puede expresar a partir de un vector viral recombinante como dos moléculas de ARN complementarias distintas o como una molécula única de ARN con dos regiones complementarias.

20 Se puede usar cualquier vector viral capaz de aceptar las secuencias de codificación para la molécula o las moléculas de siRNA que se han de expresar, por ejemplo, vectores obtenidos de adenovirus (AV); de virus adeno-asociado (AAV), de retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), Rhabdovirus, virus de leucemia murina), virus del herpes y similares. El tropismo de los vectores virales también se puede modificar mediante pseudotipificación de los
25 vectores con proteínas de la envoltura u otros antígenos de superficie de otros virus. Por ejemplo, un vector AAV de la invención se puede pseudotipificar con proteínas de superficie de virus de estomatitis vesicular (VSV), rabia, Ébola, Mokola y similares.

La selección de vectores virales recombinantes adecuados para uso en la invención, los métodos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar el siRNA en el vector y los métodos para suministrar el vector viral a las
30 células de interés entran dentro de la experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Domburg R (1995), *Gene Therap.* 2: 301 - 310; Eglitis MA (1988), *Bio-techniques* 6: 608 - 614; Miller AD (1990), *Hum Gene Therap.* 1: 5 - 14; y Anderson WF (1998), *Nature* 392: 25 - 30.

Los vectores virales preferidos son aquellos que se derivan de AV y AAV. En una realización particularmente preferida, el siRNA se expresa como dos moléculas de ARN monocatenarias complementarias distintas a partir de
35 un vector AAV recombinante que comprende, por ejemplo, bien sea los promotores de ARN U6 o H1 o el promotor de citomegalovirus (CMV).

Se han descrito un vector AV adecuado para expresar el siRNA, un método para construir el vector AV recombinante y un método para suministrar el vector a células diana.

Los vectores AAV adecuados para expresar el siRNA, los métodos para construir el vector AAV recombinante y los métodos para suministrar los vectores en células diana se describen en Samulski R et al. (1987), *J. Virol.* 61: 3096 -
40 3101; Fisher KJ et al. (1996), *J. Virol.*, 70: 520 - 532; Samulski R et al. (1989), *J. Virol.* 63: 3822 - 3826; patente de EE.UU. n° 5.252.479; patente de EE. UU. n° 5.139.941; solicitud de patente internacional N° WO 94/13788; y solicitud de patente internacional n° WO 93/24641.

45 Como se discutió anteriormente, el siRNA es capaz de dirigir y causar la degradación mediada por RNAi de VEGF, más preferentemente VEGF humano. La degradación del mRNA diana por el presente siRNA reduce la producción de producto génico funcional a partir del VEGF.

La degradación mediada por iRNA del mRNA diana se puede detectar midiendo los niveles del mRNA diana o proteína en las células de un sujeto, usando técnicas estándar para aislar y cuantificar mRNA o proteína como se ha descrito anteriormente.

50 La inhibición de la angiogénesis se puede evaluar midiendo directamente el progreso de la angiogénesis patógena o no patógena en un sujeto; por ejemplo, observando el tamaño de un área neovascularizada antes y después del tratamiento con el siRNA. Se indica una inhibición de la angiogénesis si el tamaño del área neovascularizada se mantiene igual o se reduce. Las técnicas para observar y medir el tamaño de las áreas neovascularizadas en un sujeto entran dentro de la experiencia en la técnica; por ejemplo, las áreas de neovascularización de coroides se pueden observar mediante oftalmoscopia.

La inhibición de la angiogénesis también se puede inferir a través de la observación de un cambio o inversión en una condición patogénica asociada con la angiogénesis. Por ejemplo, en ARMD, una ralentización, parada o inversión de la pérdida de visión indica una inhibición de la angiogénesis en la coroides.

5 Se entiende que el siRNA puede degradar el mRNA diana (y por consiguiente inhibir la angiogénesis) en cantidades sub-estequiométricas. Sin deseo de vincularse a ninguna teoría, se cree que el siRNA causa la degradación del mRNA diana de una manera catalítica. Así pues, en comparación con terapias anti-angiogénicas estándar, se necesita suministrar una cantidad de siRNA significativamente menor en o en las proximidades del sitio de neovascularización para tener un efecto terapéutico.

10 En ciertas realizaciones, una cantidad efectiva de siRNA es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg. En otras realizaciones, una cantidad efectiva de siRNA es de aproximadamente 0,2 mg a aproximadamente 20 mg. En realizaciones preferidas, una cantidad efectiva de siRNA es de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 5 mg, más preferentemente de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 3 mg, incluyendo de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 mg y aproximadamente 3,0 mg.

15 Otras enfermedades angiogénicas incluyen retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad (ARMD), soriasis, artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias. Estas enfermedades están caracterizadas por la destrucción de tejido normal por vasos sanguíneos recién formados en el área de la neovascularización. Por ejemplo, en ARMD, la coroides es invadida y destruida por los capilares. La destrucción impulsada por la angiogénesis de la coroides en ARMD conduce eventualmente a la ceguera parcial o completa.

20 Mas preferentemente, se usa un siRNA de la invención para inhibir la neovascularización coroidal en la degeneración macular relacionada con la edad.

25 Para tratar enfermedades angiogénicas, se puede administrar el siRNA a un sujeto en combinación con un agente farmacéutico que es diferente del siRNA presente. Alternativamente, el siRNA se puede administrar a un sujeto en combinación con otro método terapéutico diseñado para tratar la enfermedad angiogénica. Por ejemplo, el siRNA se puede administrar en combinación con métodos terapéuticos empleados en la actualidad para tratar la degeneración macular relacionada con la edad.

El presente siRNA puede ser administrado a un sujeto bien sea como siRNA desnudo, junto con un reactivo de suministro o bien como un plásmido recombinante o vector viral que expresa el siRNA.

30 Los reactivos de suministro adecuados para la administración junto con el presente siRNA incluyen el reactivo lipofílico Transit TKO de Mirus; lipofectina; lipofectamina; celfectina; o policationes (por ejemplo, polilisina) o liposomas. Un reactivo de suministro preferido es un liposoma.

35 Los liposomas pueden ayudar en el suministro del siRNA a un tejido particular, tal como tejido retiniano o tumoral, y también pueden aumentar la vida mitad en sangre del siRNA. Los liposomas adecuados para uso en la invención se forman a partir de lípidos formadores de vesícula estándar, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros o cargados negativamente, y un esteroles tal como colesterol. La selección de lípidos generalmente está regida por la consideración de factores tales como el tamaño del liposoma deseado y la vida mitad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Se conocen diversos métodos para preparar liposomas, por ejemplo como se describe en Szoka et al. (1980), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467; y patentes de los EE. UU. n° 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

40 Preferentemente, los liposomas que encapsulan el presente siRNA comprenden una molécula de ligando que puede dirigir al liposoma a una célula o tejido particular en o las proximidades del sitio de la angiogénesis. Son preferidos los ligandos que se unen a receptores prevalentes en células tumorales o endoteliales vasculares, tales como anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos tumorales o antígenos de superficie de células endoteliales.

45 De forma particularmente preferible, los liposomas que encapsulan los presentes siRNA se modifican de forma que eviten la eliminación por los sistemas de macrófago mononuclear y retículo endotelial, por ejemplo, teniendo restos de inhibición de la opsonización unidos a la superficie de la estructura. En una realización, un liposoma de la invención puede comprender tanto restos de inhibición de la opsonización como un ligando.

50 Los restos de inhibición de la opsonización para uso en la preparación de liposomas de la invención son típicamente grandes polímeros hidrófilos que están unidos a la membrana del liposoma. Como se usa en el presente texto, un resto inhibidor de la opsonización está "unido" a una membrana de liposoma cuando está fijado químicamente o físicamente a la membrana, por ejemplo mediante la intercalación de un ancla soluble en lípidos en la propia membrana o mediante la unión directamente a grupos activos de lípidos de membrana. Estos polímeros hidrófilos que inhiben la opsonización forman una capa superficial protectora que reduce significativamente la absorción de los liposomas por el sistema de macrófagos-monocitos ("MMS") y el sistema reticuloendotelial ("RES"); por ejemplo, como se describe en la patente de EU. UU. n° 4.920.016. Los liposomas modificados con restos de inhibición de la opsonización se mantienen entonces en la circulación mucho más tiempo que los liposomas no modificados. Por esta razón, tales liposomas se denominan algunas veces liposomas "furtivos" ("stealth").

Se sabe que los liposomas furtivos se acumulan en tejidos alimentados por microvasculatura porosa o "filtrante". Por tanto, el tejido diana caracterizado por tales defectos de la microvasculatura, por ejemplo los tumores sólidos, acumulará eficazmente estos liposomas. Además, la absorción reducida por el RES hace que disminuya la toxicidad de los liposomas furtivos evitando una acumulación significativa en el hígado y el bazo. Por tanto, los liposomas que se modifican con restos de inhibición de opsonización pueden suministrar el presente siRNA a las células tumorales.

Los restos de inhibición de la opsonización adecuados para modificar los liposomas son preferentemente polímeros solubles en agua con un peso molecular medio numérico de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 daltons, y más preferentemente de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 20.000 daltons. Tales polímeros incluyen derivados de polietilenglicol (PEG) o de polipropilenglicol (PPG); por ejemplo, metoxi PEG o PPG, y estearato de PEG o PPG; polímeros sintéticos tales como poli(acrilamida) o poli-N-vinil pirrolidona; poliamidoaminas lineales, ramificadas o dendrímicas; ácidos poli(acrílicos), poli(alcoholes), por ejemplo poli(alcohol vinílico) y polixilitol, a los que se enlazan químicamente grupos carboxílicos o amino, así como gangliósidos, tales como gangliósido GM₁. Los copolímeros de PEG, metoxi PEG o metoxi PPG, o los derivados de los mismos, son también adecuados. Además, el polímero que inhibe la opsonización puede ser un copolímero de bloque de PEG y un poliaminoácido, un polisacárido, una poliamidoamina, una polietilenamina o un polinucleótido. Los polímeros que inhiben la opsonización pueden ser también polisacáridos naturales que contienen aminoácidos o ácidos carboxílicos, por ejemplo, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido hialurónico, ácido péctico, ácido neuramínico, ácido alginico, carragenina; polisacáridos u oligosacáridos aminados (lineales o ramificados); o polisacáridos u oligosacáridos carboxilados, por ejemplo, que han sido sometidos a una reacción con derivados de ácidos carbónicos teniendo por resultado la unión de grupos carboxílicos.

Preferentemente, el resto de inhibición de la opsonización es un PEG, PPG o derivados de los mismos. Los liposomas modificados con PEG o derivados de PEG se denominan algunas veces "liposomas PEGilados".

El resto que inhibe la opsonización se puede unir a la membrana del liposoma por una cualquiera de diversas técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida de PEG se puede unir a un ancla liposoluble de fosfatidil-etanolamina, y después se puede unir a una membrana. De un modo similar, se puede derivatizar un polímero de dextrano con un ancla liposoluble de estearilamina por medio de una aminación reductora usando Na(CN)BH₃ y una mezcla de disolventes tal como tetrahidrofurano y agua, en una proporción de 30:12 a 60°C.

Más adelante se describen plásmidos recombinantes que expresan siRNA. Tales plásmidos recombinantes se pueden también administrar directamente o junto con un reactivo de suministro adecuado, incluyendo el reactivo lipófilo Mirus Transit LT1; lipofectina; lipofectamina; celfectina; policationes (por ejemplo, polilisina) o liposomas. Los vectores virales recombinantes que expresan siRNA también se han descrito anteriormente y los métodos para suministrar tales vectores a un área de neovascularización en un paciente caen dentro de la experiencia en la técnica.

El siRNA puede ser administrado al sujeto por cualquier medio adecuado para suministrar el siRNA a las células del tejido en el área de neovascularización o en sus proximidades. Por ejemplo, el siRNA se puede administrar mediante una pistola de genes, electroporación o por otras vías de administración parenterales o enterales adecuadas.

Las vías de administración enteral adecuadas incluyen el suministro oral, rectal o intranasal.

Las vías de administración parenteral adecuadas incluyen administración intra-vascular (por ejemplo, inyección intravenosa en bolo, infusión intravenosa, inyección intra-arterial en bolo, infusión intra-arterial e instilación de catéter en la vasculatura); administración peri- e intra-tisular (por ejemplo, inyección peri-tumoral e intra-tumoral, inyección intra-retiniana, inyección sub-retiniana o intravítrea); inyección o deposición subcutánea incluyendo infusión subcutánea (tal como mediante bombas osmóticas); aplicación directa (por ejemplo, tópica) al área del sitio de neovascularización o en sus proximidades, por ejemplo, mediante un catéter u otro dispositivo de colocación (por ejemplo, un gránulo corneal o un supositorio, un colirio o un implante que comprende un material poroso, no poroso o gelatinoso); e inhalación. Los dispositivos de emplazamiento adecuados incluyen los implantes oculares descritos en las patentes de los EE. UU. n° 5.902.598 y 6.375.972, y los implantes oculares biodegradables descritos en la patente de los EE. UU. n° 6.331.313. Tales implantes oculares están disponibles en Control Delivery Systems, Inc. (Watertown, MA) y Oculex Pharmaceuticals, Inc. (Sunnyvale, CA).

En una realización preferida, las inyecciones o infusiones del siRNA se administran en el sitio de neovascularización o en sus proximidades. Mas preferentemente, el siRNA se administra por vía tópica en el ojo, por ejemplo, en forma de líquido o de gel al párpado inferior o en el fondo de saco conjuntival, como se hace dentro de la especialidad en la materia (véase, por ejemplo, Acheampong AA et al, 2002, *Drug Metabol. and Disposition* 30: 421 - 429).

Típicamente, el siRNA se administra por vía tópica al ojo en cantidades de aproximadamente 5 microlitros a aproximadamente 75 microlitros, por ejemplo, de aproximadamente 7 microlitros a aproximadamente 50 microlitros, preferentemente de aproximadamente 10 microlitros a aproximadamente 30 microlitros. Se entiende que la instilación tópica en el ojo de siRNA en volúmenes mayores de 75 microlitros puede dar como resultado la pérdida de siRNA del ojo por vertido y drenaje.

- Una vía de administración parenteral particularmente preferida es la administración intraocular. Se entiende que la administración intraocular del presente siRNA se puede conseguir mediante la administración por inyección o directa (por ejemplo, tópica) al ojo, siempre y cuando la vía de administración permita que el siRNA entre en el ojo. Además de las vías tópicas de administración en el ojo descritas anteriormente, las vías de administración intraoculares adecuadas incluyen administración intra-vítrea, intra-retiniana, sub-retiniana, sub-tenoniana, peri- y retro-orbital, trans-corneal y trans-esclerótica. Tales vías de administración intraoculares caen dentro de la experiencia en la técnica; por ejemplo, véase, Acheampong AA et al, 2002, *supra*; y Bennett et al. (1996), *Hum. Gene Ther.* 7: 1763 - 1769 y Ambati J et al., 2002, *Progress in Retinal and Eye Res.* 21: 145 - 151. En otra realización preferida, el siRNA es administrado por inyección intravítrea.
- El siRNA se puede administrar en una dosis única o en dosis múltiples. Cuando la administración del siRNA es mediante infusión, la infusión puede ser una única dosis mantenida o se puede suministrar mediante infusiones múltiples. Se prefiere la inyección del agente directamente en el tejido en el sitio de neovascularización o en sus proximidades. Las inyecciones múltiples del agente en el tejido en el sitio de neovascularización o en sus proximidades son particularmente preferidas.
- El siRNA se puede administrar al sujeto una vez, tal como mediante una inyección o deposición única en el sitio de neovascularización o en sus proximidades. Alternativamente, el siRNA se puede administrar a un sujeto varias veces al día o semanalmente. Por ejemplo, el siRNA se puede administrar a un sujeto una vez a la semana durante un periodo de aproximadamente tres a aproximadamente veintiocho semanas, más preferentemente de aproximadamente siete a aproximadamente diez semanas. En un régimen de dosificación preferido, el siRNA se inyecta en el sitio de neovascularización o en sus proximidades una vez cada cuatro semanas, ocho semanas, o doce semanas. En un régimen de dosificación más preferido, el siRNA se inyecta en el sitio de neovascularización o en sus proximidades (p. ej. por administración intravítrea) una vez cada cuatro semanas durante un periodo de iniciación, preferentemente aproximadamente ocho semanas, seguido por un periodo de mantenimiento en el que dicho siRNA es inyectado una vez cada ocho a doce semanas. Preferentemente la dosis de siRNA está precedida por la administración de un antagonista de VEGF, preferentemente dos semanas antes de la administración del siRNA, y durante un periodo de ocho semanas (es decir, el periodo de iniciación). Se entiende que pueden ser necesarias administraciones periódicas del siRNA durante un periodo de tiempo indefinido para sujetos que sufren de una enfermedad de neovascularización crónica, tal como ARMD húmeda o retinopatía diabética.
- Cuando un régimen de dosificación comprende administraciones múltiples, se entiende que la cantidad efectiva de siRNA administrada al sujeto puede comprender la cantidad total de siRNA administrada a lo largo del régimen de dosificación completo.
- Los siRNA se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas antes de la administración a un sujeto, de acuerdo con técnicas conocidas en este campo. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se caracterizan por ser al menos estériles y sin pirógenos. Como se usa en el presente texto, la expresión "formulaciones farmacéuticas" incluye formulaciones para uso humano y veterinario. Los métodos para preparar composiciones farmacéuticas de la invención caen dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, como se describe en *Remington's Pharmaceutical Science*, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985).
- En una realización, las formulaciones farmacéuticas comprenden un siRNA (por ejemplo, del 0,1 al 90% en peso) o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, mezclado con un medio de transporte fisiológicamente aceptable. Los medios de transporte fisiológicamente aceptables preferidos son agua, agua tamponada, soluciones salinas (por ejemplo, solución salina normal o solución salina equilibrada, tales como soluciones salinas equilibradas de Hank o Earle), solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y similares.
- Las composiciones farmacéuticas pueden también comprender excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen estabilizantes, antioxidantes, agentes de ajuste de la osmolalidad, tampones y agentes de ajuste del pH. Los aditivos adecuados incluyen tampones biocompatibles fisiológicamente (por ejemplo, hidrocloreto de trometamina), adiciones de quelantes (tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida) o complejos de quelato de calcio (como por ejemplo, DTPA de calcio, CaNaDTPA-bisamida) o bien, opcionalmente, adiciones de sales de calcio o sodio (por ejemplo, cloruro de calcio, ascorbato de calcio, gluconato de calcio o lactato de calcio). Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden envasar para uso en forma líquida o se pueden liofilizar.
- Para administración tópica en el ojo, se pueden usar reactivos de suministro intraocular convencionales. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención para suministro intraocular tópico pueden comprender soluciones salinas como se han descrito anteriormente, potenciadores de la penetración corneal, partículas insolubles, vaselina u otras pomadas basadas en gel, polímeros que experimentan un aumento de la viscosidad al tener lugar la instilación en el ojo o polímeros mucoadhesivos. Preferentemente, el reactivo de suministro intra-ocular aumenta la penetración corneal, o prolonga la retención preocular del siRNA por medio de efectos de viscosidad o estableciendo interacciones fisicoquímicas con la capa de mucina que cubre el epitelio corneal.

Las partículas insolubles adecuadas para suministro intraocular tópico incluyen las partículas de fosfato cálcico descritas en la patente de los EE. UU. nº 6.355.271 de Bell et al. Los polímeros adecuados que experimentan un aumento de la viscosidad al tener lugar la instilación en el ojo incluyen copolímeros de bloque de polietilenopolioxipropileno tales como poloxámero 407 (por ejemplo, a una concentración del 25%), acetofalato de celulosa (por ejemplo, a una concentración del 30%) o una goma de gelano con bajo contenido de acetilo tal como Gelrite® (disponible en CP Kelco, Wilmington, DE). Los polímeros mucoadhesivos adecuados incluyen hidrocoloides con múltiples grupos funcionales hidrófilos tales como grupos carboxilo, hidroxilo, amida y/o sulfato; por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, poli(ácido acrílico), polietilenglicoles de alto peso molecular (por ejemplo, peso molecular medio numérico mayor que 200.000), dextranos, ácido hialurónico, ácido poligalacturónico y xilocano. Los potenciadores de la penetración corneal adecuados incluyen ciclodextrinas, cloruro de benzalconio, polietilenglicol lauril éter (por ejemplo, Brij® 35), polioxietilenglicol estearil éter (por ejemplo, Brij® 78), polioxietilenglicol oleil éter (por ejemplo, Brij® 98), ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), digitonina, taurocolato sódico, saponinas y aceite de ricino polioxietilado tal como Cremaphor EL.

Para composiciones sólidas, se pueden usar vehículos sólidos no tóxicos convencionales; por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

Por ejemplo, una composición farmacéutica sólida para administración oral puede comprender cualquiera de los vehículos y excipientes enumerados anteriormente y del 10 al 95%, preferentemente del 25% al 75% de uno o más siRNA. Una composición farmacéutica para administración en aerosol (inhalación) puede comprender del 0,01 al 20% en peso, preferentemente del 1% al 10% en peso, de uno o más siRNA encapsulados en un liposoma como se ha descrito anteriormente, y un propulsor. También se puede incluir un vehículo según se desee; por ejemplo, lecitina para suministro intranasal.

La invención se ilustrará ahora con los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1 - Interferencia de RNA *in vivo* de VEGF en monos con siRNA anti-VEGF.

Diseño del siRNA. Una secuencia de 19 nt situada a 329 nt del extremo 5' del mRNA de VEGF humano fue elegida como secuencia diana: AAACCTCACCAAGGCCAGCAC (SEC ID NO: 51). Para asegurar que no estaba contenida en el mRNA de cualquier otro gen, esta secuencia diana fue introducida en el motor de búsqueda BLAST proporcionado por NCBI. El uso del algoritmo BLAST se describe en Altschul et al. (1990), *J Mol. Biol.* 215: 403 - 410 y Altschul et al. (1997), *Nucleic Acids Res* 25: 3389 - 3402. Como no se encontró otro mRNA que contenía la secuencia diana, se sintetizó un siRNA dúplex para dirigir esta secuencia (Dharmacon Research, Inc., Lafayette, CO).

El siRNA dúplex tenía las siguientes cadenas sentido y antisentido:

sentido:

5'-accucaccaagggcagcac**TT**-3' (SEC ID NO: 77).

antisentido:

5'-gugcuggccuuggugaggu**TT**-3' (SEC ID NO: 78).

Juntas, las cadenas de siRNA sentido y antisentido formaban un siRNA de 19 nt bicatenario con salientes TT 3' (indicados en negrita) en cada cadena. Este siRNA se denominó "Candidato 5" o "Cand5." Otros siRNA que dirigen mRNA de VEGF humano fueron diseñados y probados como se describe para Cand5.

Los objetivos de este estudio eran determinar la seguridad y la eficacia de Cand5 cuando se administra mediante inyección intravítrea única a monos cinomolgos después de la inducción de CNV. Se administró Cand5 en el artículo de control de vehículo a monos cinomolgos macho *naive* en los siguientes niveles de dosis: 0 mg/ojo (control), 0,07 mg/ojo, 0,18 mg/ojo, 0,35 mg/ojo y 0,70 mg/ojo.

La CNV se indujo mediante tratamiento con láser en las máculas de ambos ojos de cada animal, y las dosis de Cand5 se administraron poco después del tratamiento con láser. Los animales fueron evaluados en cuanto a los cambios de los síntomas clínicos, peso corporal y condición ocular (exámenes oftalmológicos extensivos, electroretinografía y tonometría). Se llevó a cabo la angiografía de fluoresceína y se recogieron muestras de sangre. Al final del estudio (día 44), todos los animales fueron sacrificados por eutanasia y se llevó a cabo una necropsia completa. Los tejidos elegidos fueron recogidos y preservados para la evaluación histopatológica.

No se detectaron efectos sistémicos ni locales (oculares) adversos de Cand5 cuando se administró a los monos una única inyección intravítrea en ambos ojos a dosis de hasta 0,70 mg/ojo después de la lesión de la mácula con láser y durante el subsiguiente desarrollo de CNV.

Ejemplo 2 - Interferencia de RNA *in vitro* de VEGF con siRNA anti-VEGF en células 293 de riñón embrionario humano.

Células 293 de riñón embrionario humano (obtenidas de ATCC, Manassas, VA) fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; obtenido de Cellgro, Herndon, VA) con 10% de suero bovino fetal (FBS; de JRH Biosciences, Lenexa, KS) y un reactivo antibiótico-antimicótico, usado para la prevención de contaminantes del desarrollo del cultivo de células (de Gibco, Carlsbad, CA).

Los siRNAs fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Las secuencias diana de siRNA se muestran en la Tabla 2. Se usó en este estudio un siRNA adicional que dirige el gen de proteína fluorescente verde potenciada (green fluorescent protein: GFP) como control o testigo negativo.

Tabla 2.

Nombre siRNA	Contenido GC	Sitio de inicio nucleótido	Secuencia diana 5'-3' de siRNA
hVEGF#1	58%	92	aaggaggaggcagaatc (SEQ ID NO: 81)
hVEGF#2	42%	124	aagttcatggatgctatcag (SEQ ID NO: 47)
hVEGF#3	58%	162	aatcgagaccctggggacat (SEQ ID NO: 48)
hVEGF#4	42%	301	aacatcaccatgcagattatg (SEQ ID NO: 50)
hVEGF#5	58%	338	aaggccagcacataggagaga (SEQ ID NO: 52)
hVEGF#6	42%	380	aatgtgaatgcagaccaaaga (SEQ ID NO: 82)
hVEGF#7	37%	396	aaagaaagatagagcaagaca (SEQ ID NO: 56)
hVEGF#8	32%	450	aaagcatttgttglacaaga (SEQ ID NO: 83)
hVEGF#9	42%	467	aagatccgcagacgtgtaaat (SEQ ID NO: 84)
hVEGF#10	53%	498	aaacacacactcgcgttgcaa (SEQ ID NO: 85)
Cand5	63%	328	aaacctcaccaggccagcac (SEQ ID NO: 51)

Transfección de siRNA e inducción de hipoxia in vitro. Células 293 humanas fueron cultivadas en placas de 24 pocillos a 37°C con 5% de CO₂ durante la noche. Al día siguiente se realizaron las transfecciones cuando las células eran confluentes en aproximadamente un 50% a 70%. Las células fueron transfectadas con siRNAs dirigidos contra VEGF humano. Los siRNAs se mezclaron en un reactivo CaPi y se añadieron a 20 µl de solución de CaCl₂ 250 mM. La mezcla siRNA/CaCl₂ se añadió gota a gota a 20 µl de 2X solución salina equilibrada de Hanks (HBS), mientras se agita con vórtice. El complejo siRNA/CaCl₂/HBS fue añadido directamente al medio en cada pocillo (300 µL/pocillo). Después de una incubación de 4 h a 37°C, el medio fue eliminado y las células se siguieron incubando con medio libre de suero que contiene 10% de DMSO (300 µL/pocillo a temperatura ambiente durante 1 - 2 minutos). Este medio fue después eliminado y las células fueron alimentadas de nuevo con medio de cultivo (500 µL/pocillo). Los controles negativos incluían siRNA carente de reactivo de transfección y siRNA no específico (siRNA de EGFP1). Para los experimentos de cribado se usaron siRNAs a una concentración de 25 nM. Para los experimentos de respuesta a la dosis, se usaron los siRNAs a concentraciones de 1 nM, 5 nM y 25 nM. La hipoxia fue inducida con desferrioxamina a una concentración final de 130 µM 4 horas después de realizada la transfección. La desferrioxamina simula un estado hipóxico, como se propone para interrumpir las rutas normales detectoras de oxígeno en las células de mamífero inhibiendo las interacciones hemo-Fe²⁺.

Cuantificación de la proteína VEGF. Aproximadamente 48 horas después de la transfección, se retiró el sobrenadante de todos los pocillos y se llevó a cabo un ELISA de VEGF humano (R & D systems, Minneapolis, MN) en las células 293 como se describe en el protocolo Quantikine de ELISA de VEGF humano. Se añadió anticuerpo específico de VEGF a cada pocillo produciendo desarrollo de color en proporción a la cantidad de VEGF unido a la placa. Los resultados fueron leídos en un lector de placas AD340 a 450 nm (Beckman Coulter).

Resultados. Los siRNAs de VEGF humano suprimen la regulación por exceso inducida por hipoxia de la proteína VEGF humana en células 293. El VEGF humano fue regulado por exceso por la inducción de la hipoxia mediada por desferrioxamina. Las lecturas de la DO a 450 nm reflejaron los niveles de proteína VEGF humano en muestras de células. El aumento inducido por hipoxia de los niveles de proteína de hVEGF se redujo significativamente en células transfectadas con todos los siRNA de VEGF humano (Figura 1). No se observó ningún efecto sobre los niveles de hVEGF con transfecciones con siRNA no específico (siRNA EGFP) o transfecciones *mock* (simulacro) sin siRNA. Se realizaron estudios de respuesta a la dosis en Cand5, hVEGF n° 1, hVEGF n° 2, hVEGF n° 3, hVEGF n° 4, hVEGF n° 6 y hVEGF n° 7 (Figura 2).

Ejemplo 3 - Interferencia de RNA *in vivo* de VEGF en seres humanos con ARMD usando siRNA anti-VEGF.

Aunque no describe una realización de la presente invención, el ejemplo presente proporciona información de interés para la invención.

Diseño del estudio. Un total 110 sujetos de estudio participaron completamente en 28 sitios clínicos (de los 129 inscritos inicialmente). Treinta y cuatro (34) sujetos fueron aleatorizados para el tratamiento con Cand5 a 0,2 mg, mientras que 39 sujetos fueron asignados al tratamiento con Cand5 a 1,5 mg y 37 sujetos recibieron tratamiento con Cand5 3,0 mg.

Los sujetos fueron seleccionados o cribados en cuanto a neovascularización coroidea subfoveal (CNV) asociada con ARMD, usando procedimientos de cribado que incluían refracción manifiesta, agudeza visual mejor corregida, examen con lámpara de hendidura, examen oftalmoscópico indirecto, angiografía con fluoresceína, fotografía del fondo de ojo, y tomografía de coherencia ocular (ocular coherence tomography: "OCT"). Los sujetos eran elegibles para el estudio y satisfacían la totalidad de los criterios siguientes:

1. Lesiones subfoveales clásicas, predominantemente clásicas, o mínimamente clásicas, secundarias a ARMD, con un tamaño total de la lesión (incluyendo hemorragia, atrofia/escara y neovascularización) de ≤ 12 áreas de disco totales (30,48 mm²), de las que al menos el 50% son CNV activas y subfoveales. Las lesiones mínimamente clásicas eran para tener evidencia de actividad de lesión definida como:

- a. La presencia de hemorragia sub-retiniana y/o fluido y/o lípido o
- b. Pérdida de una o más líneas de visión (ETDRS o equivalente; cartillas de agudeza visual para el estudio de la retinopatía diabética en tratamiento temprano (*Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*) durante las últimas 12 semanas o
- c. crecimiento de la lesión documentada FA en $\geq 10\%$ durante las últimas 12 semanas;

2. Agudeza visual mejor corregida ETDRS de 64 a 24 letras (20/50 a 20/320 de Equivalente de Snellen) en el ojo de estudio;

3. Hemorragia sub-retiniana (si la hay) no más del 50% del tamaño total de la lesión, y puede no implicar el espacio subfoveal;

5. ≥ 50 años de edad;

6. Proporciona un formulario de consentimiento informado escrito;

7. Deseoso y dispuesto a volver para los exámenes de seguimiento programados.

8. Para mujeres, ≥ 1 año post-menopausia o esterilizada quirúrgicamente.

Todos los sujetos recibieron dos inyecciones intravítreas de 100 μ L de Cand5 de la dosis asignada. Las inyecciones fueron administradas a seis semanas de distancia, el Día 0 y la Semana 6. Se programó que los sujetos volviesen para examen 3 y 6 semanas después de la primera inyección, y 3, 6, 9 y 12 semanas después de la segunda inyección del producto de investigación doblemente enmascarado. El contacto telefónico se había de hacer con todos los sujetos en el día 1 y 1 semana después de cada inyección. Se realizaron visitas adicionales de seguimiento a las 30, 52 y 104 semanas después de la primera inyección.

Para los puntos finales de la eficacia, se usó la extrapolación de la última observación (Last Observed Carried Forward: LOCF) como método de imputación para sujetos con valores perdidos. Para sujetos que recibieron terapia de rescate, se usaron los valores de la eficacia últimamente observados antes de la terapia de rescate como valor de LOCF. Además de los análisis de LOCF, se realizó el análisis en los datos observados disponibles sin imputación. A menos que se especifique otra cosa, el análisis es en los datos observados disponibles.

Resultados del estudio. En la Tabla 3 se proporciona un resumen de los resultados clave de eficacia y seguridad. Como se muestra, la agudeza visual a distancia era estable desde la línea de base a las 12 semanas en aproximadamente el 78% de la cohorte de estudio; esto aumentó a aproximadamente el 83% de la cohorte de estudio cuando se considera el periodo de 3 a 15 semanas. El tamaño del CNV cambió solamente lo mínimo, sugiriendo la estabilización de la lesión. Esto se reflejó aún más en el descenso del porcentaje de lesión representado por CNV (véase también la **Tabla 11**).

Tabla 3: Resumen de los resultados clave de eficacia y seguridad

Resultados de eficacia	De la línea de base a la semana 12			
	0,2 mg	1,5 mg	3,0 mg	Total

Mantenimiento de la visión - distancia:	83,3 %	73,0 %	78,8 %	78,0 %
BCDVA % pérdida < 15 letras				
BCDVA % ganancia ≥ 15 letras	0,0 %	2,7 %	6,1 %	3,0 %
BCDVA % ganancia ≥ 10 letras	13,3 %	8,1 %	6,1 %	9,0 %
BCDVA% ganancia ≥ 5 letras	16,7 %	13,5 %	12,1 %	14,0 %
BCDVA% ganancia ≥ 0 letras	43,3 %	43,2 %	30,3 %	39,0 %
BCDVA cambio medio en letras	- 3,3	-6,4	-5,1	-5,1
Mantenimiento de la visión - próxima	83,3 %	75,7 %	97,1 %	85,3 %
BCDVA % pérdida < 15 letras				
BCDVA cambio medio en letras	- 1,4	- 6,2	- 0,5	- 2,9
Angiografía de fluoresceína:	+ 5,08	+ 2,04	+ 1,96	+2,88
Cambio medio en tamaño de CNV (mm ²)				
CNV % de la lesión	- 4,59	- 14,70	- 9,83	-10,11

	De la semana 3 a la semana 15			
Resultados de eficacia	0,2 mg	1,5 mg	3,0 mg	Total
Mantenimiento de la visión - distancia:	90,9 %	78,1 %	81,5 %	82,7 %
BCDVA % pérdida < 15 letras				
BCDVA % ganancia ≥ 15 letras	0,0 %	0,0 %	7,1 %	2,4 %
BCDVA % ganancia ≥ 10 letras	4,3 %	6,3 %	17,9 %	9,6 %
BCDVA% ganancia ≥ 5 letras	17,4 %	28,1 %	28,6 %	25,3 %
BCDVA% ganancia ≥ 0 letras	39,1 %	50,0 %	42,9 %	44,6 %
BCDVA cambio medio en letras	- 4,0	- 5,8	- 5,6	- 5,3
Mantenimiento de la visión - próxima	95,7 %	87,5 %	92,9 %	91,6 %
BCDVA % pérdida < 15 letras				
BCDVA cambio medio en letras	- 2,6	- 2,3	- 0,7	- 1,9
Angiografía de fluoresceína:	+ 1,27	+ 0,65	+ 1,11	+ 0,97
Cambio medio en tamaño de CNV (mm ²)				
CNV % de la lesión	- 14,67	- 18,65	- 8,46	-14,17

5 Revisando los resultados, es importante observar que el Cand5 induce la degradación del mRNA de VEGF y por tanto evita la producción de nueva proteína VEGF, pero no es antagonista de VEGF y por consiguiente puede no tener acción sobre la proteína VEGF previamente producida. La eficacia de Cand5 en la inhibición de la producción de VEGF puede no manifestarse inmediatamente como resultado del VEGF previamente expresado presente en el tejido retiniano.

10 Dadas estas consideraciones, se presenta el análisis con la evaluación del cambio desde la línea de base hasta las 12, 15 y 18 semanas para cada parámetro de eficacia, además del análisis del cambio medio en las letras de BCVA (aguda visual mejor corregida) tanto para la agudeza visual a distancia como para la próxima. Adicionalmente,

5 basándose en el mecanismo de acción de Cand5 en la supresión del gen VEGF pero la no actividad como antagonista de VEGF, se presenta la evaluación del cambio desde las 3 semanas hasta las 12, 15 y 18 semanas para cada parámetro de la eficacia clave. Este análisis asume reposición y degradación del VEGF presente en los tejidos retinianos en ~3 semanas, y permite el establecimiento de la eficacia de Cand5 con respecto a la supresión de la expresión de VEGF.

Agudeza visual a distancia mejor corregida (BCDVA). El cambio en la agudeza visual a distancia mejor corregida media (BCDVA) desde la línea de base se muestra en la Fig. 3. Como se indica, el número medio de letras perdidas aumenta desde la línea de base en el curso del estudio, sin embargo la pérdida media era menor que 10 letras (< 2 líneas) de BCDVA para todos los grupos de tratamiento.

10 La ganancia en letras de la agudeza a distancia mejor corregida desde la línea de base hasta las visitas de seguimiento a las 9, 12, 15 y 18 semanas se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4: Resumen del aumento de BCDVA desde la línea base -
Sujetos que ganan 15, 10, 5 o cualquier letra.**

Mejora de BCDVA	0,2 mg n %	1,5 mg n %	3,0 mg n %	Valor de P test exacto de Fischer	Total n %
Semana 9					
N	32	39	36		107
≥ 15 letras	1 (3,1 %)	0 (0,0 %)	1 (2,8 %)	0,5324	2 (1,9 %)
≥ 10 letras	3 (9,4 %)	2 (5,1 %)	1 (2,8 %)	0,5095	6 (5,6 %)
≥ 5 letras	7 (21,9 %)	5 (12,8 %)	5 (13,9 %)	0,6011	17 (15,9 %)
≥ 0 letra	14 (43,8 %)	16 (41,0 %)	9 (25,0 %)	0,2176	39 (36,4 %)
Semana 12					
N	30	37	33		100
≥ 15 letras	0 (0,0 %)	1 (2,7 %)	2 (6,1 %)	0,5140	3 (3,0 %)
≥ 10 letras	4 (9,4 %)	3 (5,1 %)	2 (2,8 %)	0,6800	9 (9,0 %)
≥ 5 letras	5 (21,9 %)	5 (12,8 %)	4 (13,9 %)	0,8768	14 (14,0 %)
≥ 0 letra	13 (43,8 %)	16 (41,0 %)	10 (25,0 %)	0,4691	39 (39,0 %)
Semana 15					
N	22	32	27		81
≥ 15 letras	0 (0,0 %)	1 (3,1 %)	1 (3,7 %)	1,0000	2 (2,5 %)
≥ 10 letras	1 (4,5 %)	2 (6,3 %)	1 (3,7 %)	1,0000	4 (4,9 %)
≥ 5 letras	4 (18,2 %)	6 (18,8 %)	3 (11,1 %)	0,7426	13 (16,0 %)
≥ 0 letra	9 (40,9 %)	12 (37,5 %)	5 (18,5 %)	0,1667	26 (32,1 %)
Semana 18					
N	19	25	20		64
≥ 15 letras	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	1 (5,0 %)	0,6094	1 (1,6 %)
≥ 10 letras	2 (10,5 %)	1 (4,0 %)	1 (5,0 %)	0,6785	4 (6,3 %)
≥ 5 letras	7 (36,8 %)	5 (20,0 %)	2 (10,0 %)	0,1363	14 (21,9 %)

≥ 0 letra	7 (36,8 %)	11 (44,0 %)	5 (25,0 %)	0,4127	23 (35,9 %)
-----------	------------	-------------	------------	--------	-------------

N = número de sujetos con datos disponibles

n = número de sujetos con la correspondiente respuesta de VA en cada grupo de dosis.

% = $n \div N \times 100\%$

5 El mismo análisis de la ganancia en letras de BCDVA desde 3 semanas hasta las mismas visitas de seguimiento se muestra en la Tabla 5. En la población de estudio de sujetos con enfermedad relativamente agresiva, es decir predominantemente y mínimamente clásica pero no oculta, varios sujetos en cada uno de los grupos de dosificación de Cand5 ganaron letras de BCDVA, ganando algunos sujetos tantas como 10 o 15 letras de BCDVA, es decir de 2 a 3 o más líneas.

**Tabla 5: Resumen del aumento de BCDVA desde la semana tres -
Sujetos que ganan 15, 10, 5 o cualquier letra.**

Mejora de BCDVA	0,2 mg n %	1,5 mg n %	3,0 mg n %	Valor de P test exacto de Fischer	Total n %
Semana 9					
N	32	39	36		107
≥ 15 letras	1 (3,1 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0,2991	1 (0,9 %)
≥ 10 letras	1 (3,1 %)	0 (0,0 %)	2 (5,6 %)	0,3960	3 (2,8 %)
≥ 5 letras	7 (21,9 %)	5 (12,8 %)	9 (25,0 %)	0,3820	21 (19,6 %)
≥ 0 letra	16 (50,0 %)	17 (43,6 %)	17 (47,2 %)	0,8585	50 (46,7 %)
Semana 12					
N	30	37	33		100
≥ 15 letras	2 (6,7 %)	1 (2,7 %)	1 (3,0 %)	0,6824	4 (4,0 %)
≥ 10 letras	2 (6,7 %)	2 (5,4 %)	4 (12,1 %)	0,6506	8 (8,0 %)
≥ 5 letras	7 (23,3 %)	6 (16,2 %)	7 (21,2 %)	0,7787	20 (20,0 %)
≥ 0 letra	10 (33,3 %)	13 (35,1 %)	13 (39,4 %)	0,8995	36 (36,0 %)
Semana 15					
N	22	32	27		81
≥ 15 letras	0 (0,0 %)	1 (3,1 %)	1 (3,7 %)	1,0000	2 (2,5 %)
≥ 10 letras	0 (0,0 %)	1 (3,1 %)	2 (7,4 %)	0,6203	3 (3,7 %)
≥ 5 letras	4 (18,2 %)	5 (15,6 %)	6 (22,2 %)	0,9343	15 (18,5 %)
≥ 0 letra	7 (31,8 %)	11 (34,4 %)	11 (40,7 %)	0,8386	29 (35,8 %)
Semana 18					
N	19	25	20		64
≥ 15 letras	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)		0 (0,0 %)
≥ 10 letras	1 (5,3 %)	1 (4,0 %)	2 (10,0 %)	0,8206	4 (6,3 %)
≥ 5 letras	3 (15,8 %)	5 (20,0 %)	3 (15,0 %)	0,9201	11 (17,2 %)

≥ 0 letra	9 (47,4 %)	9 (36,0 %)	7 (35,0 %)	0,6903	25 (39,1 %)
-----------	------------	------------	------------	--------	-------------

N = número de sujetos con datos disponibles

n = número de sujetos con la correspondiente respuesta de VA en cada grupo de dosis.

% = $n \div N \times 100\%$

5 La estabilización de la agudeza mejor corregida, definida como la no pérdida de 15 letras y considerada el análisis primario en los experimentos clínicos de agentes terapéuticos para CNV, se muestra en las Tablas 6 y 7, y en la Fig. 4. Como se muestra en la Tabla 6, aproximadamente el 85% de los ojos se mantuvieron estables a lo largo de 9 semanas, esto disminuyó algo al 78% a las 12 semanas, y después se mantuvo relativamente estable a 77% y 83% a las 15 y 18 semanas respectivamente.

Tabla 6: Resumen de la disminución de BCDVA desde la línea de base -

10

Sujetos que no pierden 15, 10, 5 o cualquier letra.

Reducción de BCDVA	0,2 mg n %	1,5 mg n %	3,0 mg n %	Valor de P test exacto de Fischer	Total n %
Semana 9					
N	32	39	36		107
no pierden 15 letras	27 (84,4 %)	34 (87,2 %)	30 (83,3 %)	0,8902	91 (85,0 %)
no pierden 10 letras	24 (75,0 %)	27 (69,2 %)	25 (69,4 %)	0,8943	76 (71,0 %)
no pierden 5 letras	17 (53,1 %)	25 (64,1 %)	22 (61,1 %)	0,6414	64 (59,8 %)
no pierden ninguna letra	14 (43,8 %)	16 (41,0 %)	9 (25,0 %)	0,2176	39 (36,4 %)
Semana 12					
N	30	37	33		100
no pierden 15 letras	25 (83,3 %)	27 (73,0 %)	26 (78,8 %)	0,5947	78 (78,0 %)
no pierden 10 letras	23 (76,7 %)	22 (59,5 %)	23 (69,7 %)	0,3342	68 (68,0 %)
no pierden 5 letras	16 (53,3 %)	19 (51,4 %)	17 (51,5 %)	1,0000	52 (52,0 %)
no pierden ninguna letra	13 (43,3 %)	16 (43,2 %)	10 (30,3 %)	0,4691	39 (39,0 %)
Semana 15					
N	22	32	27		81
no pierden 15 letras	18 (81,8 %)	23 (71,9 %)	21 (77,8 %)	0,7578	62 (76,5 %)
no pierden 10 letras	14 (63,6 %)	19 (59,4 %)	17 (63,0 %)	0,9185	50 (61,7 %)
no pierden 5 letras	10 (45,5 %)	17 (53,1 %)	9 (33,3 %)	0,3295	36 (44,4 %)
no pierden ninguna letra	9 (40,9 %)	12 (37,5 %)	5 (18,5 %)	0,1667	26 (32,1 %)
Semana 18					
N	19	25	20		64
no pierden 15 letras	16 (84,2 %)	22 (88,0 %)	15 (75,0 %)	0,5961	53 (82,8 %)
no pierden 10 letras	14 (73,7 %)	20 (80,0 %)	13 (65,0 %)	0,5568	47 (73,4 %)

no pierden 5 letras	9 (47,4 %)	17 (68,0 %)	7 (35,0 %)	0,0833	33 (51,9 %)
no pierden ninguna letra	7 (40,9 %)	11 (44,0 %)	5 (25,0 %)	0,4127	23 (35,9 %)

N = número de sujetos con datos disponibles

n = número de sujetos con la correspondiente respuesta de VA en cada grupo de dosis.

% = $n \div N \times 100\%$

5 Números sustancialmente mayores de sujetos de estudio experimentaron estabilización de la agudeza mejor corregida cuando se considera el cambio desde las 3 semanas (Tabla 7), esto es, aproximadamente el 92% de los sujetos a las 9 semanas, 84% a las 12 semanas y sobre el 80% a las 15 y las 18 semanas. Este hallazgo es consistente con el mecanismo de acción de Cand5 en el silenciamiento de la expresión de VEGF, de forma que la eficacia de Cand5 se manifiesta más claramente cuando el VEGF extracelular expresado previamente ha sido roto (Fig. 4).

10

**Tabla 7: Resumen de la disminución de BCDVA desde la semana tres -
Sujetos que no pierden 15, 10, 5 o cualquier letra.**

Reducción de BCDVA	0,2 mg n %	1,5 mg n %	3,0 mg n %	Valor de P test exacto de Fischer	Total n %
Semana 9					
N	32	39	36		107
no pierden 15 letras	27 (87,5 %)	37 (94,9 %)	33 (91,7 %)	0,5642	98 (91,6 %)
no pierden 10 letras	24 (84,4 %)	34 (87,2 %)	28 (77,8 %)	0,5524	89 (83,2 %)
no pierden 5 letras	23 (71,9 %)	27 (69,2 %)	25 (69,4 %)	1,0000	75 (70,1 %)
no pierden ninguna letra	16 (50,0 %)	17 (43,6 %)	17 (47,2 %)	0,8585	50 (46,7 %)
Semana 12					
N	30	37	33		100
no pierden 15 letras	27 (90,0 %)	29 (78,4 %)	28 (84,8 %)	0,4595	84 (84,0 %)
no pierden 10 letras	24 (80,0 %)	24 (64,9 %)	25 (75,8 %)	0,4353	73 (73,0 %)
no pierden 5 letras	17 (56,7 %)	18 (48,6 %)	20 (60,6 %)	0,6092	55 (55,0 %)
no pierden ninguna letra	10 (33,3 %)	13 (35,1 %)	13 (39,4 %)	0,8996	36 (36,0 %)
Semana 15					
N	22	32	27		81
no pierden 15 letras	20 (90,9 %)	25 (78,1 %)	22 (81,5 %)	0,4955	67 (82,7 %)
no pierden 10 letras	17 (77,3 %)	22 (68,8 %)	17 (63,0 %)	0,5663	56 (69,1 %)
no pierden 5 letras	13 (59,1 %)	19 (59,4 %)	13 (48,1 %)	0,6907	45 (55,6 %)
no pierden ninguna letra	7 (31,8 %)	11 (34,4 %)	11 (40,7 %)	0,8386	29 (35,8 %)
Semana 18					
N	19	25	20		64

no pierden 15 letras	16 (84,2 %)	24 (96,0 %)	16 (80,0 %)	0,2394	56 (87,5 %)
no pierden 10 letras	14 (73,7 %)	21 (84,0 %)	14 (70,0 %)	0,5334	49 (76,6 %)
no pierden 5 letras	9 (47,4 %)	16 (64,0 %)	12 (60,0 %)	0,5916	37 (57,8 %)
no pierden ninguna letra	9 (47,4 %)	9 (36,0 %)	7 (35,0 %)	0,6903	25 (39,1 %)

N = número de sujetos con datos disponibles

n = número de sujetos con la correspondiente respuesta de VA en cada grupo de dosis.

% = $n \div N \times 100\%$

5 Agudeza visual próxima mejor corregida. El cambio en las letras de la agudeza visual próxima (Best Corrected Near Visual Acuity: BCNVA) desde la línea de base a lo largo del tiempo se muestra en las Tablas 8 y 9, y en las Fig. 5 y 6. Solamente pequeños cambios en la BCNVA, generalmente menores que 5 letras o 1 línea de visión próxima, fueron observados durante el curso del seguimiento del estudio, lo que sugiere una buena estabilidad de la agudeza visual próxima mejor corregida (Fig. 5).

10 La ganancia de letras de la agudeza visual próxima mejor corregida a lo largo del tiempo se resume en la Tabla 8. La mejora en la agudeza a distancia mejor corregida de 15 o más letras, es decir 3 o más líneas, fue observada en aproximadamente el 5% de la población de estudio, y se mantuvo relativamente estable desde la semana 9 a la semana 18. En el análisis del aumento de BCNVA desde la línea base, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de tratamiento, ganando un número mayor de sujetos del grupo de 3,0 mg de Cand5 letras de agudeza próxima que en los dos grupos de dosis más baja (Tabla 8; $p < 0,05$).

15 **Tabla 8: Resumen del aumento de BCDVA desde la línea base -**

Sujetos que ganan 15, 10, 5 o cualquier letra.

Reducción de BCDVA	0,2 mg n %	1,5 mg n %	3,0 mg n %	Valor de P test exacto de Fischer	Total n %
Semana 9					
N	32	39	36		107
≥ 15 letras	2 (6,3 %)	2 (5,1 %)	4 (91,7 %)	0,6537	8 (7,5 %)
≥ 10 letras	3 (9,4 %)	3 (7,7 %)	5 (77,8 %)	0,7260	11 (10,3 %)
≥ 5 letras	10 (31,3 %)	8 (20,5 %)	6 (69,4 %)	0,3652	24 (22,4 %)
≥ 0 letras	21 (65,6 %)	14 (35,9 %)	12 (47,2 %)	0,0142	47 (43,9 %)
Semana 12					
N	30	37	35		102
≥ 15 letras	1 (3,3 %)	0 (0,0 %)	5 (14,3 %)	0,0182	6 (5,9 %)
≥ 10 letras	5 (16,7 %)	5 (13,5 %)	5 (14,3 %)	0,9407	15 (14,7 %)
≥ 5 letras	10 (33,1 %)	6 (16,2 %)	7 (20,0 %)	0,2521	23 (22,5 %)
≥ 0 letras	15 (50,0 %)	12 (32,4 %)	13 (37,1 %)	0,3524	40 (39,2 %)
Semana 15					
N	23	32	28		83
≥ 15 letras	0 (0,0 %)	2 (6,3 %)	4 (14,3 %)	0,1954	6 (7,2 %)
≥ 10 letras	3 (13,0 %)	5 (15,6 %)	4 (14,3 %)	1,0000	12 (14,5 %)

≥ 5 letras	9 (39,1 %)	9 (28,1 %)	7 (25,0 %)	0,5704	25 (30,1 %)
≥ 0 letras	10 (43,5 %)	13 (40,6 %)	9 (32,1 %)	0,7154	32 (38,6 %)
Semana 18					
N	18	25	20		63
≥ 15 letras	2 (11,1 %)	1 (4,0 %)	4 (20,0 %)	0,2753	7 (11,1 %)
≥ 10 letras	3 (16,7 %)	5 (20,0 %)	5 (25,0 %)	0,8579	13 (20,6 %)
≥ 5 letras	4 (22,2 %)	8 (32,0 %)	5 (25,0 %)	0,8226	17 (27,0 %)
≥ 0 letras	8 (44,4 %)	13 (52,0 %)	7 (35,0 %)	0,5384	28 (44,4 %)

N = número de sujetos con datos disponibles

n = número de sujetos con la correspondiente respuesta de VA en cada grupo de dosis.

% = $n \div N \times 100\%$

5 La estabilización de la agudeza próxima mejor corregida, es decir, la proporción de sujetos que no pierden 15 letras, y la pérdida de letras de BCNVA se resumen en la Tabla 9 y en la Fig. 6. En la semana 9, sobre el 90% de la población de estudio no había perdido 15 letras de agudeza próxima, y solamente una pequeña disminución de esta proporción de respondedores fue observada a las 12, 15 y 18 semanas. La estabilidad de la agudeza próxima mejor corregida era incluso más notable cuando se considera el cambio desde 3 semanas a visitas posteriores (Fig. 6).

Tabla 9: Resumen de la disminución de BCDVA desde la línea base -

10

Sujetos que no pierden 15, 10, 5 o cualquier letra.

Reducción de BCDVA	0,2 mg n %	1,5 mg n %	3,0 mg n %	Valor de P test exacto de Fischer	Total n %
Semana 9					
N	32	39	36		107
no pierden 15 letras	29 (90,6 %)	36 (92,3 %)	34 (94,4 %)	0,9007	99 (92,5 %)
no pierden 10 letras	25 (78,1 %)	33 (84,6 %)	29 (80,6 %)	0,7814	87 (81,3 %)
no pierden 5 letras	24 (75,0 %)	23 (59,0 %)	20 (55,6 %)	0,2138	67 (62,6 %)
no pierden 0 letras	21 (65,6 %)	14 (35,9 %)	12 (33,3 %)	0,0142	47 (43,9 %)
Semana 12					
N	30	37	35		102
no pierden 15 letras	25 (83,3 %)	28 (75,7 %)	34 (97,1 %)	0,0284	87 (85,3 %)
no pierden 10 letras	23 (76,7 %)	23 (62,2 %)	30 (85,7 %)	0,0758	76 (74,5 %)
no pierden 5 letras	19 (63,3 %)	16 (43,2 %)	18 (51,4 %)	0,2769	53 (52,0 %)
no pierden 0 letras	15 (50,0 %)	12 (32,4 %)	13 (37,1 %)	0,3524	40 (39,2 %)
Semana 15					
N	23	32	28		83
no pierden 15 letras	20 (87,0 %)	28 (87,5 %)	25 (89,3 %)	1,0000	73 (88,0 %)
no pierden 10 letras	18 (78,3 %)	21 (65,6 %)	19 (67,9 %)	0,6245	58 (69,9 %)

no pierden 5 letras	17 (73,9 %)	18 (56,3 %)	14 (50,0 %)	0,2035	49 (59,0 %)
no pierden 0 letras	10 (43,5 %)	13 (40,6 %)	9 (32,1 %)	0,7154	32 (38,6 %)
Semana 18					
N	18	25	20		63
no pierden 15 letras	15 (83,3 %)	22 (88,0 %)	18 (90,0 %)	0,8015	55 (87,3 %)
no pierden 10 letras	13 (72,2 %)	17 (68,0 %)	16 (80,0 %)	0,7216	46 (73,0 %)
no pierden 5 letras	11 (61,1 %)	13 (52,0 %)	12 (60,0 %)	0,8520	36 (57,1 %)
no pierden 0 letras	8 (44,4 %)	13 (52,0 %)	7 (35,0 %)	0,5384	28 (44,4 %)

N = número de sujetos con datos disponibles

n = número de sujetos con la correspondiente respuesta de VA en cada grupo de dosis.

$$\% = n \div N \times 100\%$$

- 5 Dado el efecto clínico aparente del Cand5 administrado en una dosis de 0,2 mg, dejando ausente un grupo de control apropiado, la comparación con datos no publicados acerca de un control no tratado o fingido es de interés en el establecimiento del beneficio clínico del Cand5 frente a una historia natural. El tratamiento de ARMD con terapia fotodinámica (TAP: Blinder KJ et al. (2003) TAP and VIP report No. 1, *Amer J Ophth* 136: 407 - 18) el grupo de placebo es particularmente apropiado para comparación ya que su población sujeto es la más similar a la población predominantemente clásica en este experimento de Cand5. Podría argumentarse que esta es una comparación conservadora ya que la población sujeto en el experimento TAP no tenía otras opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de ARMD, permitiendo una población de tratamiento completamente *naïve* que no sea sujeto de prejuicios del investigador durante la inscripción. Los prejuicios del investigador hacia sujetos de tratamiento con terapias de competencia o sujetos de inscripción en otros experimentos clínicos pueden haber conducido a la población en este estudio actual que fuese sesgada hacia sujetos que era improbable que lo hubiesen hecho bien en otro tratamiento. Los sujetos placebo en el estudio TAP, con enfermedad predominantemente clásica, habían perdido 11,7 letras a los 3 meses (Bressler NM et al. (2002) *Arch Ophthalmol*. 120: 1443 - 54), en comparación con una pérdida de 5,5 letras en la correspondiente población de Cand5 (Fig. 7A y 7B (LOCF)). Un total de 69,0% de sujetos placebo TAP predominantemente clásico mantuvo la visión (pérdida de < 15 letras), en comparación con el 78,3% de sujetos en el estudio actual.
- 10
- 15
- 20 Tamaño de la CNV. El cambio desde la línea base en el tamaño medio de la neovascularización coroidea (CNV) se muestra en la Fig. 8A y 8B (LOCF). Se ha demostrado que el VEGF es tanto necesario como suficiente para el desarrollo de CNV en modelos de animales (Adamis AP et al. (1996) *Arch Ophthalmol* 114: 66 - 71), y por consiguiente se espera que sea el componente más respondedor al VEGF de la lesión. Es importante puntualizar que hay evidencia de una tendencia al efecto de la dosis, que aunque no sea estadísticamente significativa es evidente en todas las visitas en el desarrollo de CNV desde la línea de base.
- 25
- 30 Tamaño total de la lesión. El cambio desde la línea base en el tamaño total de la lesión se muestra en la Tabla 10. Aunque los parámetros más pertinentes están representados por el cambio en el tamaño de la CNV y el cambio en la proporción de la lesión representada por la CNV, la información acerca del tamaño total de la lesión tiene utilidad como base para el análisis del cambio de la CNV como el porcentaje de las dimensiones de la lesión global. Es también notable que el cambio en el tamaño total de la lesión era más pequeño en el grupo de dosificación más alta que en el grupo de 1,5 mg, especialmente en los puntos de mayor tiempo, aun cuando estas diferencias no eran estadísticamente significativas.

Tabla 10: Angiografía de fluoresceína - tamaño total de la lesión.

Visita	Datos estadísticos	0,2 mg	1,5 mg	3,0 mg	Total
Semana 3	N	34	38	37	109
	Media	2,11	1,17	1,81	1,68
	95% CI	0,73, 3,50	0,07, 2,27	1,10, 2,51	1,07, 2,29
	sd	3,97	3,35	2,12	3,21
	mediana	1,29	1,18	1,62	1,38

ES 2 390 499 T3

	intervalo	-5,2, 17,0	-14,1, 8,4	-5,1, 6,3	-14,1, 17,0
Semana 6 pre-inyección	N	33	39	35	107
	Media	3,61	2,15	2,60	2,74
	95% CI	1,73, 5,49	0,80, 3,50	1,79, 3,40	1,96, 3,53
	sd	5,30	4,16	2,34	4,10
	mediana	1,93	1,91	2,46	2,13
	intervalo	-5,7, 20,8	-13,0, 11,8	-1,6, 7,7	-13,0, 20,8
Semana 9	N	31	38	35	104
	Media	4,03	3,13	2,87	3,31
	95% CI	2,24, 5,83	1,28, 4,99	1,87, 3,87	2,41, 4,21
	sd	4,89	5,65	2,91	4,63
	mediana	2,94	2,70	2,68	2,73
	intervalo	-3,1, 18,0	-12,8, 19,2	-4,6, 8,6	-12,8, 19,2
Semana 12	N	29	37	35	101
	Media	5,92	4,56	3,32	4,52
	95% CI	3,22, 8,62	2,22, 6,90	2,16, 4,48	3,32, 5,72
	sd	7,09	7,03	3,37	6,07
	mediana	3,04	3,00	2,99	3,00
	intervalo	-1,9, 23,9	-13,2, 20,5	-3,0, 11,9	-13,2, 23,9
Semana 15	N	23	33	28	84
	Media	6,64	4,87	3,42	4,87
	95% CI	3,20, 10,07	2,40, 7,34	1,83, 5,01	3,46, 6,29
	sd	7,95	6,98	4,09	6,52
	mediana	3,72	3,89	2,88	3,43
	intervalo	-2,9, 24,3	-9,4, 30,6	-5,6, 11,8	-9,4, 30,6
Semana 18	N	19	24	18	61
	Media	9,13	6,78	4,19	6,75
	95% CI	4,79, 13,47	2,06, 11,49	0,99, 7,38	4,35, 9,14
	sd	9,01	11,17	6,43	9,36
	mediana	6,20	4,92	3,96	4,90
	intervalo	-3,9, 24,4	-6,7, 50,1	-8,5, 22,6	-8,5, 50,1

Línea de base: el dato de no pérdida más reciente antes de la inyección de tratamiento el día 0

N = número de sujetos con datos disponibles.

Porcentaje de CNV del tamaño total de la lesión. El cambio en la proporción de la lesión total representado por la CNV se muestra en la Tabla 11. Como se indica, hubo una disminución global en el porcentaje de CNV del tamaño total de la lesión en los tres grupos de tratamiento, aumentando la magnitud de este cambio desde la semana 3 a la semana 18.

5

Tabla 11: Cambio desde la línea base en la angiografía de fluoresceína - neovascularización coroidea % de la lesión.

Visita	Datos estadísticos	0,2 mg	1,5 mg	3,0 mg	Total
Semana 3	N	34	38	37	109
	Media	-4,3	1,53	-7,57	-3,29
	95% CI	-11,91, 3,85	-1,30, 4,35	-14,29, -0,85	-6,75, 0,16
	sd	22,57	8,60	20,15	18,19
	mediana	0,00	0,00	0,00	0,00
	intervalo	-100,0, 28,0	-17,0, 28,5	-82,5, 14,5	-100,0, 28,5
Semana 6 pre-inyección	N	33	39	35	107
	Media	-1,36	-0,73	-3,40	-1,80
	95% CI	-8,43, 5,71	-7,15, 5,69	-7,70, 0,90	-5,19, 1,59
	sd	19,94	19,81	12,51	17,67
	mediana	0,00	0,00	0,00	0,00
	intervalo	-100,0, 27,5	-100,0, 37,5	-61,5, 21,0	-100,0, 37,5
Semana 9	N	31	38	35	104
	Media	-3,40	-3,41	-5,56	3,31
	95% CI	-12,0, 5,19	-11,97, 5,15	-13,08, 1,97	-8,74, 0,48
	sd	23,42	26,04	21,90	23,72
	mediana	0,00	0,00	0,00	0,00
	intervalo	-100,0, 25,0	-100,0, 28,5	-82,5, 49,5	-100,0, 49,5
Semana 12	N	29	37	35	101
	Media	-4,59	-14,70	-9,83	-10,11
	95% CI	-15,90, 6,73	-26,56, -2,85	-19,31, -0,35	-16,28, -3,93
	sd	29,76	35,55	27,59	31,28
	mediana	0,00	0,00	0,00	0,00
	intervalo	-100,0, 36,0	-100,0, 34,0	-100,0, 22,5	-100,0, 36,0
Semana 15	N	23	33	28	84
	Media	-23,04	-16,59	-15,52	-18,00
	95% CI	-41,99, -4,10	-30,46, -2,73	-28,25, -2,79	-26,29, -9,71
	sd	43,80	39,10	32,83	38,19

	mediana	-2,50	0,00	0,00	0,00
	intervalo	-100,0, 32,0	-100,0, 34,0	-86,5, 49,5	-100,0, 49,5
Semana 18	N	19	24	18	61
	Media	-25,16	-25,17	-15,11	-22,20
	95% CI	-45,17, -5,15	-42,53, -7,81	-30,25, 0,03	-31,94, -12,45
	sd	41,51	41,11	30,44	38,06
	mediana	-1,00	0,00	-0,25	0,00
	intervalo	-100,0, 12,5	-100,0, 16,0	-82,5, 49,5	-100,0, 49,5

Línea de base: el dato de no pérdida más reciente antes de la inyección de tratamiento el día 0

N = número de sujetos con datos disponibles.

5 El cambio del % CNV de la lesión desde la semana 3 a las semanas 12, 15 y 18 se muestra en la Tabla 12. De forma consistente con el análisis del cambio desde la línea de base, hay una disminución a lo largo del tiempo en el % de la lesión representado por CNV, lo que indica la eficacia de Cand5 en la reducción del tamaño de la CNV basada en el porcentaje de la lesión global. Este efecto fue observado para la cohorte de estudio total así como para cualquier tipo de lesión.

Tabla 12: Cambio desde la línea base angiografía de fluoresceína - neovascularización coroidea % de la lesión.

10

Visita	Datos estadísticos	0,2 mg	1,5 mg	3,0 mg	Total
Semana 6 pre-inyección	N	33	39	35	107
	Media	2,79	-2,22	2,23	0,78
	95% CI	-0,56, 6,14	-8,12, 3,68	-1,86, 6,32	-1,91, 3,47
	sd	9,45	18,20	11,90	14,02
	mediana	0,00	0,00	0,00	0,00
	intervalo	-6,5, 34,0	-100,0, 22,0	-14,0, 61,5	-100,0, 61,5
Semana 9	N	31	38	35	104
	Media	-0,45	-4,93	0,44	-1,79
	95% CI	-4,31, 3,41	-13,13, 3,26	-5,97, 6,86	-5,56, 1,99
	sd	10,52	24,94	18,68	19,41
	mediana	0,00	0,00	0,00	0,00
	intervalo	-34,5, 23,5	-100,0, 28,5	-69,5, 55,5	-100,0, 55,5
Semana 12	N	29	37	35	101
	Media	1,03	-16,24	-1,74	-6,26
	95% CI	-6,21, 8,28	-28,22, -4,26	-11,92, 8,44	-12,26, -0,26
	sd	19,04	35,93	29,64	30,40
	mediana	0,00	0,00	0,00	0,00

	intervalo	-67,5, 43,0	-100,0, 34,5	-100,0, 72,5	-100,0, 72,5
Semana 15	N	23	33	28	84
	Media	-14,67	-18,65	-8,46	-14,17
	95% CI	-29,19, -0,16	-32,02, -5,28	-20,52, 3,59	-21,62, -6,71
	sd	33,56	37,71	31,09	34,36
	mediana	-2,00	0,00	0,00	0,00
	intervalo	-100,0, 23,5	-100,0, 34,5	-74,5, 55,5	-100,0, 55,5
Semana 18	N	19	24	18	61
	Media	-14,45	-26,96	-4,61	-16,47
	95% CI	-28,68, -0,22	-43,73, -10,18	-19,76, 10,54	-25,40, -7,53
	sd	29,52	39,72	30,47	34,88
	mediana	0,00	0,00	0,00	0,00
	intervalo	-100,0, 16,5	-100,0, 9,0	-67,0, 60,0	-100,0, 60,0

N = número de sujetos con datos disponibles.

- Resumen y discusión. El Cand5 puede actuar silenciando la expresión de VEGF, pero no es un antagonista de VEGF y no tiene acción sobre la proteína VEGF previamente producida. En sujetos con ARMD húmeda, los niveles crecientes de VEGF en circulación en varios tejidos del ojo continúan favoreciendo la neovascularización y la permeabilidad vascular en ausencia de producción de nuevo VEGF, hasta que la producción de proteína es recambiada por la unión del receptor y/o procesos catabólicos naturales. La eficacia de Cand5 en la inhibición de la producción de VEGF puede no manifestarse inmediatamente hasta que ocurre este “recambio” (“turnover”) de la proteína. A medida que esta población de proteína VEGF extracelular se recambia, la nueva producción de VEGF sería inhibida por Cand5.
- Así pues, el análisis del cambio desde las 3 semanas a las 12, 15 y 18 semanas para cada resultado clave puede representar una ventana de tiempo más relevante farmacológicamente para observar la eficacia de Cand5. Este análisis asume el recambio y la degradación del VEGF extracelular presente en los tejidos retinianos en aproximadamente 3 semanas, aun cuando esto no ha sido establecido de un modo definitivo.
- Aunque no se identificaron diferencias significativas entre grupos, hay varias tendencias importantes en resultados clave que son dignas de atención. Concretamente, la agudeza visual a distancia era estable desde la línea de base hasta la Semana 12 en aproximadamente el 78% de los sujetos de estudio: esto aumentó a aproximadamente el 83% de la cohorte de estudio cuando se considera el periodo de la Semana 3 a la Semana 15. Esta estabilización de la agudeza visual del 83% se mantuvo a través de la visita de la Semana 18, que fue 12 semanas desde el último tratamiento con Cand5.
- El tamaño de la CNV cambió tan solo mínimamente en este periodo de la semana 18, lo que sugiere estabilización de la lesión. Es importante indicar que se observó un claro efecto de la dosis en el tamaño de la lesión de la CNV, en donde el crecimiento del tamaño de la CNV era el mayor en la dosis de 0,2 mg de Cand5, algo más bajo en el grupo de 1,5 mg, y mínimo en los ojos tratados con Cand5 a una dosis de 3,0 mg. Se ha indicado que VEGF es tanto necesario como suficiente para el desarrollo de CNV en modelos con animales, y por tanto es de esperar que CNV sea el componente más respondedor a VEGF de la lesión. Así pues, este resultado es un marcador particularmente apropiado para el efecto de Cand5. Aunque la diferencia entre el cambio en el tamaño de la CNV no era estadísticamente significativa desde la línea de base a la Semana 12 ($p = 0,0582$), es de esperar que esto sería mejor demostrado cuando se investiga en una población mayor.
- Estos hallazgos en la agudeza visual y la estabilización del tamaño de la CNV son particularmente notables dadas las características de la población de estudio con relación al tipo de lesión de CNV. Para permitir la evaluación de la eficacia de Cand5 después de 12 semanas de tratamiento, fueron inscritos sujetos con enfermedad agresiva. La cohorte de estudio comprendió el 64% de lesiones predominantemente clásicas y el 36% de lesiones mínimamente clásicas; los sujetos con enfermedad oculta fueron excluidos de la inscripción. Se requería que las lesiones mínimamente clásicas fuesen activas, y sobre los 3 meses antes de la inscripción se requería un aumento en el tamaño de la lesión de $\geq 10\%$ o una pérdida de ≥ 1 línea de BCDVA. Finalmente, se permitieron tratamientos previos múltiples, es decir, hasta dos inyecciones de Macugen®, una inyección de triamcinolona, y un tratamiento con PDT.

5 En este estudio, el 24% de los sujetos había sido tratado previamente de ARMD en su ojo de estudio. Es interesante observar que el 21% de las lesiones fueron identificadas como poseedoras de características de proliferación angiomasosa retiniana (retinal angiomatous proliferation: RAP) que determina el Digital Angiography Reading Center (centro de lectura de angiografías digitales). La incidencia imprevista de lesiones de RAP altamente agresivas condujo a la introducción de una estratificación de aleatorización adicional en el curso de este estudio. A pesar de esta población severamente afectada, el Cand5 parecía tener eficacia en todos los grupos de dosis.

Puede llegarse a la conclusión de que Cand5 es seguro y eficaz a dosis de hasta 3,0 mg administrados mediante inyección intravítrea.

10 Basándose en lo que antecede, se expone también que puede ser ventajoso combinar la administración de Cand5 con una segunda terapia. Por ejemplo, una terapia inicial aguda consistente en la administración de Lucentis sobre una base mensual durante los 3 primeros meses o más, y la administración de Cand5 como terapia de mantenimiento, que no parece afectar al VEGF pre-existente.

Ejemplo 4 - Interferencia *in vivo* de RNA del VEGF en seres humanos con DME usando siRNA anti-VEGF.

15 Diseño del estudio. Cuarenta y ocho (48) sujetos fueron aleatorizados para tratamiento con Cand5 a 0,2 mg (18), a 1,5 mg (12) y a 3,0 mg (18). Las inyecciones fueron administradas con cuatro semanas de separación, el Día 0, Semana 4 y Semana 8. Los sujetos tenían al menos 21 años de edad y estaban diagnosticados de diabetes de Tipo 1 o de Tipo 2. El ojo o los ojos de los sujetos tenían edema macular implicando el centro de la mácula en la OCT de al menos 250 micrómetros o más en el subcampo central, sin evidencia de etiología fraccional, y CSME en el examen oftalmoscópico, una agudeza visual mejor corregida con puntuaciones de letras entre 0,69 y 24 y equivalente de Snellen (20/40 - 20/230). Los pacientes fueron excluidos si tenían fallo renal crónico, estatus médico inestable (HbA1C de más del 10%), PRP dentro de 12 semanas de inclusión o RPR previsto, laser focal dentro de 12 semanas de inclusión o uso de esteroides dentro de los 6 meses de inclusión.

20 La edad de la línea de base era 62,7 años, 56% de hembras y 44% de varones, 70% caucásicos y 30% no caucásicos. En el ojo contralateral, el 76,7% tenía DME y el 23,3% no tenía DME. La agudeza visual media era 57,3 letras (20/63). Usando la escala de gravedad de la enfermedad de retinopatía diabética clínica internacional 6 eran ligeramente no proliferantes, 18 eran moderadamente no proliferantes, 8 eran severamente no proliferantes y 16 eran proliferantes.

30 Se tomaron muestras a los 30 minutos, 3 horas y 24 horas después de la inyección intravítrea. Ninguna muestra de plasma contenía niveles detectables de Cand5. El punto final primario de la eficacia era el cambio del espesor de la OCT a las 12 semanas y el punto final secundario de la eficacia era el cambio de la agudeza visual a las 12 semanas. El punto final primario (OCT) se midió como el cambio del espesor de la retina comparado con el espesor medio en el subcampo central. El cambio medio desde la línea base a las 12 semanas, después de 3 dosis fue -8,9 μm (intervalo de -547 μm a 310 μm), que se representa con más detalle en la Figura 9. El punto final secundario fue analizado como el cambio medio de la agudeza corregida en letras. El cambio medio desde la línea de base a las 12 semanas, después de 3 dosis fue 0,1 letras (intervalo de -39 letras a 21 letras), que se representa con más detalle en la Figura 10.

40 El Cand5 es seguro y bien tolerado en pacientes con DME. A los tres meses, después de 3 dosis, hubo un cambio mínimo en el espesor medio de OCT y en la agudeza visual, aun cuando subconjuntos de pacientes soportaron bien un efecto biológico en DME. Como se observa en AMD, no parecen conseguirse *pools* de VEGF extracelular preexistentes pero la producción de nuevo VEGF se inhibe. El efecto último de los puntos finales, por tanto, necesita tiempo para ser observado.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Reich, Samuel Jotham
 - 5 <120> Composiciones y métodos para la inhibición de la angiogénesis por siRNA
 - <130> 129402.01302
 - <140> Aún no asignada
 - 10 <141> 12-06-2007
 - <150> US 60/804, 500
 - <151> 12-06-2006
 - 15 <150> US 60/824, 972
 - <151> 08-09-2006
 - <150> us 60/864, 440
 - <151> 06-11-2006
 - 20 <160> 85
 - <170> Patent In versión 3.3
 - 25 <210> 1
 - <211> 2250
 - <212> DNA
 - <213> Mus musculus
 - 30 <400> 1
- | | | | | | | | |
|----|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| | tgagccaggc | tggcaggaag | gagcctccct | cagggtttcg | ggaaccagac | ctctcaccgg | 60 |
| | aaagaccgat | taaccatgct | accaccacgc | catcatcgtc | accgttgaca | gaacagtccct | 120 |
| | taatccagaa | agcctgacat | gaaggaagag | gagactcttc | gaggagcact | ttgggtccgg | 180 |
| | agggcgagac | tccggcagac | gcattcccgg | gcaggtgacc | aagcacggtc | cctcgtggga | 240 |
| | ctggattcgc | cattttctta | tatctgctgc | taaatcgcca | agcccggaag | attagggttg | 300 |
| | tttctgggat | tcctgtagac | acaccaccc | acatacacac | atatatatat | attatatata | 360 |
| | taaataaata | tataigtttt | atatataaaa | tatatataata | ttcttttttt | taaattaact | 420 |
| | ctgctaattg | tattgggtgc | ttcactggat | atgtttgact | gctgtggact | tgtgttggga | 480 |
| | ggaggatgct | ctcactcggg | tgccgacatg | ggagacaatg | ggatgaaagg | cttcagtgtg | 540 |
| | gtctgagaga | ggccgaagtc | cttttgctcg | ccggggagca | agcaaggcca | gggcacgggg | 600 |
| | gcacattggc | tcacttccag | aaacacgaca | aaccatttcc | tggccctgag | tcaagaggac | 660 |
| | agagagacag | atgatgacac | agaaaagat | aaagatgccg | gttccaacca | gaagtttggg | 720 |
| | gagcctcagg | acatggcatg | ctttgtggat | ccccatgata | gtctacaaaa | gcaccccgcc | 780 |
| | cctctgggca | ctgcctggaa | gaatcgggag | cctggccagg | cttcagctcg | ctcctccact | 840 |
| | tctgaggggc | ctaggaggcc | tcccacaggt | gtcccggcaa | gagaagacac | ggtggtggaa | 900 |
| | gaagaggcct | ggtaatggcc | cctcctcctg | ggacccttc | gtcctctcct | taccccaact | 960 |
| | cctgggtaca | gcccaggagg | accttgtgtg | atcagaccat | tgaaccact | aattctgtcc | 1020 |
| | ccaggagact | tggctctgtg | tgtgagtggc | ttacccttcc | tcactctccc | ttccaagggc | 1080 |
| | acagagcaat | ggggcaggac | ccgcaagccc | ctcacggagg | cagagaaaag | agaaagtgtt | 1140 |
| | ttatatacgg | tacttattta | atagcccttt | ttaattagaa | attaaaaacag | ttaatttaat | 1200 |
| | taaagagtag | ggtttttttc | agtattcttg | gttaataatt | aatttcaact | atztatgaga | 1260 |
| | tgtatctctc | gctctctctt | atttgtactt | atgtgtgtgt | gtgtgtgtgt | gtgtgtgtgt | 1320 |
| | gtgtgtgtgt | gtatgaaatc | tgtgtttcca | atctctctct | cccagatcgg | tgacagtcac | 1380 |
| | tagcttgtcc | tgagaagata | tttaattttg | ctaacactca | gctctgccct | cccttgtccc | 1440 |
| | caccacacat | tcctttgaaa | taaggtttca | atatacattt | acatactata | tatatatttg | 1500 |
| | gcaacttgtg | ttgtatata | aatatataata | tatatatag | tttatgtata | tatgtgattc | 1560 |
| | tgataaaaata | gacattgcta | ttctgttttt | tatatgtaaa | aacaaaaaa | gaaaaataga | 1620 |
| | gaattctaca | tactaaatct | ctctcctttt | tttaattttaa | tatttgttat | catttattta | 1680 |
| | ttgggtgctac | tgtttatccg | taataattgt | gggggaaaaa | gatattaaca | tcacgtcttt | 1740 |
| | gtctctagag | cagttttccg | agatattccg | tagtacatat | ttatttttaa | acagcaacaa | 1800 |
| | agaaatacag | atatacttta | aaaaaaaaagc | atttgtatt | aaagaattga | attctgatct | 1860 |
| | caaagctctc | cctggctctc | ccttctctcc | tgggccctcc | tgtctcgctt | tccctctctc | 1920 |
| | tttggggtag | atagtttttg | tcttaggttt | gagaagcagt | ccctggagta | gaatatgggg | 1980 |
| | tgaccatcc | attcctgggc | ggaggggaga | tggctccttt | gcccaagggtc | ctcacactac | 2040 |
| | gtggtactct | gttccttgtc | agacaaggat | gggggcatgt | ctccaggtgc | taactggaga | 2100 |
| | tcggagagag | ctgttgctg | cagctggcca | ggatttgggc | atgcccggga | catgggaggc | 2160 |
| | tgtgagccca | gcattgcagt | tacttctggg | tgtctaaatg | aagagtcacg | taaaaagagt | 2220 |
| 35 | cttgcctcatg | ggattccatt | ccgctttgtg | | | | 2250 |

<210> 2
 <211> 444
 <212> DNA
 5 <213> Homo sapiens

<400> 2
 atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgctt tgctgtctta cctccaccat 60
 gccaaagtgg cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120
 gtgaagtcca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctgggtggac 180
 atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgcccctg 240
 atgcatgacg ggggctgctg caatgacgag ggcctggagt gtgtgcccac tgaggagtcc 300
 aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg 360
 agcttctctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa 420
 aaatgtgaca agccgaggcg gtga 444

10 <210> 3
 <211> 576
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

15 <400> 3
 atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgctt tgctgtctta cctccaccat 60
 gccaaagtgg cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120
 gtgaagtcca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctgggtggac 180
 atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgcccctg 240
 atgcatgacg ggggctgctg caatgacgag ggcctggagt gtgtgcccac tgaggagtcc 300
 aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg 360
 agcttctctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa 420
 aatcctctgt ggccttgctc agagcggaga aagcatttgt ttgtacaaga tccgcagacg 480
 tgtaaatggt cctgcaaaaa cacagactcg cgttgcaagg cgaggcagct tgagttaaac 540
 gaacgtactt gcagatgtga caagccgagg cggatga 576

<210> 4
 <211> 648
 <212> DNA
 20 <213> Homo sapiens

<400> 4
 atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgctt tgctgtctta cctccaccat 60
 gccaaagtgg cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120
 gtgaagtcca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctgggtggac 180
 atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgcccctg 240
 atgcatgacg ggggctgctg caatgacgag ggcctggagt gtgtgcccac tgaggagtcc 300
 aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg 360
 agcttctctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa 420
 aaaaaatcag ttcgaggaaa gggaaagggg caaaaaagaa agcgaagaa atcccggat 480
 aagtcttggg gcgttccctg tgggccttgc tcagagcggg gaaagcattt gtttgcataa 540
 gatccgcaga cgtgtaaatg ttcctgcaaa aacacagaat cgcgttgcaa ggcgaggcag 600
 cttgagttaa acgaacgtac ttgcagatgt gacaagccga ggcggtga 648

25 <210> 5
 <211> 670
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30 <400> 5
 gccttgctgc tctacctcca ccatgccaaag tgggtcccagg ctgcacccat ggcagaagga 60
 ggagggcaga atcatcacga agtgggtgaa ttcatggatg tctatcagcg cagctactgc 120
 catccaatcg agacccttgc ggacatcttc caggagtacc ctgatgagat cgagtacatc 180
 ttcaagccat cctgtgtgct cctgatgcga tgcgggggct gctgcaatga cgagggcctg 240
 gagtgtgtgc ccactgagga gtccaacatc acctgcaga ttatgctgat caaacctcac 300
 caaggccagc acataggaga gatgagcttc ctacagcaca acaaatgtga atgcagacca 360
 aagaaggata gagcaagaca agaaaaaaaaa tcagttcgag gaaagggaaa ggggcaaaaa 420
 cgaaagcgca agaaatcccc gtataagtcc tggagcgttt acgttgggtc ccgctgctgt 480
 ctaatgccct ggagcctccc tggcccccat ccctgtgggc cttgctcaga gcggagaaag 540
 catttgtttg tacaagatcc gcagacgtgt aaatgttctt gcaaaaacac agactcgcgt 600
 tgcaaggcga ggcagcctga gttaaacgaa cgtacttgca gatgtgacaa gccgaggcgg 660
 tgatgaatga 670

35 <210> 6

<211> 1137
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5 <400> 6

```

atgctcattg tccagactgg ggtcagatca gcaaacaaag ggctctgat ggtgattggt 60
gaatattgca aatatggaaa tctatccaac tacctcaaga gcaaatatga cttatttttt 120
ctcgacaagg atgtggcatc acacatggag cgtaagaaag aaaaaatgga gccaggcctg 180
gaacaaggca agaaaccaaa actagatagc atcaccagca gcgagagctt tgggagctcc 240
aagtttcagg aagataaaaa tctgagtgat gttgaggaaag aggaggattc tgatggtttc 300
taccaggagc ccatcactat ggaagatctg atttcttaca gttttcaagt ggccagaggc 360
atgaagtttc tgtcttcagg aaagtgcatt cattgggacc tggcagcaag aaacattctt 420
ttatctgaga acaatgtggt gaagatttgt gattttggcc ttgccagga tatttacaag 480
aacgccgatt atgtgagaaa aggagggtgg tctccatacc caggagtgca aatggatgag 540
cacttctgca gttgcctgag ggaaggcatg aggatgagag ctgctgagta ctccactcct 600
gaaatctatc agatcatgct ggactgcagg cacaagacc caaaagaaa gccaagattt 660
gcagaacttg tggaaaaaact agaaaatagt gggtttacct actcaactcc tgccttctct 720
gaggacttct tcaaggaagg tatttccagct cccaagttta gttcaggaag ctctgatgat 780
gtcagatcac taaatgcttt caagttcatg agcctggaaa gaatcaaac ctttgaagaa 840
cttttgcaa atgccacctc catgtttgat gactaccagg gggacagcag cgctctgctg 900
gcctctcca tgctgaagcg cttcaccagg actgacagca aaccaaggc ctgctcaag 960
attgacttga gactaacctg caaaagtaag aagtctgggc ttctgatgt cagcaggccc 1020
agtttctgcc attccaacag tgggcacatc agcaaaaggca agggcagggt cacctacgac 1080
aacgccgagc tggaaaggaa gacggcgtgc tgctccccgc ccctctggga gttgtag 1137
    
```

<210> 7
 <211> 5830
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10 <400> 7

```

actgagtcct gggaccctcg gagagcggtc agtgtgtggt cgctgcgttt cctctgcctg 60
cgccgggcat cacttgctgc ccgcagaaaag tccgtctggc agcctggata tcctctccta 120
ccggcaccctc cagacgcctcc ggtcggcgcc gggctccct agcctgtgct 180
gctcaactgt cctgcgctgc ggggtgccgc gagttccacc tccgcgcctc cttctctaga 240
caggcgctgg gagaaagaac cggctcccga gttctgggca ttctgcccgg ctcgagggtgc 300
aggatgcaga gcaagggtgct gctggccgct gccctgtggc tctgcgtgga gaccggggcc 360
gcctctgtgg gtttgcttag tgtttctctt gatctgcca ggctcagcat acaaaaagac 420
atacttacia ttaaggctaa tacaactctt caaattactt gcaggggaca gagggacttg 480
gactggcttt ggcccaataa tcagagtggc agtgagcaaa ggggtggagg gactgagtgct 540
agcgatggcc tcttctgtaa gacactcaca attccaaaag tgatcggaaa tgactctgga 600
gcctacaagt gcttctaccg ggaactgac ttggcctcgg tcatttatgt ctatgttcaa 660
gattacagat ctccatttat tgcttctggt agtgaccaac atggagtcgt gtacattact 720
gagaacaaaa acaaaactgt ggtgatcca tgtctcgggt ccatttcaa tctcaacgtg 780
tcactttgtg caagataccc agaaaagaga ttgttctctg atggtaacag aatttctctg 840
gacagcaaga agggctttac tattcccagc tacatgatca gctatgctgg catggctctc 900
tgtgaagcaa aaattaatga tgaaagttac cagtctatta tgtacatagt tgtcgttgta 960
gggtatagga tttatgatgt ggttctgagt ccgtctcatg gaattgaact atctgttggga 1020
gaaaagcttg tcttaaatgt tacagcaaga actgaactaa atgtgggat tgacttcaac 1080
tgggaatacc ctcttcgaa gcatcagcat aagaaacttg taaaccgaga cctaaaaaac 1140
cagtctggga gtgagatgaa gaaattttg agcacctaa ctatagatgg tgtaaccctg 1200
agtgaccaag gattgtacac ctgtgcagca tccagtgggc tgatgaccaa gaagaacagc 1260
acatttctca ggttccatga aaaacctttt gttgctttg gaagtggcat ggaatctctg 1320
gtggaagcca cgggtgggga gcgtgtcaga atccctgcga agtaccttgg ttaccacccc 1380
ccagaaataa aatggtataa aaatggaata ccccttgagt ccaatcacac aattaaagcg 1440
gggcatgtac tgacgattat ggaagtgagt gaaagagaca caggaaatta cactgtcatc 1500
cttaccatc ccatttcaaa ggagaagcag agccatgtgg tctctctggt tgtgtatgct 1560
ccacccaga ttggtgagaa atctctaact tctcctgtgg attcctacca gtacggcacc 1620
actcaaacgc tgacatgtac ggtctatgcc attcctccc cgcacacat ccactggtat 1680
tggcagttgg aggaagagtg cgccaacgag cccagccaag ctgtctcagt gacaaaacca 1740
tacccttctg aagaatggag aagtgtggag gacttcagag gaggaataa aattgaagtt 1800
aataaaaatc aatttctctt aattgaaagg aaaaacaaaa ctgtaagtac cctgtttatc 1860
    
```

15

caagcggcaa atgtgtcagc tttgtacaaa tgtgaagcgg tcaācaaagt cgggagagga 1920
gagaggggtga tctccttcca cgtgaccagg ggtcctgaaa ttactttgca acctgacatg 1980
cagcccactg agcaggagag cgtgtctttg tgggtgactg cagacagatc tacgtttgag 2040
aacctcacat ggtacaagct tggcccacag cctctgcca tccatgtggg agagttgccc 2100
acacctgttt gcaagaactt ggatactctt tggaaattga atgccaccat gttctcta 2160
agcacaaatg acattttgat catggagcct aagaatgcat ccttgcagga ccaaggagac 2220
tatgtctgcc ttgtccaaga agtgaagacc aagaaaagac attgctggt caggcagctc 2280
acagtcctag agcgtgtggc acccagatc acaggaacc tggagaatca gacgacaagt 2340
attgggggaaa gcatcgaagt ctcatgcacg gcatctggga atccccctcc acagatcatg 2400
tggtttaaag ataatgagac cctttagaa gactcaggca ttgtattgaa ggatgggaac 2460
cggaaacctca ctatccgag gaaaggaag agtgaagaa gaggacgaag gcctctacac ctgcccaggca 2520
tgcatgtttc ttggctgtgc aaaagtggag gcaattttca taatagaagg tgcccaggaa 2580
aagacgaact tggaaatcat tattctagta ggcacggcgg tgattgccat gttcttctgg 2640
ctacttcttg ctatcatcct accgaccgtt aagcgggcca atggagggga actgaagaca 2700
ggctacttgt ccatcgtcat ggatccagat gaactcccat tggatgaaca ttgtgaacga 2760
ctgcccattg atgccagcaa atgggaattc cccagagacc ggctgaagct aggtaaagcct 2820
cttggccgtg gtgccttgg ccaagtgatt gaagcagatg cctttggaat tgacaagaca 2880
gcaacttgca ggacagtagc agtcaaaatg ttgaaagaag gagcaacaca cagtgagcat 2940
cgagctctca tgtctgaact caagatcctc attcataatg gtcaccatct caatgtggtc 3000
aaccttctag gtgcctgtac caagccagga gggccactca tgggtgattg ggaattctgc 3060
aaatttggaa acctgtccac ttacctgag agcaagagaa atgaatttgt cccctacaag 3120
accaaagggg cacgattccg tcaagggaaa gactacgttg gagcaatccc tgggatctg 3180
aaacggcgct tggacagcat caccagtagc cagagctcag ccagctctg atttgtggag 3240
gagaagctcc tcaagtgtg agaagaagag gaagctcctg aagatctgta taaggacttc 3300
ctgaccttgg agcatctcat ctgttacagc ttccaagtgg ctaagggcat ggagttctg 3360
gcatcgcgaa agtgtatcca cagggacctg gcggcacgaa atatcctctt atcggagaag 3420
aacgtggtta aatctgtga ctttggcctg gccccgggata ttataaaga tccagattat 3480
gtcagaaaag gagatgtctg cctccctttg aaatggatgg ccccagaaac aatttttgac 3540
agagtgtaca caatccagag tgacgtctgg tcttttggtg ttttgcctg ggaatatatt 3600
tccttagtgg ctctccata tcctgggata aagattgatg aagaatttgg taggctgattg 3660
aaagaaggaa ctagaatgag ggcccctgat tatactacac cagaaatgta ccagaccatg 3720
ctggactgct ggcacgggga gccagctcag agaccacagt ttccagagtt ggtggaacat 3780
ttgggaaatc tcttgaagc taatgctcag caggatggca aagactacat tgttctccg 3840
atatcagaga ctttagcat ggaagaggat tctggactct ctctgcctac ctacactgtt 3900
tcctgtatgg aggaggagga agtatgtgac cccaaattcc attatgacaa cacagcagga 3960
atcagtcagt atctgcagaa cagtaagcga aagagccggc ctgtgagtgt aaaaacattt 4020
gaagatattc atctagaaga accagaagta aaagtaatcc cagatgacaa ccagacggag 4080
agtggatagg ttcttgctc agaagagctg aaaactttgg aagacagaac caaattatct 4140
ccatcttttg gtggaatggt gccagcaaa agcagggagt ctgtggcatc tgaaggctca 4200
aacacagaca ggcctatcca cctccgatat cactccgatg acacagacac caccgtgtac 4260
tccagtgagg aagcagaact ttaaaagctg atagagatg gagtgcaaac cggtagaca 4320
gccagattc tccagcctga ctccggggacc acactgagct ctctcctgt ttaaaaggaa 4380
gcataccacac ccaactccc ggacatcaca tgagaggtct gctcagattt tgaagtgttg 4440
ttctttccac cagcaggaag tagccgcat tgattttcat ttcgacaaca gaaaaggac 4500
ctcggactgc agggagccag tcttctaggc atatcctgga agaggttgt gacccaagaa 4560
tgtgtctgtg tcttctcca gtgttgacct gatcctctt tttcattcat ttaaaaagca 4620
ttatcatgcc cctgctcggg gtctcaccat gggtttagaa caaagagctt caagcaatgg 4680
ccccatctc aaagaagtag cagtacctgg ggagctgaca cttctgtaaa actagaagat 4740
aaaccaggca acgtaagtgt tcgaggtgtt gaagatggga aggatttgca gggctgagtc 4800
tatccaagag gctttgtta ggacgtgggt cccaagccaa gccttaagtg tggaattcgg 4860
attgatagaa aggaagacta acgttacctt gctttggaga gtactggagc ctgcaaatgc 4920
attgtgtttg ctctgggtgga ggtgggcatg gggctgttc tgaatgtaa agggttcaga 4980
cggggtttct gtttttagaa ggttgcgtgt tcttcgagtt gggctaaagt agagttcgtt 5040
gtgctgtttc tgactcctaa tgagagttcc tccagaccg ttagctgtct cttgccaag 5100
ccccaggaag aaaatgatgc agctctggct ccttgtctcc caggctgatc ctttattcag 5160
aataccacaa agaaaggaca ttcagctcaa ggcctctgac cgtgttgaag agttctgact 5220
gcacaaacca gcttctggtt tcttctggaa tgaataacct catatctgtc ctgatgtgat 5280
atgtctgaga ctgaaatgagg gaggttcaat gtgaagctgt gtgtgggtgc aaagtttcag 5340
gaaggatttt acccttttgg tcttccccct cctcccaacc cactctcacc ccgcaaccga 5400
tcagtatttt agttatttgg cctctactcc agtaaacctg attgggtttg ttcactctct 5460
gaatgattat tagccagact tcaaaattat tttatagccc aaattataac atctattgta 5520
ttatttagac tttaacata tagagctatt tctactgatt tttgccctg ttctgtcctt 5580
ttttcaaaa aagaaaatgt gtttttggtt ttgtaccata gtgtgaaatg ctgggaacaa 5640
tgactataag acatgctatg gcacatatat ttatagtctg tttatgtaga aacaaatgta 5700
atatattaaa gccttatata taatgaactt tgtactattc acattttga tcagtatatt 5760
gtagcataac aaaggtcata atgctttcag caattgatgt cattttatta aagaacattg 5820
aaaaacttga

<210> 8
<211> 19
5 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana

10 <400> 8

tcatcacgaa gtggtgaag 19
 <210> 9
 <211> 21
 5 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena sentido
 10
 <400> 9
 ucaucacgaa guggugaagu u 21
 <210> 10
 <211> 21
 15 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena antisentido
 20
 <400> 10
 cuucaccacu ucgugaugu u 21
 25 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cadena sentido
 <221> misc_RNA
 <222> (1) ... (19)
 <223> ribonucleótido
 35 <221> característica miscelánea
 <222> (20) ... (21)
 <223> desoxiribonucleótido
 <400> 11
 40 ucaucacgaa guggugaagt t 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena antisentido
 <221> misc_RNA
 50 <222> (1) ... (19)
 <223> ribonucleótidos
 <221> característica miscelánea
 <222> (20)...(21)
 <223> desoxiribonucleótidos
 55
 <400> 12
 cuucaccacu ucgugaugat t 21
 <210> 13
 60 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>

	<223> Secuencia diana	
5	<400> 13 aacgtacttg cagatgtgac a	21
	<210> 14 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia diana	
15	<400> 14 gttcatggat gtctatcag	19
	<210> 15 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia diana	
25	<400> 15 tcgagaccct ggtggacat	19
	<210> 16 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencia diana	
35	<400> 16 tgacgagggc ctggagtgt	19
	<210> 17 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Secuencia diana	
45	<400> 17 tgacgagggc ctggagtgt	19
	<210> 18 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencia diana	
55	<400> 18 catcacatg cagattatg	19
	<210> 19 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
60		

	<220> <223> Secuencia diana	
5	<400> 19 acctcaccaa ggccagcac	19
10	<210> 20 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 20 ggccagcaca taggagaga	19
20	<210> 21 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 21 caaatgtgaa tgacagacca	19
30	<210> 22 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencia diana	
40	<400> 22 atgtgaatgc agaccaaag	19
45	<210> 23 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 23 tgacagaccaa agaaagata	19
55	<210> 24 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 24 agaaagatag agcaagaca	19
	<210> 25 <211> 19	

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Secuencia diana

 <400> 25
 gaaagataga gcaagacaa 19

 10 <210> 26
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Secuencia diana

 <400> 26
 gatagagcaa gacaagaaa 19

 20 <210> 27
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Secuencia diana

 <400> 27
 30 gacaagaaaa tccctgtgg 19

 <210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia diana

 <400> 28
 40 gaaaatccct gtggcctt 19

 <210> 29
 <211> 19
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia diana

 <400> 29
 50 aatccctgtg ggccttgct 19

 <210> 30
 <211> 19
 <212> DNA
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Secuencia diana

 <400> 30
 tccctgtggg ccttgctca 19

<210> 31
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia diana
 <400> 31
 10 gcattgttt gtacaagat 19
 <210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia diana
 20 <400> 32
 gatccgcaga cgtgtaaat 19
 <210> 33
 <211> 19
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia diana
 30 <400> 33
 atgttctgc aaaaacaca 19
 <210> 34
 <211> 19
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia diana
 <400> 34
 tggtctgca aaaacacag 19
 <210> 35
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia diana
 <400> 35
 55 aaacacagac tcgcttgc 19
 <210> 36
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Secuencia diana
 <400> 36

ES 2 390 499 T3

	aacacagact cgcgttgca	19
5	<210> 37 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 37 acacagactc gcgttgcaa	19
15	<210> 38 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 38 cacagactcg cgttgcaag	19
25	<210> 39 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 39 ggcgaggcag cttgagtta	19
35	<210> 40 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 40 acgaacgtac ttgcagatg	19
45	<210> 41 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 41 cgaacgtact tgcagatgt	19
55	<210> 42 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Secuencia diana	

	<400> 42 cgctacttgca gatgtgaca	19
5	<210> 43 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia diana	
15	<400> 43 gtgggtcccag gctgcaccc	19
20	<210> 44 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencia diana	
30	<400> 44 ggaggagggc agaatcatc	19
35	<210> 45 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Secuencia diana	
45	<400> 45 gtgggaagt tcatggatg	19
50	<210> 46 <211> 21 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Secuencia diana	
60	<400> 46 aatcatcacg aagtggtgaa g	21
65	<210> 47 <211> 21 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Secuencia diana	
75	<400> 47 aagttcatgg atgtctatca g	21
80	<210> 48 <211> 21 <212> DNA <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Secuencia diana	
5	<400> 48 aatcgagacc ctggtggaca t	21
10	<210> 49 <211> 21 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencia diana	
15	<400> 49 aatgacgagg gcctggagtg t	21
20	<210> 50 <211> 21 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencia diana	
25	<400> 50 aacatcacca tgcagattat g	21
30	<210> 51 <211> 21 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencia diana	
35	<400> 51 aaacctcacc aaggccagca c	21
40	<210> 52 <211> 21 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Secuencia diana	
50	<400> 52 aaggccagca cataggagag a	21
55	<210> 53 <211> 21 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Secuencia diana	
60	<400> 53 aacaatgtg aatgcagacc a	21
60	<210> 54 <211> 21 <212> DNA	

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia diana
 5
 <400> 54
 aaatgtgaat gcagaccaa g 21
 <210> 55
 10 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Secuencia diana
 <400> 55
 aatgcagacc aaagaaagat a 21
 20 <210> 56
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia diana
 <400> 56
 30 aaagaaagat agagcaagac a 21
 <210> 57
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia diana
 <400> 57
 40 aaagaaagata gagcaagaca a 21
 <210> 58
 <211> 23
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia diana
 50 <400> 58
 aagatagagc aagacaagaa aat 23
 <210> 59
 <211> 23
 55 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia diana
 60 <400> 59
 aagacaagaa aatccctgtg ggc 23
 <210> 60

ES 2 390 499 T3

	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia diana	
	<400> 60	
10	aagaaaatcc ctgtggcct tgc	23
	<210> 61	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia diana	
	<400> 61	
20	aatccctgtg ggccttgctc aga	23
	<210> 62	
	<211> 23	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia diana	
	<400> 62	
30	aagcatttgt ttgtacaaga tcc	23
	<210> 63	
	<211> 23	
35	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia diana	
	<400> 63	
40	aagatccgca gacgtgtaaa tgt	23
	<210> 64	
45	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Secuencia diana	
	<400> 64	
	aaatgttctt gcaaaaacac aga	23
55	<210> 65	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Secuencia diana	
	<400> 65	
	aatgttcttg caaaaacaca gac	23

<210> 66
 <211> 23
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia diana

 10 <400> 66
 aaaacacag actcgcgttg caa 23

 <210> 67
 <211> 23
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia diana
 20
 <400> 67
 aaaacacaga ctgcggttg aag 23

 <210> 68
 <211> 23
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia diana
 30
 <400> 68
 aaacacagac tcgcgttgca agg 23

 <210> 69
 <211> 23
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia diana
 40
 <400> 69
 aacacagact cgcgttgcaa ggc 23
 45
 <210> 70
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia diana

 <400> 70
 55 aaggcgaggc agcttgagtt aaa 23

 <210> 71
 <211> 23
 <212> DNA
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia diana

	<400> 71 aaacgaacgt actgcagat gtg	23
5	<210> 72 <211> 23 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 72 aacgaacgta cttgcagatg tga	23
15	<210> 73 <213> 23 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 73 aagtggtccc aggctgcacc cat	23
25	<210> 74 <211> 23 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 74 aaggaggagg gcagaatcat cac	23
35	<210> 75 <211> 23 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 75 aagtggtgaa gttcatggat gtc	23
45	<210> 76 <211> 23 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencia diana	
	<400> 76 aaaatccctg tggccttgc tca	23
55	<210> 77 <211> 21 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
60	<220>	

	<223> Cadena sentido	
	<221> RNA misceláneo	
	<222> (1) ... (19)	
	<223> ribonucleótidos	
5	<221> característica miscelánea	
	<222> (20)...(21)	
	<223> desoxiribonucleótidos	
10	<400> 77 accucaccaa ggccagcact t	21
	<210> 78	
	<211> 21	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cadena antisentido	
	<221> RNA misceláneo	
20	<222> (1)...(19)	
	<223> ribonucleótidos	
	<221> característica miscelánea	
	<222> (20)...(21)	
	<223> desoxiribonucleótidos	
25	<400> 78 gugcuggccu uggugaggut t	21
	<210> 79	
30	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia diana	
	<400> 79 ggctacgtcc agcgacc	18
40	<210> 80	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia diana	
	<400> 80 aaaccucacc aaagccagca c	21
50	<210> 81	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> Secuencia diana	
	<400> 81 aaggaggagg gcagaatcat c	21
60	<210> 82	
	<211> 21	
	<212> DNA	

ES 2 390 499 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia diana	
5	<400> 82	
	aatgtgaatg cagaccaaag a	21
10	<210> 83	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia diana	
	<400> 83	
	aaagcatttg ttgtacaag a	21
20	<210> 84	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Secuencia diana	
	<400> 84	
30	aagatccgca gacgtgtaa t	21
	<210> 85	
	<211> 21	
	<212> DNA	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia diana	
40	<400> 85	
	aaacacacac tcggttgca a	21

REIVINDICACIONES

- 1ª. Un siRNA que comprende una cadena de RNA sentido de SEC ID NO: 77 y una cadena de RNA antisentido de SEC ID NO: 78, para su uso en el tratamiento del edema macular diabético en un sujeto humano.
- 5 2ª. El siRNA para ser usado según la reivindicación 1ª, en el que las cadenas de RNA sentido y antisentido están estabilizadas contra la degradación por nucleasa.
- 3ª. El siRNA para ser usado según la reivindicación 2ª, en el que el siRNA es adecuado para la administración por una vía de administración intraocular, preferentemente en el que la vía de administración intraocular se elige entre la administración intravítrea, intrarretinal, sub-retinal, subtenon, peri- y retro-orbital, transcorneal, y transescleral.
- 10 4ª. El siRNA para ser usado según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, en el que también se administra un antagonista del VEGF.
- 5ª. El siRNA para ser usado según la reivindicación 4ª, en el que el antagonista del VEGF es un anticuerpo monoclonal dirigido a VEGF humano elegido entre bevacizumab y ranibizumab, preferentemente en el que es antagonista del VEGF es ranibizumab.
- 15 6ª. El siRNA para ser usado según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, en el que el siRNA es administrado en una cantidad efectiva de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 5 mg, preferentemente en el que la cantidad efectiva es aproximadamente 2,5 mg.
- 7ª. El siRNA para ser usado según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, en el que el siRNA es para administración una vez cada cuatro semanas.
- 20 8ª. El siRNA para ser usado según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, en el que el siRNA es para administración una vez cada ocho semanas.
- 9ª. El siRNA para ser usado según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, en el que el siRNA es para administración una vez cada doce semanas.
- 25 10ª. El uso de un siRNA que comprende una cadena de RNA sentido de SEC ID NO: 77 y una cadena de RNA antisentido de SEC ID NO: 78 en la elaboración de un medicamento para tratar el edema macular diabético en un sujeto humano.
- 30 11ª. Una combinación de una cantidad efectiva de (i) un antagonista del VEGF y (ii) un siRNA que comprende una cadena de RNA sentido de SEC ID NO: 77 y una cadena antisentido de SEC ID NO: 78, en el que las cadenas de RNA sentido y antisentido forman un RNA dúplex, para ser usada en el tratamiento del edema macular diabético en un sujeto humano.
- 12ª. La combinación para ser usada según la reivindicación 11ª, en la que dicho antagonista del VEGF es para su administración antes o después de la administración del siRNA.
- 13ª. La combinación para ser usada según la reivindicación 11ª, en la que dicho antagonista del VEGF es para su administración simultáneamente con dicho siRNA.
- 35 14ª. La combinación para ser usada según una cualquiera de las reivindicaciones 11ª a 13ª, en la que el siRNA es adecuado para administración por una vía de administración intraocular, preferentemente en la que la vía de administración intraocular se elige entre la administración intravítrea, intrarretinal, sub-retinal, subtenon, peri- y retro-orbital, transcorneal y transescleral.
- 40 15ª. La combinación para ser usada según una cualquiera de las reivindicaciones 11ª a 14ª, en la que el siRNA es administrado en una cantidad efectiva de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 5 mg, preferentemente en la que la cantidad efectiva es aproximadamente 2,5 mg.
- 16ª. La combinación para ser usada según una cualquiera de las reivindicaciones 11ª a 15ª, en la que el antagonista del VEGF es un anticuerpo monoclonal dirigido a VEGF humano elegido entre bevacizumab y ranibizumab, preferentemente en la que el antagonista del VEGF es ranibizumab.
- 45 17ª. La combinación para ser usada según una cualquiera de las reivindicaciones 11ª a 16ª, en la que el siRNA es para administración una vez cada cuatro semanas.
- 18ª. La combinación para ser usada según una cualquiera de las reivindicaciones 11ª a 16ª, en la que el siRNA es para administración una vez cada ocho semanas.

19ª. La combinación para ser usada según una cualquiera de las reivindicaciones 11ª a 16ª, en la que el siRNA es para administración una vez cada doce semanas.

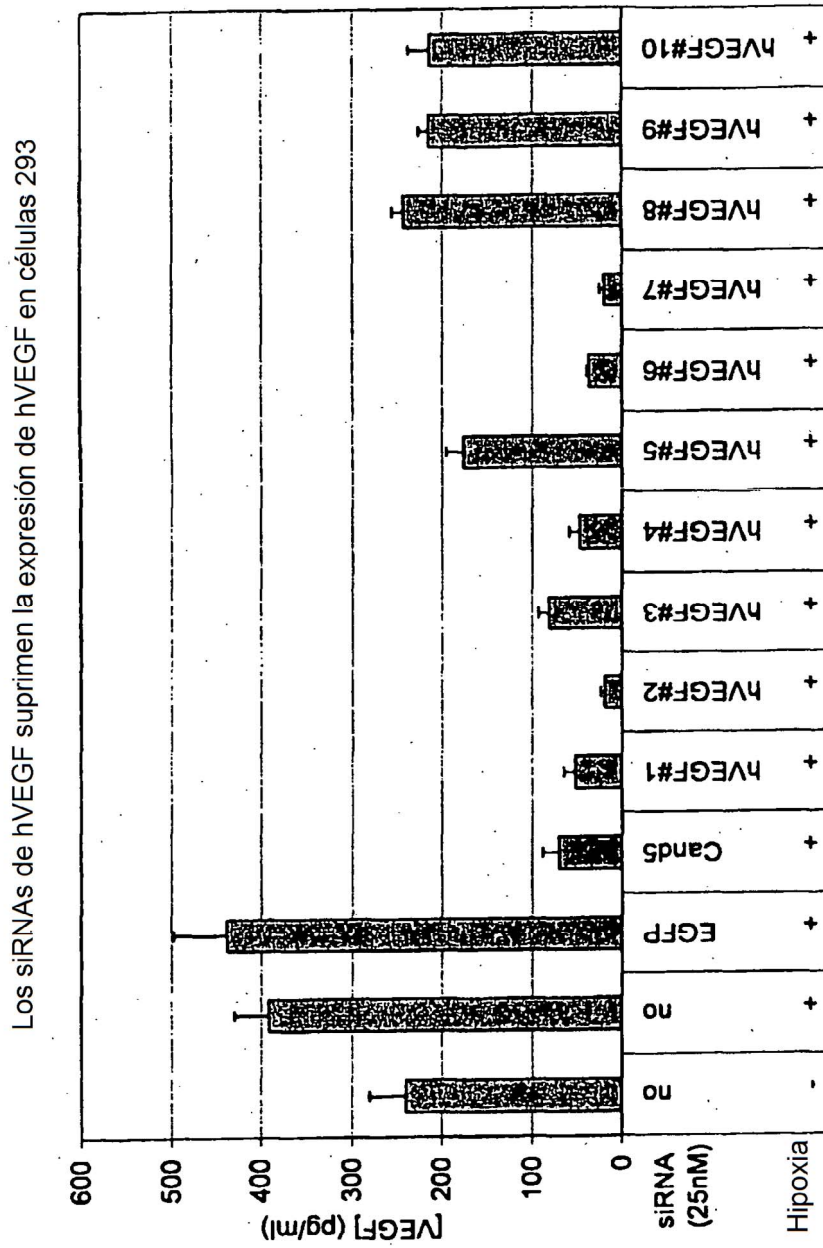


FIG. 1

Los siRNAs de hVEGF suprimen la expresión de hVEGF en células 293

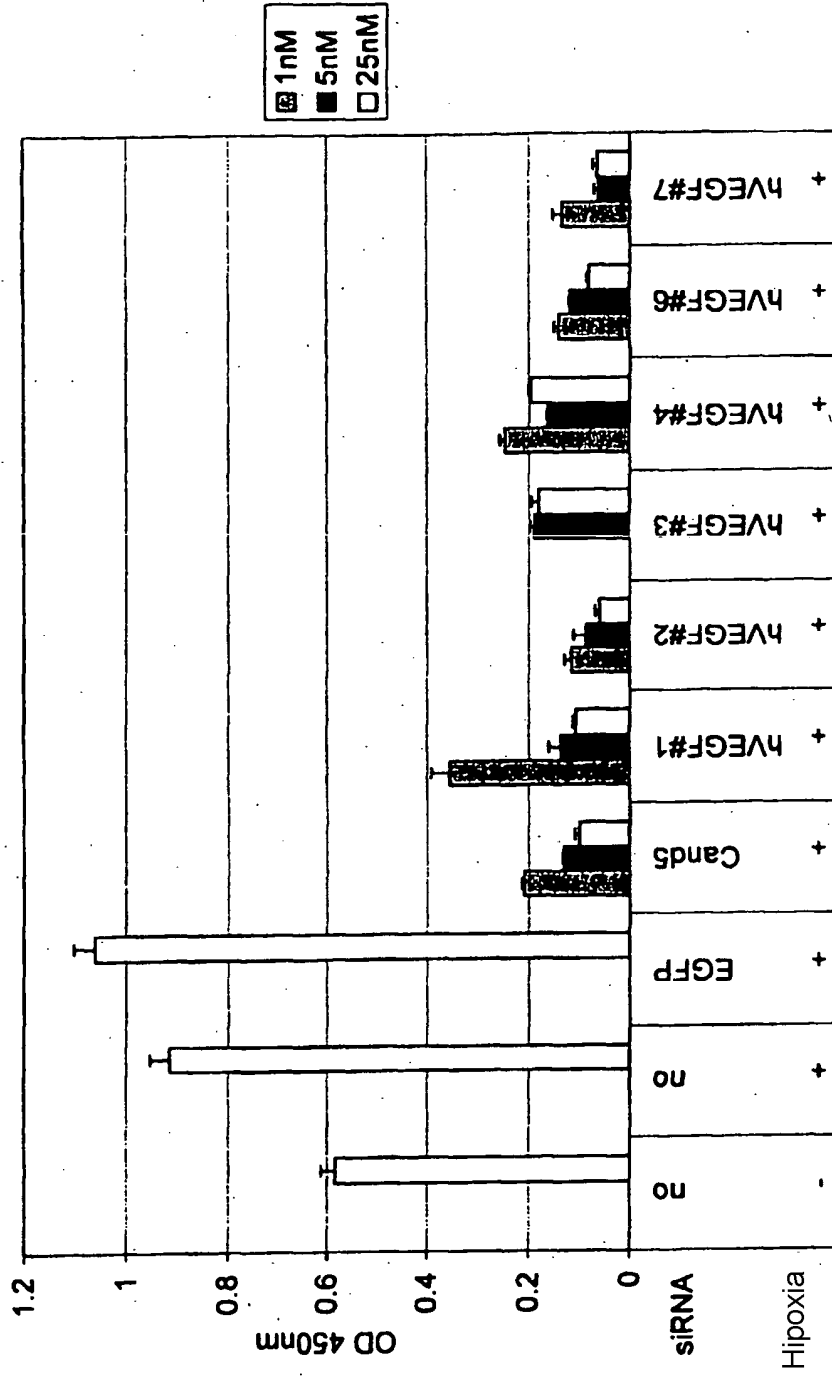


FIG. 2

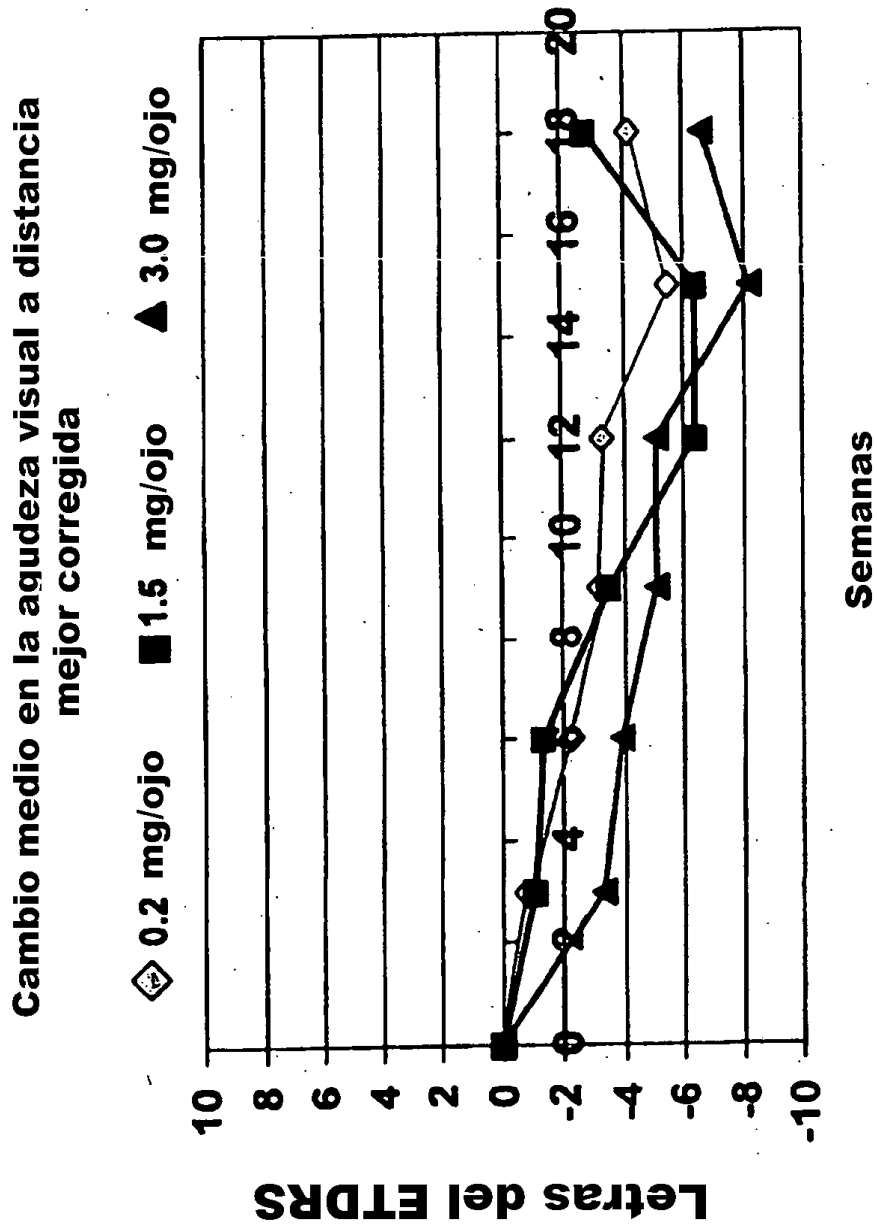


FIG. 3

Análisis respondedor de BCDVA

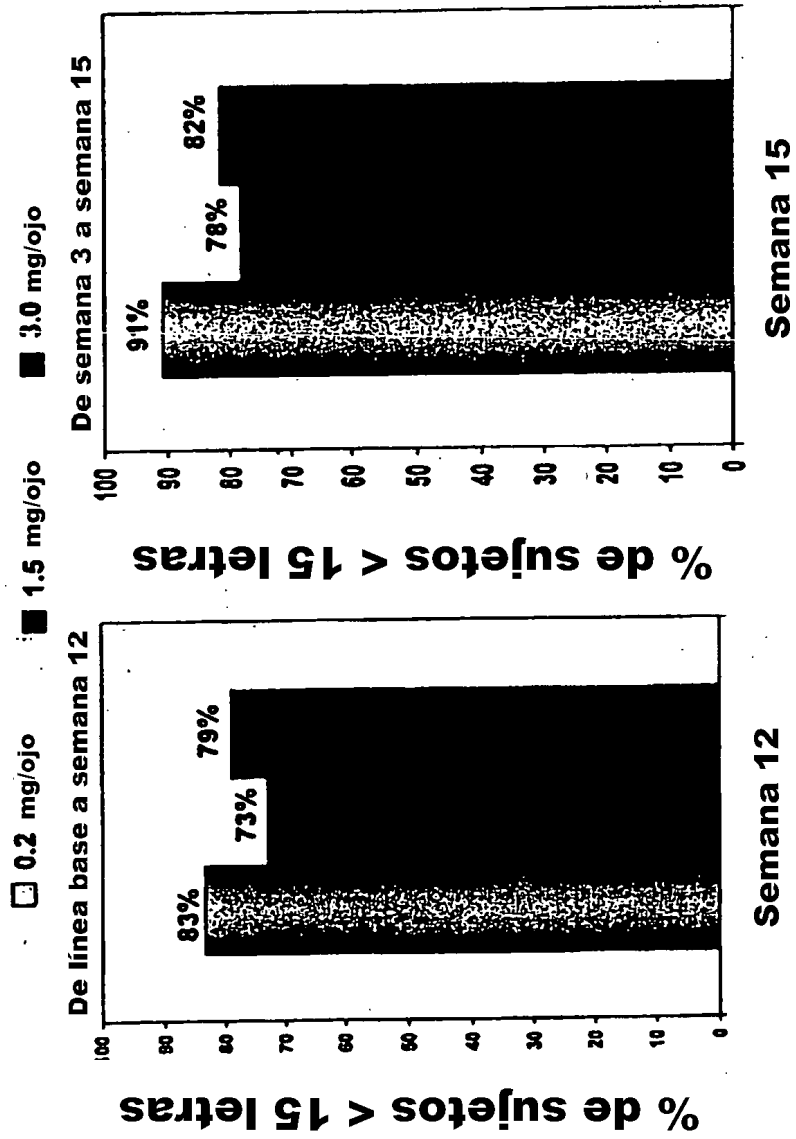


FIG. 4

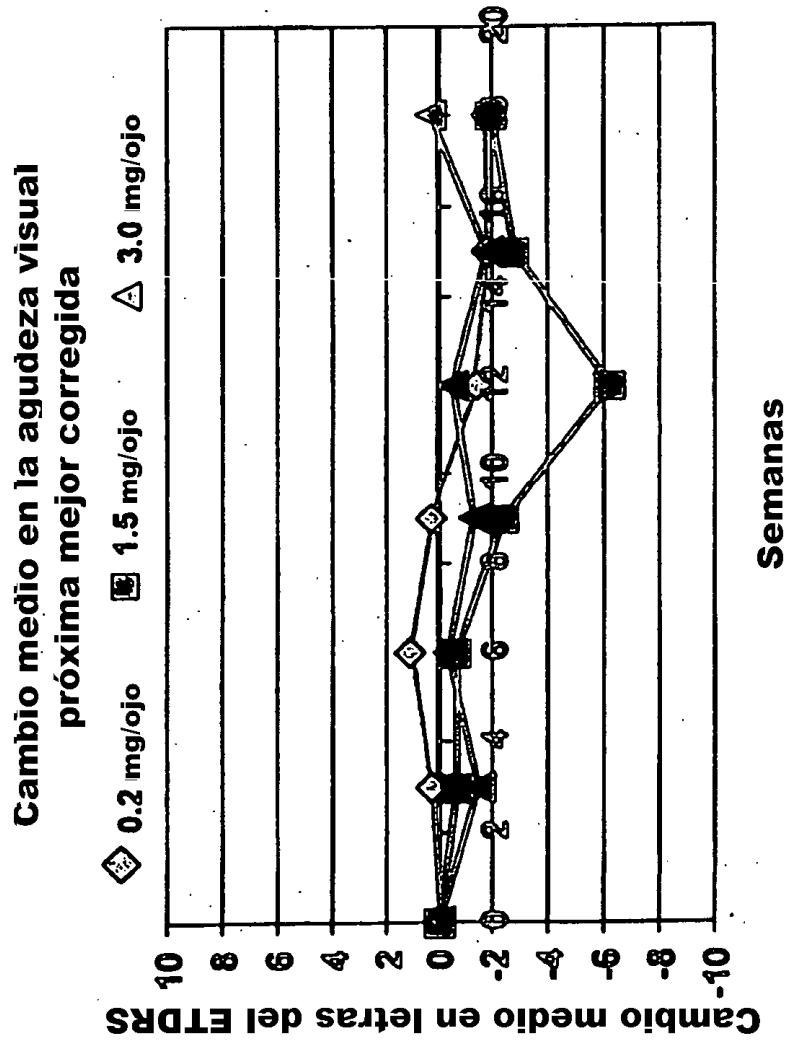


FIG. 5

Análisis de respondedor BCNVA

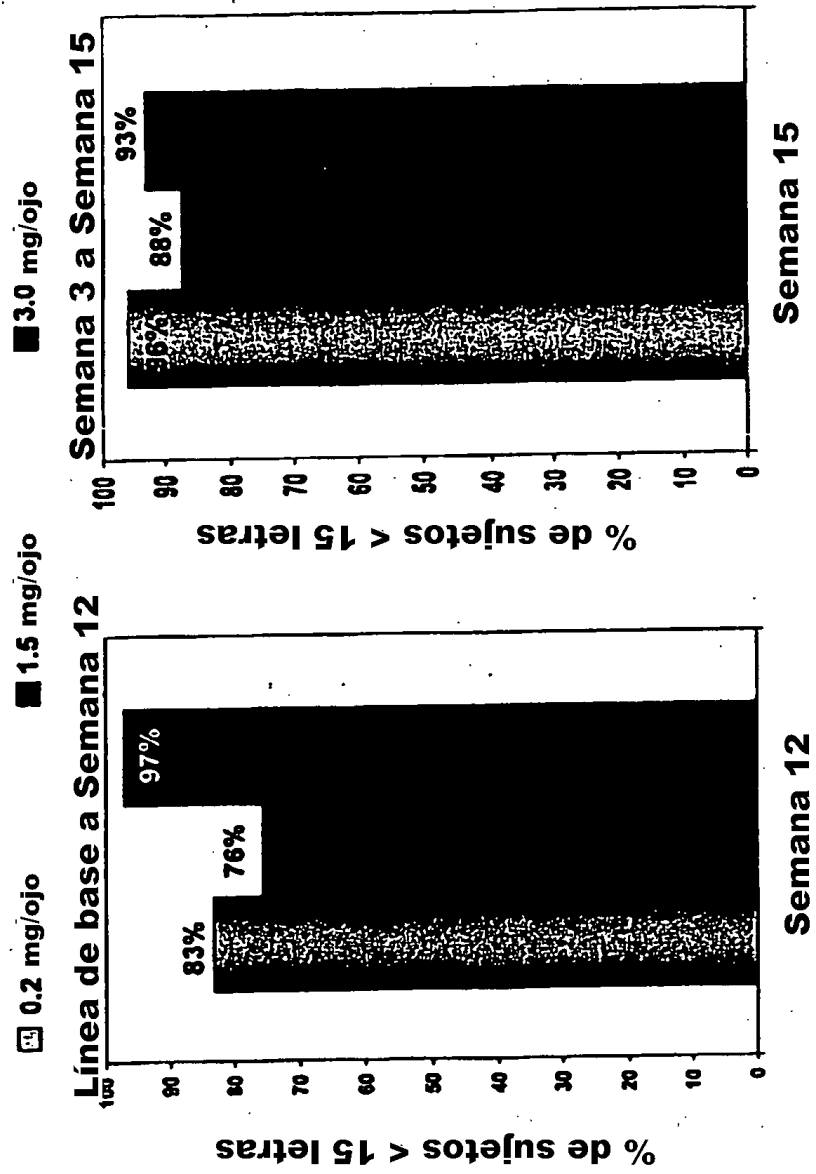


FIG. 6

Cambio medio de la agudeza visual a distancia mejor corregida

◇ 0,2 mg/ojo (n 0 34) ■ 1,5 mg/ojo (n = 39) ▲ 3,0 mg/ojo (n = 37) ● Placebo TAP (n = 83)

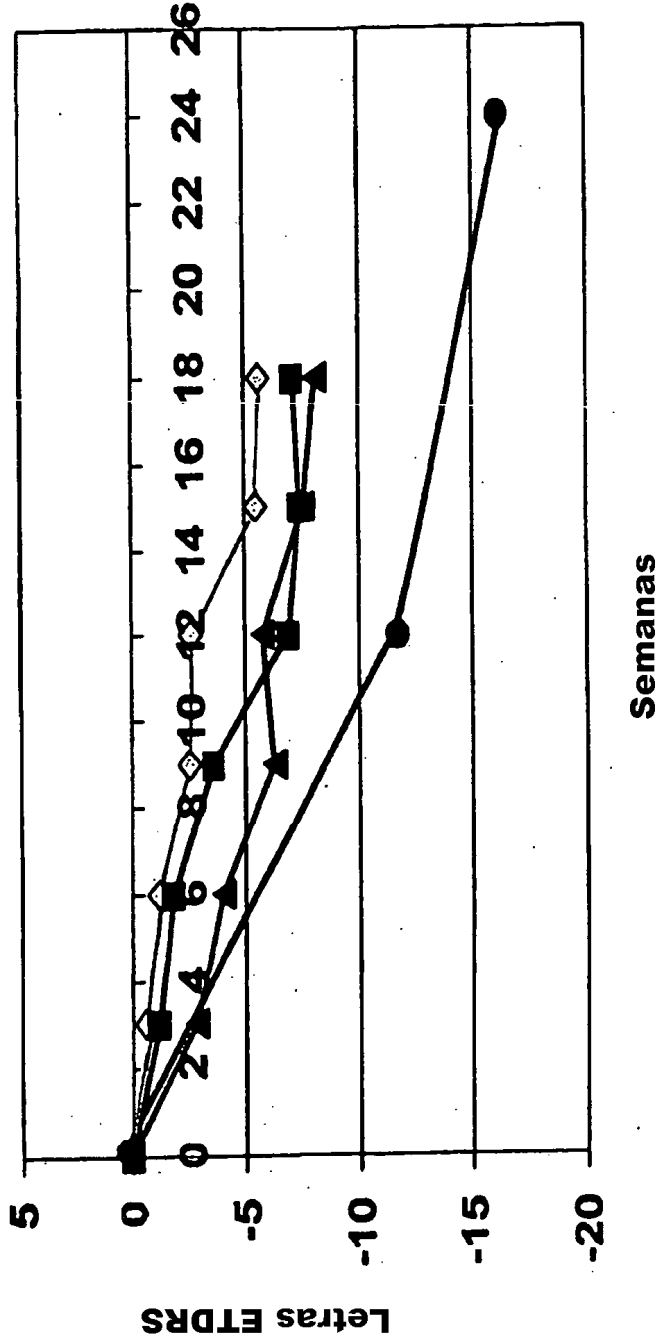


FIG. 7A

Cambio medio en la agudeza visual a distancia mejor corregida por población de protocolo (LOCF)

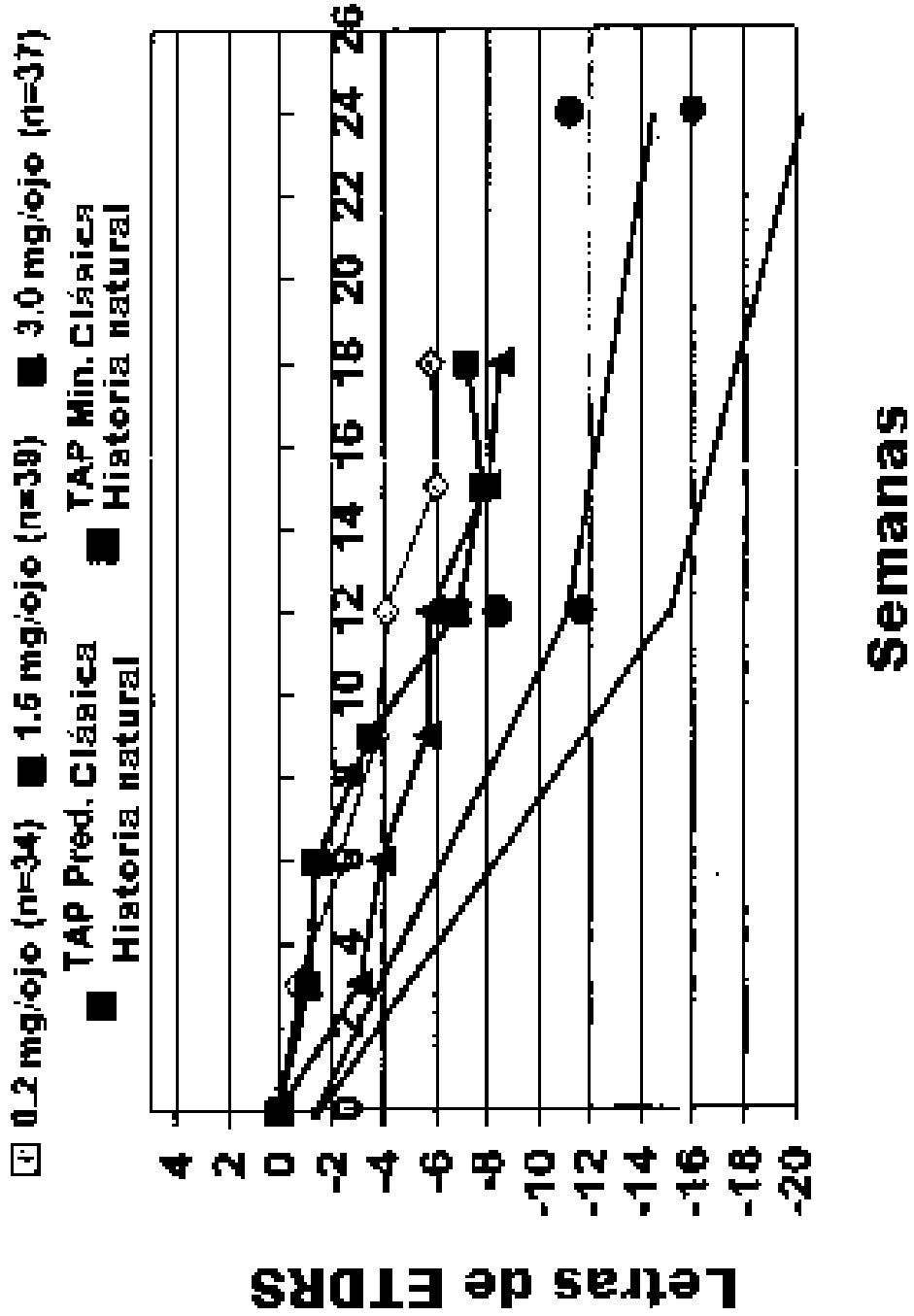


FIG. 7B

Angiografía de fluoresceína - Cambio desde la línea base en el tamaño de la CNV

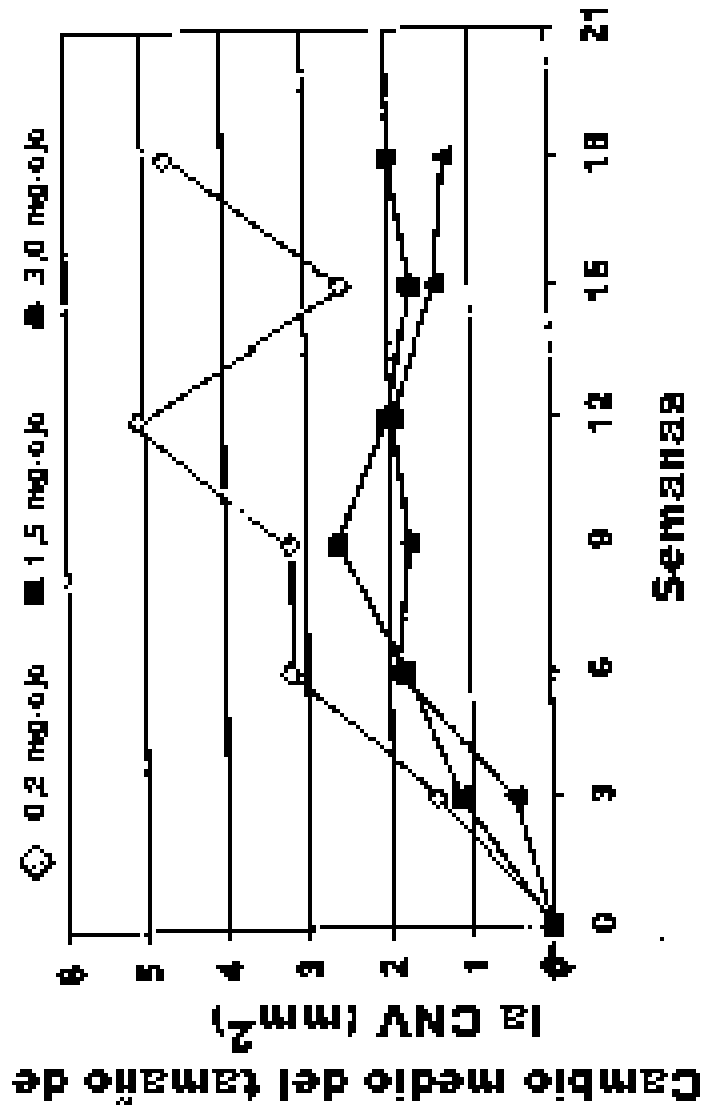


FIG. 9A

Angiografía de fluoresceína - Cambio desde la línea base del tamaño de la CNVC población por protocolo (LOCF)

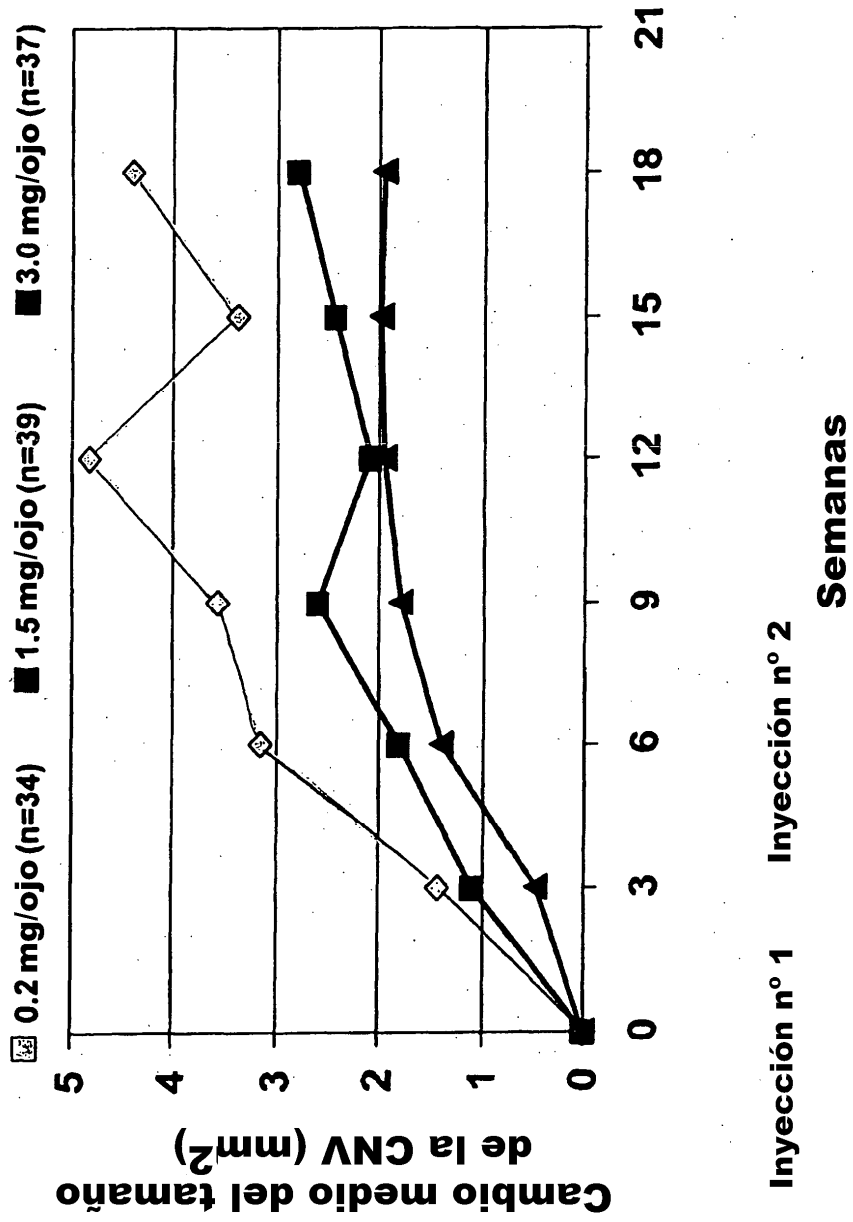


FIG. 8B

**Hallazgos confirmativos en DME
OCT: Cambio del espesor foveal**

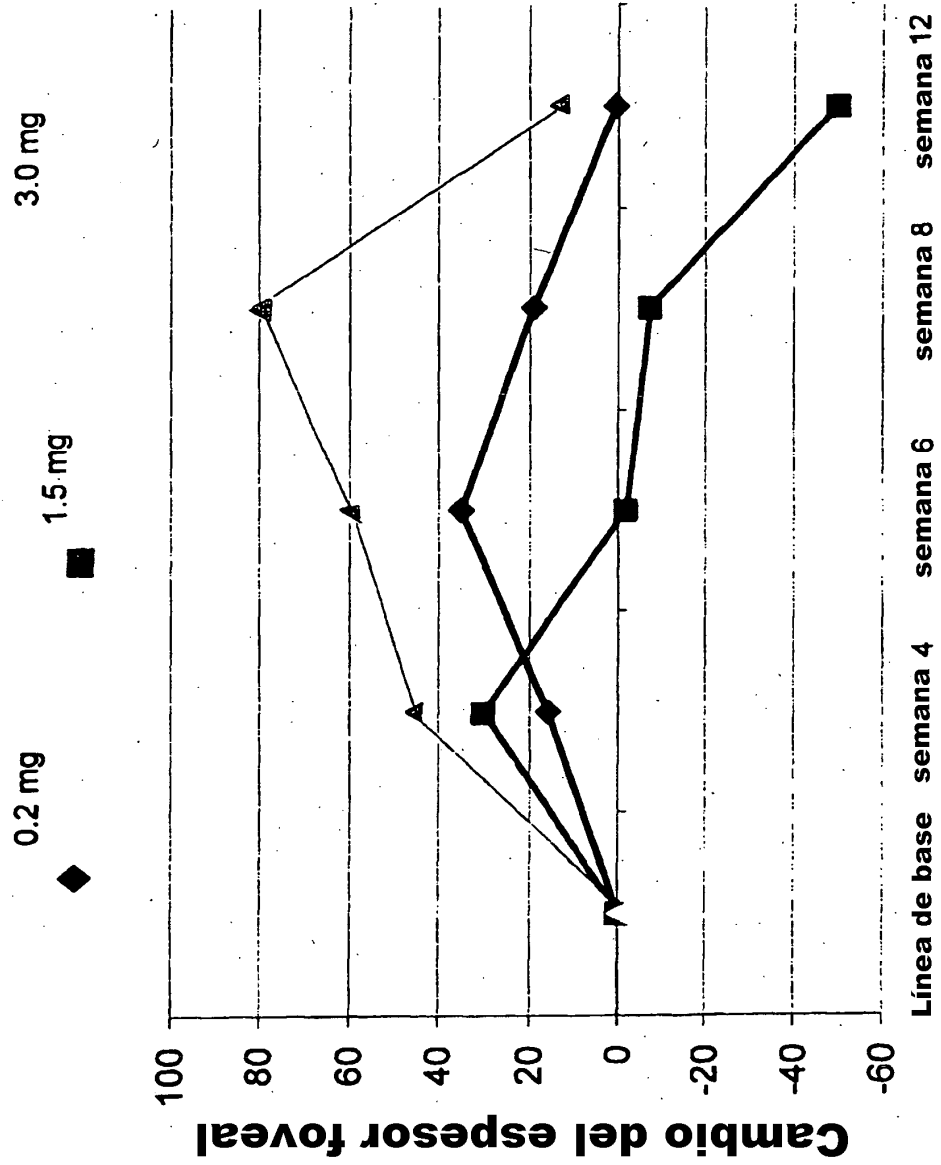


FIG. 9

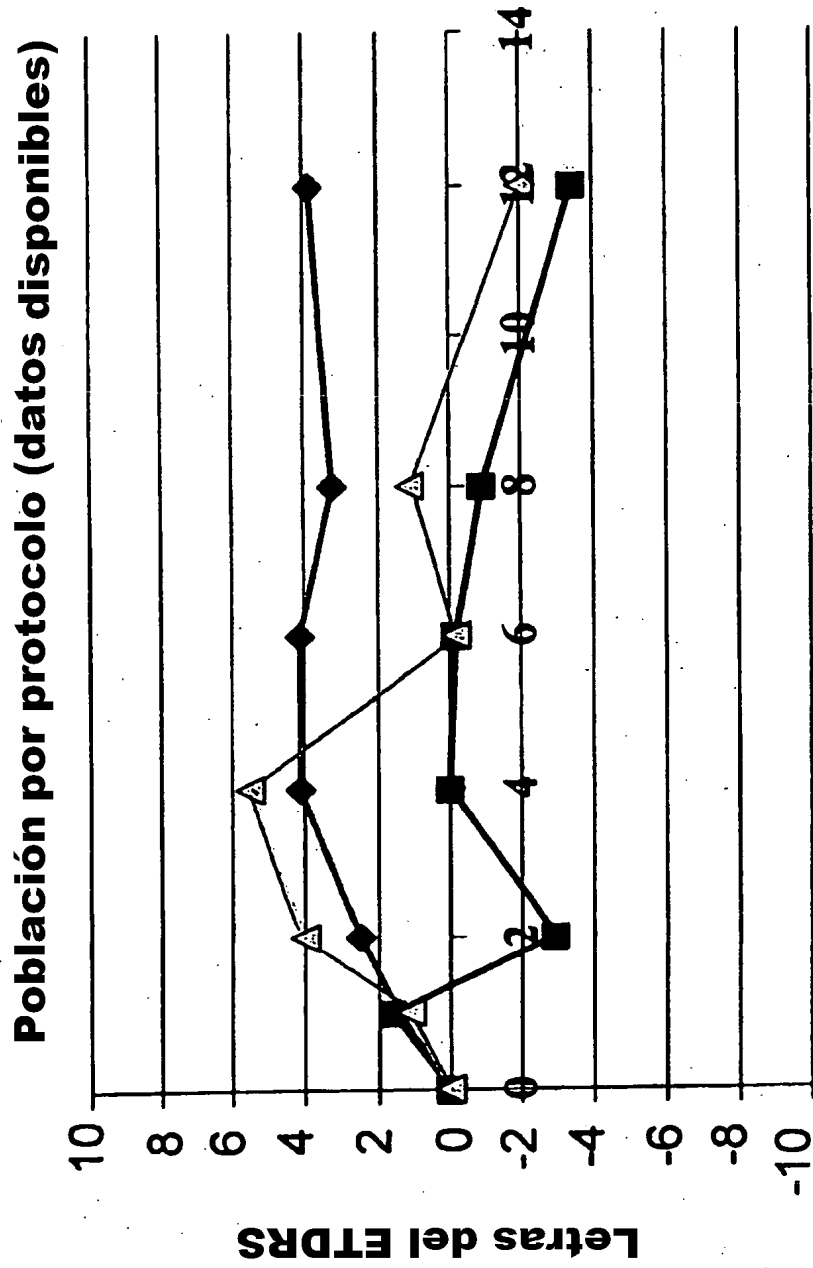


FIG. 10