

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 185**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06840364 .1**

96 Fecha de presentación: **29.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1966368**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54 Título: **Inhibición de IGF-1R mediada por ARNi para tratamiento de angiogénesis ocular**

30 Prioridad:

**29.12.2005 US 754796 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**05.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**05.12.2012**

73 Titular/es:

**ALCON RESEARCH, LTD. (100.0%)  
6201 SOUTH FREEWAY  
FORT WORTH, TX 76134-2099, US**

72 Inventor/es:

**CHATTERTON, JON E. y  
BINGAMAN, DAVID P.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 392 185 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**

Inhibición de IGF-1R mediada por ARNi para tratamiento de angiogénesis ocular

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de las composiciones de ARN de interferencia para inhibición de la expresión del receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R), la proteína codificada por ARNm de IGF1R, en angiogénesis ocular, incluyendo aquellos cambios celulares resultantes de la interacción del factor de crecimiento 1 similar a insulina (IGF-1) y IGF-1R que conducen directa o indirectamente a neovascularización ocular, edema retinal, retinopatía diabética, secuela asociada con isquemia retinal, neovascularización del segmento posterior y glaucoma neovascular, por ejemplo.

**10 Antecedentes de la invención**

15 La retinopatía diabética (DR) es una enfermedad del ojo que se desarrolla en la diabetes debido a cambios en las células que forran los vasos sanguíneos, es decir el endotelio microvascular retiniano. Durante la diabetes mellitus, la hiperglucemia puede causar daño en varias formas. Por ejemplo, la glucosa, o un metabolito de la glucosa, se une a los grupos amino de proteínas, conduciendo a daño tisular. Además, la glucosa en exceso entra en la ruta del poliol dando como resultado acumulaciones de sorbitol. El sorbitol no se puede metabolizar por las células de la retina y puede contribuir a alta presión osmótica intracelular, edema intracelular, difusión dañada, hipoxia tisular, daño celular capilar y debilitamiento capilar. La retinopatía diabética implica engrosamiento de membranas basales capilares que pueden a su vez evitar que los pericitos, el tipo celular perivascular predominante en capilares retinales, entren en contacto con las células endoteliales. La muerte de los pericitos y las células endoteliales tiene lugar a través de un mecanismo apoptótico durante la retinopatía diabética, donde la pérdida de pericitos incrementa probablemente la permeabilidad de los capilares y conduce a la rotura de la barrera sangre-retina y a la desregulación de flujo sanguíneo. Los capilares debilitados conducen a formación de aneurisma y a pérdida adicional. Estos efectos de la hiperglucemia pueden también dañar funciones neuronales en la retina. DR está asociada con microaneurismas retinianos, hemorragias, exudados y retinitis proliferans, es decir, crecimiento de tejidos neurovasculares y conectivos masivo sobre la superficie interna de la retina. La retinopatía diabética puede ser del tipo de los antecedentes, progresivamente caracterizado por microaneurismas; hemorragias puntiformes intrarretinales; exudados cerosos, amarillos; manchas algodonomas; y edema macular. Esto es una fase temprana de retinopatía diabética llamada retinopatía diabética no proliferativa.

30 El documento WO 03/100059 revela ARNi y reactivos antisentido capaces de bloquear la expresión del receptor IGF1R. Los reactivos se sugieren para usar como inhibidor de crecimiento tumoral en condiciones malignas tales como diferentes tipos de cáncer. Bohula y cols., J.BioLChem., vol. 278 (2003), páginas 15991-15997 revelan ARNi y su uso en la regulación de la proliferación de células tumorales. Sohail y cols., Nucleic Acid Research (2003), n.º: 7 e38 describe ARNi como reactivos de interferencia de ARN poderosos para probarse en células de cáncer de mama humano. El documento US 2004/0086860 enseña procedimientos para elaborar dúplex de ARN y ARN de cadena simple. Smith y cols., Nature Medicine, diciembre de 1999, 1390-1394 describen experimentos relativos a la regulación de neovascularización retinal dependiente de factores de crecimiento endotelial vascular por receptor de decrecimiento 1 similar a la insulina en la que se ha probado el efecto de JB3. Kim y cols., American Journal of Pathology, diciembre de 2004, páginas 2177-2185 describe la inhibición de angiogénesis ocular por ARNi que tiene como objetivo, sin embargo, genes de la ruta del factor de crecimiento endotelial vascular. Unsold y cols., Molecular Vision 2004, páginas 468-474 describe el uso de una molécula química pequeña que tiene la designación MAE 87 como inhibidor de receptores tirosina cinasas en ratones. El documento US 2005/0282761 revela compuestos, composiciones y procedimientos para modular la expresión del receptor de hormona de crecimiento.

45 Según el progreso de patología microvascular inducida por diabetes, los capilares retinales eventualmente llegan a estar ocluidos y conducen a áreas multifocales de hipoxia de isquemia dentro de la retina. Las condiciones hipóxicas en el tejido no perfundido facilitan la producción de factores del crecimiento capaces de estimular crecimiento anormal de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos existentes (angiogénesis). Estos vasos sanguíneos nuevos patológicos crecen en el vítreo y pueden causar pérdida de visión, una afección llamada retinopatía diabética proliferativa (PDR), dado que los vasos sanguíneos nuevos son frágiles y tienden a dejar pasar sangre dentro del ojo. El tipo de proliferación de DR está caracterizado por neovascularización de la retina y disco óptico que puede proyectarse en el vítreo, la proliferación de tejido fibroso, hemorragia vítrea y desprendimiento de retina.

50 La neovascularización también ocurre en un tipo de glaucoma llamado glaucoma neovascular en el que la presión intraocular incrementada está causada por crecimiento de tejido conectivo y vasos sanguíneos nuevos sobre la malla trabecular. El glaucoma neovascular es una forma de glaucoma secundario causado por neovascularización en el ángulo de la cámara.

55 La neovascularización de segmento posterior (PSNV) es una patología que amenaza la visión responsable de las dos causas más comunes de ceguera adquirida en los países desarrollados: degeneración macular relacionada con la edad exudativa (AMD) y PDR. Hasta hace poco, los únicos tratamientos aprobados para PSNV que tienen lugar

durante la AMD exudativa fueron fotocoagulación láser o terapia fotodinámica con VISUDYNE™. Ambas terapias implican la oclusión de vasos afectados, lo que da como resultado daño inducido por láser, permanente para la retina y no se dirigen a la causa subyacente de la neovascularización. La recurrencia de neovascularización a partir de la misma zona es común. Para pacientes con PDR, las intervenciones quirúrgicas con vitrectomía y retirada de las membranas preretinales son las únicas opciones disponibles actualmente, así como una terapia láser llamada fotocoagulación panretinal para evitar la producción de más vasos nuevos.

Los esfuerzos farmacéuticos actuales se han centrado en inhibir los efectos de factores angiogénicos potentes tales como VEGF. Recientemente, inyección intravítrea de LUCENTIS™, un fragmento de anticuerpo anti-VEGF, se aprobó para el tratamiento de AMD. Este fragmento de anticuerpo se diseñó para unirse a e inhibir VEGF para inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos. Lucentis está también en los ensayos clínicos para el tratamiento de edema macular diabético. Otros enfoques incluyen el uso de este ARN de interferencia pequeño que se dirige a VEGF o a su receptor.

El eje de hormona del crecimiento (GH)/IGF1 está implicado en DR como se evidencia por los resultados que muestran un incremento de IGF1 en fluidos oculares y tejidos de pacientes con DR avanzada. Adicionalmente, los pacientes tratados subcutáneamente con octreotida, un análogo de somatostatina que inhibe el eje GH/IGF1, muestran una mejora empírica de edema macular diabético y PDR. En el modelo de ratón OIR, el tratamiento con un antagonista de inhibidor de GH o un antagonista de IGF1R disminuye la neovascularización retinal. En un modelo de diabetes de ratón, la terapia de IGF-1 mediada por plásmidos revertió la angiogénesis incrementada diabética y el flujo arterial.

IGF1R es un miembro de la familia de receptores tirosina cinasas. Se han descrito inhibidores de receptores tirosina cinasas de moléculas pequeñas (RTKi) que inhiben la neovascularización retinal y/o la neovascularización coroidal en ratones. Cada una de estas moléculas inhibe múltiples cinasas que pueden ser efectivas en bloquear neovascularización, sin embargo, cada una tiene el riesgo concomitante de causar efectos secundarios tóxicos. Un fármaco de molécula pequeña que inhibirá todas las cinasas necesarias para bloquear la neovascularización puede también inhibir una cinasa que sea necesaria para la supervivencia celular.

La presente invención trata esta carencia de especificidad de inhibición de receptores tirosina cinasas, específicamente el receptor de factor de crecimiento 1 similar a insulina. La presente invención proporciona ARN de interferencia que tienen como objetivo IGF1R en angiogénesis y permeabilidad vascular.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a ARN de interferencia que silencian expresión de ARNm de IGF1R, disminuyendo así la actividad del complejo unido IGF-1/IGF-1R y tratando la angiogénesis ocular efectuando una bajada de actividad celular preangiogénica y angiogénica ocular. IGF-1R se activa por la unión de IGF-1 al dominio extracelular del receptor. La activación de la cinasa a su vez da como resultado la estimulación de sustratos intracelulares diferentes.

El término "angiogénesis ocular," como se usa en el presente documento, incluye afecciones pre-angiogénicas oculares y afecciones angiogénicas oculares e incluye aquellos cambios celulares resultantes de la interacción de IGF-1 y IGF-1R que conducen directa o indirectamente a angiogénesis ocular, neovascularización ocular, edema retinal, retinopatía diabética, secuela asociada con isquemia retinal, PSNV, permeabilidad vascular y glaucoma neovascular, por ejemplo. Los ARN de interferencia de la invención son útiles para tratar pacientes con angiogénesis ocular, neovascularización ocular, edema retinal, retinopatía diabética, secuela asociada con isquemia retinal, neovascularización de segmento posterior (PSNV) y glaucoma neovascular, o pacientes en riesgo de desarrollar tales afecciones, por ejemplo.

Una realización de la presente invención se puede usar en un procedimiento de atenuar expresión de un objetivo de ARNm de IGF1R en un sujeto. El procedimiento comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de ARN de interferencia tal como un ARNi que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La administración es a un ojo del sujeto para atenuar expresión de un objetivo de angiogénesis ocular en un ser humano.

En una realización de la invención, el ARN de interferencia comprende una hebra de nucleótidos en sentido correcto, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos. Además, la cadena antisentido hibrida en condiciones fisiológicas a una parte de un ARNm correspondiente a la SEC ID N.º: 1 que es la secuencia de ADNc en sentido correcto que codifica IGF1R (N.º de acceso de GenBank NM\_000875) y tiene una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con la parte hibridante de ARNm correspondiente a SEC ID N.º: 1. La administración de una composición tal atenúa la expresión de un ARNm de IGF1R del sujeto.

La secuencia de IGF1R depositada como NM\_000875 y designada en el presente documento como SEC ID N.º: 1 tiene la secuencia siguiente:

ttttttttt ttttgagaaa ggaatttca tcccaaataa aaggaatgaa gtctggctcc	60
ggaggagggg ccccgacctc gctgtggggg ctctgtttc tctccgccgc gctctcctc	120
tggccgacga gtggagaaat ctgctggcca ggcacgaca tccgcaacga ctatcagcag	180
ctgaagcgc tggagaactg cacggtgatc gagggctacc tccacatcct gctcatctcc	240
aaggccgagg actaccgcag ctaccgcttc cccaagctca cggtcattac cgagtacttg	300
ctgctgttcc gagtggctgg cctcgagagc ctgagagacc tcttcccaa cctcacggtc	360
atccgctgct ggaaactctt ctacaactac gccctggtca tcttcgagat gaccaatctc	420
aaggatattg ggctttacaa cctgaggaac attactcggg gggccatcag gattgagaaa	480
aatgctgacc tctgttacct ctccactgtg gactggtccc tgatcctgga tgcggtgtcc	540
aataactaca ttgtggggaa taagcccca aaggaatgtg gggacctgtg tccagggacc	600
atggaggaga agccgatgtg tgagaagacc accatcaaca atgagtaca ctaccgctgc	660
tggaccacaa accgctgcca gaaaatgtgc ccaagcacgt gtgggaagcg ggcgtgcacc	720
gagaacaatg agtctgcca ccccgagtgc ctgggcagct gcagcgcgcc tgacaacgac	780
acggcctgtg tagcttgccg ccaactactac tatgccggtg tctgtgtgcc tgccctgcccg	840
cccaacacct acaggtttga gggctggcgc tgtgtggacc gtgacttctg cgccaacatc	900
ctcagcgcg agagcagcga ctccgagggg tttgtgatcc acgacggcga gtgcatgcag	960
gagtgcccct cgggcttcat ccgcaacggc agccagagca tgtactgcat cccttgtgaa	1020
ggccttgcc cgaaggctctg tgaggaagaa aagaaaacaa agaccattga ttctgttact	1080
tctgctcaga tgctccaagg atgcaccatc ttcaagggca atttgctcat taacatccga	1140
cgggggaata acattgcttc agagctggag aacttcattg ggctcatcga ggtggtgacg	1200
ggctacgtga agatccgcca ttctcatgcc ttggtctcct tgtccttctt aaaaaacctt	1260
cgctcatcc taggagagga gcagctagaa ggaattact cttctacgt cctcgacaac	1320
cagaacttgc agcaactgtg ggactgggac caccgcaacc tgaccatcaa agcagggaaa	1380
atgtactttg ctttcaatcc caaattatgt gtttccgaaa tttaccgcat ggaggaagtg	1440
acggggacta aagggcgcca aagcaaaggg gacataaaca ccaggaacaa cggggagaga	1500

gcctcctgtg aaagtgacgt cctgcatttc acctccacca ccacgtcgaa gaatcgcattc 1560  
 atcataacct ggcaccggta ccggccccct gactacaggg atctcatcag cttcaccggt 1620  
 tactacaagg aagcaccctt taagaatgtc acagagtatg atgggcagga tgcctgcggc 1680  
 tccaacagct ggaacatggt ggacgtggac ctcccgccca acaaggacgt ggagccccggc 1740  
 atcttactac atgggctgaa gccctggact cagtacgccg tttagctcaa ggctgtgacc 1800  
 ctaccatgg tggagaacga ccatatccgt ggggcccaaga gtgagatctt gtacattcgc 1860  
 accaatgctt cagttccttc cattcccttg gacgttcttt cagcatcgaa ctctcttctt 1920  
 cagttaatcg tgaagtggaa ccctccctct ctgcccaacg gcaacctgag ttactacatt 1980  
 gtgcgctggc agcggcagcc tcaggacggc tacctttacc ggcaacaatta ctgctccaaa 2040  
 gacaaaatcc ccatcaggaa gtatgccgac ggcaccatcg acattgagga ggtcacagag 2100  
 aacccaaga ctgaggtgtg tgggtggggag aaagggcctt gctgcgctg ccccaaaaact 2160  
 gaagccgaga agcaggccga gaaggaggag gctgaatacc gcaaagtctt tgagaatttc 2220  
 ctgcacaact ccatcttcgt gcccagacct gaaaggaagc ggagagatgt catgcaagtg 2280  
 gccaacacca ccatgtccag ccgaagcagg aacaccacgg ccgagacac ctacaacatc 2340  
 accgacccgg aagagctgga gacagagtac ctttctttg agagcagagt ggataacaag 2400  
 gagagaactg tcatttctaa cttcggcct ttcacattgt accgcatcga tatccacagc 2460  
 tgcaaccacg aggctgagaa gctgggctgc agcgcctcca acttcgtctt tgcaaggact 2520  
 atgcccgcag aaggagcaga tgacattctt gggccagtga cctgggagcc aaggcctgaa 2580  
 aactccatct ttttaaagtg gccggaacct gagaatcca atggattgat tctaattgat 2640  
 gaaataaaat acggatcaca agttgaggat cagcgagaat gtgtgtccag acaggaatac 2700  
 aggaagtatg gggggccaa gctaaaccgg ctaaaccgg ggaactacac agcccggatt 2760  
 caggccacat ctctctctgg gaatgggtcg tggacagatc ctgtgttctt ctatgtccag 2820  
 gccaaaacag gatatgaaaa ctcatccat ctgatcatcg ctctgccgt cgctgtcctg 2880  
 ttgatcgtgg gagggttggg gattatgctg tacgtcttcc atagaaagag aaataacagc 2940  
 aggctgggga atggagtgt gtatgcctct gtgaaccgg agtacttcag cgctgtgat 3000  
 gtgtacgttc ctgatgagtg ggaggtggct cgggagaaga tcaccatgag ccgggaactt 3060  
 gggcaggggt cgtttgggat ggtctatgaa ggagttgcca aggggtgtgg gaaagatgaa 3120  
 cctgaaacca gagtggccat taaaacagtg aacgaggccg caagcatgcg tgagaggatt 3180  
 gagtttctca acgaagcttc tgtgatgaag gagttcaatt gtcaccatgt ggtgcgattg 3240  
 ctgggtgtgg tgtcccaagg ccagccaaca ctggtcatca tggaaactgat gacacggggc 3300  
 gatctcaaaa gttatctccg gtctctgagg ccagaaatgg agaataatcc agtcctagca 3360  
 cctccaagcc tgagcaagat gattcagatg gccggagaga ttgcagacgg catggcatac 3420  
 ctcaacgcca ataagtctgt ccacagagac ctgctgccc ggaattgcat ggtagccgaa 3480  
 gatttcacag tcaaaatcgg agattttggg atgacgcgag atatctatga gacagactat 3540

taccggaag gaggcaaagg gctgctgccc gtgcgctgga tgtctctga gtcctcaag	3600
gatggagtct tcaccactta ctcgagcgtc tggctcttcg gggctcctct ctgggagatc	3660
gccacactgg ccgagcagcc ctaccagggc ttgtccaacg agcaagtcct tcgcttcgctc	3720
atggagggcg gccttctgga caagccagac aactgtcctg acatgctgtt tgaactgatg	3780
cgcattgtgct ggcagtataa cccaagatg aggccttctct tcctggagat catcagcagc	3840
atcaaagagg agatggagcc tggcttccgg gaggtctcct tctactacag cgaggagaac	3900
aagctgcccg agccggagga gctggacctg gagccagaga acatggagag cgtccccctg	3960
gacccctcgg cctcctcgtc ctccctgcca ctgcccgaca gacactcagg acacaaggcc	4020
gagaacggcc ccggccctgg ggtgctggtc ctccgcgcca gcttcgacga gagacagcct	4080
tacgcccaca tgaacggggg ccgcaagaac gagcgggcct tgccgctgcc ccagtcttcg	4140
acctgctgat cttggatcc tgaatctgtg caaacagtaa cgtgtgcgca cgcgcagcgg	4200
ggtggggggg gagagagagt ttttaacaatc cattcacaag cctcctgtac ctcagtggat	4260
cttcagttct gcccttgctg cccgcgggag acagcttctc tgcagtaaaa cacatttggg	4320
atgttccttt tttcaatag caagcagctt tttattccct gcccaaacc ttaactgaca	4380
tgggccttta agaacctta tgacaacact taatagcaac agagcacttg agaaccagtc	4440
tcctcactct gtccctgtcc ttcctgttc tccctttctc tctcctctct gcttcataac	4500
ggaaaaataa ttgccacaag tccagctggg aagccctttt tatcagtttg aggaagtggc	4560
tgtccctgtg gcccaccca accactgtac acaccgcct gacaccgtgg gtcattacaa	4620
aaaaacacgt ggagatggaa atttttacct ttatctttca cctttctagg gacatgaaat	4680
ttacaaaggg ccacgttca tccaaggctg ttaccatttt aacgctgcct aattttgcca	4740
aaatcctgaa ctttctccct catcgcccg gcgctgattc ctctgtctcg gaggcattggg	4800
tgagcatggc agctggttgc tccatttgag agacacgctg gcgacacact ccgtccatcc	4860
gactgcccct gctgtgctgc tcaaggccac aggcacacag gtctcattgc ttctgactag	4920
attattattt gggggaactg gacacaatag gtctttctct cagtgaaggt ggggagaagc	4980
tgaaccggc	4989

5 En una realización de la invención, un ARN de interferencia está diseñado para dirigirse a un ARNm correspondiente a la SEC ID N.º 1 que comprende nucleótido 401, 635, 1062, 1548, 1604, 1643, 1766, 1922, 2012, 2069, 2210, 2416, 2423, 2654, 2909, 3339, 3416, 3464, 3476, 3505, 3512, 3781, 3782, 3881, 4064, 4158, 4411, 4487, 4904, 4905, 4909, 3329, 2323 o 2887.

10 La presente invención comprende adicionalmente la administración de un segundo ARN de interferencia a un sujeto además de un primer ARN de interferencia. Ello comprende administrar al sujeto un segundo ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y que comprende una hebra de nucleótidos en sentido correcto, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de al menos complementariedad casi perfecta de al menos 19 nucleótidos; en el que la hebra antisentido del segundo ARN de interferencia hibrida en condiciones fisiológicas con una segunda parte de ARNm correspondiente a la SEC ID N.º 1 y la hebra antisentido tiene una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con la segunda parte hibridante de ARNm correspondiente a la SEC ID N.º 1. Adicionalmente, un tercer, cuarto o quinto, etc. ARN de interferencia se puede  
15 administrar en una manera similar.

Otra realización de la invención es atenuar la expresión de ARNm de IGF1R en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad efectiva de ARN de interferencia de cadena simple que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Para atenuar la expresión de ARNm de IGF1R, el ARN de interferencia de cadena simple hibrida en condiciones fisiológicas con una parte de ARNm correspondiente a la SEC ID N.º: 1 que comprende nucleótido 401, 635, 1062, 1548, 1604, 1643, 1766, 1922, 2012, 2069, 2210, 2416, 2423, 2654, 2909, 3339, 3416, 3464, 3476, 3505, 3512, 3781, 3782, 3881, 4064, 4158, 4411, 4487, 4904, 4905, 4909, 3329, 2323 o 2887 y el ARN de interferencia tiene una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con la parte de hibridación de ARNm correspondiente a la SEC ID N.º: 1. La expresión de ARNm de está IGF1R de este modo  
10 atenuada.

La invención es para su uso en el tratamiento de la angiogénesis ocular en un sujeto en necesidad de ello.

15 El uso comprende administrar a un ojo del sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, comprendiendo el ARN de interferencia una hebra de nucleótidos en sentido correcto, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos. La hebra antisentido hibrida en condiciones fisiológicas a una parte de ARNm correspondiente a la SEC ID N.º: 1 y tiene una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con la parte hibridante de ARNm correspondiente a la SEC ID N.º: 1. De este modo se trata la angiogénesis ocular.

20 El uso de tratar angiogénesis ocular en un sujeto en necesidad de ello comprende administrar a un ojo del sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, comprendiendo el ARN de interferencia una región de al menos 13 nucleótidos contiguos que tiene al menos el 90 % de complementariedad de secuencia a, o al menos el 90 % de identidad de secuencia con, los penúltimos 13 nucleótidos del extremo 3' de un ARNm correspondiente a una cualquiera de SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 8-SEC ID N.º: 40, en la que de este modo se trata la angiogénesis  
25 ocular.

Otra realización de la invención es el uso para atenuar la expresión de un ARNm de IGF1R en un sujeto, comprendiendo administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de ARN de interferencia que tenga una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el ARN de interferencia comprende una región de al menos 13 nucleótidos contiguos que tienen al menos el 90 % de complementariedad de  
30 secuencia a, o al menos el 90 % de identidad de secuencia con, los 13 penúltimos nucleótidos del extremo 3' de un ARNm correspondiente a una cualquiera de SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 8-SEC ID N.º: 40.

35 En una realización adicional de la presente invención, la región de los nucleótidos contiguos es una región de al menos 14 nucleótidos contiguos que tiene al menos el 85 % de complementariedad de secuencia a, o al menos el 85 % de identidad de secuencia con, los 14 penúltimos nucleótidos del extremo 3' de un ARNm correspondiente a la secuencia del identificador de secuencia. En aún otra realización de la invención, la región de los nucleótidos contiguos es una región de al menos 15, 16, 17, o 18 nucleótidos contiguos que tienen al menos el 80 % de complementariedad de secuencia a, o al menos el 80 % de identidad de secuencia con, los penúltimos 15, 16, 17, o 18 nucleótidos, respectivamente, del extremo 3' de un ARNm correspondiente a la secuencia identificada por el identificador de secuencia.

40 Una realización adicional de la invención es una composición para uso de tratar angiogénesis ocular en un sujeto en necesidad de la misma, comprendiendo el uso administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de ARNip de cadena doble que regula a la baja la expresión de un gen IGF1R por medio de interferencia de ARN, en la que cada hebra de la molécula de ARNip es independientemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 27 nucleótidos de longitud; y una hebra de la molécula de ARNip comprende una secuencia de nucleótidos que tiene  
45 complementariedad sustancial a un ARNm que corresponde al gen de IGF1R, respectivamente, tal que la molécula de ARNip dirige escisión del ARNm por medio de interferencia de ARNm.

Una composición que comprende ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y que tiene una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 8-SEC ID N.º: 40, o un complemento de la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable es una realización de la presente invención.  
50 En una realización, el ARN de interferencia se aisló. El término "aislado" significa que el ARN de interferencia es libre de su medio natural total.

Otra realización de la invención es una composición que comprende una molécula de ARNip de cadena doble que regula a la baja la expresión de un gen de IGF1R por medio de interferencia de ARN, en el que cada hebra de la molécula de ARNip es independientemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 27 nucleótidos de longitud;  
55 y una cadena de la molécula de ARNip comprende una secuencia de nucleótidos que tiene complementariedad sustancial a un ARNm que corresponde al gen IGF1R, respectivamente, tal que la molécula de ARNip dirige escisión del ARNm por medio de interferencia de ARN.

La presente invención proporciona una ventaja sobre inhibidores de molécula pequeña de IGF-1R dado que un efecto secundario indeseable de terapias moleculares actuales de moléculas pequeñas, por ejemplo, la falta de especificidad, se puede superar.

**Breve descripción de los dibujos**

5 A fin de que la manera en que lo anteriormente enumerado y otras mejoras y objetos de la invención se obtengan, una descripción más particular de la presente invención descrita brevemente anteriormente se presentará por referencia a realizaciones específicas de la misma, que se ilustran, en los dibujos adjuntos. Entendiendo que estos dibujos representan solamente realizaciones típicas de la invención y no son por lo tanto para considerarse limitantes de su alcance, la invención se describirá con especificidad y detalle adicional a través del uso de los dibujos acompañantes en los que:

La figura proporciona una prueba de bandas de western IGF-1R $\beta$  de las células HeLa transfectadas con ARNip n.º 6, n.º 8, n.º 17 y n.º 18 de IGF1R y un ARNip control libre de RISC, cada uno a 10 nM, 1 nM y 0,1 nM; un ARNip de control no dirigido (NTC2) a 10 nM; y un control de tampón (-ARNip). Las flechas indican las posiciones del IGF-1R $\beta$  de 97 kDa, del precursor de IGF-1R de 200 kDa y de las bandas de actina de 42 kDa.

15 **Descripción detallada de la invención**

Los detalles mostrados en el presente documento son solamente a modo de ejemplo y para propósitos de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención y se presentan en la causa de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de diversas realizaciones de la invención. En este sentido, no se hace ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención en más detalle de los que es necesario para la comprensión fundamental de la invención, haciendo patente la descripción tomada con los dibujos y/o ejemplos para aquellos expertos en la técnica cómo las diversas formas de la invención se pueden realizar en la práctica.

Las siguientes definiciones y explicaciones significan que y se desean para estar controlando en cualquier construcción futura modificada menos claramente y menos no ambiguamente en los siguientes ejemplos o cuando la aplicación del significado vuelve a cualquier construcción sin sentido o esencialmente sin sentido. En los casos en que la construcción del término lo volvería sin sentido o esencialmente sin sentido, la definición se tomaría del Diccionario Webster, 3ª Edición.

Como se usa en el presente documento, todos los porcentajes son porcentajes en peso, a menos que se indique lo contrario.

30 Como se usa en el presente documento, un "fluido" es una sustancia continua, amorfa cuyas moléculas se mueven libremente alrededor de las otras y que tiene la tendencia a asumir la forma de su recipiente, por ejemplo, un líquido o un gas.

Como se usa en el presente documento, el término "proveedor de servicios de salud" se conoce en la técnica e incluye específicamente un médico, una persona con autoridad de prescribir una medicación (ya sea directa o indirectamente) y un veterinario. En ciertas realizaciones, un proveedor de servicios de salud incluye un individuo que proporciona una medicación sin prescripción, tal como proporcionando una medicación sin receta.

Como se usa en el presente documento, los términos "identificar sujetos" y "diagnosticar" se usan intercambiamente en relación con la detección de una "predisposición", "propensión incrementada", "riesgo", "riesgo incrementado" y similares.

40 Como se usa en el presente documento, el término "otra enfermedad retiniana o del nervio óptico" significa que y se refiere a al menos una degeneración macular relacionada con la edad, catarata, neuropatía óptica isquémica aguda (AION), conmoción de la retina, desprendimiento de retina, desgarros o agujeros retinianos, retinopatía diabética y yatrogénica y otras retinopatías isquémicas o retinopatías ópticas, miopía, retinitis pigmentosa, y/o similares.

La interferencia de ARN (ARNi) es un proceso por el que ARN de doble cadena (ARNds) se usa para silenciar expresión génica. Aunque sin querer comprometerse con ninguna teoría, ARNi comienza con la escisión de ARNds más largos dentro de ARN de interferencia pequeños (ARNip) por una enzima similar a RNasa III, Dicer. Los ARNip son ARNds que son usualmente aproximadamente de 19 a 28 nucleótidos, o de 20 a 25 nucleótidos, o de 21 a 22 nucleótidos de longitud y a menudo contienen salientes 3' de dos nucleótidos y extremos fosfato 5' e hidroxilo 3'. Una hebra de la ARNip se incorpora dentro de un complejo de ribonucleoproteína conocido como el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). RISC usa esta hebra de ARNip para identificar moléculas de ARNm que son al menos parcialmente complementarias a la hebra de ARNip incorporada y después escinde estos ARN objetivo o inhibe su traducción. Por lo tanto, la hebra de ARNip que se incorpora en RISC se conoce como la hebra guía o la hebra antisentido. La otra hebra de ARNip, conocida como la hebra pasajera o la hebra en sentido correcto, se elimina del ARNip y es al menos parcialmente homóloga al ARNm objetivo. Aquellos de habilidad en la técnica



reconocerán que, en principio, cada hebra de un ARNip puede incorporarse dentro de RISC y funciona como una hebra guía. Sin embargo, el diseño de ARNip (por ejemplo, estabilidad de dúplex de ARNip disminuida en el extremo 5' de la cadena antisentido) puede favorecer incorporación de la cadena antisentido en RISC.

5 La escisión mediada por RISC de ARNm que tiene una secuencia al menos parcialmente complementaria a la hebra guía conduce a un decrecimiento en el nivel del estado estable de ese ARNm y de la proteína correspondiente codificada por este ARNm. Alternativamente, RISC puede también disminuir la expresión de la proteína correspondiente por medio de la represión traduccional sin escisión del ARNm objetivo. Otras moléculas de ARN y similares a ARN pueden interactuar también con RISC y silenciar expresión génica. Ejemplos de otras moléculas de ARN que pueden interactuar con RISC incluyen ARN ahorquillados cortos (ARNsh), ARNip de cadena simple, 10 microARN, (miARN) y dúplex 27-meros de sustrato de dicer. El término "ARNip" como se usa en el presente documento se refiere a un ARN de interferencia de cadena doble a menos que se indique lo contrario. Ejemplos de moléculas similares a ARN que pueden interactuar con RISC incluyen moléculas de ARN que contienen uno o más nucleótidos modificados químicamente, uno o más desoxirribonucleótidos, y/o uno o más enlaces no fosfodiéster. Para propósitos de la presente discusión, todas las moléculas de ARN o moléculas similares a ARN que 15 pueden interactuar con RISC y participar en cambios mediados por RISC en expresión génica se referirán como "ARN de interferencia". ARNip, miARN y dúplex de 27-meros de sustrato de dicer son, por lo tanto, subgrupos de "ARN de interferencia".

ARN de interferencia de realizaciones de la invención parece actuar en una manera catalítica para escisión de ARNm objetivo, es decir, el ARN de interferencia es capaz de efectuar inhibición de ARNm objetivo en cantidades 20 subestequiométricas. Según se compara con terapias antisentido, se requiere significativamente menos ARN de interferencia para proporcionar un efecto terapéutico en tales condiciones de inhibición.

La presente invención se refiere al uso de ARN de interferencia para inhibir la expresión del ARNm del factor de crecimiento 1 similar a insulina (IGF-1R), interfiriendo así con unión a ligando e interfiriendo con la proliferación y la angiogénesis subsiguientes. De acuerdo con la presente invención, los ARN de interferencia proporcionados 25 exógenamente o expresados endógenamente llevan a cabo silenciamiento de expresión de IGF1R en tejidos oculares.

Las secuencias de ácidos nucleicos citadas en el presente documento se escriben en una dirección 5' a 3' a menos que se indique lo contrario. El término "ácido nucleico," como se usa en el presente documento, se refiere bien a ADN o bien a ARN o bien a una forma modificada de los mismos que comprende las bases púricas o pirimidínicas presentes en el ADN (adenina "A", citosina "C", guanina "G", timina "T") o en el ARN (adenina "A", citosina "C", 30 guanina "G", uracilo "U"). Los ARN de interferencia proporcionados en el presente documento pueden comprender las bases de "T", particularmente en los extremos 3', a pesar de que las bases de "T" no se dan de forma natural en el ARN. "Ácido nucleico" incluye los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" y puede referirse a una molécula de cadena simple o a una molécula de cadena doble. Una molécula de cadena doble está formada por apareamiento de bases de Watson-Crick entre bases de A y T, bases de C y G y entre bases de A y U. Las hebras de una molécula de doble cadena pueden tener complementariedad parcial, sustancial o completa unas con otras y 35 formarán un híbrido dúplex, la fuerza de formación de enlace del cual es dependiente de la naturaleza y del grado de complementariedad de la secuencia de bases.

Una secuencia de ARNm se deduce fácilmente de la secuencia de ADN correspondiente. Por ejemplo, la SEC ID N.º: 1 proporciona la secuencia de la hebra en sentido correcto de ADN que corresponde a la ARNm para IGF1R. La 40 secuencia de ARNm es idéntica a la secuencia de hebra en sentido correcto de ADN con las bases "T" reemplazadas con bases "U". Por lo tanto, la secuencia de ARNm de IGF1R se conoce a partir de la SEC ID N.º: 1.

*ARNm del receptor de factor de crecimiento 1 similar a insulina (IGF1R):* IGF-1R es un miembro de la familia de receptores tirosina cinasas. La escisión proteolítica del precursor de IGF-1R genera la subunidad  $\alpha$  de ~~lí~~ a 45 ligando, extracelular y la subunidad  $\beta$  transmembrana, que contiene el dominio de tirosina cinasa intracelular. IGF-1 R comprende dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  ligadas por enlaces disulfuro. La unión a ligando activa proliferación que promueve auto-transfosforilación y supervivencia celular.

Las actividades biológicas de factor de crecimiento insulínico están mediadas por IGF-1R. Se ha observado un incremento de IGF-1 en fluidos oculares y tejidos de pacientes con retinopatía diabética avanzada. Diversos factores de crecimiento proangiogénicos que incluyen factor de crecimiento similar a insulina 1 se han encontrado en tejidos 50 y fluidos de pacientes con angiogénesis ocular. Los pacientes tratados subcutáneamente con octreotida, un análogo de somatostatina que inhibe el eje GH/IGF1, muestran mejora empírica en DME y PDR. En el modelo de ratón OIR, el tratamiento con un inhibidor de GH o un antagonista de IGF-1 R disminuye significativamente la neovascularización retinal. IGF-1 estimula producción endotelial retinal del factor de crecimiento endotelial vascular *in vitro*. En un modelo de diabetes de ratón, la terapia de IGF-1 mediada por plásmidos revertió la angiogénesis 55 incrementada diabética y el flujo arterial incrementado diabético. Por lo tanto, la inhibición de expresión de IGF-1 R se proporciona en el presente documento para tratar angiogénesis ocular incluyendo actividad celular pre-angiogénica y actividad celular angiogénica.

La base de datos de GenBank del National Center for Biotechnology Information en [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) proporciona la secuencia de ADN para IGF1R como n.º de acceso: NM\_000875, incluida en el "Listado de secuencias" como SEC ID N.º: 1. La SEC ID N.º: 1 proporciona la secuencia de cadena en sentido correcto de ADN que corresponde a la ARNm que codifica IGF1R (con la excepción de bases "T" por bases "U"). La secuencia codificante para IGF1R es de nucleótidos 46-4149.

Los equivalentes de la secuencia de ARNm de IGF1R citados anteriormente son formas de ajuste alternativo, formas alélicas, isozimas, o un análogo de las mismas. Un análogo es un ARNm de IGF1R de otras especies de mamíferos que es homólogo a la SEC ID N.º: 1 (un ortólogo).

*Atenuar expresión de un ARNm:* la frase, "atenuar expresión de un ARNm", como se usa en el presente documento, significa administrar o expresar una cantidad de ARN de interferencia (por ejemplo, un ARNip) para reducir la traducción del ARNm objetivo a proteína, bien por escisión de ARNm o bien por inhibición directa de la traducción. La reducción en expresión del ARNm objetivo o de la proteína correspondiente se refiere comúnmente como "knock-down" y se comunica en relación con los niveles presentes tras la administración o expresión de un ARN de control no dirigido (por ejemplo, un ARNip de control no dirigido). Knock-down de expresión de una cantidad incluyendo y entre el 50 % y el 100 % se contempla por las realizaciones en el presente documento. Sin embargo, no es necesario que tales niveles de knock-down se logren para los propósitos de la presente invención. En una realización, se administra un ARN de interferencia único dirigido a IGF1R para disminuir producción de IGF1R, inhibiendo de este modo la ruta de señalización de IGF1R. En otras realizaciones, dos o más ARN de interferencia que tienen como objetivo el ARNm de IGF1R se administran para disminuir expresión. En aún otras realizaciones, un primer ARN de interferencia que tiene como objetivo el ARNm de IGF1R y un segundo ARN de interferencia que tiene como objetivo otro ARNm de receptor de tirosina cinasa se administran para efectuar una disminución de la actividad celular preangiogénica y angiogénica.

Knock-down se evalúa frecuentemente midiendo los niveles de ARNm usando amplificación de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) o midiendo los niveles de proteína por prueba de bandas de western o por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Analizar el nivel de proteínas proporciona una evaluación tanto de escisión de ARNm así como de inhibición de traducción. Técnicas adicionales para medir knock-down incluye hibridación de soluciones de ARN, protección de nucleasas, hibridación de northern, realización de seguimiento de expresión génica con un microensayo, unión a anticuerpos, radioinmunoensayo y análisis de células activadas de fluorescencia.

La inhibición de objetivos citados en el presente documento se infiere también en un ser humano o mamífero observando una mejora en un síntoma de angiogénesis ocular tal como mejora en edema retinal, retinopatía diabética, isquemia retinal, o en neovascularización de segmento posterior (PSNV), por ejemplo.

*ARN de interferencia:* en una realización de la invención, el ARN de interferencia (por ejemplo, ARNip) tiene una hebra en sentido correcto y una hebra antisentido y las hebras en sentido correcto y antisentido comprenden una región de al menos complementariedad casi perfecta de al menos 19 nucleótidos. En una realización adicional de la invención, el ARN de interferencia (por ejemplo, el ARNip) tiene una cadena sentido y una cadena antisentido y la cadena antisentido comprende una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos a una secuencia objetivo de ARNm de IGF1R y la hebra en sentido correcto comprende una región de al menos identidad casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con una secuencia objetivo de ARNm de IGF1R, respectivamente. En una realización adicional de la invención, el ARN de interferencia comprende una región de al menos 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleótidos contiguos que tienen porcentajes de complementariedad de secuencia a o, que tienen porcentajes de identidad de secuencia con, los penúltimos 13, 14, 15, 16, 17, o 18 nucleótidos, respectivamente, del extremo 3' de un ARNm correspondiente a la secuencia objetivo dentro de un ARNm.

La longitud de cada hebra del ARN de interferencia comprende 19 a 49 nucleótidos y puede comprender una longitud de 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, o 49 nucleótidos.

La hebra antisentido de un ARNip es el agente de guía activo del ARNip en el que la hebra antisentido se incorpora en RISC, permitiendo así a RISC identificar ARNm objetivo con al menos complementariedad parcial al ARNip antisentido para escisión o represión traduccional.

En realizaciones de la presente invención, las secuencias objetivo de ARN de interferencia (por ejemplo, secuencias objetivo de ARNip) dentro de una secuencia de ARNm objetivo se seleccionan usando herramientas de diseño disponibles. Los ARN de interferencia correspondientes a una secuencia objetivo de IGF1R se ponen a prueba después por transfección de células que expresan el ARNm objetivo seguido por valoración de knock-down según se describe anteriormente.

Las técnicas para seleccionar secuencias objetivo para ARNip se proporcionan por Tuschl, T. y cols., "The siRNA User Guide", revisado el 6 de mayo, 2004, disponible en el sitio web de la Universidad Rockefeller; por Technical Bulletin n.º: 506, "siRNA Design Guidelines", Ambion Inc en el sitio de Internet de Ambion; y por otras herramientas

de diseño basadas en Internet en, por ejemplo, los sitios de Internet de Invitrogen, Dharmacon, Integrated DNA Technologies, Genscript, o Proligo. Los parámetros de búsqueda iniciales pueden incluir contenidos de G/C entre el 35 % y el 55 % y longitudes de ARNip entre 19 y 27 nucleótidos. La secuencia objetivo puede localizarse en la región codificante o en las regiones no traducidas 5' o 3' del ARNm.

5 Una realización de una secuencia objetivo de ADN de 19 nucleótidos para ARNm de IGF1R está presente en los nucleótidos 401 a 419 de SEC ID N.º: 1:

**5'-TCTTCGAGATGACCAATCT-3' SEC ID. N.º: 2.**

Un ARNip de la invención para dirigir una secuencia de ARNm correspondiente de SEC ID N.º: 2 y que tiene hebras de 21 nucleótidos y un saliente 3' de 2 nucleótidos es:

10

**5' - UCUUCGAGAUGACCAAUCUNN-3' SEC ID N.º: 3**  
**3' - NNAGAAGCUCUACUGGUUAGA-5' SEC ID N.º: 4.**

15 Cada residuo "N" puede ser cualquier nucleótido (A, C, G, U, T) o nucleótido modificado. El extremo 3' puede tener un número de residuos "N" entre e incluyendo 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Los residuos "N" en cada hebra pueden ser el mismo residuo (por ejemplo, UU, AA, CC, GG, o TT) o pueden ser diferentes (por ejemplo, AC, AG, AU, CA, CG, CU, GA, GC, GU, UA, UC, o UG). Los salientes 3' pueden ser el mismo o pueden ser diferentes. En una realización, ambas hebras tienen un saliente 3'UU.

Un ARNip de la invención para dirigir una secuencia de ARNm correspondiente de SEC ID N.º: 2 y que tiene hebras de 21 nucleótidos y un saliente 3'UU en cada hebra es:

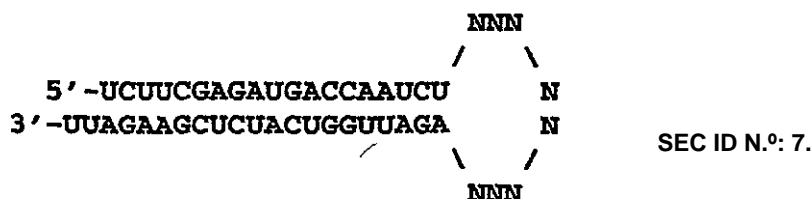
20 **5' -UCUUCGAGAUGACCAAUCUUU-3' SEC ID N.º: 5**  
**3' -UUAGAAGCUCUACUGGUUAGA-5' SEC ID N.º: 6.**

El ARN de interferencia también puede tener un saliente 5' de nucleótidos o puede tener extremos romos. Un ARNip de la invención para dirigir una secuencia de ARNm correspondiente de SEC ID N.º: 2 y que tiene hebras de 19 nucleótidos y extremos romos es:

25

**5' - UCUUCGAGAUGACCAAUCU -3' SEC ID N.º: 41**  
**3' - AGAAGCUCUACUGGUUAGA -5' SEC ID N.º: 42.**

30 Las hebras de un ARN de interferencia de doble cadena (por ejemplo, un ARNip) pueden estar conectadas para formar una estructura de horquilla o una estructura de tallo-lazo (por ejemplo, un ARNsh). Un ARNsh de la invención que tiene como objetivo una secuencia de ARNm correspondiente de SEC ID N.º: 1 y que tiene una región troncal de cadena doble de 19 pb bicatenaria y un saliente 3'UU es:



N es un nucleótido A, T, C, G, U, o una forma modificada conocida por alguien de habilidad ordinaria en la técnica. El número de nucleótidos N en el lazo es un número entre e incluyendo 3 a 23, o 5 a 15, o 7 a 13, o 4 a 9, o 9 a 11, o el número de nucleótidos N es 9. Algunos de los nucleótidos en el lazo pueden estar implicados en interacciones de pares de bases con otros nucleótidos en el lazo. Ejemplos de secuencias de oligonucleótidos que se pueden usar para formar el lazo incluyen 5'-UUCAAGAGA-3' (Brummelkamp, T.R. y cols. (2002) Science 296: 550) y 5'-UUUGUGUAG-3' (Castanotto, D. y cols. (2002) RNA 8: 1454). Se reconocerá por alguien experto en la técnica que el oligonucleótido de cadena simple resultante forma una estructura de tallo-lazo o de horquilla que comprende una región de cadena doble capaz de interactuar con la maquinaria de ARNi. La secuencia objetivo de ARNip identificada anteriormente puede prolongarse en el extremo 3' para facilitar el diseño de dúplex 27-meros de sustrato de dicer. La prolongación de la secuencia objetivo de ADN de 19 nucleótidos (SEC ID N.º: 2) identificada en la secuencia de ADN de IGF1R (SEC ID N.º: 1) en 6 nucleótidos proporciona una secuencia objetivo de ADN de 25 nucleótidos presente en los nucleótidos 401 a 425 de la SEC ID N.º: 1:

**5'-TCTTCGAGATGACCAATCTCAAGGA-3' SEC ID. N.º: 43.**

Un dúplex 27-mero sustrato de dicer de la invención para dirigir una secuencia de ARNm correspondiente de SEC ID N.º: 43 es:

**5'~ UCUUCGAGAUGACCAAUCUCAAGGA -3' SEC ID N.º: 44**  
**3'~ UUAGAAGCUCUACUGGUAGAGUCCU -5' SEC ID N.º: 45.**

Los dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena en sentido correcto (es decir, los nucleótidos GA de SEC ID N.º: 44) pueden ser desoxinucleótidos para procesamiento potenciado. El diseño de dúplex 27-meros sustratos de dicer a partir de 19-21 secuencias objetivo de nucleótidos, tal como se proporciona en el presente documento, se analiza adicionalmente por el sitio de Internet de Integrated DNA Technologies (IDT) y por Kim, D.-H. y cols., (febrero, 2005) Nature Biotechnology 23: 2; 222-226.

Cuando los ARN de interferencia se producen por síntesis química, la fosforilación en la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' de una o ambas hebras (cuando están presentes) pueden potenciar eficacia y especificidad de ARNip del complejo de RISC unido pero no se requiere dado que la fosforilación puede ocurrir intracelularmente.

La tabla 1 enumera ejemplos de secuencias objetivo de ADN de IGF1R de SEC ID N.º: 1 a partir de los que están diseñados los ARNip de la presente invención en una manera como se expone anteriormente. IGF1R codifica receptor de factor 1 de crecimiento similar a insulina, como se destaca anteriormente.

**Tabla 1. Secuencias objetivo de IGF1R para ARNip**

Secuencia objetivo de IGF1R	N.º de nucleótidos de partida con referencia a SEC ID N.º: 1	SEC ID N.º:
TCTTCGAGATGACCAATCT	401	2
TCAACAATGAGTACAATA	635	8
GACCATTGATTCTGTACT	1062	9
GAAGAATCGCATCATCATA	1548	10
TCATCAGCTTCACCGTTTA	1604	11
AGAATGTACAGAGTATGA	1643	12
GGACTCAGTACCGTTTA	1766	13
AGTTAATCGTGAAGTGGAA	1922	14
ACCTTTACCGG CACAATTA	2012	15
ACGGCACCATCGACATTGA	2069	16

(continuación)

<b>Secuencia objetivo de IGF1R</b>	<b>N.º de nucleótidos de partida con referencia a SEC ID N.º: 1</b>	<b>SEC ID N.º:</b>
TTGAGAATTTCTGCACAA	2210	17
TCTAACCTTCGGCCTTTCA	2416	18
TTCGGCCTTTCACATTGTA	2423	19
GATCACAAGTTGAGGATCA	2654	20
TGTACGTCTTCCATAGAAA	2909	21
GGAGAATAATCCAGTCCTA	3339	22
CATACCTCAACGCCAATAA	3416	23
ATTGCATGGTAGCCGAAGA	3464	24
CCGAAGATTTACAGTCAA	3476	25
TTTGGTATGACGCGAGATA	3505	26
TGACGCGAGATATCTATGA	3512	27
CGCATGTGCTGGCAGTATA	3781	28
GCATGTGCTGGCAGTATAA	3782	29
TCTACTACAGCGAGGAGAA	3881	30
TCGACGAGAGACAGCCTTA	4064	31
TCCTGAATCTGTGCAAACA	4158	32
TAATAGCAACAGAGCACTT	4411	33
CTCTGCTTCATAACGGAAA	4487	34
TCATTGCTTCTGACTAGAT	4904	35
CATTGCTTCTGACTAGATT	4905	36
GCTTCTGACTAGATTATTA	4909	37
GGCCAGAAATGGAGAATAA	3329	38
GCAGACACCTACAACATCA	2323	39
GTGGGAGGGTTGGTGATTA	2887	40

5 Como se cita en los ejemplos anteriores, alguien de experiencia en la técnica es capaz de usar la información de secuencia objetivo proporcionada en la tabla 1 para diseñar ARN de interferencia que tengan una longitud más corta o más larga que las secuencias proporcionadas en la tabla y haciendo referencia a la posición de secuencia en la SEC ID N.º: 1 y añadiendo y eliminando nucleótidos complementarios o casi complementarios a la SEC ID N.º: 1.

10 La reacción de escisión de ARN objetivo guiada por ARNip y otras formas de ARN de interferencia es altamente específica de secuencia. En general, el ARNip que contiene una hebra de nucleótidos en sentido correcto idéntica en secuencia a una parte del ARNm objetivo y una hebra de nucleótidos antisentido exactamente complementaria a una parte del ARNm objetivo son realizaciones de ARNip para inhibición de ARNm citadas en el presente documento. Sin embargo, la complementariedad de secuencia del 100 % entre la hebra de ARNip antisentido y el ARNm objetivo, o entre la hebra de ARNip antisentido y la hebra de ARNip en sentido correcto, no se requiere para

poner en práctica la presente invención. Así, por ejemplo, la invención permite variaciones de secuencia que podrían esperarse debido a mutación genética, polimorfismo de cepas, o divergencia evolutiva.

En una realización de la invención, la hebra antisentido del ARNip tiene al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con el ARNm objetivo. "Casi perfecta", como se usa en el presente documento, significa que la cadena antisentido del ARNip es "sustancialmente complementaria a" y la cadena en sentido correcto del ARNip es "sustancialmente idéntica a" al menos una parte del ARNm objetivo. "Identidad", como se conoce por alguien de habilidad ordinaria en la técnica es el grado de parentesco de secuencia entre secuencias de nucleótidos como se determina combinando el orden y la identidad de los nucleótidos entre las secuencias. En una realización, la hebra antisentido de un ARNip que tiene complementariedad del 80 % y entre el 80 % hasta el 100 %, por ejemplo, complementariedad del 85 %, 90 % o 95 %, a la secuencia de ARNm objetivo se considera complementariedad casi perfecta y se puede usar en la presente invención. Complementariedad contigua "perfecta" es apareamiento de bases de Watson-Crick estándar de pares de bases adyacentes. Complementariedad contigua "al menos casi perfecta" incluye complementariedad "perfecta" como se usa en el presente documento. Los procedimientos informáticos para determinar la identidad o complementariedad están diseñados para identificar el grado más grande de apareamiento de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, BLASTN (Altschul, S.F., y cols. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410).

El término "porcentaje de identidad" describe el porcentaje de nucleótidos contiguos en una primera molécula de ácido nucleico que es la misma que en el grupo de nucleótidos contiguos de la misma longitud en una segunda molécula de ácido nucleico. El término "complementariedad porcentual" describe el porcentaje de nucleótidos contiguos en una primera molécula de ácido nucleico que puede emparejar bases en el sentido correcto de Watson-Crick con un grupo de nucleótidos contiguos en una segunda molécula de ácido nucleico.

La relación entre un ARNm objetivo (hebra en sentido correcto) y una hebra de un ARNip (la hebra en sentido correcto) es aquella de identidad. La hebra en sentido correcto de un ARNip se llama también una hebra pasajera, si está presente. La relación entre un ARNm objetivo (hebra en sentido correcto) y la hebra de un ARNip (la hebra antisentido) es aquella de complementariedad. La hebra antisentido de un ARNip se llama también una hebra guía.

La penúltima base en una secuencia de ácidos nucleicos que está escrita en una dirección 5' a 3' es la siguiente a la última base, es decir, la base siguiente a la base 3'. Las penúltimas 13 bases de una secuencia de ácidos nucleicos escritas en una dirección 5' a 3' son las últimas 13 bases de una secuencia contiguas a la base 3' y no incluyendo la base 3'. Asimismo, las penúltimas 14, 15, 16, 17, o 18 bases de una secuencia de ácidos nucleicos escrita en una dirección 5' a 3' dirección son las últimas 14, 15, 16, 17, o 18 bases de una secuencia, respectivamente, próximas a la base 3' y no incluyendo la base 3'.

La frase "una región de al menos 13 nucleótidos contiguos que tiene al menos el 90 % de complementariedad de secuencia a, o al menos el 90 % de identidad de secuencia con, los 13 penúltimos nucleótidos del extremo 3' de un ARNm que corresponde a una cualquiera de (un identificador de secuencia)" permite una sustitución de un nucleótido. Las sustituciones de dos nucleótidos (es decir, 11/13 = identidad del 85 %/complementariedad) no están incluidas en una frase tal.

En una realización de la invención, la región de los nucleótidos contiguos es una región de al menos 14 nucleótidos contiguos que tiene al menos el 85 % de complementariedad de secuencia a, o al menos el 85 % de identidad de secuencia con, los 14 penúltimos nucleótidos del extremo 3' de un ARNm correspondiente a la secuencia identificada por cada identificador de secuencia. Las sustituciones de dos nucleótidos (es decir, 12/14 = identidad del 86 %/complementariedad) están incluidas en una frase tal.

En una realización adicional de la invención, la región de los nucleótidos contiguos es una región de al menos 15, 16, 17, o 18 nucleótidos contiguos que tienen al menos el 80 % de complementariedad de secuencia a, o al menos el 80 % de identidad de secuencia con, los 14 penúltimos nucleótidos del extremo 3' de un ARNm correspondiente a la secuencia del identificador de secuencia. Están incluidas sustituciones de tres nucleótidos en una frase tal.

La secuencia objetivo en los ARNm correspondiente a la SEC ID N.º: 1 puede estar en las regiones no traducidas 5' o 3' del ARNm así como en la región codificante del ARNm.

Una o ambas de las hebras del ARN de interferencia de doble cadena pueden tener un saliente 3' desde 1 hasta 6 nucleótidos, que pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una mezcla de los mismos. Los nucleótidos del saliente no están formando pares de bases. En una realización de la invención, el ARN de interferencia comprende un saliente 3' de TT o UU. En otra realización de la invención, el ARN de interferencia comprende al menos un extremo romo. Los extremos tienen usualmente un grupo fosfato 5' o un grupo hidroxilo 3'. En otras realizaciones, la hebra antisentido tiene un grupo fosfato 5' y la hebra en sentido correcto tiene un grupo hidroxilo 5'. En aún otras realizaciones, los extremos están modificados adicionalmente por adición covalente de las otras moléculas o grupos funcionales.

Las hebras sentido y antisentido del ARNip de cadena doble pueden estar en una formación de dúplex de dos hebras individuales según se describe anteriormente o pueden ser una molécula individual donde las regiones de complementariedad están formando pares de bases y están unidas covalentemente por un lazo de horquilla tal como para formar una hebra individual. Se cree que la horquilla se escinde intracelularmente por una proteína llamada dicer para formar un ARN de interferencia de dos moléculas de ARN que forman pares de bases individuales.

Los ARN de interferencia pueden diferir del ARN que se da en la naturaleza por la adición, delección, sustitución o modificación de uno o más nucleótidos. El material no nucleotídico puede unirse al ARN de interferencia, bien en el extremo 5', bien en el extremo 3', o bien internamente. Tales modificaciones están diseñadas comúnmente para incrementar la resistencia a nucleasas de los ARN de interferencia, para mejorar la captación celular, para potenciar marcado como objetivo celular, para ayudar en localización de ARN de interferencia, para mejorar adicionalmente la estabilidad, o para reducir el potencial de activación de la ruta de interferón. Por ejemplo, ARN de interferencia pueden comprender un nucleótido de purina en los extremos de salientes. La conjugación de colesterol al extremo 3' de la cadena en sentido correcto de una molécula de ARNip por medio de un engarce de pirrolidina, por ejemplo, también proporciona estabilidad a un ARNip.

Las modificaciones adicionales incluyen una molécula de biotina terminal 3', un péptido conocido por tener propiedades de penetración celular, una nanopartícula, un peptidomimético, un tinte fluorescente, o un dendrímero, por ejemplo.

Los nucleótidos se pueden modificar en su parte de base, en su parte de azúcar, o en la parte de fosfato de la molécula y funcionar en realizaciones de la presente invención. Las modificaciones incluyen sustituciones con grupos alquilo, alcoxi, amino, deaza, halo, hidroxilo, tiol o una combinación de los mismos, por ejemplo. Los nucleótidos pueden estar sustituidos con análogos con mayor estabilidad tales como reemplazando un ribonucleótido con un desoxirribonucleótido o que tengan modificaciones de azúcares tales como grupos 2' OH reemplazados por grupos 2' amino, grupos 2' O-metilo, o un puente de metileno 2'-O, 4'-C, por ejemplo. Ejemplos de un análogo de purina o pirimidina de nucleótidos incluyen una xantina, una hipoxantina, una azapurina, una metiltioadenina, 7-deaza-adenosina y nucleótidos O-modificados y N-modificados. El grupo fosfato del nucleótido puede modificarse sustituyendo uno o más de los oxígenos del grupo fosfato con nitrógeno o con azufre (fosforotioatos). Las modificaciones son útiles, por ejemplo, para potenciar la función, para mejorar la estabilidad o la permeabilidad, o para dirigir la localización o el marcado como objetivo.

Puede haber una región o regiones de la hebra de ARN de interferencia antisentido que es (son) no complementaria(s) a una parte de SEC ID N.º: 1. Las regiones no complementarias pueden estar en el extremo 3', 5' o en ambos extremos de una región complementaria o entre las regiones complementarias.

Los ARN de interferencia pueden generarse exógenamente por síntesis química, por transcripción *in vitro*, o por escisión de ARN de doble cadena más largo con dicer u otra nucleasa apropiada con actividad similar. Los ARN de interferencia sintetizados químicamente, producidos a partir de fosforamiditas de ribonucleósidos usando un sintetizador de ADN/ARN convencional, pueden obtenerse a partir de suministradores comerciales tales como Ambion Inc. (Austin, TX), Invitrogen (Carlsbad, CA), o Dharmacon (Lafayette, CO). Los ARN de interferencia se purifican por extracción con un disolvente o una resina, precipitación, electroforesis, cromatografía, o una combinación de las mismas, por ejemplo. Alternativamente, el ARN de interferencia se puede usar con poca si alguna purificación para evitar pérdidas debidas al procesamiento de muestras.

Los ARN de interferencia se pueden expresar también endógenamente a partir de vectores de expresión plasmídicos o víricos o a partir de casetes de expresión mínima, por ejemplo, fragmentos generados por PCR que comprenden uno o más promotores y una plantilla o plantillas apropiadas para el ARN de interferencia. Ejemplos de vectores de expresión basados en plásmidos comercialmente disponibles para ARNsh incluyen miembros de la serie pSilencer (Ambion, Austin, TX) y pCpG-ARNip (InvivoGen, San Diego, CA). Los vectores víricos para expresión de ARN de interferencia puede derivarse de una diversidad de virus incluyendo adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus (por ejemplo, VIH, FIV, y EIAV) y herpes virus. Ejemplos de vectores virales comercialmente disponibles para expresión de ARNsh incluyen pSilencer adeno (Ambion, Austin, TX) y pLenti6BLOCK-iT™-DEST (Invitrogen, Carlsbad, CA). Selección de vectores víricos, procedimientos para expresar el ARN de interferencia del vector y procedimientos de administrar el vector vírico están dentro de la habilidad ordinaria de alguien en la técnica. Ejemplos de kits para producción de casetes de expresión de ARNsh generados por PCR incluyen Silencer Express (Ambion, Austin, TX) y siXpress (Mirus, Madison, WI). Un primer ARN de interferencia puede administrarse por medio de expresión *in vivo* a partir de un primer vector de expresión capaz de expresar el primer ARN de interferencia y se puede administrar un segundo ARN de interferencia por medio de expresión *in vivo* a partir de un segundo vector de expresión capaz de expresar el segundo ARN de interferencia, o ambos ARN de interferencia se pueden administrar por medio de expresión *in vivo* a partir de un vector de expresión individual capaz de expresar ambos ARN de interferencia.

Los ARN de interferencia se pueden expresar a partir de una diversidad de promotores eucarióticos conocidos por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica, incluyendo los promotores pol III, tales como los promotores U6 o H1, o

los promotores pol II, tales como el promotor de citomegalovirus. Aquellos de habilidad en la técnica reconocerán que estos promotores pueden adaptarse también para permitir la expresión inducible del ARN de interferencia.

*Hibridación en condiciones fisiológicas:* en ciertas realizaciones de la presente invención, una hebra antisentido de un ARN de interferencia híbrida con un ARNm *in vivo* como parte del complejo de RISC.

5 La "hibridación" se refiere a un proceso en el que ácidos nucleicos de cadena simple con secuencias de bases complementarias o casi complementarias interaccionan para formar complejos de enlaces de hidrógeno llamados híbridos. Las reacciones de hibridación son sensibles y selectivas. *In vitro*, la especificidad de hibridación (es decir, la rigurosidad) está controlada por las concentraciones de sal o de formamida en soluciones de prehibridación y de hibridación, por ejemplo y por la temperatura de hibridación; tales procedimientos se conocen bien en la técnica. En particular, la rigurosidad se incrementa reduciendo la concentración de sal, incrementando la concentración de formamida, o elevando la temperatura de hibridación.

10 Por ejemplo, las condiciones de rigurosidad alta podrían tener lugar en formamida a aproximadamente el 50 % a 37 °C hasta 42 °C. Las condiciones de rigurosidad reducida podrían ocurrir en formamida a aproximadamente el 35 % al 25 % a 30 °C a 35 °C. Los ejemplos de condiciones de rigurosidad para hibridación se proporcionan en Sambrook, J., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Ejemplos adicionales de condiciones de hibridación restrictivas incluyen NaCl 400 mM, PIPES 40 mM, pH 6,4, EDTA 1 mM, 50 °C o 70 °C durante 12-16 horas seguido por lavado, o hibridación a 70 °C en SSC 1X o a 50 °C en SSC 1X, formamida al 50 % seguido por lavado a 70 °C en SSC 0,3X, o hibridación a 70 °C en SSC 4X o a 50 °C en SSC 4X, formamida al 50 % seguido por lavado a 67 °C en SSC 1X. La temperatura para hibridación es de aproximadamente 5-10 °C menos que la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del híbrido donde  $T_m$  se determina para híbridos entre 19 y 49 pares de bases de longitud usando el siguiente cálculo:  $T_m \text{ °C} = 81,5 + 16,6 (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ G} + \text{C}) - (600/\text{N})$  donde N es el número de bases en el híbrido y  $[\text{Na}^+]$  es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación.

25 El ensayo de hibridación *in vitro* anteriormente descrito proporciona un procedimiento de predecir si la unión entre un ARNip candidato y un objetivo tendrá especificidad. Sin embargo, en el contexto del complejo de RISC, la escisión específica de un objetivo puede ocurrir también con una hebra antisentido que no demuestra rigurosidad alta para hibridación *in vitro*.

30 *ARN de interferencia de cadena simple:* como se cita anteriormente, los ARN de interferencia funcionan en última instancia como hebras individuales. Se ha encontrado que ARN de interferencia de cadena simple (ss) efectúa silenciación de ARNm, no obstante menos eficientemente que el ARNip de cadena doble. Por lo tanto, las realizaciones de la presente invención estipulan también administración de un ARN de interferencia ss que hibrida en condiciones fisiológicas con una parte de la SEC ID N.º: 1 y tiene una región de al menos complementariedad casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con la parte de hibridación de SEC ID N.º: 1. El ARN de interferencia ss tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos como para el ARNip ds citado anteriormente. El ARN de interferencia ss tiene un fosfato 5' o está fosforilado *in situ* o *in vivo* en la posición 5'. El término "5' fosforilado" se usa para describir, por ejemplo, los polinucleótidos o los oligonucleótidos que tienen un grupo fosfato unido por medio de enlace éster al hidroxilo C5 del azúcar (por ejemplo, ribosa, desoxirribosa, o un análogo de las mismas) en el extremo 5' del polinucleótido u oligonucleótido.

40 Los ARN de interferencia ss se sintetizan químicamente o por transcripción *in vitro* o se expresan endógenamente a partir de vectores o casetes de expresión como para ARN de interferencia ds. Los grupos de fosfato 5' se pueden añadir por medio de una cinasa, o un fosfato 5' puede ser el resultado de una escisión por nucleasa de un ARN. La administración es como para ARN de interferencia ds. En una realización, los ARN de interferencia que tienen extremos protegidos y modificaciones resistentes a nucleasas se administran para silenciación. Los ARN de interferencia ss se pueden secar para almacenamiento o disolver en una solución acuosa. La solución puede contener tampones o sales para inhibir la fusión o para estabilización.

50 *ARN de interferencia de horquilla:* un ARN de interferencia de horquilla es una molécula individual (por ejemplo, una cadena de oligonucleótidos individual) que comprende tanto las hebras en sentido correcto como las hebras antisentido en una estructura de tallo-lazo o de horquilla (por ejemplo, un ARNsh). Por ejemplo, ARNsh pueden expresarse a partir de vectores de ADN en los que los oligonucleótidos de ADN que codifican una hebra de ARN de interferencia en sentido correcto están ligados a los oligonucleótidos de ADN que codifican la hebra de ARN de interferencia antisentido complementaria reversa por un espaciador corto. Si es necesario para el vector de expresión elegido, las T 3' terminales y los nucleótidos que forman sitios de restricción pueden añadirse. El transcrito de ARN resultante se pliega sobre sí mismo para formar una estructura de tallo-lazo.

55 *Modo de administración:* el ARN de interferencia puede administrarse por medio de administración de aerosol, bucal, dérmica, intradérmica, de inhalación, intramuscular, intranasal, intraocular, intrapulmonar, intravenosa, intraperitoneal, nasal, ocular, oral, ótica, parenteral, de parche, subcutánea, sublingual, tópica, o transdérmica, por ejemplo.



- 5 El ARN de interferencia puede administrarse directamente al tejido ocular por inyección tal como inyecciones perioculares, conjuntivales, subtenon, intracamerales, intravítreas, intraoculares, subretinianas, subconjuntivales, retrobulbares, o intracanaliculares; por aplicación directa al ojo usando un catéter u otro dispositivo de colocación tal como un sedimento retiniano, inserto intraocular, supositorio o un implante que comprende un material poroso, no poroso, o gelatinoso; por gotas o pomadas oculares tópicas; o por un dispositivo de liberación lenta en el callejón sin salida o implantado adyacente a la esclerótica (transescleral) o dentro del ojo. La inyección intracameral puede ser a través de la córnea dentro de la cámara anterior para permitir al agente alcanzar el cuerpo trabecular. La inyección intracanalicular puede ser dentro de los canales colectores venosos que drenan el canal de Schlemm o dentro del canal de Schlemm.
- 10 *Asunto:* un sujeto en necesidad de tratamiento para angiogénesis ocular o en riesgo de desarrollar angiogénesis ocular es un ser humano u otro mamífero que tiene angiogénesis ocular o que está en riesgo de tener angiogénesis ocular asociada con expresión indeseada o inapropiada o con actividad de IGF-1R según se cita en el presente documento. Las estructuras oculares asociadas con tales trastornos pueden incluir el ojo, retina, coroides, cristalino, córnea, red trabecular, iris, nervio óptico, cabeza del nervio óptico, esclerótica, segmentos anteriores o posteriores, o
- 15 cuerpo ciliar, por ejemplo. Un sujeto puede ser también una célula ocular, cultivo celular, órgano u órgano o tejido *ex vivo*.
- Formulaciones y dosificación:* las formulaciones farmacéuticas comprenden ARN de interferencia, o sales de los mismos, de la invención hasta el 99 % en peso mezclados con un vehículo fisiológicamente aceptable tal como agua, tampón, solución salina, glicina, ácido hialurónico, manitol y similares.
- 20 Los ARN de interferencia de la presente invención se administran como soluciones, suspensiones, o emulsiones. Los siguientes son ejemplos de formulaciones posibles realizadas por esta invención.

	Cantidad en % en peso
ARN de interferencia	hasta el 99; 0,1-99; 0,1-50; 0,5-10,0
Hidroxipropilmetilcelulosa	0,5
Cloruro de sodio	0,8
Cloruro de benzalconio	0,01
EDTA	0,01
NaOH/HCl	c.s. para pH 7,4
Agua purificada (libre de ARNasa)	c.s. hasta 100 ml

	Cantidad en % en peso
ARN de interferencia	hasta el 99; 0,1-99; 0,1- 50; 0,5-10,0
Solución salina tamponada con fosfato	1,0
Cloruro de benzalconio	0,01
Polisorbato 80	0,5
Agua purificada (libre de ARNasa)	Cantidad suficiente para llegar al 100 %

	Cantidad en % en peso
ARN de interferencia	hasta el 99; 0,1-99; 0,1- 50; 0,5-10,0
Fosfato monobásico de sodio	0,05
Fosfato dibásico de sodio (anhidro)	0,15
Cloruro de sodio	0,75
EDTA disódico	0,05
Cremophor EL	0,1
Cloruro de benzalconio	0,01
HCl y/o NaOH	pH 7,3-7,4
Agua purificada (libre de ARNasa)	Cantidad suficiente para llegar al 100 %

	Cantidad en % en peso
ARN de interferencia	hasta el 99; 0,1-99; 0,1- 50; 0,5-10,0
Solución salina tamponada con 1,0 fosfato	
Hidroxipropil-β-ciclodextrina	4,0
Agua purificada (libre de ARNasa)	Cantidad suficiente para llegar al 100 %

- 5 En general, una cantidad efectiva de los ARN de interferencia de realizaciones de la invención da como resultado una concentración extracelular en la superficie de la célula objetivo desde 100 pM hasta  $\mu$ M, o desde 1 nM hasta 100 nM, o desde 5 nM hasta aproximadamente 50 nM, o hasta aproximadamente 25 nM. La dosis requerida para alcanzar esta concentración local variará dependiendo de un número de factores, incluyendo el procedimiento de administración, el lugar de administración, el número de capas celulares entre el sitio de administración y la célula o tejido objetivo, si la administración es local o sistémica, etc. La concentración en el sitio de administración puede ser considerablemente más alta que si está en la superficie de la célula o tejido objetivo. Las composiciones tópicas se administran a la superficie del órgano objetivo de una a cuatro veces por día, o en un programa de administración prolongado tal como diariamente, semanalmente, bisemanalmente, mensualmente, o durante más tiempo, de acuerdo con la discreción de rutina de un trabajador clínico experto. El pH de la formulación es aproximadamente pH 4 a 9, o bien pH 4,5 a pH 7,4.
- 10
- 15 El tratamiento terapéutico de pacientes con ARN de interferencia dirigidos contra ARNm de IGF1R se espera que sea beneficioso sobre tratamientos moleculares incrementando la duración de la acción, permitiendo de este modo dosificación menos frecuente y mayor conformidad del paciente.

20 Una cantidad efectiva de una formulación puede depender de factores tales como la edad, raza y sexo del sujeto, la gravedad de la angiogénesis ocular, la velocidad de recambio de transcritos de gen objetivo/proteína objetivo, la potencia de ARN de interferencia y la estabilidad de ARN de interferencia, por ejemplo. En una realización, el ARN de interferencia se administra tópicamente a un órgano objetivo y alcanza el tejido que contiene ARNm de IGF1R tal como la retina o la cabeza del nervio óptico a una dosis terapéutica mejorando de este modo un proceso morboso asociado a angiogénesis.

25 *Vehículos aceptables:* un vehículo aceptable hace referencia a aquellos vehículos que causan como mucho, poca o ninguna irritación ocular, proporcionan preservación adecuada si es necesario y administran uno o más ARN de interferencia de la presente invención en una dosificación homogénea. Un vehículo aceptable para administración de ARN de interferencia de realizaciones de la presente invención incluye los reactivos de transfección basados en lípidos catiónicos TransIT®-TKO (Mirus Corporation, Madison, WI), LIPOFECTINA®, Lipofectamina, OLIGOFECTAMINA™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), o DHARMAFECT™ (Dharmacon, Lafayette, CO); policones

tales como polietilenoimina; péptidos catiónicos tales como Tat, poliarginina, o Penetratina (péptido Antp); o liposomas. Los liposomas se forman a partir de lípidos que forman vesículas estándar y un esteroles, tal como colesterol y pueden incluir una molécula objetivo tal como un anticuerpo monoclonal que tiene afinidad de unión por antígenos de superficie de células endoteliales, por ejemplo. Adicionalmente, los liposomas pueden ser liposomas PEGilados.

Los ARN de interferencia pueden administrarse en solución, en suspensión, o en dispositivos de administración bioerosionables o no bioerosionables. Los ARN de interferencia pueden administrarse solos o como componentes de conjugados covalentes, definidos. Los ARN de interferencia también pueden estar formando complejos con lípidos catiónicos, péptidos catiónicos, o polímeros catiónicos; estar formando complejos con proteínas, proteínas de condensación o dominios proteicos con propiedades de unión de ácidos nucleicos (por ejemplo, protamina); o pueden encapsularse en nanopartículas o liposomas. La administración específica de células o específica de tejidos puede llevarse a cabo por la inclusión de un resto de marcado como objetivo apropiado tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

Para administración oftálmica, un ARN de interferencia puede combinarse con conservantes oftalmológicamente aceptables, codisolventes, tensioactivos, potenciadores de viscosidad, potenciadores de penetración, tampones, cloruro de sodio, o agua para formar una suspensión o solución acuosa, oftálmica estéril. Las formulaciones de solución se pueden preparar disolviendo el ARN de interferencia en un tampón acuoso isotónico fisiológicamente aceptable. Adicionalmente, la solución puede incluir un tensioactivo aceptable para ayudar en disolver el inhibidor. Los agentes de construcción de viscosidad, tales como hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, o similares se pueden añadir a las composiciones de la presente invención para mejorar la retención del compuesto.

Con el fin de preparar una formulación de pomada oftálmica estéril, el ARN de interferencia se combina con un conservante en un vehículo adecuado, tal como aceite mineral, lanolina líquida, o vaselina blanca. Las formulaciones de gel oftálmicas estériles se pueden preparar suspendiendo el ARN de interferencia en una base hidrófila preparada a partir de la combinación de, por ejemplo, CARBOPOL®-940 (BF Goodrich, Charlotte, NC), o similares, de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. VISCOAT® (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) puede usarse para inyección intraocular, por ejemplo. Otras composiciones de la presente invención pueden contener agentes potenciadores de penetración tales como cremephor y TWEEN® 80 (monolaurato de polioxietileno sorbitán, Sigma Aldrich, San Luis, MO), en el caso de que el ARN de interferencia sea menos penetrante en el ojo.

*Kits*: realizaciones de la presente invención proporcionan un kit que incluye reactivos para atenuar la expresión de un ARNm como se cita en el presente documento en una célula. El kit contiene un ARNip o un vector de expresión ARNsh. Para vectores de expresión ARNip y ARNsh el kit contiene también un reactivo de transfección u otro vehículo de administración adecuado. Para vectores de expresión de ARNsh vírico, el kit puede contener el vector vírico y/o los componentes necesarios para la producción de vector vírico (por ejemplo, una línea celular de envasado, así como un vector que comprende la plantilla de vector vírico y vectores coadyuvantes adicionales para envasado). El kit puede contener también vectores de expresión de ARNip o ARNsh positivo y negativo (por ejemplo, un ARNip control no dirigido o un ARNip que tiene como objetivo un ARNm no relacionado). El kit puede contener también reactivos para evaluar knockdown del gen objetivo deseado (por ejemplo, cebadores y sondas para PCR cuantitativa para detectar el ARNm objetivo y/o anticuerpos frente a la proteína correspondiente para pruebas de bandas de western). Alternativamente, el kit puede comprender una secuencia de ARNip o una secuencia de ARNsh y las instrucciones y materiales necesarios para generar el ARNip por transcripción *in vitro* o para construir un vector de expresión de ARNsh.

Se proporciona adicionalmente una combinación farmacéutica en forma de kit que incluye, en combinación envasada, un medio de vehículo adaptado para recibir un medio contenedor en confinamiento en espacio reducido con ello y un primer medio contenedor que incluye una composición de ARN de interferencia y un vehículo aceptable. Tales kits pueden incluir adicionalmente, si se desea, uno o más componentes de kits farmacéuticos convencionales, tales como, por ejemplo, contenedores con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, contenedores adicionales, etc., como será fácilmente patente para aquellos expertos en la técnica. Las instrucciones impresas, bien como insertos o bien como etiquetas, indicando las cantidades de los componentes a administrarse, directrices para la administración, y/o directrices para mezclar los componentes, pueden estar también incluidas en el kit.

La capacidad de ARN de interferencia para someter a knock-down los niveles de expresión génica del gen objetivo endógeno en, por ejemplo, una línea celular ocular humana se evalúa *in vitro* como sigue. Las células humanas transformadas se plaquearon 24 horas antes de transfección en medio de crecimiento estándar (por ejemplo, DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10 %). La transfección se lleva a cabo usando Dharmafect 1 (Dharmacon, Lafayette, CO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante a concentraciones de ARN de interferencia que varían desde 0,1 nM-100 nM. El ARNip de control no marcado como objetivo y el ARNip de lámina A/C (Dharmacon) se usan como controles. Los niveles de ARNm objetivo se evaluaron por qPCR 24 horas después de la transfección usando, por ejemplo, cebadores directo y reverso TAQMAN® y un conjunto de sondas que comprende el sitio objetivo (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los niveles de proteínas objetivo pueden evaluarse

aproximadamente 72 horas tras la transfección (dependientes de tiempo real en velocidad de recambio de proteínas) por prueba de bandas de western, por ejemplo. Las técnicas estándar de aislamiento de ARN y/o de aislamiento de proteínas a partir de células cultivadas son bien conocidas para aquellos expertos en la técnica. Para reducir la posibilidad de efectos fuera del objetivo, no específicos, se usa la concentración posible más baja de ARN de interferencia que produzca el nivel deseado de knock-down en expresión del gen objetivo.

La capacidad de ARN de interferencia de la presente invención para causar knock-down en los niveles de expresión de proteína IGF-1R se ejemplifica adicionalmente en el Ejemplo 1 como sigue.

De acuerdo con ello, en el presente documento se revela al menos:

Un procedimiento para atenuar expresión de ARNm de IGF1R en un sistema de expresión, comprendiendo dicho procedimiento: administrar a dicho sistema de expresión una composición que comprende una cantidad eficaz de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho ARN de interferencia: una hebra de nucleótidos en sentido correcto, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos; en el que dicho nucleótido antisentido de la cadena híbrida en condiciones fisiológicas con una parte de ARNm que corresponde a SEC ID N.º: 1 y tiene una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con dicha parte hibridante de ARNm correspondiente a la SEC ID N.º: 1, en el que dicha expresión de ARNm de IGF1R está de este modo atenuada.

Uso de un medicamento para tratar la angiogénesis ocular en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo dicho procedimiento: administrar a un ojo de dicho sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho ARN de interferencia: una hebra de nucleótidos en sentido correcto, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos; en la que dicha hebra de nucleótidos antisentido híbrida en condiciones fisiológicas a una parte de ARNm correspondiente a la SEC ID N.º: 1 y tiene al menos una región de complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con dicha parte hibridante de ARNm correspondiente a la SEC ID N.º: 1, en el que de este modo dicha angiogénesis ocular se trata.

Un procedimiento de atenuar expresión de ARNm de IGF1R en un sistema de expresión, comprendiendo dicho procedimiento: administrar a dicho sistema de expresión una composición que comprende una cantidad eficaz de ARN de interferencia de cadena simple que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que dicho ARN de interferencia de cadena simple híbrida en condiciones fisiológicas con una parte de ARNm correspondiente a SEC ID N.º: 1 que comprende el nucleótido 401, 635, 1062, 1548, 1604, 1643, 1766, 1922, 2012, 2069, 2210, 2416, 2423, 2654, 2909, 3339, 3416, 3464, 3476, 3505, 3512, 3781, 3782, 3881, 4064, 4158, 4411, 4487, 4904, 4905, 4909, 3329, 2323 o 2887 y dicho ARN de interferencia tiene una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con dicha parte hibridante de ARNm correspondiente a SEC ID N.º: 1, en el que dicha expresión de ARNm de IGF1R está de este modo atenuada.

Un procedimiento de atenuar expresión de ARNm de IGF1R en un sistema de expresión, comprendiendo dicho procedimiento: administrar a dicho sistema de expresión una composición que comprende una cantidad eficaz de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho ARN de interferencia: una región de al menos 13 nucleótidos contiguos que tienen al menos complementariedad de secuencia al 80 %, o al menos identidad de secuencia al 80 % con, dichos 13, 14, 15, 16, 17, o 18 penúltimos nucleótidos de dicho extremo 3' de un ARNm correspondiente con una cualquiera de SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 8-SEC ID N.º: 40, en el que dicha expresión de ARNm de IGF1R está de este modo atenuada.

El uso, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la angiogénesis ocular en un sujeto, de una composición que comprende: una cantidad efectiva de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho ARN de interferencia: una región de al menos 13 nucleótidos contiguos que tiene al menos complementariedad de secuencia al 90 % para, o al menos identidad de secuencia al 90 % con, dichos penúltimos 13 nucleótidos de dicho extremo 3' de un ARNm correspondiente a una cualquiera de SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 8-SEC ID N.º: 40, en el que de este modo se trata angiogénesis ocular.

El uso, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la angiogénesis ocular en un sujeto, de una composición que comprende: una molécula de ARNip de cadena doble que regula a la baja la expresión de un gen IGF1R por medio de interferencia de ARN, en la que: cada hebra de dicha molécula de ARNip es independientemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 27 nucleótidos de longitud; y una hebra de dicha molécula de ARNip comprende una secuencia de nucleótidos que tiene complementariedad sustancial a un ARNm correspondiente con dicho gen de IGF1R, respectivamente, de tal forma que dicha molécula de ARNip dirige la escisión de dicho ARNm por medio de interferencia de ARN.

Una composición que comprende un ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y que comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a una cualquiera de SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 8-SEC ID N.º: 40, o un complemento de la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Una composición que comprende una molécula de ARNip de cadena doble que regula a la baja la expresión de un gen de IGF1R por medio de ARN de interferencia, en la que: cada hebra de dicha molécula de ARNip es independientemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 27 nucleótidos de longitud; y una hebra de dicha molécula de ARNip comprende una secuencia de nucleótidos que tiene complementariedad sustancial a un ARN correspondiente con dicho gen de IGF1R de tal forma que dicha molécula de ARNip dirige la escisión de dicho ARNm por medio de interferencia de ARN.

10 y

Un procedimiento de atenuar la expresión de ARNm de IGF1R a un sujeto que expresa ARNm de IGF1R, comprendiendo dicho procedimiento: administrar a dicho sujeto una composición que comprende una cantidad efectiva de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho ARN de interferencia: una hebra de nucleótidos en sentido correcto, una cadena de nucleótidos antisentido y una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos; en el que dicha hebra de nucleótidos antisentido hibrida en condiciones fisiológicas a una parte de ARNm correspondiente a la SEC ID N.º: 1 y tiene al menos una región de complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con dicha parte hibridante de ARNm correspondiente a la SEC ID N.º: 1, en el que de este modo dicha expresión de ARNm de IGFR1 está atenuada.

## 20 **Ejemplo 1**

### **ARN de interferencia para silenciar IGF1R específicamente**

El presente estudio examina la capacidad de ARN de interferencia de IGF1R para producir knock down en los niveles de expresión de proteína IGF-1R endógena en células HeLa cultivadas.

25 La transfección de células HeLa se llevó a cabo usando concentraciones estándar *in vitro* (0,1-10 nM) de ARNip de IGF1R, ARNip libre de RISC CONTROLip n.º: 1, o ARNip no dirigido CONTROLip n.º: 2 (NTC2) y reactivo de transfección DHARMAFECT® n.º: 1 (Dharmacon, Lafayette, CO). Todos los ARNip se disolvieron en tampón ARNip 1X, una solución acuosa de KCl 20 mM, HEPES 6 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 0,2 mM. Las muestras de control incluían un control de tampón en el que el volumen de ARNip se reemplazó con un volumen igual de tampón ARNip 1X (-ARNip). Se llevaron a cabo pruebas de bandas de western usando un anticuerpo anti-IGF-1Rβ evaluando la expresión de proteínas IGF-1R. Este anticuerpo reconoce tanto las proteínas precursoras de IGF-1R de 200 kDa como las proteínas IGF-1Rβ maduras de 97 kDa. Los ARNip de IGF1R son ARN de interferencia de doble cadena que tienen especificidad por los objetivos siguientes: IGF1Rip n.º: 6 tiene como objetivo SEC ID N.º: 38; IGF1Rip n.º: 8 tiene como objetivo SEC ID N.º: 39; IGF1Rip n.º: 17 tiene como objetivo SEC ID N.º: 13; IGF1Rip n.º: 18 tiene como objetivo SEC ID N.º: 40. Como se muestra por los datos de la figura, los ARNip IGF1Rip n.º: 8 e IGF1Rip n.º: 35 17 redujeron la expresión de proteínas IGF-1R significativamente a las concentraciones de 10 nM y de 1 nM en relación a los ARNip de control, indicando que estos ARNip de IGF1R son más efectivos que IGF1Rip n.º: 6 e IGF1Rip n.º: 18. Ninguno de los ARNip redujo la expresión de proteínas IGF-1R significativamente a 0,1 nM.

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, los términos "un" y "una" se toman para querer decir "uno", "al menos uno" y "uno o más".

40

**Listado de secuencias**

<110> Chatterton, Jon E. Bingaman, David P.

<120> Inhibición de IGF-1R mediada por ARNi para tratamiento de angiogénesis ocular

5

<130> 45623-P017US

<150> 60/754.796

<151> 29-12-2.005

10

<160> 45

<170> PatentIn version 3.3

15

<210> 1

<211> 4989

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20

<400> 1

tttttttttt	ttttgagaaa	gggaatttca	tcccaaataa	aaggaatgaa	gtctggctcc	60
ggaggagggt	ccccgacctc	gctgtggggg	ctcctgtttc	tctccgccgc	gctctcgctc	120
tggccgacga	gtggagaaat	ctgcgggcca	ggcatcgaca	tccgcaacga	ctatcagcag	180
ctgaagcgcc	tggagaactg	cacggtgatc	gagggctacc	tccacatcct	gctcatctcc	240
aaggccgagg	actaccgcag	ctaccgcttc	cccaagctca	cggtcattac	cgagtacttg	300
ctgctgttcc	gagtggctgg	cctcgagagc	ctcggagacc	tcttcccaa	cctcacggtc	360
atccgcggt	ggaaactctt	ctacaactac	gccctggta	tcttcgagat	gaccaatctc	420
aaggatattg	ggctttacaa	cctgaggaac	attactcggg	gggcatcag	gattgagaaa	480
aatgctgacc	tctgttacct	ctccactgtg	gactggctcc	tgatcctgga	tgcggtgtcc	540
aataactaca	ttgtggggaa	taagcccca	aaggaatgtg	gggacctgtg	tccagggacc	600
atggaggaga	agccgatgtg	tgagaagacc	accatcaaca	atgagtacaa	ctaccgctgc	660
tggaccacaa	accgctgcca	gaaaatgtgc	ccaagcacgt	gtgggaagcg	ggcgtgcacc	720
gagaacaatg	agtgtgcca	ccccgagtg	ctgggcagct	gcagcgcgcc	tgacaacgac	780
acggcctgtg	tagcttgccg	ccactactac	tatgccggtg	tctgtgtgcc	tgccctgccc	840
cccaacacct	acaggtttga	gggctggcgc	tgtgtggacc	gtgacttctg	cgccaacatc	900
ctcagcgccg	agagcagcga	ctccgagggg	tttgtgatcc	acgacggcga	gtgcatgcag	960
gagtgccct	cgggcttcat	ccgcaacggc	agccagagca	tgtactgcat	cccttgtgaa	1020
ggtccttgcc	cgaaggctctg	tgaggaagaa	aagaaaacaa	agaccattga	ttctgttact	1080
tctgctcaga	tgctccaagg	atgcaccatc	ttcaagggca	atctgctcat	taacatccga	1140
cgggggaata	acattgcttc	agagctggag	aacttcatgg	ggctcatcga	ggtgggtgacg	1200
ggctacgtga	agatccgcca	ttctcatgcc	ttggtctcct	tgctcttctc	aaaaaacctt	1260
cgctcatcc	taggagagga	gcagctagaa	gggaattact	ccttctacgt	cctcgacaac	1320
cagaacttgc	agcaactgtg	ggactgggac	caccgcaacc	tgaccatcaa	agcagggaaa	1380

ES 2 392 185 T3

atgtactttg ctttcaatcc caaattatgt gtttccgaaa tttaccgcat ggaggaagtg 1440  
acggggacta aagggcgcca aagcaaaggg gacataaaca ccaggaacaa cggggagaga 1500  
gcctcctgtg aaagtgacgt cctgcatttc acctccacca ccacgtcgaa gaatcgcac 1560  
atcataacct ggcaccggtg ccggccccct gactacaggg atctcatcag cttcaccggt 1620  
tactacaagg aagcaccctt taagaatgtc acagagtatg atgggcagga tgcctgcggc 1680  
tccaacagct ggaacatggt ggacgtggac ctcccgccca acaaggacgt ggagcccggc 1740  
atcttactac atgggctgaa gccctggact cagtacgccg tttacgtcaa ggctgtgacc 1800  
ctcaccatgg tggagaacga ccatatccgt ggggccaaga gtgagatcct gtacattcgc 1860  
accaatgctt cagttccttc cattcccttg gacgttcttt cagcatcgaa ctctcttct 1920  
cagttaatcg tgaagtggaa ccctccctct ctgcccacg gcaacctgag ttactacatt 1980  
gtgcgctggc agcggcagcc tcaggacggc tacctttacc ggcacaatta ctgctccaaa 2040  
gacaaaatcc ccatcaggaa gtatgccgac ggcaccatcg acattgagga ggtcacagag 2100  
aaccccaaga ctgaggtgtg tgggtggggag aaagggcctt gctgcgctg ccccaaaact 2160  
gaagccgaga agcaggccga gaaggaggag gctgaatacc gcaaagtctt tgagaatttc 2220  
ctgcacaact ccatcttctg gcccagacct gaaaggaagc ggagagatgt catgcaagtg 2280  
gccaacacca ccatgtccag ccgaagcagg aacaccacgg ccgcagacac ctacaacatc 2340  
accgaccgg aagagctgga gacagagtac cttttctttg agagcagagt ggataacaag 2400  
gagagaactg tcatttctaa ctttcggcct ttcacattgt accgcatcga tatccacagc 2460  
tgcaaccacg aggtgagaa gctgggctgc agcgcctcca acttcgtctt tgcaaggact 2520  
atgcccgcag aaggagcaga tgacattcct gggccagtga cctgggagcc aaggcctgaa 2580  
aactccatct ttttaaagtg gccggaacct gagaatccca atggattgat tctaattgat 2640  
gaaataaaat acggatcaca agttgaggat cagcgagaat gtgtgtccag acaggaatac 2700  
aggaagtatg gaggggcca gctaaaccgg ctaaaccgg ggaactacac agcccggatt 2760  
cagggcacat ctctctctgg gaatgggtcg tggacagatc ctgtgttctt ctatgtccag 2820  
gccaaaacag gatatgaaaa cttcatccat ctgatcatcg ctctgccctg cgctgtcctg 2880  
ttgatcgtgg gagggttggt gattatgctg tacgtcttcc atagaaagag aaataacagc 2940  
aggctgggga atggagtgt gtatgcctct gtgaaccgg agtacttcag cgctgtgat 3000  
gtgtacgttc ctgatgagt ggaggtggct cgggagaaga tcaccatgag ccgggaactt 3060  
gggcaggggt cgtttgggat ggtctatgaa ggagttgcca aggggtgtggt gaaagatgaa 3120  
cctgaaacca gagtggccat taaaacagtg aacgaggccg caagcatgcg tgagaggatt 3180  
gagtttctca acgaagcttc tgtgatgaag gagttcaatt gtcaccatgt ggtgcgattg 3240  
ctgggtgtgg tgtcccaagg ccagccaaca ctggtcatca tggaactgat gacacggggc 3300  
gatctcaaaa gttatctccg gtctctgagg ccagaaatgg agaataatcc agtcctagca 3360  
cctccaagcc tgagcaagat gattcagatg gccggagaga ttgcagacgg catggcatac 3420



ES 2 392 185 T3

ctcaacgcca ataagttcgt ccacagagac cttgctgccc ggaattgcat ggtagccgaa 3480  
 gatttcacag tcaaaatcgg agattttggt atgacgcgag atatctatga gacagactat 3540  
 taccggaaag gaggcaaagg gctgctgccc gtgctgctgga tgtctcctga gtcctcaag 3600  
 gatggagtct tcaccactta ctcggacgtc tggtccttcg gggtcgtcct ctgggagatc 3660  
 gccacactgg ccgagcagcc ctaccagggc ttgtccaacg agcaagtcct tcgcttcgtc 3720  
 atggagggcg gccttctgga caagccagac aactgtcctg acatgctggt tgaactgatg 3780  
 cgcatgtgct ggcagtataa cccaagatg aggccttcct tcctggagat catcagcagc 3840  
 atcaaagagg agatggagcc tggcttcagg gaggtctcct tctactacag cgaggagaac 3900  
 aagctgcccg agccggagga gctggacctg gagccagaga acatggagag cgtccccctg 3960  
 gacccctcgg cctcctcgtc ctccctgcc a ctgcccgaca gacactcagg acacaaggcc 4020  
 gagaacggcc ccggccctgg ggtgctggtc ctccgcgcca gcttcgacga gagacagcct 4080  
 tacgcccaca tgaacggggg ccgcaagaac gagcgggcct tgccgctgcc ccagtcttcg 4140  
 acctgctgat cttggatcc tgaatctgtg caaacagtaa cgtgtgcgca cgcgcagcgg 4200  
 ggtggggggg gagagagagt ttaacaatc cattcacaag cctcctgtac ctcagtggat 4260  
 cttcagttct gcccttgctg ccgcggggag acagcttctc tgcaagtaaaa cacatttggg 4320  
 atgttccttt tttcaatatg caagcagctt tttattcctt gcccaaacc ttaactgaca 4380  
 tgggccttta agaaccttaa tgacaacact taatagcaac agagcacttg agaaccagtc 4440  
 tcctcactct gtccctgtcc ttccctgttc tccctttctc tctcctctct gttcataac 4500  
 ggaaaaataa ttgccacaag tccagctggg aagccctttt tatcagtttg aggaagtggc 4560  
 tgtccctgtg gcccatacca accactgtac acaccgcct gacaccgtgg gtcattacaa 4620  
 aaaaacacgt ggagatggaa atttttacct ttatctttca cctttctagg gacatgaaat 4680  
 ttacaaaggg ccatcgttca tccaaggctg ttaccatttt aacgctgcct aattttgcca 4740  
 aaatcctgaa ctttctcct catcggcccg gcgctgattc ctcgtgtccg gaggcattgg 4800  
 tgagcatggc agctggttgc tccatttgag agacacgctg gcgacacact ccgtccatcc 4860  
 gactgcccct gctgtgctgc tcaaggccac aggcacacag gtctcattgc ttctgactag 4920  
 attattattt gggggaactg gacacaatag gtctttctct cagtgaaggt ggggagaagc 4980  
 tgaaccggc 4989

<210> 2

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

<400> 2

5 tcttcgagat gaccaatct 19

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Hebra en sentido correcto con 3'NN

15 <220>

<221> misc\_RNA

<222> (1)..(19)

<223> Ribonucleótidos

20 <220>

<221> misc\_feature

<222> (20)..(21)

<223> cualquier A, T/U, C, G

25 <400> 3

ucuucgagau gaccaaucun n 21

<210> 4

<211> 21

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Hebra antisentido con 3'NN

35

<220>  
 <221> misc\_RNA  
 <222> (1)..(19)  
 <223> Ribonucleótidos  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20)..(21)  
 <223> cualquier A, T/U, C, G  
 10  
 <400> 4  
 agauugguca ucucgaagan n 21  
  
 <210> 5  
 15 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Hebra en sentido correcto  
  
 <400> 5  
 ucuucgagau gaccaaucuu u 21  
  
 25 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Hebra antisentido  
  
 <400> 6  
 agauugguca ucucgaagau u 21  
 35

<210> 7

<211> 48

<212> ARN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Dúplex de horquilla con lazo

<220>

10 <221> misc\_RNA

<222> (1)..(19)

<223> Ribonucleótidos

<220>

15 <221> misc\_feature

<222> (20)..(27)

<223> cualquier A, T/U, C, G

<220>

20 <221> misc\_RNA

<222> (28)..(48)

<223> Ribonucleótidos

<400> 7

25 ucuucgagau gaccaaucun nnnnnnaga uuggucaucu cgaagauu 48

<210> 8

<211> 19

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

35 <400> 8

tcaacaatga gtacaacta 19

<210> 9  
<211> 19

5 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia objetivo

10

<400> 9  
gaccattgat tctgtcat 19

<210> 10

15 <211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia objetivo

<400> 10  
gaagaatgc atcatcata 19

25 <210> 11  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Secuencia objetivo

<400> 11  
tcatcagctt caccgta 19

35

<210> 12

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia objetivo

<400> 12

10 agaatgtcac agagtatga 19

<210> 13

<211> 19

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

20 <400> 13

ggactcagta cgccgttta 19

<210> 14

<211> 19

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

30

<400> 14

agttaatcgt gaagtggaa 19

<210> 15

35 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia objetivo

<400> 15

acctttaccg gcacaata 19

10 <210> 16

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia objetivo

<400> 16

acggcaccat cgacattga 19

20

<210> 17

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia objetivo

<400> 17

30 ttgagaattt cctgcacaa 19

<210> 18

<211> 19

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

5 <400> 18

tctaaccttc ggccttca 19

<210> 19

<211> 19

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

15

<400> 19

ttcggccttt cacattgta 19

<210> 20

20 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Secuencia objetivo

<400> 20

gatcacaagt tgaggatca 19

30 <210> 21

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>



<223> Secuencia objetivo

<400> 21

tgtacgtctt ccatagaaa 19

5

<210> 22

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia objetivo

<400> 22

15 ggagaatat ccagtccta 19

<210> 23

<211> 19

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

25 <400> 23

catacctcca cgccaataa 19

<210> 24

<211> 19

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

35

<400> 24

attgcatggt agccgaaga 19

<210> 25

5 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia objetivo

<400> 25

ccgaagattt cacagtcaa 19

15 <210> 26

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Secuencia objetivo

<400> 26

tttggatga cgcgagata 19

25

<210> 27

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Secuencia objetivo

<400> 27

35 tgacgcgaga tatctatga 19

<210> 28

<211> 19

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

10 <400> 28

cgcatgtgct ggcagtata 19

<210> 29

<211> 19

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

20

<400> 29

gcatgtgctg gcagtataa 19

<210> 30

25 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Secuencia objetivo

<400> 30

tctactacag cgaggagaa 19

35 <210> 31

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Secuencia objetivo

<400> 31

tcgacgagag acagcctta 19

10

<210> 32

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia objetivo

<400> 32

20 tcctgaatct gtgcaaaca 19

<210> 33

<211> 19

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

30 <400> 33

taatagcaac agagcactt 19

<210> 34

<211> 19

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

5

<400> 34

ctctgctca taacggaaa 19

<210> 35

10 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia objetivo

<400> 35

tcattgcttc tgactagat 19

20 <210> 36

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Secuencia objetivo

<400> 36

cattgcttct gactagatt 19

30

<210> 37

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> Secuencia objetivo

<400> 37

5 gcttctgact agattatta 19

<210> 38

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

15 <400> 38

ggccagaaat ggagaataa 19

<210> 39

<211> 19

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia objetivo

25

<400> 39

gcagacacct acaacatca 19

<210> 40

30 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Secuencia objetivo

<400> 40

gtgggagggt tgggatta 19

5 <210> 41

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Hebra en sentido correcto

<400> 41

ucuucgagau gaccaaucu 19

15

<210> 42

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Hebra antisentido

<400> 42

25 agauugguca ucucgaaga 19

<210> 43

<211> 25

<212> ARN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Hebra en sentido correcto

35 <400> 43

tcttcgagat gaccaatctc aagga 25

<210> 44

<211> 25

5 <212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Hebra en sentido correcto

10

<400> 44

ucuucgagau gaccaaucuc aagga 25

<210> 45

15 <211> 25

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Hebra antisentido

<400> 45

uccuugagau uggucaucuc gaagau 27

25



## REIVINDICACIONES

1. Composición para su uso en el tratamiento de angiogénesis ocular que comprende: una cantidad efectiva de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho ARN de interferencia:
- 5 una región de al menos 13 nucleótidos contiguos que tiene al menos complementariedad de secuencia al 90 % para, o al menos identidad de secuencia al 90 % con, los penúltimos 13 nucleótidos del extremo 3' de un ARNm correspondiente a una cualquiera de SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 8-SEC ID N.º: 40,
- en la que de este modo se trata angiogénesis ocular.
2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de angiogénesis ocular que comprende:
- 10 una molécula de ARNip de cadena doble que regula a la baja la expresión de un gen de IGF1R por medio de ARN de interferencia, en la que:
- 15 cada hebra de dicha molécula de ARNip es independientemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 27 nucleótidos de longitud; y una hebra de dicha molécula de ARNip comprende una secuencia de nucleótidos que tiene complementariedad sustancial a una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ADN de una cualquiera de SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 8-SEC ID N.º: 40, de tal forma que dicha molécula de ARNip dirige la escisión de dicho ARNm por medio de interferencia de ARN.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de angiogénesis ocular que comprende un ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y que comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ADN de una cualquiera de SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 8-SEC ID N.º: 40, o un complemento de la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 4. La composición para su uso en el tratamiento de angiogénesis ocular de la reivindicación 3, que comprende adicionalmente un segundo ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y que comprende una región de al menos 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleótidos contiguos que tienen al menos complementariedad del 80 % a, o al menos identidad de secuencia del 80 % con los 13 penúltimos nucleótidos del extremo 3' de un segundo ARNm correspondiente a la secuencia de ADN de una cualquiera de SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 8-SEC ID N.º: 40.
- 25 5. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de angiogénesis ocular de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos, que comprende:
- 30 una hebra de nucleótidos en sentido correcto, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta de al menos 19 nucleótidos;
- en la que dicho nucleótido antisentido de la cadena tiene al menos complementariedad del 80 % con una parte de ARNm correspondiente a una secuencia objetivo de IGF1R que comprende nucleótido 401, 635, 1062, 1548, 1604, 1643, 1766, 1922, 2012, 2069, 2210, 2416, 2423, 2654, 2909, 3339, 3416, 3464, 3476, 3505, 3512, 3781, 3782, 3881, 4064, 4158, 44111, 4487, 4904, 4905, 4909, 3329, 2323 o 2887 de la SEC ID N.º: 1 y tiene una región de al menos complementariedad contigua casi perfecta con dicha parte hibridante de ARNm correspondiente a SEC ID N.º: 1,
- 35 para atenuar la expresión de ARNm de IGF1R en el ojo de un sujeto que sufre de una afección asociada con angiogénesis ocular.
6. Composición de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de angiogénesis ocular, que comprende adicionalmente el uso de un segundo ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y que comprende una región de al menos 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleótidos contiguos que tienen al menos complementariedad del 80 %, o al menos identidad de secuencia del 80 % con los 13 penúltimos nucleótidos del extremo 3' de un segundo ARNm correspondiente a la secuencia de ADN de una cualquiera de SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 8-SEC ID N.º: 40.
- 40
- 45

