

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 325**

51 Int. Cl.:
C12N 15/113 (2010.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05855060 .9**
96 Fecha de presentación: **19.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1831369**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2007**

54 Título: **Inhibición de amiloide sérico A por iARN para el tratamiento de glaucoma**

30 Prioridad:
23.12.2004 US 638706 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.12.2012

73 Titular/es:
NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel , CH

72 Inventor/es:
CLARK, ABBOT, F.;
WANG, WAN-HENG y
MCNATT, LORETTA

74 Agente/Representante:
MILTENYI, Peter

ES 2 393 325 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 amiloide sérico A por iARN para el tratamiento de glaucoma

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de composiciones de ARN de interferencia para la inhibición de la expresión de amiloide sérico A (SAA) en glaucoma, particularmente para glaucoma de ángulo abierto primario.

Antecedentes de la invención

10 El glaucoma es un grupo heterogéneo de neuropatías ópticas que comparten determinadas características clínicas. La pérdida de visión en glaucoma se debe a la muerte selectiva de células ganglionares retinianas en la retina neural que se diagnostica clínicamente por cambios característicos en el campo visual, defectos en la capa de fibras nerviosas y una excavación progresiva de la cabeza del nervio óptico (CNO). Uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de glaucoma es la presencia de hipertensión ocular (presión intraocular elevada, PIO). Se necesita una presión intraocular adecuada para mantener la forma del ojo y para proporcionar un gradiente de presión para permitir el flujo de humor acuoso a la córnea avascular y el cristalino. La PIO parece estar implicada también en la patogénesis de glaucoma de tensión normal en el que los pacientes tienen lo que se considera a menudo que es una PIO normal.

15 La PIO elevada asociada con el glaucoma se debe a una resistencia elevada al flujo de salida de humor acuoso en la malla trabecular (MT), un pequeño tejido especializado ubicado en el ángulo iris-córnea de la cámara anterior ocular. Los cambios glaucomatosos en la MT incluyen una pérdida de células de la MT y la deposición y acumulación de residuos extracelulares incluyendo material similar a placas proteínicas. Además, también hay cambios que se producen en la CNO glaucomatosa. En ojos glaucomatosos, hay cambios morfológicos y de movilidad en células gliales de la CNO. En respuesta a la PIO elevada y/o ataques isquémicos transitorios, hay un cambio en la composición de la matriz extracelular de la CNO y alteraciones en las morfologías de axones de células gliales y células ganglionares retinianas.

20 Los glaucomas primarios resultan de alteraciones en el flujo de fluido intraocular que tienen una base anatómica o fisiológica. Se producen glaucomas secundarios como resultado de lesión o traumatismo en el ojo o una enfermedad preexistente. El glaucoma de ángulo abierto primario (GAAP), también conocido como glaucoma crónico o simple, representa el noventa por ciento de todos los glaucomas primarios. GAAP se caracteriza por la degeneración de la malla trabecular, dando como resultado una resistencia anómalamente alta al drenaje de fluido del ojo. Una consecuencia de tal resistencia es un aumento en la PIO que se requiere para impulsar el fluido producido normalmente por el ojo a través del aumento de resistencia.

25 Las terapias antiglaucoma actuales incluyen la disminución de la PIO mediante el uso de supresores de la formación de humor acuoso o agentes que potencian el flujo de salida uveoescleral, trabeculoplastia con láser o trabeculectomía que es una cirugía de filtración para mejorar el drenaje. Enfoques farmacéuticos antiglaucoma han presentado diversos efectos secundarios no deseados. Por ejemplo, mióticos tales como pilocarpina pueden provocar visión borrosa y otros efectos secundarios visuales negativos. Inhibidores de la anhidrasa carbónica administrados de manera sistémica pueden provocar también náuseas, dispepsia, fatiga y acidosis metabólica. Además, determinados betabloqueantes se han asociado cada vez más con efectos secundarios pulmonares graves atribuibles a sus efectos sobre receptores beta-2 en tejido pulmonar. Los simpatomiméticos provocan taquicardia, arritmia e hipertensión. Tales efectos secundarios negativos pueden conducir a una disminución del cumplimiento del paciente o a una interrupción de la terapia.

30 De manera más importante, las terapias antiglaucoma actuales no abordan directamente el daño patológico en la malla trabecular, el nervio óptico y la pérdida de axones y células ganglionares retinianas, que continúa incólume. En vista de la importancia del glaucoma, y lo inadecuado de los métodos anteriores de tratamiento, sería deseable tener un método mejorado de tratamiento del glaucoma que aborde las causas subyacentes de su progresión.

45 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a ARN de interferencia que se dirigen a ARNm de SAA y de ese modo interfieren con la expresión de ARNm de SAA. Los ARN de interferencia de la invención son útiles para tratar glaucoma relacionado con SAA. La presente invención se define mediante las siguientes realizaciones 1 a 16.

50 1. 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 secuencia de nucleótidos sentido, una secuencia de nucleótidos antisentido y una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos entre las secuencias sentido y antisentido; en la que la secuencia antisentido se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y tiene una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con la parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 para su uso en el tratamiento de glaucoma asociado a amiloide sérico A en un ojo de un sujeto.

2. 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 secuencia de nucleótidos que tiene una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con una parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, en la que la secuencia de nucleótidos se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, para su uso en el tratamiento de glaucoma asociado a amiloide A en un ojo de un sujeto.
3. Método *in vitro* para atenuar la expresión de ARNm de amiloide sérico A que comprende administrar 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 secuencia de nucleótidos sentido, una secuencia de nucleótidos antisentido y una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos entre las secuencias sentido y antisentido; en el que la secuencia antisentido se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y tiene una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con la parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 a una célula.
4. Método *in vitro* para atenuar la expresión de ARNm de amiloide sérico A que comprende administrar 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 secuencia de nucleótidos que tiene una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con una parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, en el que la secuencia de nucleótidos se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 a una célula.
5. Composición o método del punto 1 ó 3, en donde la secuencia antisentido tiene una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 21 a 23 nucleótidos con la parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y comprende una secuencia TT adicional en el extremo 3' de cada una de la secuencia sentido y antisentido.
6. Composición o método del punto 1, 3 ó 5, en donde la secuencia de nucleótidos sentido y la secuencia de nucleótidos antisentido están conectadas mediante una secuencia de nucleótidos en bucle.
7. Composición o método de cualquiera de los puntos 1, 3, 5 y 6, en donde la secuencia antisentido está diseñada para dirigirse a una secuencia de nucleótidos de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 que comienza en el nucleótido 230, 357, 362, 380, 447, 470, 527, 531, 548 ó 557.
8. Composición o método de cualquiera de los puntos 1, 3, 5 y 6, en donde la secuencia antisentido está diseñada para dirigirse a una secuencia de nucleótidos de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 43, 170, 175, 193, 260, 283, 339 ó 370.
9. Composición o método de cualquiera de los puntos 1, 3, 5, 6 y 8, en donde la secuencia antisentido está diseñada para dirigirse a una secuencia de nucleótidos de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 252, 271, 276, 325, 343.
10. Composición o método de cualquiera de los puntos 1, 3, 5 a 9, en donde la secuencia antisentido comprende
 CUUUGCCACUCCUGCCCCA (SEQ ID NO: 37), UCGGAAGUGAUUGGGGUCU (SEQ ID NO: 38),
 UUUGUCUGAGCCGAUGUAA (SEQ ID NO: 39), AACCAGGCCCGUGAGAAGC (SEQ ID NO: 40),
 CUGAGCCGAUGUAAUUGGC (SEQ ID NO: 41), GCCACUCCUGCCCCAUUUA (SEQ ID NO: 69),
 CCCCCGAGCAUGGAAGUAAU (SEQ ID NO: 42), CUCUGGCAUUGCUGAUCAC (SEQ ID NO: 43),
 GCCUGUGAGUCUCUGGAUA (SEQ ID NO: 44), GCCACUCCUGCCCCAUUUA (SEQ ID NO: 45),
 GCCAGCAGGUCGGAAGUGA (SEQ ID NO: 46), AGUCUCUGGAUUAUUCUCUC (SEQ ID NO: 47),
 UUUUAUUGGCAGCCUGAUCG (SEQ ID NO: 48), UUGCUGAUCACUUCUGCGG (SEQ ID NO: 49),
 CUGGAUUAUUCUCUCUGGCA (SEQ ID NO: 50), UCUGCCACUCCUGCCCCAU (SEQ ID NO: 51),
 AACCCCUUGGAGAGCCUCC (SEQ ID NO: 52), UGCCAUGUCCCCAACCCC (SEQ ID NO: 53),
 AUAGAGAUUAUCUGUUUGAA (SEQ ID NO: 54), CGAGCAUAGAGAUUAUCUGU (SEQ ID NO: 55),
 CUUUGGGCAGCAUCAUAGU (SEQ ID NO: 56), AGACACCCCAGGUCCUCU (SEQ ID NO: 57),
 CCUGGAACGGCUGAUGAGU (SEQ ID NO: 58), CCAAUAUAAUAGUAGUCUA (SEQ ID NO: 59),
 UCCAAUACAGUGCUGCUGU (SEQ ID NO: 60), CUCAGCUUUCUGUUGGAC (SEQ ID NO: 61),

CCAUUCCUCAGCUUUCUCG (SEQ ID NO: 62), CCGGCCCAUUCCUCAGCU (SEQ ID NO: 63),
 CUUUGCCACUCCGGCCCA (SEQ ID NO: 64) o UCUGAAGCGGUCGGGGUCU (SEQ ID NO: 65).

11. Composición o método de cualquier punto anterior, en donde el ARN de interferencia comprende una modificación en una parte de base, en una parte de azúcar o en una parte de fosfato.

5 12. Composición o método de cualquiera de los puntos 1, 3 y 5, en donde la composición comprende además un
 segundo ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos, y que comprende una secuencia de
 nucleótidos sentido, una secuencia de nucleótidos antisentido y una región de al menos el 80% de
 complementariedad de al menos 19 nucleótidos entre las secuencias sentido y antisentido; en donde la secuencia
 10 antisentido del segundo ARN de interferencia se hibrida en condiciones fisiológicas con una segunda parte del
 ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y la secuencia antisentido tiene una región de al menos el
 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con la segunda parte hibridante de ARNm que
 corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

13. Composición de cualquiera de los puntos 1, 3 y 5, en donde la composición comprende una cantidad eficaz de
 15 una mezcla de al menos cuatro ARN de interferencia, teniendo cada ARN de interferencia una longitud de 19 a 49
 nucleótidos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, comprendiendo cada ARN de interferencia: una secuencia
 de nucleótidos sentido, una secuencia de nucleótidos antisentido y una región de al menos el 80% de
 complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos entre las secuencias sentido y antisentido de cada uno de
 los cuatro ARN de interferencia; en la donde las secuencias antisentido de la mezcla se hibridan en condiciones
 20 fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 175, 252, 276
 y 325, respectivamente, y tienen una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19
 nucleótidos con la parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 175,
 252, 276 y 325, respectivamente.

14. Composición del punto 2 o método del punto 4, en donde la composición comprende además un segundo ARN
 25 de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos, y comprendiendo una segunda secuencia de
 nucleótidos que tiene una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos
 con una segunda parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

15. Composición del punto 2 o método del punto 4, en donde la composición comprende una cantidad eficaz de una
 30 mezcla de al menos cuatro ARN de interferencia, teniendo cada ARN de interferencia una longitud de 19 a 49
 nucleótidos, y comprendiendo la mezcla: una primera, segunda, tercera y cuarta secuencia de nucleótidos que
 tienen una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con la parte
 hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 175, 252, 276 y 325,
 respectivamente.

16. Composición o método de cualquier punto anterior, en donde la composición se prepara para administración por
 vía tópica, intravítrea o transescleral.

35 Se da a conocer en el presente documento un método de atenuación de la expresión de ARNm de amiloide sérico A
 en un ojo de un sujeto. El método comprende administrar al ojo del sujeto una composición que comprende una
 cantidad eficaz de ARN de interferencia tal como ARNip bicatenario (bc) o ARNip monocatenario (mc) que tiene una
 longitud de 19 a 49 nucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 El ARNip bicatenario comprende una secuencia de nucleótidos sentido, una secuencia de nucleótidos antisentido y
 una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos. Además, la
 secuencia antisentido se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO:
 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 que son secuencias sentido de ADN que codifican para SAA1, SAA2 y SAA4,
 respectivamente (n.º de referencia de GenBank NM_000331, BC020795 y NM_006512) y tiene una región de
 45 complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con la parte hibridante de ARNm
 que corresponde a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respectivamente. La administración de una
 composición de este tipo atenúa la expresión de ARNm de amiloide sérico A del ojo del sujeto.

Cuando el ARN de interferencia es monocatenario, el ARN de interferencia comprende una secuencia de
 nucleótidos que tiene una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos
 con una parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

50 En una realización de la invención, el ARNip antisentido está diseñado para dirigirse a una secuencia de nucleótidos
 de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 que comienza en el nucleótido 230, 357, 362, 380, 447, 470, 527, 531,
 548 ó 557. En otra realización de la invención, la secuencia antisentido está diseñada para dirigirse a una secuencia
 de nucleótidos de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 43, 170, 175, 193, 260,
 283, 339 ó 370. En una realización adicional de la invención, la secuencia antisentido está diseñada para dirigirse a
 55 una secuencia de nucleótidos de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 252, 271,
 276, 325 ó 343. Aún en una realización adicional de la invención, la secuencia antisentido está diseñada para
 dirigirse a una secuencia de nucleótidos de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 3 que comienza en el nucleótido

153, 166, 222, 227, 251, 268, 297, 335, 356, 384, 390, 396, 406 ó 423.

Se da a conocer adicionalmente en el presente documento un método de tratamiento de un glaucoma asociado a amiloide sérico A en un sujeto que lo necesita. El método comprende administrar al 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 secuencia de nucleótidos sentido, una secuencia de nucleótidos antisentido y una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos. La secuencia antisentido se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, y tiene una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con la parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respectivamente. De ese modo, se trata el glaucoma asociado a amiloide sérico A.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 proporciona un análisis de QPCR de la razón de ARNm de SAA2/ARNr 18s para examinar el efecto de ARNip sobre ARNm de SAA endógeno en células de malla trabecular normales NTM 765 transfectadas con ARNip SMARTPOOL[®] que se dirige a ARNm de SAA. Se transfectaron las células de malla trabecular con 100 nM del ARNip usando reactivo Dharmafect n.º 1 a tres concentraciones diferentes durante 24 h: Con: control; Tratam 1: tratamiento 1 a 0,05 µl/pocillo de 100 µl; Tratam 2: tratamiento 2 a 0,2 µl/pocillo de 100 µl; Tratam 3: tratamiento 3 a 0,4 µl/pocillo de 100 µl.

La figura 2 proporciona un análisis de QPCR de la razón de ARNm de SAA2/ARNr 18s para examinar el efecto de ARNip sobre ARNm de SAA endógeno en células de malla trabecular glaucomatosas GTM686 transfectadas con ARNip SMARTPOOL[®] que se dirige a ARNm de SAA. Se transfectaron las células de malla trabecular con 100 nM del ARNip usando reactivo Dharmafect n.º 1 a tres concentraciones diferentes durante 24 h: Con: control; Tratam 1: tratamiento 1 a 0,05 µl/pocillo de 100 µl; Tratam 2: tratamiento 2 a 0,2 µl/pocillo de 100 µl; Tratam 3: tratamiento 3 a 0,4 µl/pocillo de 100 µl. *: p<0,05 frente a tanto el control como el tratamiento 1 mediante ANOVA de una vía, luego prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

La figura 3 proporciona monitorización electrónica en tiempo real (RE-CES[™]) del efecto del tratamiento con ARNip de SAA sobre el crecimiento y la morfología de células de malla trabecular normales (NTM 765-04) y glaucomatosas (GTM 686-03). Se transfectaron las células con 100 nM de ARNip SMARTPOOL[®] que se dirige a ARNm de SAA usando reactivo Dharmafect n.º 1 a tres concentraciones diferentes durante 48 h: T1: 0,05 µl/pocillo de 100 µl; T2: 0,2 µl/pocillo de 100 µl; T3: 0,4 µl/pocillo de 100 µl.

La figura 4 proporciona los resultados de un ensayo ELISA para el nivel de proteína de SAA endógena en lisados de células de malla trabecular normales NTM765 tratadas con ARNip. Se transfectaron las células con 100 nM de ARNip SMARTPOOL[®] de SAA que se dirige a ARNm de SAA usando reactivo Dharmafect n.º 1 a tres concentraciones diferentes durante 48 h: Tratam 1: tratamiento 1 a 0,05 µl/pocillo de 100 µl; Tratam 2: tratamiento 2 a 0,2 µl/pocillo de 100 µl; Tratam 3: tratamiento 3 a 0,4 µl/pocillo de 100 µl.

La figura 5 proporciona los resultados de un ensayo ELISA para el nivel de proteína de SAA endógena en lisados de células de malla trabecular glaucomatosas GTM686 tratadas con ARNip. Se transfectaron las células con 100 nM de ARNip SMARTPOOL[®] de SAA que se dirige a ARNm de SAA usando reactivo Dharmafect n.º 1 a tres concentraciones diferentes durante 48 h: Tratam 1: tratamiento 1 a 0,05 µl/pocillo de 100 µl; Tratam 2: tratamiento 2 a 0,2 µl/pocillo de 100 µl; Tratam 3: tratamiento 3 a 0,4 µl/pocillo de 100 µl. *: p<0,05; **: p<0,01 frente al control mediante ANOVA luego prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Descripción detallada de la invención

La interferencia por ARN, denominada "iARN", es un método para reducir la expresión de un gen diana que se efectúa mediante moléculas de ARN pequeño mono o bicatenario. Los ARN de interferencia incluyen ARN de interferencia pequeños, o bien bicatenarios o bien monocatenarios (ARNip bc o ARNip mc), microARN (miARN), ARN en horquilla pequeños (ARNhp) y otros. Sin querer restringirse a la teoría, la interferencia por ARN parece producirse *in vivo* con la escisión de precursores de ARNbc para dar ARN pequeños de aproximadamente 20 a 25 nucleótidos de longitud. La escisión se logra mediante ARNasa III-ARN helicasa Dicer. La hebra "sentido" de un ARNip, es decir, la hebra que tiene exactamente la misma secuencia que una secuencia de ARNm diana, se elimina, dejando la hebra "antisentido" que es complementaria al ARNm diana que funciona reduciendo la expresión del ARNm. La hebra antisentido del ARNip parece guiar un complejo proteico conocido como RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) al ARNm, complejo que entonces escinde el ARNm mediante la proteína Argonauta del RISC, reduciendo de ese modo la producción mediante ese ARNm. Los ARN de interferencia son catalíticos y la reducción de la expresión del ARNm puede lograrse con cantidades subestequiométricas de ARN de interferencia en relación con ARNm. La reducción en la expresión de ARNm también puede producirse mediante mecanismos transcripcionales y traduccionales.

La presente invención se refiere al uso de ARN de interferencia para la inhibición de la expresión de amiloide sérico

A (SAA) en trastornos oculares. Según la presente invención, ARNip proporcionados de manera exógena efectúan el silenciamiento de ARNm de SAA de estructuras oculares. Los presentes inventores han mostrado previamente que la expresión de ARNm y proteína de amiloide sérico A (SAA) están significativamente regulados por incremento en células y tejidos de MT glaucomatosa (solicitud de patente estadounidense pendiente USSN 60/530.430, titulada "Uso del gen de amiloide sérico A en el diagnóstico y tratamiento de glaucoma e identificación de agentes antiglaucoma" presentada el 17 de diciembre de 2003. Los presentes inventores han verificado la expresión de ARNm diferencial observada usando chips génicos Affymetrix mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (QPCR) y el aumento de los niveles de proteína de SAA mediante ELISA de SAA (solicitud de patente estadounidense pendiente mencionada anteriormente).

Las secuencias de ácido nucleico mencionadas en el presente documento están escritas en la dirección de 5' a 3' a menos que se indique lo contrario. El término "ácido nucleico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a bien ADN o bien ARN o una forma modificada de los mismos que comprende las bases de purina o pirimidina presentes en el ADN (adenina "A," citosina "C," guanina "G," timina "T") o en el ARN (adenina "A," citosina "C," guanina "G," uracilo "U"). Los ARN de interferencia proporcionados en el presente documento pueden comprender bases de "T", particularmente en los extremos 3', aún cuando las bases de "T" no se producen de manera natural en el ARN. "Ácido nucleico" incluye los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" y puede referirse a una molécula monocatenaria o una molécula bicatenaria. Una molécula bicatenaria se forma mediante apareamiento de bases de Watson-Crick entre bases de A y T, bases de C y G, y bases de A y U. Las hebras de una molécula bicatenaria pueden tener complementariedad parcial, sustancial o completa entre sí y formarán un dúplex híbrido, cuya fuerza de unión depende de la naturaleza y el grado de complementariedad de la secuencia de bases. Una secuencia de ARNm se determina fácilmente conociendo la secuencia de ADN de la hebra sentido o antisentido que codifica para el mismo. Por ejemplo, SEQ ID NO: 1 proporciona la secuencia de ADN de la hebra sentido que corresponde al ARNm para amiloide sérico A1. La secuencia de ARNm es idéntica a la secuencia de la hebra sentido de ADN con las bases de "T" sustituidas por residuos de "U". Por tanto, la secuencia de ARNm de amiloide sérico A1 se conoce a partir de SEQ ID NO: 1, la secuencia de ARNm de amiloide sérico A2 se conoce a partir de SEQ ID NO: 2 y la secuencia de ARNm de amiloide sérico A4 se conoce a partir de SEQ ID NO: 3.

ARNm de amiloide sérico A: El amiloide sérico A humano comprende un número de apolipoproteínas pequeñas, expresadas de manera diferencial codificadas por genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 11. Hay cuatro isoformas de SAA. La base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information en ncbi.nlm.nih.gov proporciona la secuencia de ADN correspondiente para el ARN mensajero de amiloide sérico A1 como número de referencia NM_000331, proporcionada a continuación como SEQ ID NO: 1. La secuencia codificante para amiloide sérico A1 es desde los nucleótidos 225-593.

SAA1: SEQ ID NO: 1:

```

1 aaggctcagt ataatagca gccaccgctc cctggcaggc agggaccgcg agctcagcta
61 cagcacagat caggtgagga gcacaccaag gagtgat ttt taaaacttac tctgttttct
121 ctttccaac aagattatca tttcctttaa aaaaaatagt taccctgggg catacagcca
181 taccattctg aagggtgtctt atctcctctg atctagagag caccatgaag cttctcacgg
241 gcctggtttt ctgctccttg gtccctgggtg tcagcagccg aagcttcttt tcgttccttg
301 gcgaggcttt tgatggggct cgggacatgt ggagagccta ctctgacatg agagaagcca
361 attacatcgg ctcagacaaa tacttccatg ctcgggggaa ctatgatgct gccaaaaggg
421 gacctggggg tgctcctggct gcagaagtga tcagcgatgc cagagagaat atccagagat
481 tctttggcca tgggtgaggag gactcgctgg ctgatcaggc tgccaatgaa tggggcagga
541 gtggcaaaga cccaatcac ttcggacctg ctggcctgcc tgagaaatac tgagcttctt
601 cttcactctg ctctcaggag atctggctgt gaggccctca gggcagggat acaaagcggg
661 gagaggggtac acaatgggta tctaataaat acttaagagg tggaaaaaaaa aaaaaaaaaa
721 aa

```

Equivalentes de la secuencia de ARNm de SAA1 mencionada anteriormente son formas de corte y empalme alternativo, formas alélicas o un análogo de la misma. Un análogo es un ARNm de amiloide sérico A1 de otra especie de mamífero que es homólogo a SEQ ID NO: 1. Secuencias de ácido nucleico de SAA1 relacionadas con SEQ ID NO: 1 son las que tienen los números de registro de GenBank NM_009117 (de ratón), NM_199161 (una variante de transcrito humano 2), BC007022.1, BG533276.1, BG567902.1, BQ691948.1, CD102084.1, M10906.1, M23698.1, X51439.1, X51441.1, X51442.1, X51443.1 y X56652.1.

La base de datos GenBank proporciona la secuencia de ADN correspondiente para el ARN mensajero de amiloide sérico A2 como número de referencia NM_ BC020795, proporcionada a continuación como SEQ ID NO: 2. La secuencia codificante para amiloide sérico A2 es desde los nucleótidos 38-406.

SAA2: SEQ ID NO: 2

```

1 agggaccocgc agctcagcta cagcacagat cagcaccatg aagcttctca cgggcctggt
61 tttctgctcc ttggctcctga gtgtcagcag cegaagcttc ttttcgttcc ttggcgaggg
121 ttttgatggg gctcggggaca tgtggagagc ctactctgac atgagagaag ccaattacat
181 cggctcagac aaatacttcc atgctcgggg gaactatgat gctgccaaaa ggggacctgg
241 ggggtgctgg gccgcagaag tgatcagcaa tgccagagag aatatccaga gactcacagg
301 ccatgggtgcg gaggactcgc tggccgatca ggctgccaat aatggggca ggagtggcag
361 agaccccaat cacttccgac ctgctggcct gctgagaaa tactgagctt cctcttact
421 ctgctctcag gagacctggc tatgaggccc tcggggcagg gatacaaagt tagtgaggtc
481 tatgtccaga gaagctgaga tatggcatat aatagggcatc taataaatgc ttaagaggtc
541 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

5 Equivalentes de la secuencia de ARNm de SAA2 mencionada anteriormente son formas de corte y empalme alternativo, formas alélicas o un análogo de la misma. Un análogo es un ARNm de amiloide sérico A2 de otra especie de mamífero que es homólogo a SEQ ID NO: 2. Secuencias de ácido nucleico de SAA2 relacionadas con SEQ ID NO: 2 son las que tienen los números de registro de GenBank NM_030754 (humano) BC058008.1, J03474.1, L05921.1, M23699.1, M23700.1, M26152.1, X51440.1, X51444.1, X51445.1 y X56653.1.

10 Los productos proteicos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 (SAA1 y SAA2) se conocen como reactantes de fase aguda y son similares a la proteína C-reactiva, se regulan por incremento drásticamente mediante citocinas proinflamatorias. Las proteínas de SAA1 y SAA2 son idénticas al 93,5% al nivel de aminoácidos y los genes son idénticos al 96,7% al nivel de nucleótidos.

La base de datos GenBank proporciona la secuencia de ADN correspondiente para el ARN mensajero de amiloide sérico A4 como número de referencia NM_006512, proporcionada a continuación como SEQ ID NO: 3. La secuencia codificante para amiloide sérico A4 es desde los nucleótidos 76 - 468.

SAA4: SEQ ID NO: 3

```

1 tatagctcca cggccagaag ataccagcag ctctgccttt actgaaattt cagctggaga
61 aagggtccaca gcacaatgag gcttttcaca ggcattgttt tctgctcctt ggtcatggga
121 gtcaccagtg aaagctggcg ttcgtttttc aaggaggctc tccaaggggt tggggacatg
181 ggcagagcct attgggacat aatgatatcc aatcaccaa attcaaacag atatctctat
241 gctcggggaa actatgatgc tgcccaaaga ggacctgggg gtgtctgggc tgctaaactc
301 atcagccgtt ccaggggtcta tcttcagggg ttaatagact actatatttatt tggaaacagc
361 agcactgtat tggaggactc gaagtccaac gagaaagctg aggaatgggg cgggagtggc
421 aaagaccccg accgcttcag acctgacggc ctgcctaaga aatactgagc ttctgtctcc
481 tctgctctca gggaaactgg gctgtgagcc acacacttct cccccagac agggacacag
541 ggtcactgag ctttgtgtcc ccaggaactg gtatagggca cctagaggtg tcaataaat
601 gtttgtcaaa ttga

```

15 SAA4 es un gen expresado de manera constitutiva a bajo nivel. Equivalentes de la secuencia de ARNm de SAA4 mencionada anteriormente son formas de corte y empalme alternativo, formas alélicas o un análogo de la misma. Un análogo es un ARNm de amiloide sérico A4 de otra especie de mamífero que es homólogo a SEQ ID NO: 3. Secuencias de ácido nucleico de SAA4 relacionadas con SEQ ID NO: 3 son las que tienen los números de registro de GenBank BC007026, M81349.1 y S48983.1.

25 *Atenuación de la expresión de un ARNm:* La expresión "atenuación de la expresión de un ARNm", tal como se usa en el presente documento, significa administrar una cantidad de ARN de interferencia para efectuar una reducción de los niveles totales de transcrito de ARNm de un gen diana en una célula, disminuyendo de ese modo la traducción del ARNm para dar proteína en comparación con un ARN control que tiene una secuencia desordenada. La reducción en la expresión del ARNm se denomina comúnmente "disminución" del ARNm. Se contempla en las realizaciones en el presente documento la disminución de la expresión de una cantidad incluyendo y entre el 50% y el 100%. Sin embargo, no es necesario que se logren tales niveles de disminución para los fines de la presente invención. Además, dos conjuntos de ARN de interferencia pueden ser ligeramente eficaces en la disminución individualmente, sin embargo, cuando se administran juntos pueden ser significativamente más eficaces. En una realización, un ARNip bc individual es eficaz en la disminución en hasta un 70%. En otra realización, dos o más ARNip bc son eficaces juntos en la disminución en hasta un 70%.

30 La disminución se mide comúnmente determinando los niveles de ARNm mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR) o determinando los niveles de proteína mediante inmunotransferencia de tipo Western o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). El análisis del nivel de proteína proporciona una evaluación de tanto la degradación del ARNm por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) así como de la inhibición de la traducción. Técnicas adicionales para medir la disminución incluyen hibridación de ARN

en solución, protección de nucleasas, hibridación de tipo Northern, transcripción inversa, monitorización de la expresión génica con una micromatriz, unión a anticuerpos, radioinmunoensayo y análisis de células activadas por fluorescencia.

5 La inhibición de SAA también se deduce en un ser humano o mamífero observando una mejora en un síntoma de glaucoma tal como mejora en la presión intraocular, mejora en la pérdida de campo visual o mejora en los cambios de la cabeza del nervio óptico, por ejemplo.

10 El ARN de interferencia de realizaciones de la invención actúa de una manera catalítica, es decir, el ARN de interferencia puede efectuar la inhibición del ARNm diana en cantidades subestequiométricas. En comparación con terapias antisentido, se requiere significativamente menos ARN de interferencia para proporcionar un efecto terapéutico.

15 *ARN de interferencia bicatenario:* El ARN de interferencia bicatenario (también referido como ARNip bc), tal como se usa en el presente documento, tiene una secuencia de nucleótidos sentido y una secuencia de nucleótidos antisentido, comprendiendo la secuencia sentido y antisentido una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos. La longitud del ARN de interferencia comprende de 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 ó 49 nucleótidos. La secuencia antisentido del ARNip bc se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y tiene una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con la parte hibridante de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respectivamente.

20 La hebra antisentido del ARNip es el agente de guía activo del ARNip porque la hebra antisentido se une a un complejo RISC dentro de una célula, y guía al complejo unido para unirse con especificidad al ARNm en una secuencia complementaria a la secuencia del ARN antisentido, permitiendo de ese modo la escisión posterior del ARNm por el complejo unido.

25 Se proporcionan técnicas para seleccionar secuencias diana para ARNip por Tuschl, T. *et al*, "The ARNip User Guide", revisado el 6 de mayo de 2004, disponible en el sitio web de la Rockefeller University, por Technical Bulletin n.º 506, "ARNip Design Guidelines", Ambion Inc. en el sitio web de Ambion, por el sitio web de Invitrogen usando parámetros de búsqueda de mín. el 35%, máx. el 55% de contenido en G/C, y por el sitio web de Dharmacon. La secuencia diana puede ubicarse en la región codificante o una región no traducida en 5' o 3' del ARNm.

30 Una realización de una secuencia diana de ADN para SAA1 se presenta en los nucleótidos 531 a 549 de SEQ ID NO: 1:

5'-TGGGGCAGGAGTGGCAAAG-3' SEQ ID NO: 4.

Un ARNip bicatenario de la invención para dirigirse a una secuencia de ARNm correspondiente de SEQ ID NO: 4 y que tiene una proyección UU en 3' en cada hebra es:

5'-UGGGGCAGGAGUGGCAAAGUU-3' SEQ ID NO: 5

35 3'-UUACCCCGUCCUCACCGUUUC-5' SEQ ID NO: 6.

La proyección en 3' puede tener un número de residuos de "U", por ejemplo, un número de residuos de "U" entre e incluyendo 2, 3, 4, 5 y 6. El extremo 5' puede tener también una proyección en 5' de nucleótidos. Un ARNip bicatenario de la invención para dirigirse a una secuencia de ARNm correspondiente de SEQ ID NO: 4 y que tiene una proyección TT en 3' en cada hebra es:

40 5'-UGGGGCAGGAGUGGCAAAGTT-3' SEQ ID NO: 7

3'-TTACCCCGUCCUCACCGUUUC-5' SEQ ID NO: 8.

Las hebras de un ARNip bicatenario pueden estar conectadas mediante un bucle en horquilla formando un ARNip monocatenario tal como sigue:

5'- UGGGGCAGGAGUGGCAAAGUUNNN \ N
3' – UUACCCCGUCCUCACCGUUUCNNNN / SEQ ID NO:9.

45 N es un nucleótido A, T, C, G, U, o una forma modificada conocida por un experto habitual en la técnica. El número de nucleótidos N es un número entre e incluyendo 3 y 23, o 5 y 15, o 7 y 13, o 4 y 9, o 9 y 11, o el número de nucleótidos N es 9.

La tabla 1 enumera ejemplos de secuencias diana de ADN de SAA de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 a partir de las cuales se diseñan ARNip de la presente invención de una manera tal como se expuso anteriormente.

Tabla 1. Secuencias diana de SAA para ARNip

Secuencia diana de SAA1	N.º de nucleótido de comienzo con referencia a SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:
TGGGGCAGGAGTGGCAAAG	531	4
AGACCCCAATCACTTCCGA	548	10
TATCCAGAGATTCTTTGGC	470	66
TGAATGGGGCAGGAGTGGC	527	67
Secuencia diana de SAA1 y SAA2 en común	N.º de nucleótido de comienzo con referencia a SEQ ID NO:1 (y con referencia a SEQ ID NO:2 entre paréntesis)	SEQ ID NO:
TTACATCGGCTCAGACAAA	362 (175)	11
GCTTCTCACGGGCTGGTT	230 (43)	12
GCCAATTACATCGGCTCAG	357 (170)	13
ATACTTCCATGCTCGGGGG	380 (193)	14
GTGATCAGCAATGCCAGAG	447 (260)	15
TATCCAGAGACTCACAGGC	470 (283)	16
TCACTTCCGACCTGCTGGC	557 (370)	17
Secuencia diana de SAA2	N.º de nucleótido de comienzo con referencia a SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:
GAGAGAATATCCAGAGACT	278	18
CGATCAGGCTGCCAATAAA	325	19
CCGCAGAAGTGATCAGCAA	252	20
TGCCAGAGAGAATATCCAG	271	21
ATGGGGCAGGAGTGGCAGA	343	22
TAAATGGGGCAGGAGTGGC	340	68
Secuencia diana de SAA4	N.º de nucleótido de comienzo con referencia a SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:
GGAGGCTCTCCAAGGGGTT	153	23
GGGGTTGGGGACATGGGCA	166	24
TTCAAACAGATATCTCTAT	222	25
ACAGATATCTCTATGCTCG	227	26
ACTATGATGCTGCCCAAAG	251	27
AGAGGACCTGGGGGTGTCT	268	28
ACTCATCAGCCGTTCCAGG	297	29
TAGACTACTATTTATTTGG	335	30
ACAGCAGCACTGTATTGGA	358	31
GTCCAACGAGAAAGCTGAG	384	32
CGAGAAAGCTGAGGAATGG	390	33
AGCTGAGGAATGGGGCCGG	396	34
TGGGGCCGGAGTGGCAAAG	406	35
AGACCCCGACCGCTTCAGA	423	36

5 Tal como se menciona en los ejemplos anteriores, un experto en la técnica es capaz de usar la información de secuencias diana proporcionada en la tabla 1 para diseñar ARN de interferencia que tienen una longitud más corta o

más larga que las secuencias proporcionadas en la tabla 1 haciendo referencia a la posición de secuencia en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y añadiendo o delecionando nucleótidos complementarios o casi complementarios a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respectivamente.

5 La reacción de escisión del ARN diana guiada por ARNip bc o mc es altamente específica de secuencia. En general, ARNip que contiene una secuencia de nucleótidos sentido idéntica a una parte del ARNm diana y una parte antisentido exactamente complementaria a la secuencia sentido del ARNm son realizaciones de ARNip para la inhibición del ARNm de SAA. Sin embargo, no se requiere un 100% de complementariedad de secuencia entre la hebra antisentido del ARNip y el ARNm diana para la puesta en práctica de la presente invención. Por tanto, la invención permite variaciones de secuencia que podrían esperarse debido a mutación genética, polimorfismo de
10 cepas o divergencia evolutiva. Por ejemplo, secuencias de ARNip con inserciones, deleciones o mutaciones de punto único en relación con la secuencia diana son eficaces para la inhibición.

En determinadas realizaciones de la invención, la secuencia antisentido comprende CUUUGCCACUCCUGCCCCA (SEQ ID NO: 37) o UCGGAAGUGAUUGGGGUCU (SEQ ID NO: 38) y la secuencia antisentido se hibrida con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1.

15 En realizaciones adicionales de la invención, la secuencia antisentido comprende UUUGUCUGAGCCGAUGUAA (SEQ ID NO: 39), AACCAGGCCCGUGAGAAGC (SEQ ID NO: 40), CUGAGCCGAUGUAAUUGGC (SEQ ID NO: 41), CCCCCGAGCAUGGAAGUAU (SEQ ID NO: 42), CUCUGGCAUUGCUGAUCAC (SEQ ID NO: 43), GCCUGAGUCUCUGGAUA (SEQ ID NO: 44), GCCACUCCUGCCCCAUUA (SEQ ID NO: 45), GCCAGCAGGUCGGAAGUGA (SEQ ID NO: 46), y la secuencia antisentido se hibrida con una parte del ARNm que
20 corresponde a SEQ ID NO: 1 o una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2.

En otra realización de la invención, la secuencia antisentido comprende AGUCUCUGGAUUAUCUCUC (SEQ ID NO: 47), UUUUAUUGGCAGCCUGAUCG (SEQ ID NO: 48), UUGCUGAUCACUUCUGCGG (SEQ ID NO: 49), CUGGAUUAUCUCUCUGGCA (SEQ ID NO: 50), UCUGCCACUCCUGCCCCAU (SEQ ID NO: 51) o GCCACUCCUGCCCCAUUA (SEQ ID NO: 69) y la secuencia antisentido se hibrida con una parte del ARNm que
25 corresponde a SEQ ID NO: 2.

El método mencionado anteriormente incluye realizaciones en las que la secuencia antisentido comprende AACCCUUGGAGAGCCUCC (SEQ ID NO: 52), UGCCAUUGUCCCCAACCCC (SEQ ID NO: 53), AUAGAGAUUAUCUGUUUGAA (SEQ ID NO: 54), CGAGCAUAGAGAUUAUCUGU (SEQ ID NO: 55), CUUUGGGCAGCAUCAUAGU (SEQ ID NO: 56), AGACACCCCAGGUCCUCU (SEQ ID NO: 57),
30 CCUGGAACGCGUGAUGAGU (SEQ ID NO: 58), CCAAUAAAUAUAGUAGUCUA (SEQ ID NO: 59), UCCAUACAGUCUGCUGU (SEQ ID NO: 60), CUCAGCUUUCUGUUGGAC (SEQ ID NO: 61), CCAUUCUCAGCUUUCUG (SEQ ID NO: 62), CCGGCCCAUUCUCAGCU (SEQ ID NO: 63), CUUUGCCACUCCGGCCCCA (SEQ ID NO: 64) o UCUGAAGCGGUCGGGGUCU (SEQ ID NO: 65), y la secuencia antisentido se hibrida con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 3.

35 La secuencia antisentido del ARNip tiene complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con la secuencia diana del ARNm. "Casi perfecta", tal como se usa en el presente documento, significa que la secuencia antisentido del ARNip es "sustancialmente complementaria a", y que la secuencia sentido del ARNip es "sustancialmente idéntica" a al menos una parte del ARNm diana. "Identidad", tal como se conoce por un experto habitual en la técnica, es el grado de relación de secuencia entre secuencias de nucleótidos tal como se
40 determina haciendo coincidir el orden de nucleótidos entre las secuencias. En una realización, ARN antisentido que tiene el 80% y entre el 80% hasta el 100% de complementariedad con la secuencia de ARNm diana se consideran complementariedad casi perfecta y pueden usarse en la presente invención. Complementariedad contigua "perfecta" es apareamiento estándar de bases de Watson-Crick de pares de bases adyacentes. Complementariedad contigua "al menos casi perfecta" incluye complementariedad "perfecta" tal como se usa en el presente documento. Se
45 diseñan métodos informáticos para determinar la identidad o complementariedad para proporcionar el mayor grado de coincidencia de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, BLASTP y BLASTN (Altschul, S.F., *et al* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410), y FASTA.

La secuencia diana de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 puede estar en las regiones no traducidas en 5' o 3' del ARNm así como en la región codificante del ARNm.

50 Una o ambas de las hebras del ARN de interferencia bicatenario pueden tener una proyección en 3' de desde 1 hasta 6 nucleótidos que pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una mezcla de los mismos. Los nucleótidos de la proyección no presentan apareamiento de bases. En una realización de la invención, el ARN bc de interferencia comprende una proyección en 3' de TT o UU.

55 Las hebras sentido y antisentido del ARNip bicatenario pueden estar en una formación de dúplex de dos hebras únicas tal como se describió anteriormente o pueden estar en una molécula única en la que las regiones de complementariedad presentan apareamiento de bases y están unidas covalentemente mediante una horquilla o un bucle de modo que se forma una hebra única. Se cree que la horquilla se escinde intracelularmente mediante una proteína denominada Dicer para formar un ARN de interferencia de dos moléculas individuales de ARN con

apareamiento de bases.

Los ARN de interferencia pueden diferir del ARN que se produce de manera natural mediante la adición, delección, sustitución o modificación de uno o más nucleótidos. Puede unirse material no nucleotídico al ARN de interferencia, o bien en el extremo 5', el extremo 3' o bien de manera interna. Tales modificaciones están diseñadas comúnmente para aumentar la resistencia a nucleasas de los ARN de interferencia, para mejorar la captación celular, para potenciar el direccionamiento celular, para ayudar en el seguimiento del ARN de interferencia o para mejorar adicionalmente la estabilidad. Por ejemplo, los ARN de interferencia pueden comprender un nucleótido de purina en los extremos de las proyecciones. La conjugación de colesterol al extremo 3' de la hebra sentido de una molécula de ARNip bc por medio de un ligador de pirrolidina, por ejemplo, también proporciona estabilidad a un ARNip. Modificaciones adicionales incluyen una molécula de biotina 3' terminal, un péptido que se sabe que tiene propiedades de penetración celular, una nanopartícula, un peptidomimético, un colorante fluorescente o un dendrímero, por ejemplo.

Pueden modificarse nucleótidos 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, alcoxilo, amino, desaza, halógeno, hidroxilo, tiol o una combinación de los mismos, por ejemplo. Pueden sustituirse nucleótidos por análogos con mayor estabilidad tal como el reemplazo de U por 2'desoxi-T, o que tienen una modificación de azúcar tal como un 2'OH reemplazado por un grupo 2'amino o 2'metilo, grupos 2'metoxietilo, o un puente metileno de 2'-0, 4'-C, por ejemplo. Los ejemplos de un análogo de purina o pirimidina de nucleótidos incluyen una xantina, una hipoxantina, una azapurina, una metiltioadenina, 7-desaza-adenosina y nucleótidos O- y N-modificados. El grupo fosfato del nucleótido puede modificarse sustituyendo uno o más de los oxígenos del grupo fosfato por nitrógeno o por azufre (fosforotioatos). Las modificaciones son útiles para mejorar la función, por ejemplo, para mejorar la estabilidad o permeabilidad, o para la localización o el direccionamiento.

Puede haber una región del ARNip antisentido que no sea complementaria a una parte de SEQ ID NO: 1. Las regiones no complementarias pueden estar en el extremo 3', 5' o ambos de una región complementaria.

Los ARN de interferencia pueden generarse de manera sintética, generarse mediante transcripción *in vitro*, vectores de expresión de ARNip o casetes de expresión de PCR, por ejemplo. Los ARN de interferencia que funcionan bien como ARNip transfectados también funcionan bien como ARNip expresados *in vivo*.

Los ARN de interferencia se sintetizan químicamente usando fosforoamiditas de ribonucleósidos protegidos y un sintetizador de ADN/ARN convencional y pueden obtenerse de proveedores comerciales tales como Ambion Inc. (Austin, Texas), Invitrogen (Carlsbad, CA) o Dharmacon (Lafayette, Colo., EE.UU.), por ejemplo. Los ARN de interferencia se purifican mediante extracción con un disolvente o una resina, precipitación, electroforesis, cromatografía o una combinación de los mismos, por ejemplo. Alternativamente, el ARN de interferencia puede usarse con poca, si acaso alguna purificación para evitar pérdidas debidas al procesamiento de las muestras.

Puede proporcionarse ARN de interferencia a un sujeto mediante expresión a partir de un plásmido recombinante usando un promotor constitutivo o inducible tal como el promotor de ARN pol III U6 o H1, el promotor de citomegalovirus, el promotor de SP6, T3 o T7, conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el psiRNA™ de InvivoGen (San Diego, CA) permite la producción de ARNip dentro de células a partir de un promotor de ARN pol III. El ARN de interferencia expresado a partir de plásmidos recombinantes puede aislarse mediante técnicas convencionales.

Un vector viral para la expresión de ARN de interferencia puede derivarse de adenovirus, virus adenoasociados, virus vaccinia, retrovirus (lentivirus, rabdovirus, virus de leucemia murina, por ejemplo), virus del herpes o similares, usando promotores tal como se mencionó anteriormente, por ejemplo, para plásmidos. La selección de vectores virales, métodos para expresar el ARN de interferencia mediante el vector y métodos de administración del vector viral están dentro de la habilidad habitual del experto en la materia.

También se proporciona la expresión de ARN de interferencia mediante el uso de SILENCER EXPRESS™ (Ambion, Austin, Texas) mediante casetes de expresión (SEC) con un promotor H1 humano, U6 humano o U6 de ratón mediante PCR. Los casetes de expresión de silenciador son productos de PCR que incluyen secuencias promotoras y terminadoras que flanquean un molde de ARNip en horquilla. Tras la transfección en células, el ARNip en horquilla se expresa a partir del producto de PCR e induce silenciamiento específico.

Hibridación en condiciones fisiológicas: La "hibridación" se refiere a una técnica en la que se permite que ácidos nucleicos monocatenarios (ADN o ARN) interaccionen de modo que se formen complejos unidos por puentes de hidrógeno denominados híbridos mediante los ácidos nucleicos con secuencias de bases complementarias o casi complementarias. Las reacciones de hibridación son sensibles y selectivas de modo que una secuencia de interés particular se identifica en muestras en las que está presente a bajas concentraciones. La especificidad de la hibridación (es decir, rigurosidad) se controla por las concentraciones de sal o formamida en las disoluciones de prehibridación e hibridación *in vitro*, por ejemplo, y por la temperatura de hibridación, y se conocen bien en la técnica. En particular, la rigurosidad se aumenta reduciendo la concentración de sal, aumentando la concentración de formamida o elevando la temperatura de hibridación.

Por ejemplo, podrían producirse condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente formamida al 50% a de 37°C a 42°C. Podrían producirse condiciones de rigurosidad reducida a aproximadamente formamida a del 35% al 25% a aproximadamente de 30°C a 35°C. Se proporcionan ejemplos de condiciones de rigurosidad para la hibridación en Sambrook, J., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Los ejemplos adicionales de condiciones de hibridación rigurosas 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 1XSSC o 50°C en 1XSSC, formamida al 50% seguido por lavado a 70°C en 0,3XSSC, o hibridación a 70°C en 4XSSC o 50°C en 4XSSC, formamida al 50% seguido por lavado a 67°C en 1XSSC. La temperatura para la hibridación es aproximadamente 5-10°C inferior a la temperatura de fusión (T_m) del híbrido en el que T_m se determina para híbridos entre 19 y 49 pares de bases de longitud usando el siguiente cálculo: $T_m, ^\circ\text{C} = 81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ de G+C}) - (600/\text{N})$ en el que N es el número de bases en el híbrido, y $[\text{Na}^+]$ es la concentración de iones sodio en el tampón de hibridación.

En realizaciones de la presente invención, una hebra antisentido de un ARN de interferencia que se hibrida con ARNm de SAA *in vitro* en condiciones de alta rigurosidad se unirá específicamente *in vivo* en condiciones fisiológicas. La identificación o aislamiento de un ácido nucleico relacionado que no se hibrida con un ácido nucleico en condiciones altamente rigurosas se lleva a cabo en rigurosidad reducida.

ARN de interferencia monocatenario: Tal como se mencionó anteriormente, los ARN de interferencia funcionan en última instancia como hebras únicas. Se ha encontrado que el ARNip mc efectúa silenciamiento del ARNm, aunque menos eficazmente que el ARN bicatenario. Por tanto, las realizaciones de la presente invención también proporcionan la administración de ARNip mc en el que el ARNip monocatenario se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, y tiene una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con la parte hibridante de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respectivamente. El ARNip mc tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos como para el ARNip bc mencionado anteriormente. El ARNip mc tiene un fosfato en 5' o se fosforila *in situ* o *in vivo* en la posición 5'. El término "fosforilado en 5'" se usa para describir, por ejemplo, polinucleótidos o oligonucleótidos que tienen un grupo fosfato unido mediante un enlace éster al hidroxilo C5 del azúcar en 5' (por ejemplo, la ribosa o desoxirribosa en 5', o un análogo de la misma). El ARNip mc puede tener un grupo mono-, di- o trifosfato.

Los ARNip mc se sintetizan químicamente o mediante vectores como para ARNip bc. Los grupos fosfato en 5' pueden añadirse mediante una cinasa, o un fosfato en 5' puede ser el resultado de escisión por nucleasas de un ARN. La administración es como para ARNip bc. En una realización, los ARNip mc que tienen extremos protegidos y modificaciones resistentes a nucleasas se administran para el silenciamiento. El ARNip mc puede secarse para su almacenamiento o disolverse en una disolución acuosa. La disolución puede contener tampones o sales para inhibir la hibridación o para la estabilización.

ARN de interferencia en horquilla: Un ARN de interferencia en horquilla es monocatenario y contiene la secuencia tanto sentido como antisentido dentro de una hebra. Para su expresión mediante un vector de ADN, los oligonucleótidos de ADN correspondientes de al menos 19 nucleótidos que corresponden a la secuencia de ARNip sentido se unen a su secuencia antisentido complementaria inversa mediante un espaciador corto. Si es necesario para el vector de expresión elegido, pueden añadirse T terminales en 3' y nucleótidos que forman sitios de restricción. El transcrito de ARN resultante se pliega hacia atrás sobre sí mismo formando una estructura de tallo-bucle.

Modo de administración: El ARN de interferencia puede administrarse directamente al ojo mediante inyección en el tejido ocular tal como inyecciones perioculares, conjuntivales, subtenonianas, intracamerales, intravítreas, subretinianas, retrobulbares o intracanaliculares; mediante aplicación directa al ojo usando un catéter u otro dispositivo de colocación tal como un gránulo retiniano, inserto intraocular, supositorio o un implante que comprende un material poroso, no poroso o gelatinoso; mediante gotas oculares tópicas o pomadas; mediante un dispositivo de liberación lenta en el fondo de saco o implantado adyacente a la esclerótica (transescleral) o dentro del ojo. La inyección intracameral puede ser a través de la córnea en la cámara anterior para permitir que el agente alcance la malla trabecular. La inyección intracanalicular puede ser en los canales colectores venosos que drenan el canal de Schlemm o en el canal de Schlemm.

Sujeto: Un sujeto que necesita tratamiento para glaucoma o que corre el riesgo de desarrollar glaucoma es un ser humano u otro mamífero que tiene una afección o corre el riesgo de tener glaucoma asociado con la expresión o actividad de SAA, es decir, un glaucoma asociado a SAA. Las estructuras oculares asociadas con tales trastornos pueden incluir la retina, coroides, cristalino, córnea, malla trabecular, iris, nervio óptico, cabeza del nervio óptico, esclerótica, cámara acuosa, cámara vítrea o cuerpo ciliar, por ejemplo.

Formulaciones y dosificación: Las formulaciones farmacéuticas comprenden un ARN de interferencia, o sal del mismo, de la invención hasta el 99% en peso mezclado con un medio de vehículo oftálmico fisiológicamente aceptable tal como agua, tampón, solución salina, glicina, ácido hialurónico, manitol y similares.

Los ARN de interferencia de la presente invención se administran como disoluciones, suspensiones o emulsiones. Los siguientes son ejemplos de posibles formulaciones 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. pH 7,4
Agua purificada	c.s. 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	c.s. hasta el 100%

ARN de interferencia	hasta el 99; 0,1-99; 0,1 - 50; 0,5 - 10,0
Fosfato de sodio monobásico	0,05
	Cantidad en % en peso
Fosfato de sodio dibásico (anhidro)	0,15
Cloruro de sodio	0,75
EDTA de disodio	0,05
Cremophor EL	0,1
Cloruro de benzalconio	0,01
HCl y/o NaOH	pH 7,3-7,4
Agua purificada	c.s. hasta el 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 fosfato	1,0
Hidroxipropil-β-ciclodextrina	4,0
Agua purificada	c.s. hasta el 100%

- 5 Generalmente, una cantidad eficaz del ARN de interferencia de realizaciones de la invención comprende una concentración intercelular en o cerca del sitio ocular de desde 200 pM hasta 100 nM, o desde 1 nM hasta 50 nM, o desde 5 nM hasta aproximadamente 25 nM. Las composiciones tópicas se administran a la superficie del ojo de una a cuatro veces al día según el criterio de rutina de un médico experto. El pH de la formulación es de aproximadamente pH 4-9, o de pH 4,5 a pH 7,4.

Mientras que el régimen preciso se deja a la discreción del médico, el ARN de interferencia puede administrarse colocando una gota en cada ojo de una a cuatro veces al día, o como indique el médico. Una cantidad eficaz de una formulación puede depender de factores tales como la edad, la raza y el sexo del sujeto, o la gravedad del glaucoma, por ejemplo. En una realización, el ARN de interferencia se administra por vía tópica al ojo y alcanza la malla trabecular, la retina o la cabeza del nervio óptico a una dosis terapéutica mejorando de ese modo un proceso patológico asociado a SAA.

Vehículos aceptables: Un vehículo oftalmológicamente aceptable se refiere a los vehículos que provocan como máximo de poca nada ninguna irritación ocular, proporcionan una conservación adecuada si es necesario y administran uno o más ARN de interferencia de la presente invención en una dosificación homogénea. Un vehículo aceptable para la administración de ARN de interferencia de realizaciones de la presente invención incluye el reactivo de transfección de ARNip Mirus TransIT®-TKO (Mirus Corporation, Madison, Wisconsin), LIPOFECTIN®, lipofectamina, OLIGOFECTAMINE™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), CELLFECTIN®, DHARMAFECT™ (Dharmacon, Chicago, IL) o policonjugados tales como polilisina, liposomas o agentes liposolubles tales como colesterol. Los liposomas se forman a partir de lípidos formadores de vesículas convencionales y un esteroide, tal como colesterol, y pueden incluir una molécula de direccionamiento tal como un anticuerpo monoclonal que tiene afinidad de unión por antígenos de superficie de células endoteliales, por ejemplo. Además, los liposomas pueden ser liposomas pegilados.

Para administración oftálmica, un ARN de interferencia puede combinarse con conservantes, codisolventes, tensioactivos, potenciadores de la viscosidad, potenciadores de la penetración, tampones, cloruro de sodio o agua oftalmológicamente aceptables para formar una suspensión o disolución oftálmica acuosa, estéril. Las formulaciones de disolución oftálmica pueden prepararse disolviendo el inhibidor en un tampón acuoso isotónico fisiológicamente aceptable. Además, la disolución oftálmica puede incluir un tensioactivo oftalmológicamente aceptable para ayudar en la disolución del inhibidor. Los agentes de generación de viscosidad, tales como hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona o similares, pueden añadirse 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 apropiado, tal como aceite mineral, lanolina líquida o vaselina blanca. Las formulaciones de gel oftálmico estéril pueden prepararse 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, según métodos conocidos en la técnica para otras formulaciones oftálmicas. Puede usarse VISCOAT® (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) para inyección intraocular, por ejemplo. Otras composiciones de la presente invención pueden contener agentes potenciadores de la penetración tales como cremophor y TWEEN® 80 (monolaurato de polioxietilensorbitano, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), en el caso de que el ARN de interferencia sea menos penetrante en el ojo.

Kits: Las realizaciones de la presente invención proporcionan un kit que incluye reactivos para atenuar la expresión de un ARNm de SAA en una célula. El kit contiene un molde ADN que tiene dos promotores diferentes tales como un promotor de T7, un promotor de T3 o un promotor de SP6, cada uno operativamente unido a una secuencia de nucleótidos que codifica para dos ARN monocatenarios complementarios que corresponden a un ARN de interferencia. El ARN se transcribe a partir del molde de ADN y se hibrida para formar un ARN bicatenario eficaz para atenuar la expresión del ARNm diana. El kit contiene opcionalmente cebadores de amplificación para amplificar la secuencia de ADN del molde de ADN y nucleótidos trifosfato (es decir, ATP, GTP, CTP y UTP) para sintetizar el ARN. Opcionalmente, el kit contiene dos ARN polimerasas, pudiendo cada una unirse a un promotor en el molde de ADN y efectuar la transcripción de la secuencia de nucleótidos a la que el promotor está operativamente unido, una columna de purificación para purificar ARN monocatenario, tal como una columna de exclusión molecular, uno o más tampones, por ejemplo, un tampón para hibridar ARN monocatenarios para producir ARN bicatenario, y ARNasa A o ARNasa T para purificar el ARN bicatenario.

La capacidad del ARN de interferencia de SAA para disminuir los niveles de la expresión endógena de SAA en, por ejemplo, células de malla trabecular (MT) humana se lleva a cabo como sigue. La transfección de una línea celular de MT humana transformada designada GTM3 o HTM-3 (véase Pang, LH. *et al.*, 1994. *Curr. Eye Res.* 13:51-63) se logra usando concentraciones *in vitro* convencionales de ARN de interferencia de SAA (100 nM) tal como se menciona en el presente documento y LIPOFECTAMINE™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California) a una razón de 1:1 (p/v). Se usan como controles ARNip desordenados y de lamina A/C (Dharmacon).

Se usan cebadores directo e inverso TAQMAN® de QPCR y un conjunto de sondas que abarcan el sitio diana para evaluar el grado de escisión del ARNm. Tales conjuntos de cebadores/sondas pueden sintetizarse por ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA), por ejemplo.

Para reducir la posibilidad de efectos no específicos, fuera de diana, se determina la concentración de ARNip más baja posible para inhibir la expresión de ARNm de SAA para un ARNip. Se evalúa la disminución de ARNm de SAA mediante amplificación por QPCR usando un conjunto apropiado de cebadores/sondas. Se observa una respuesta a la dosis de ARNip de SAA en células GTM3 tras 24 horas de tratamiento con un intervalo de dosis de 0, 1, 3, 10, 30 y 100 nM de ARNip, por ejemplo. Se ajustan los datos usando el software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software,

Inc., San Diego, CA) con una pendiente variable, algoritmo de respuesta a la dosis sigmoideo y una restricción superior del 100%. Se obtiene una CI_{50} para el ARNip particular sometido a prueba.

Ejemplo 1

ARN de interferencia para el silenciamiento de SAA en células de malla trabecular

- 5 El presente estudio examina la capacidad del ARN de interferencia de SAA para disminuir los niveles de expresión de SAA endógeno en células de malla trabecular (MT) humana normales y glaucomatosas.

Se llevó a cabo la transfección de una línea celular de MT normal (NTM765-04-OD, p5) y glaucomatosa (GTM686-03-OS, p6) usando concentraciones *in vitro* convencionales de un grupo de ARN de interferencia de SAA SMARTPOOL® (100 nM) y reactivo de transfección DHARMAFECT® n.º1 (Dharmacon Research Inc., Chicago, IL).

- 10 El ARN de interferencia de SAA SMARTPOOL® contenía un grupo de cuatro ARNip bicatenarios homólogos diseñados para dirigirse a regiones de ARNm de SAA que tienen los identificadores de secuencia SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 y se usó a tres concentraciones diferentes (tratamiento 1: 0,05 µl/pocillo de 100 µl; tratamiento 2: 0,2 µl/pocillo de 100 µl; tratamiento 3: 0,4 µl/pocillo de 100 µl) por triplicado durante 24 o 48 h. El control no tuvo tratamiento.

- 15 *Efectos sobre los niveles de ARNm:* Para el análisis de QPCR de ARNm de SAA, se extrajo el ARN total de las células tratadas durante 24 h usando PCR RNAqueous-4™ (Ambion, Austin, TX) y se sintetizó el ADNc con agentes de transcripción inversa TaqMan® (PE Biosystems, Foster City, CA). Se realizó la QPCR usando la mezcla maestra de PCR universal TaqMan® y 7700 SDS (PE Biosystems) por triplicado. Se usó ARN ribosómico (ARNr 18s, PE Biosystems) como control de normalización en la QPCR múltiplex. Se realizaron los análisis de QPCR usando dos
- 20 conjuntos de sondas/cebadores TaqMan® (PE Biosystems). Un primer conjunto (P423) se dirige a la región codificante de la secuencia de ADNc de SAA y un segundo conjunto (P428) se dirige a la región no codificante.

- Tal como se muestra en la figura 1, se observó aproximadamente un 35% de inhibición del ARNm de SAA en relación con el ARNr 18s en células normales NTM765-04 tratadas con ARNip en condiciones de tratamiento 3 usando el conjunto de cebadores P423. Tal como se muestra en la figura 2, se observó aproximadamente un 41%
- 25 de inhibición del ARNm de SAA en relación con el ARNr 18s en células glaucomatosas GTM686-03 tratadas con ARNip en condiciones de Tratamiento 3 usando el conjunto de cebadores P423. Se obtuvieron resultados similares usando el conjunto de cebadores P428.

Efectos sobre los niveles de proteína de SAA: Se usaron ensayos ELISA para examinar los niveles de proteína de SAA endógena en lisados celulares preparados a partir de células tratadas durante 48 h.

- 30 Se observó aproximadamente un 66% de disminución de la proteína de SAA en todas las células glaucomatosas GTM 686 tratadas con ARNip de Tratamiento 1, Tratamiento 2 y Tratamiento 3 (figura 5) pero no en células NTM765 (figura 4). El nivel de proteína de SAA endógena fue muy bajo en ambas líneas celulares de malla trabecular, particularmente en la línea celular normal NTM765.

- 35 *Efectos sobre el crecimiento celular y la morfología:* Se monitorizó el efecto del ARNip de SAA sobre la morfología de células de MT mediante un sistema de detección electrónica en tiempo real (RT-CES™, ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA). Tal como se muestra en la figura 3, no se observaron efectos tóxicos debido a los tratamientos con ARNip sobre el crecimiento o la morfología de células de MT.

- Los expertos en la técnica, vista la luz de la presente descripción, apreciarán que pueden hacerse modificaciones obvias de las realizaciones divulgadas en el presente documento sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.
- 40 Todas las realizaciones dadas a conocer en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación indebida vista la luz de la presente descripción. El alcance completo de la invención se expone en la descripción y realizaciones equivalentes de la misma. No debe interpretarse que la descripción limita indebidamente el alcance completo de protección al que la presente invención tiene derecho.

- Tal como se usa en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, los términos “un/uno” y “una”
- 45 significan “uno”, “al menos uno” o “uno o más”.

Lista de secuencias

- <110> Clark, Abbot F
Wang, Wan-Heng
McNatt, Loretta
- 5 <120> Inhibición de amiloide sérico A por iARN para el tratamiento de glaucoma
- <130> 34576.44
- 10 <150> Documento 60/638.706
<151> 23-12-2004
- <160> 69
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 722
<212> ADN
- 20 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- | | |
|---|-----|
| aaggctcagt ataaatagca gccaccgctc cctggcaggc agggacccgc agctcagcta | 60 |
| cagcacagat caggtgagga gcacaccaag gagtgat ttaaaacttac tctgttttct | 120 |
| ctttcccaac aagattatca tttcctttaa aaaaaatagt tctcctgggg catacagcca | 180 |
| taccattctg aaggtgtctt atctcctctg atctagagag caccatgaag cttctcacgg | 240 |
| gcctggtttt ctgctccttg gtcctgggtg tcagcagccg aagcttcttt tcgttccttg | 300 |
| gcgaggcttt tgatggggct cgggacatgt ggagagccta ctctgacatg agagaagcca | 360 |
| attacatcgg ctcagacaaa tacttccatg ctcgggggaa ctatgatgct gccaaaaggg | 420 |
| gacctggggg tgcttgggct gcagaagtga tcagcagatgc cagagagaat atccagagat | 480 |
| tctttggcca tgggtgcggag gactcgctgg ctgatcaggg tgccaatgaa tggggcagga | 540 |
| gtggcaaaaga cccaatcac ttccgacctg ctggcctgcc tgagaaatac tgagcttctt | 600 |
| cttcaactctg ctctcaggag atctggctgt gaggccctca gggcagggat acaaaagcggg | 660 |
| gagaggggtac acaatgggta tctaataaat acttaagagg tggaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 720 |
| aa | 722 |
- 25 <210> 2
<211> 570
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 2
- | | |
|--|-----|
| agggacccgc agctcagcta cagcacagat cagcaccatg aagcttctca cgggcctggg | 60 |
| tttctgctcc ttggtcctga gtgtcagcag ccgaagcttc tttcgttcc ttggcgaggc | 120 |
| ttttgatggg gctcgggaca tgtggagagc ctactctgac atgagagaag ccaattacat | 180 |
| cggctcagac aaatacttcc atgctcgggg gaactatgat gctgccaaaa ggggacctgg | 240 |
| gggtgcctgg gccgcagaag tgatcagcaa tgccagagag aatatccaga gactcaca9g | 300 |
| ccatgggtgcg gaggactcgc tggccgatca ggctgccaat aaatggggca ggagtggcag | 360 |

agacccaat cacttccgac ctgctggcct gcctgagaaa tactgagctt cctcttcaact 420
 ctgctctcag gagacctggc tatgaggccc tcggggcagg gatacaaagt tagtgaggtc 480
 tatgtccaga gaagctgaga tatggcatat aataggcatc taataaatgc ttaagaggtc 540
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 570

5 <210> 3
 <211> 614
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3
 tatagctcca cggccagaag ataccagcag ctctgccttt actgaaattt cagctggaga 60
 aaggctcaca gcacaatgag gcttttcaca ggcattgttt tctgctcctt ggtcatggga 120
 gtcaccagtg aaagctggcg ttcgtttttc aaggaggctc tccaaggggt tggggacatg 180
 ggcagagcct attgggacat aatgatatcc aatcaccaa attcaaacag atatctctat 240
 gctcggggaa actatgatgc tgcccaaaga ggacctgggg gtgtctgggc tgctaaactc 300
 atcagccggt ccagggctca tcttcagggga ttaatagact actatttatt tggaaacagc 360
 agcactgtat tggaggactc gaagtccaac gagaaagctg aggaatgggg ccggagtggc 420
 aaagaccccg accgcttcag acctgacggc ctgcctaaga aatactgagc ttctgtctcc 480
 tctgctctca gggaaactgg gctgtgagcc acacacttct cccccagac agggacacag 540
 ggtcactgag ctttgtgtcc ccaggaactg gtatagggca cctagagggtg ttcaataaat 600
 gtttgtcaaa ttga 614

10 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de direccionamiento

20 <400> 4
tggggcagga gtggcaaag 19

25 <210> 5
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Hebra sentido

30 <400> 5
uggggcagga guggcaaagu u 21

35 <210> 6
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Hebra antisentido

<400> 6
cuuugccacu ccugcccca u 21

5 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Hebra sentido con TT en 3'

15 <220>
 <221> misc_ARN
 <222> (1)..(19)
 <223> ribonucleótidos

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 7
uggggcagga guggcaaagt t 21

25 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Hebra antisentido con TT en 3'

35 <220>
 <221> misc_ARN
 <222> (1)..(19)
 <223> ribonucleótidos

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> desoxirribonucleótidos

<400> 8
cuuugccacu ccugcccat t 21

45 <210> 9
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Dúplex en horquilla con bucle

55 <220>
 <221> misc_ARN
 <222> (1)..(21)
 <223> ribonucleótidos

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(30)
 <223> cualquiera, A, T/U, C, G

65 <220>
 <221> misc_feature

	<222> (31)..(51)	
	<223> ribonucleótidos	
	<400> 9	
5	uggggcagga guggcaaagu unnnnnnnnn cuuugccacu ccugcccau u	51
	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de direccionamiento	
15	<400> 10	
	agacccaat cacttccga	19
	<210> 11	
	<211> 19	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de direccionamiento	
25	<400> 11	
	ttacatcggc tcagacaaa	19
	<210> 12	
30	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia de direccionamiento	
	<400> 12	
	gcttctcag ggcctggtt	19
40	<210> 13	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia de direccionamiento	
	<400> 13	
	gccaattaca tcggctcag	19
50	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Secuencia de direccionamiento	
	<400> 14	
60	atacttccat gctcggggg	19

5	<p><210> 15 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Secuencia de direccionamiento</p>	
10	<p><400> 15 gtgatcagca atgccagag</p>	19
15	<p><210> 16 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Secuencia de direccionamiento</p>	
20	<p><400> 16 tatccagaga ctcacaggc</p>	19
25	<p><210> 17 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Secuencia de direccionamiento</p>	
30	<p><400> 17 tcacttccga cctgctggc</p>	19
35	<p><210> 18 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Secuencia de direccionamiento</p>	
40	<p><400> 18 gagagaatat ccagagact</p>	19
45	<p><210> 19 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Secuencia de direccionamiento</p>	
50	<p><400> 19 cgatcaggct gccataaa</p>	19
55	<p><210> 20 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Secuencia de direccionamiento</p>	
60	<p><210> 20 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Secuencia de direccionamiento</p>	

	<400> 20		
	ccgcagaagt gatcagcaa		19
5	<210> 21 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Secuencia de direccionamiento		
	<400> 21		
	tgccagagag aatatccag		19
15	<210> 22 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Secuencia de direccionamiento		
	<400> 22		
	atggggcagg agtggcaga		19
25	<210> 23 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Secuencia de direccionamiento		
	<400> 23		
35	ggaggctctc caaggggtt		19
40	<210> 24 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Secuencia de direccionamiento		
45	<400> 24		
	ggggttgggg acatgggca		19
50	<210> 25 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Secuencia de direccionamiento		
55	<400> 25		
	ttcaaacaga tatctctat		19
60	<210> 26 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia de direccionamiento		
	<400> 26		
5	acagatatct ctatgctcg		19
	<210> 27		
	<211> 19		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia de direccionamiento		
15	<400> 27		
	actatgatgc tgcccaaag		19
	<210> 28		
20	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> Secuencia de direccionamiento		
	<400> 28		
	agaggacctg ggggtgtct		19
	<210> 29		
30	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia de direccionamiento		
	<400> 29		
	actcatcagc cgttccagg		19
40	<210> 30		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia de direccionamiento		
	<400> 30		
	tagactacta tttatttgg		19
50	<210> 31		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia de direccionamiento		
	<400> 31		
60	acagcagcac tgtattgga		19
	<210> 32		
	<211> 19		

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Secuencia de direccionamiento	
	<400> 32	
	gtccaacgag aaagctgag	19
10	<210> 33	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia de direccionamiento	
	<400> 33	
	cgagaaagct gaggaatgg	19
20	<210> 34	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Secuencia de direccionamiento	
	<400> 34	
30	agctgaggaa tggggccgg	19
	<210> 35	
	<211> 19	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de direccionamiento	
40	<400> 35	
	tggggccgga gtggcaaag	19
	<210> 36	
	<211> 19	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de direccionamiento	
50	<400> 36	
	agaccccgac cgcttcaga	19
	<210> 37	
55	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Hebra antisentido	
	<400> 37	

	cuuugccacu ccugcccca	19
	<210> 38 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
5		
	<220> <223> Hebra antisentido	
10		
	<400> 38 ucggaaguga uuggggucu	19
	<210> 39 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15		
	<220> <223> Hebra antisentido	
20		
	<400> 39 uuugucugag ccgauguaa	19
25		
	<210> 40 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30		
	<220> <223> Hebra antisentido	
	<400> 40 aaccaggccc gugagaagc	19
35		
	<210> 41 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40		
	<220> <223> Hebra antisentido	
	<400> 41 cugagccgau guaaauggc	19
45		
	<210> 42 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50		
	<220> <223> Hebra antisentido	
55		
	<400> 42 cccccgagca uggaaguau	19
	<210> 43 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60		
	<220> <223> Hebra antisentido	

	<400> 43		
	cucuggcauu gcugaucac		19
5	<210> 44 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Hebra antisentido		
	<400> 44		
	gccugugagu cucuggaua		19
15	<210> 45 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Hebra antisentido		
	<400> 45		
25	gccacuccug ccccauuua		19
30	<210> 46 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Hebra antisentido		
35	<400> 46		
	gccagcaggu cggaaguga		19
40	<210> 47 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Hebra antisentido		
45	<400> 47		
	agucucugga uauucucuc		19
50	<210> 48 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Hebra antisentido		
55	<400> 48		
	uuuauuggca gccugaucg		19
60	<210> 49 <211> 19 <212> ARN		

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Hebra antisentido	
	<400> 49	
	uugcugauca cuucugcgg	19
	<210> 50	
10	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Hebra antisentido	
	<400> 50	
	cuggauauuc ucucuggca	19
	<210> 51	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Hebra antisentido	
	<400> 51	
	ucugccacuc cugccccaau	19
30	<210> 52	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Hebra antisentido	
	<400> 52	
40	aaccccuugg agagccucc	19
	<210> 53	
	<211> 19	
	<212> ARN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Hebra antisentido	
50	<400> 53	
	ugcccauguc cccaacccc	19
	<210> 54	
	<211> 19	
55	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Hebra antisentido	
60	<400> 54	
	auagagauau cuguuugaa	19

	<210> 55	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Hebra antisentido	
	<400> 55	
10	cgagcauāga gauaucugu	19
	<210> 56	
	<211> 19	
	<212> ARN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Hebra antisentido	
20	<400> 56	
	cuuūgggag caucaugu	19
	<210> 57	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Hebra antisentido	
30	<400> 57	
	agacaccccc agguccucu	19
	<210> 58	
35	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Hebra antisentido	
	<400> 58	
	ccuggaacgg cugaugagu	19
45	<210> 59	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Hebra antisentido	
	<400> 59	
55	ccāāuaāāu aguagucua	19
	<210> 60	
	<211> 19	
	<212> ARN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Hebra antisentido	
	<400> 60	

	uccaauacag ugcugcugu	19
	<210> 61	
	<211> 19	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Hebra antisentido	
10	<400> 61	
	cucagcuuuc ucguggac	19
	<210> 62	
15	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Hebra antisentido	
	<400> 62	
	ccaauccuca gcuuucug	19
25	<210> 63	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Hebra antisentido	
	<400> 63	
35	ccggcccca uccucagcu	19
	<210> 64	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Hebra antisentido	
	<400> 64	
45	cuuugccacu ccggcccca	19
	<210> 65	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Hebra antisentido	
55	<400> 65	
	ucugaagcgg ucggggucu	19
	<210> 66	
	<211> 19	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

REIVINDICACIONES

1. 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 secuencia de nucleótidos sentido, una secuencia de nucleótidos antisentido y una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos entre las secuencias sentido y antisentido; en la que la secuencia antisentido se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y tiene una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con la parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 para su uso en el tratamiento de glaucoma asociado a amiloide sérico A en un ojo de un sujeto.
2. 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 secuencia de nucleótidos que tiene una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con una parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, en la que la secuencia de nucleótidos se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, para su uso en el tratamiento de glaucoma asociado a amiloide A en un ojo de un sujeto.
3. Método *in vitro* para atenuar la expresión de ARNm de amiloide sérico A que comprende administrar 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 secuencia de nucleótidos sentido, una secuencia de nucleótidos antisentido y una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos entre las secuencias sentido y antisentido; en el que la secuencia antisentido se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y tiene una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con la parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 a una célula.
4. Método *in vitro* para atenuar la expresión de ARNm de amiloide sérico A que comprende administrar 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 secuencia de nucleótidos que tiene una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con una parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, en el que la secuencia de nucleótidos se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 a una célula.
5. Composición o método según la reivindicación 1 ó 3, en donde la secuencia antisentido tiene una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 21 a 23 nucleótidos con la parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y comprende una secuencia TT adicional en el extremo 3' de cada una de la secuencia sentido y antisentido.
6. Composición o método según la reivindicación 1, 3 ó 5, en donde la secuencia de nucleótidos sentido y la secuencia de nucleótidos antisentido están conectadas mediante una secuencia de nucleótidos en bucle.
7. Composición o método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 y 6, en donde la secuencia antisentido está diseñada para dirigirse a una secuencia de nucleótidos de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 que comienza en el nucleótido 230, 357, 362, 380, 447, 470, 527, 531, 548 ó 557.
8. Composición o método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 y 6, en donde la secuencia antisentido está diseñada para dirigirse a una secuencia de nucleótidos de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 43, 170, 175, 193, 260, 283, 339 ó 370.
9. Composición o método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5, 6 y 8, en donde la secuencia antisentido está diseñada para dirigirse a una secuencia de nucleótidos de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 252, 271, 276, 325, 343.
10. Composición o método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 a 9, en donde la secuencia antisentido comprende
 CUUUGCCACUCCUGCCCCA (SEQ ID NO: 37), UCGGAAGUGAUUGGGGUCU (SEQ ID NO: 38),
 UUUGUCUGAGCCGAUGUAA (SEQ ID NO: 39), AACCAGGCCCGUGAGAAGC (SEQ ID NO: 40),
 CUGAGCCGAUGUAAUUGGC (SEQ ID NO: 41), GCCACUCCUGCCCCAUUUA (SEQ ID NO: 69),
 CCCCCGAGCAUGGAAGUAU (SEQ ID NO: 42), CUCUGGCAUUGCUGAUCAC (SEQ ID NO: 43),

- GCCUGUGAGUCUCUGGAUA (SEQ ID NO: 44), GCCACUCCUGCCCCAUUUA (SEQ ID NO: 45),
 GCCAGCAGGUCGGAAGUGA (SEQ ID NO: 46), AGUCUCUGGAUAUUCUCUC (SEQ ID NO: 47),
 UUUAUUGGCAGCCUGAUCG (SEQ ID NO: 48), UUGCUGAUCACUUCUGCGG (SEQ ID NO: 49),
 CUGGAUAUUCUCUCUGGCA (SEQ ID NO: 50), UCUGCCACUCCUGCCCCAU (SEQ ID NO: 51),
 5 AACCCCUUGGAGAGCCUCC (SEQ ID NO: 52), UGCCCAUGUCCCCAACCCC (SEQ ID NO: 53),
 AUAGAGAUUUCUGUUUGAA (SEQ ID NO: 54), CGAGCAUAGAGAUUUCUGU (SEQ ID NO: 55),
 CUUUGGGCAGCAUCAUAGU (SEQ ID NO: 56), AGACACCCCAGGUCCUCU (SEQ ID NO: 57),
 CCUGGAACGGCUGAUGAGU (SEQ ID NO: 58), CCAAUAAAUAUAGUAGUCUA (SEQ ID NO: 59),
 UCCAUAACAGUGCUGCUGU (SEQ ID NO: 60), CUCAGCUUUCUGUUGGAC (SEQ ID NO: 61),
 10 CCAUUCUCAGCUUUCUCG (SEQ ID NO: 62), CCGGCCCAUUCUCAGCU (SEQ ID NO: 63),
 CUUUGCCACUCCGGCCCCA (SEQ ID NO: 64) o UCUGAAGCGGUCGGGGUCU (SEQ ID NO: 65).
11. Composición o método según cualquier reivindicación anterior, en donde el ARN de interferencia comprende una modificación en una parte de base, en una parte de azúcar o en una parte de fosfato.
12. Composición o método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 5, en donde la composición comprende además un segundo ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos, y que comprende una secuencia de nucleótidos sentido, una secuencia de nucleótidos antisentido y una región de al menos el 80% de complementariedad de al menos 19 nucleótidos entre las secuencias sentido y antisentido; en donde la secuencia antisentido del segundo ARN de interferencia se hibrida en condiciones fisiológicas con una segunda parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y la secuencia antisentido tiene una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con la segunda parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
13. Composición según la reivindicación 1, 3 y 5, en donde la composición comprende una cantidad eficaz de una mezcla de al menos cuatro ARN de interferencia, teniendo cada ARN de interferencia una longitud de 19 a 49 nucleótidos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, comprendiendo cada ARN de interferencia: una secuencia de nucleótidos sentido, una secuencia de nucleótidos antisentido y una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos entre las secuencias sentido y antisentido de cada uno de los cuatro ARN de interferencia; en la donde las secuencias antisentido de la mezcla se hibridan en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 175, 252, 276 y 325, respectivamente, y tienen una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con la parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 175, 252, 276 y 325, respectivamente.
14. Composición según la reivindicación 2 o método según la reivindicación 4, en donde la composición comprende además un segundo ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos, y comprendiendo una segunda secuencia de nucleótidos que tiene una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con una segunda parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
15. Composición según la reivindicación 2 o método según la reivindicación 4, en donde la composición comprende una cantidad eficaz de una mezcla de al menos cuatro ARN de interferencia, teniendo cada ARN de interferencia una longitud de 19 a 49 nucleótidos, y comprendiendo la mezcla: una primera, segunda, tercera y cuarta secuencia de nucleótidos que tienen una región de al menos el 80% de complementariedad contigua de al menos 19 nucleótidos con la parte hibridante de ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 175, 252, 276 y 325, respectivamente.
16. Composición o método según cualquier reivindicación anterior, en donde la composición se prepara para administración por vía tópica, intravítrea o transescleral.

FIG. 1

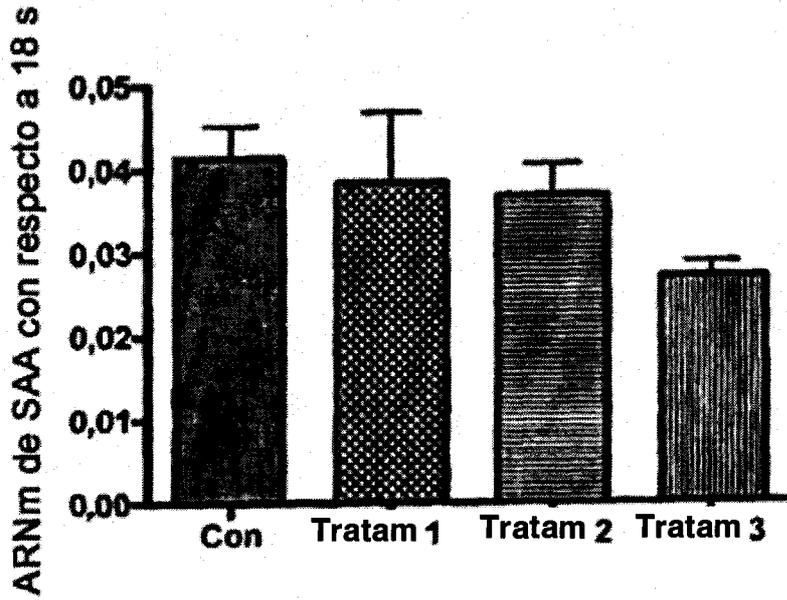


FIG. 2

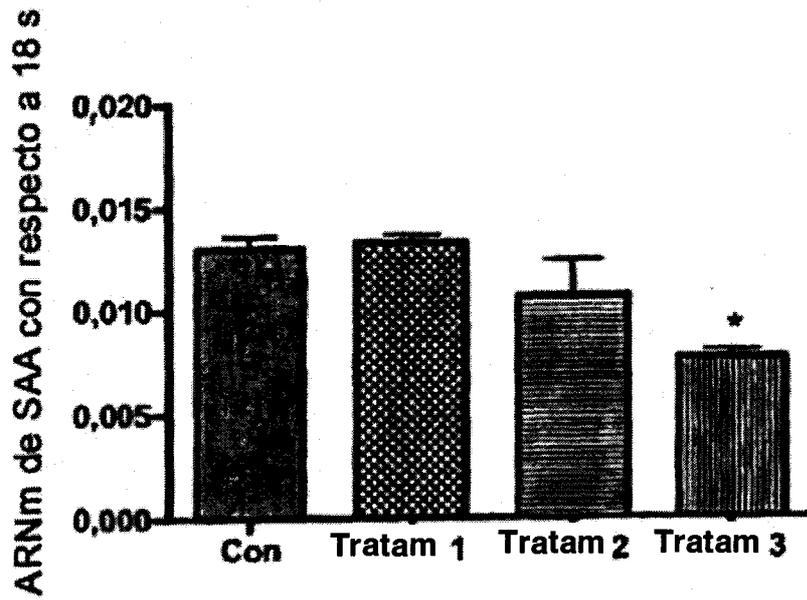


FIG. 3

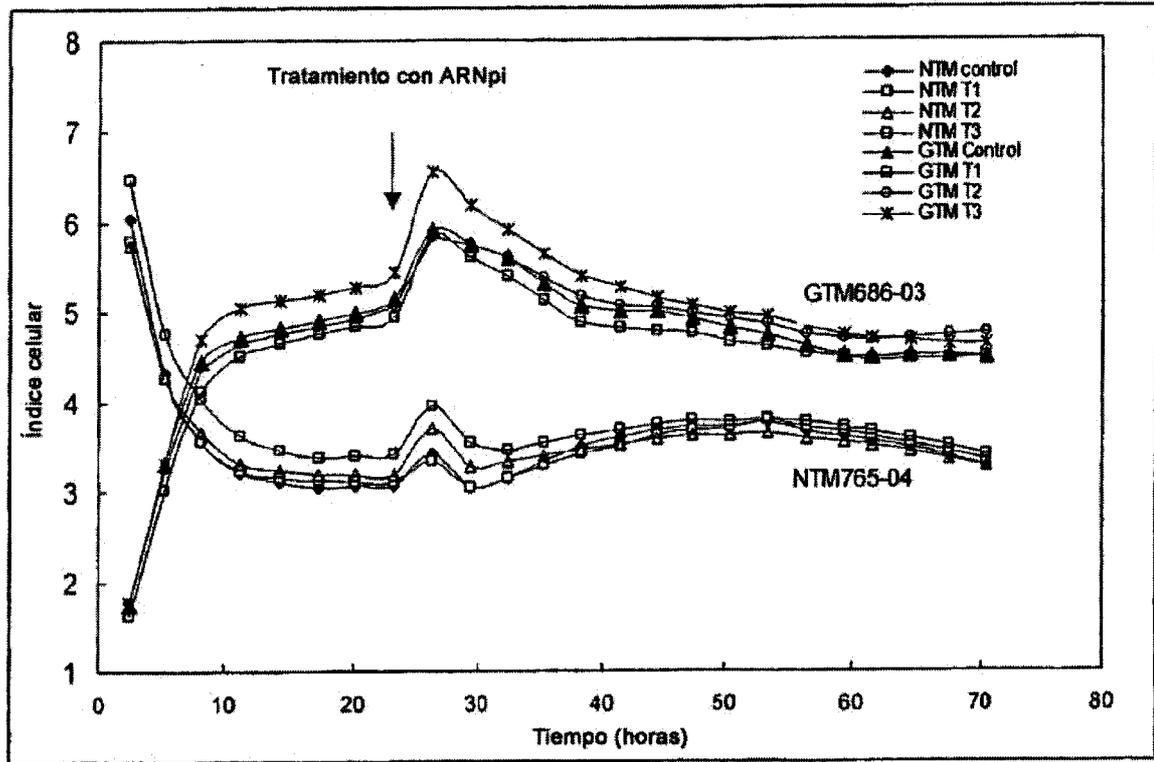


FIG. 4

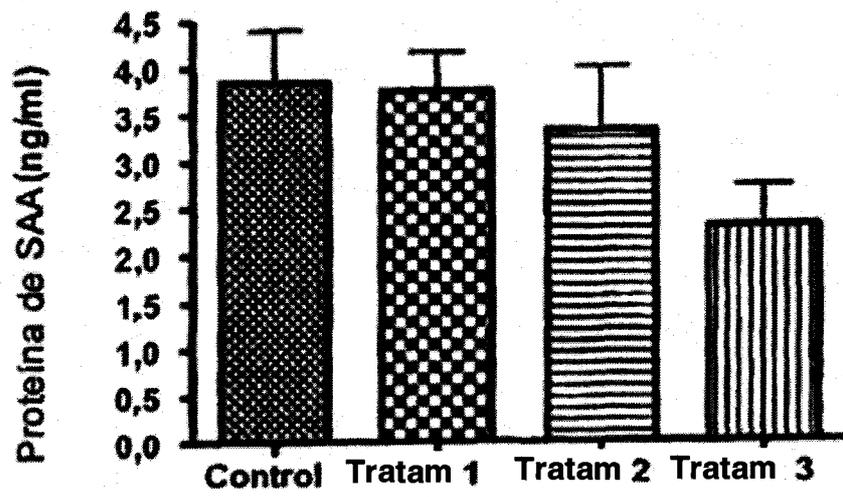


FIG. 5

