

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 305**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2006 E 06795009 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 1941037**

54 Título: **Modulación de la expresión de la 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 para el tratamiento de enfermedades oculares**

30 Prioridad:

25.10.2005 GB 0521716

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.05.2013

73 Titular/es:

**SYLENTIS S.A. (100.0%)
José Abascal 2
28003 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**JIMÉNEZ ANTÓN, ANA ISABEL;
SESTO YAGÜE, ÁNGELA y
JIMÉNEZ GÓMEZ, M^a CONCEPCIÓN**

74 Agente/Representante:

BALLESTER CAÑIZARES, Rosalía

ES 2 403 305 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).

**MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA 11BETA-HIDROXIESTEROIDE
DESHIDROGENASA DE TIPO 1 PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
OCULARES**

5 **Descripción**

CAMPO DE INVENCIÓN

[0001] La presente invención se dirige a métodos y composiciones para el tratamiento y/o la prevención de afecciones oculares relacionadas con altos niveles de expresión o de actividad de la 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 (en adelante, 10 11beta-HSD1); en particular, pero no de manera exclusiva a los tratamientos de glaucoma. En modos de realización preferidos, la invención se dirige al uso de tecnología ARN de interferencia (ARNi) para disminuir la expresión de la 11 beta-HSD1.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

[0002] El glaucoma es una de las principales causas de ceguera. El glaucoma produce aproximadamente el 15% de los casos de ceguera mundial. El tipo más común, el glaucoma de ángulo abierto primario, tiene una prevalencia de 1/200 en la población general mayor de 40 años. El glaucoma se ha definido simplemente como el proceso 20 de destrucción de tejido ocular causado por una elevación continua de la presión intraocular (PIO) superior a los límites fisiológicos normales. Aunque varias etiologías pueden verse implicadas en el complejo del glaucoma, un factor determinante en la selección del tratamiento es la cantidad de cambios primarios y/o inducidos en la presión del ángulo iridocorneal.

[0003] Las terapias actuales incluyen tratamientos o cirugías destinados a reducir dicha presión, aunque se desconocen los mecanismos fisiopatológicos por los que la PIO elevada conduce a un daño neuronal en el glaucoma. La supresión médica de una PIO elevada puede intentarse mediante el uso de cuatro tipos de fármacos: (1) 25 supresores de la formación de humor acuoso (tales como inhibidores de la anhidrasa carbónica, agentes bloqueadores beta-adrenérgicos y agonistas de adrenoreceptor alfa2); mióticos (tales como parasimpaticomiméticos, incluidos inhibidores colinérgicos y anticolinérgicos); (3) potenciadores de flujo uveoescleral; y (4) agentes 30 hiperosmóticos (que producen un gradiente de presión osmótica sobre la barrera sanguínea/acuosa del epitelio ciliar). Una quinta categoría de fármacos, los agentes 35 neuroprotectores, está emergiendo como un complemento importante a la terapia

médica, que incluye, por ejemplo, inhibidores de la NO-sintetasa (NOS), antagonistas de los aminoácidos excitatorios, antagonistas de receptores de glutamato, inhibidores de apoptosis y bloqueadores del canal del calcio.

[0004] Reseñas de diferentes trastornos oculares pueden encontrarse en las siguientes referencias: Bunce et al., 2005, Associations between the deletion polymorphism of the angiotensin 1-converting enzyme gene and ocular signs of primary open-angle glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*; 243(4):294; Costagliola et al., 2000, Effect of oral losartan potassium administration on intraocular pressure in normotensive and glaucomatous human subjects. *Exp Eye Res* 71(2):167; Costagliola et al., 1995, Effect of oral captopril (SQ 14225) on intraocular pressure in man. *Eur J Ophthalmol.*, 5(1):19; Cullinane et al., 2002, Renin-angiotensin system expression and secretory function in cultured human ciliary body non-pigmented epithelium. *Br J Ophthalmol.*, 86(6):676; Sakaguchi et al., 2002, Chymase and angiotensin converting enzyme activities in a hamster model of glaucoma filtering surgery. *Curr Eye Res.* 24(5):325; Shah et al., 2000, Oculohypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in acute and chronic models of glaucoma. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 36(2):169, y Wang et al., 2005, Effect of CS-088, an angiotensin AT1 receptor antagonist, on intraocular pressure in glaucomatous monkey target RNAeyes. *Exp Eye Res.*, 80(5):629.

[0005] La interferencia por ARN se refiere al proceso de silenciamiento génico postranscripcional de una secuencia específica transmitida por ARN interferente pequeño (ARNip). Tras el descubrimiento de este fenómeno en plantas a principios de la década de los 90, Andy Fire y Craig Mello demostraron que el ARN bicatenario (ARNbc) inhibía selectiva y específicamente la expresión génica de un modo muy eficiente en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998, Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806). La secuencia de la primera hebra (ARN con sentido) coincidió con la de la correspondiente región del ARN mensajero diana (ARNm). La segunda hebra (ARN antisentido) era complementario al ARNm. El ARNbc resultante resultó ser diferentes órdenes de magnitud más eficaz que las correspondientes moléculas de ARN monocatenarias (en particular, el ARN antisentido).

[0006] El proceso de interferencia por ARN (ARNi) empieza cuando la enzima, DICER, encuentra ARNbc y lo corta en fragmentos que reciben el nombre de ARN interferente pequeño (ARNip). Esta proteína pertenece a la familia de nucleasas RNasa III. Un complejo de proteínas reúne estos residuos de ARN y utiliza su código como guía para buscar y destruir cualquier ARN en la célula con una secuencia de apareamiento,

como ARNm diana (véase: Boshier & Labouesse, 2000, RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2):E31, y Akashi et al., 2001, Suppression of gene expression by RNA interference in cultured plant cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 11(6):359).

5 **[0007]** En intentos por utilizar ARNi para el silenciamiento génico, se reconoció que las células de mamífero han desarrollado diversos mecanismos protectores contra infecciones virales que podrían dificultar la utilización de este enfoque. De hecho, la presencia de niveles extremadamente bajos de ARNbc viral da como resultado una respuesta interferón, que ocasiona una supresión de la traducción no específica
10 global, lo que, a su vez, provoca apoptosis (Williams, 1997, Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem Soc Trans*, 25(2):509; Gil & Esteban, 2000, Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*, 5(2):107-14).

[0008] En 2000, se declaró que el ARNbc inhibía específicamente 3 genes en el oocito
15 de ratón y en el embrión en etapa temprana. No se observó detención translacional ni, por tanto, una respuesta de proteína-quinasa R, puesto que los embriones continuaron desarrollándose (Wianny & Zernicka-Goetz, 2000, Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol*, 2(2):70). La investigación en Ribopharma AG (Kulmbach, Alemania) demostró la funcionalidad
20 de ARNi en células de mamíferos, utilizando ARNbc pequeño (20-24 pares de bases) para desactivar genes en células humanas sin iniciar la respuesta de la fase aguda. Estos resultados se confirmaron por experimentos similares llevados a cabo por otros grupos de investigación. (Elbashir et al., 2001, RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15(2):188; Caplen et al., 2001, Specific inhibition
25 of gene expression by small double stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 9742). Sometido a ensayo en una variedad de líneas de células de ratón y humanas de cáncer y normales, se determinó que el ARN de horquilla pequeña (ARNhp) puede silenciar genes con la misma eficacia que sus homólogos de ARNip (Paddison et al, 2002, Short hairpin RNAs (shRNAs) induce
30 sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 16(8):948). Recientemente, se demostró que otro grupo de ARN pequeños (21-25 pares de bases) mediaba la regulación por disminución de la expresión génica. Estos ARN, ARN pequeños regulados temporalmente (ARNtp), regulan el calendario de la expresión génica durante el desarrollo en *Caenorhabditis elegans* (para una revisión, véase
35 Banerjee & Slack, Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. *Bioessays*, 2002,

24(2):119-29 y Grosshans & Slack, 2002, Micro-RNAs: small is plentiful. J Cell Biol, 156(1):17).

[0009] Los científicos han utilizado ARNi en diversos sistemas, incluyendo *Caenorhabditis elegans*, Drosófila, tripanosomas y otros invertebrados. Diversos grupos han presentado recientemente la supresión específica de la biosíntesis de proteínas en diferentes líneas de células de mamífero (en concreto, en células HeLa) demostrando que ARNi es un método de amplia aplicación para el silenciamiento génico *in vitro*. A partir de estos resultados, ARNi se ha convertido rápidamente en una herramienta bien reconocida para validar (identificar y asignar) la función génica. El ARNi que emplea oligonucleótidos de ARNbc pequeños, aportará una comprensión de la función de los genes que están secuenciados sólo parcialmente.

[0010] Como ya se ha indicado, la PIO se mantiene gracias al equilibrio entre la producción (dependiente del transporte de sodio a través de la bicapa epitelial ciliar) y el drenaje (predominantemente a través de la malla trabecular) de humor acuoso (HA). El HA se secreta en la cámara posterior del ojo, fluye desde el epitelio ciliar, entre el iris y el cristalino, pasando a la apertura pupilar, y finalmente fluye radialmente a la periferia, donde se encuentra predominantemente a través del canal de Schlemm en la malla trabecular, y en menor grado a través de vías de flujo uveoesclerales (Davson H. The aqueous humour and intraocular pressure. In: Davson's Physiology of the Eye, 5th edn. London, Macmillan Press, 1990:3-95; Hart WM. Intraocular pressure. In: Hart WM, ed. Adler's Physiology of the Eye. St Louis, Mosby-Year Book Inc, 1992:248-267).

[0011] En los tejidos epiteliales periféricos, el transporte de sodio y agua se regula mediante corticosteroides y las isoenzimas 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11beta-HSD) (11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 (11beta-HSD1), que activa cortisol a partir de cortisona, y 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 2 (11beta-HSD2) desactivando cortisol en cortisona). La 11beta-HSD1 se expresa ampliamente, sobre todo en muchos tejidos diana glucocorticoides entre los que se incluyen el hígado, el tejido adiposo, los huesos, así como el pulmón, la vasculatura, los ovarios y el sistema central nervioso.

[0012] La expresión de la 11beta-HSD ha sido descrita en el ojo humano. La 11beta-HSD2 está expresada ampliamente en el endotelio corneal, mientras que la 11beta-HSD1 está más expandida en la malla trabecular, el epitelio del cristalino y el epitelio corneal (Tomlinson JW. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human disease: a novel therapeutic target. Minerva Endocrinol. 2005 Mar;30(1):37-46).

[0013] La 11beta-HSD1, pero no la 11beta-HSD2, ha sido localizada en células

neuroepiteliales no pigmentadas humanas (Rauz S, Walker EA, Shackleton CHL, Hewison M, Murray PI, Stewart PM. Expression and putative role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes within the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42:2037-42; Suzuki T, Sasano H, Kaneko C, Ogawa S, Darnel AD, Krozowski ZS.

5 Immunohistochemical distribution of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human eye. Mol Cell Endocrinol 2001; 173:121-5; Mirshahi M, Nicolas C, Mirshahi A, Hecquet C, d'Hermies F, Faure JP, et al. The mineralocorticoid hormone receptor and action in the eye. Biochem Biophys Res Commun 1996; 219:150-6; Stokes J, Noble J, Brett L, Philips C, Seckl JR, O'Brien C, et al. Distribution of glucocorticoid and mineralocorticoid

10 receptors and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases in human and rat ocular tissues. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41:1629-38). La hibridación *in situ* definió la expresión de la 11beta-HSD1 en el epitelio ciliar, mientras que el análisis por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) de tejido de cuerpo ciliar confirmó la expresión de la 11beta-HSD1, con receptores de glucocorticoides y de

15 mineralocorticoides adicionales (Rauz S, Cheung CM, Wood PJ, Coca-Prados M, Walker EA, Murray PI, Stewart PM. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 lowers intraocular pressure in patients with ocular hypertension. QJM., 2003 Jul;96(7):481-90). La enzima 11beta-HSD1 desempeña un papel fundamental en la determinación de las concentraciones de glucocorticoides intracelulares al generar, en

20 una reacción reversible, glucocorticoide activo (cortisol en los humanos, corticosteronas en las ratas y los ratones) a partir de cortisona inactiva y 11-dehidrocorticosterona. Se ha documentado una proporción elevada de cortisol/cortisona de 14:1 en el humor acuoso, coherente con este sistema generador de cortisol local (Rauz S, Walker EA, Shackleton CHL, Hewison M, Murray PI, Stewart

25 PM. Expression and putative role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes within the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42:2037-42).

[0014] La administración oral de carbenoxolona (CBX), un inhibidor de la 11beta-HSD1, a voluntarios en un estudio piloto no controlado, conllevó una disminución de la PIO del 17,5%, planteando que la actividad de la 11beta-HSD1 podría regular

30 parcialmente el transporte de sodio a través de la bicapa pigmentada y no pigmentada, y, por consiguiente, la secreción del humor acuoso (Rauz S, Walker EA, Shackleton CHL, Hewison M, Murray PI, Stewart PM. Expression and putative role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes within the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42:2037-42). Estudios adicionales, aleatorios, controlados por placebo a

35 voluntarios sanos y a pacientes con hipertensión (con elevada PIO, pero sin neuropatía óptica) evaluaron el efecto de la CBX en la PIO (Rauz S, Cheung CM,

Wood PJ, Coca-Prados M, Walker EA, Murray PI, Stewart PM. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 lowers intraocular pressure in patients with ocular hypertension. QJM., 2003 Jul;96(7):481-90).

5 **[0015]** Lo anterior es un debate de técnica interesante en cuanto a ARNi. El debate se ha planteado únicamente para la comprensión de la invención que sigue, y no constituye una admisión de que cualquiera de los trabajos descritos sea de la técnica anterior a la invención reivindicada.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

10 **[0016]** En la presente invención, proporcionamos métodos y composiciones para modular la expresión y/o la actividad de la 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 (11beta-HSD1) mediante el uso de ácido nucleico de interferencia pequeño (ANip) para el tratamiento de las afecciones oculares. En modos de realización preferentes, las afecciones del ojo se caracterizan por una PIO modificada en
15 animales, incluso en humanos. En particular, la afección del ojo es el glaucoma.

[0017] Otro aspecto de la presente invención se dirige a un compuesto de ANip aislado, que incluye una secuencia complementaria de una secuencia de nucleótidos seleccionada de la SEC ID N° 1 a la SEC ID N° 61 o que incluye unas secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo de la SEC ID N° 62 a la SEC ID N° 122.

20 **[0018]** Otro aspecto más de la presente invención se refiere a las composiciones farmacéuticas que incluyen compuestos de ANip que seleccionan como diana a la 11 beta-HSD1.

[0019] Además del tratamiento para el glaucoma, el presente método es también adecuado para el tratamiento de otras enfermedades de la cámara posterior del ojo.
25 En particular, este método puede aplicarse al tratamiento de enfermedades caracterizadas por la formación o el flujo acuosos modificados en el ojo. Ejemplos de afecciones que pueden ser tratadas de acuerdo con la invención incluyen afecciones locales tales como infecciones o inflamaciones y afecciones generales tales como uveítis o expresiones de enfermedades sistémicas. Además, ciertos modos de
30 realización de la invención proporcionan tratamiento para la retinopatía diabética.

[0020] La disminución puede efectuarse mediante el uso de residuos de ácido nucleico bicatenario, denominados ANip o AN de interferencia pequeño que se dirigen a interferir con la expresión de ARNm de la 11beta-HSD1. Los ANip son preferiblemente ARNip, aunque también se incluyen ácidos nucleicos modificados o entidades
35 similares químicamente sintetizadas dentro del objetivo de esta invención.

[0021] Los medios de realización preferentes de la invención se refieren a aplicaciones tópicas de ANip. Dichos medios de realización de la invención también proporcionan composiciones farmacéuticas para el uso en los tratamientos de las afecciones del ojo. La invención puede utilizarse en los campos de los tratamientos de ojo locales, de los genes diana implicados en patogénesis del glaucoma, así como en el del uso de entidades químicamente sintetizadas para tratar animales (incluido humanos).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0022]

10 La figura 1 muestra los números de acceso GenBank que le corresponden a las dos transcripciones alternativas de la 11beta-HSD.

La figura 2 muestra fragmentos pequeños de la secuencia de gen diana elegida como las secuencias diana del ANip de la invención.

15 La figura 3 muestra moléculas ANip de la invención.

La figura 4 muestra el efecto máximo de dos ARNip en la reducción de la PIO en conejos neozelandeses normotensos. Los valores representan la media del porcentaje de reducción de la PIO sobre la medida de control (ojo contralateral con vehículo sólo) y su error estándar (SD). Los ARNip utilizados son 20 11had/01: CCACAUCACCAACGCUUCUdTdT (SEC ID 133; secuencia de conejo homóloga a la humana SEC ID N° 100) y 11HSD/02: CGUCA AUGUAUCAAUCAUCUdTdT (SEC ID 134; secuencia de conejo con el mejor resultado y sin secuencia humana revelada correspondiente).

La figura 5 muestra el efecto *in vivo* del ARNip 11HSD/02 en la reducción de la PIO en los conejos neozelandeses normotensos con el paso del tiempo. Cuatro aplicaciones consecutivas de 265 ug de ARNip produjeron una disminución de 30 la PIO de 20, 34 sobre la medida de control. Por el contrario, un ARNip descontrolado no tuvo ningún efecto en los niveles de la PIO.

[0023] Cada valor representa la media del porcentaje de reducción de la PIO sobre la medida de control (ojo contralateral con vehículo sólo) en cuatro animales diferentes.

35

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0024] En el primer aspecto, la invención se refiere al uso de NAip en la fabricación de

un medicamento para el tratamiento de la afección del ojo, en el cual dicho NAip es capaz de inhibir la expresión de la 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 (11beta-HSD1).

5 **[0025]** El término inhibir utilizado según la invención abarca la disminución de la 11beta-HSD1. En un modo de realización, la afección del ojo de acuerdo con la invención se caracteriza por una presión intraocular (PIO) alterada en el paciente. En otro modo de realización, la afección del ojo es seleccionada de un grupo que incluye glaucoma, infección, inflamación, uveítis y expresión de enfermedades sistémicas. La afección del ojo puede ser seleccionada del glaucoma o de la retinopatía diabética.
10 De acuerdo con la invención, la expresión del gen diana puede ser inhibida en el ojo del paciente.

[0026] En un modo de realización, el ANip de acuerdo con la invención es ARNip. Preferiblemente, el ARNip es ARNbc.

15 **[0027]** Aunque los mecanismos para el ARNi siguen siendo desconocidos, los pasos necesarios para generar los oligonucleótidos de ARNbc específicos están claros. Se ha mostrado que las hebras dúplex de ARNbc que miden de 21 a 26 nucleótidos de longitud funcionan de modo más eficaz en la producción de ARN por interferencia. Por consiguiente, en un modo de realización, el ANip de la invención mide 21-26 nucleótidos de largo. No obstante, la longitud del compuesto ANip de acuerdo con la
20 invención no es limitada. También es importante seleccionar la región homóloga correcta dentro del gen. Factores como la distancia desde el codón de inicio, el contenido en G/C y la localización de dímeros de adenosina son importantes cuando se considera la generación de ARNbc para ARNi. No obstante, una de las consecuencias de esto es que uno pueda necesitar probar varias secuencias
25 diferentes para el ARNi más eficiente con el consiguiente aumento del coste.

[0028] En 1999, Tuschl et al. (Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. Genes Dev., 1999; 13(24):3191-7) descifraron el efecto de silenciamiento de los ARNip demostrando que su eficacia es una función de la longitud del dúplex, la longitud de los extremos salientes 3', y la secuencia en estos salientes. Basado en
30 este trabajo fundador, Eurogentec recomienda que la región de ARNm diana y, por lo tanto, la secuencia de los dúplex ARNip, debería elegirse haciendo uso de las siguientes directrices:

Puesto que ARNi cuenta con la creación de interacciones de proteínas complejas, es pacífico la diana de ARNm debería carecer de factores seguros
35 ajenos. En este contexto, ambas regiones sin traducir de 5' y 3' y las regiones

próximas al codón de inicio deberían evitarse, puesto que podrían ser más ricas en sitios de unión de proteínas reguladoras. Por lo tanto, la secuencia del ARNip es seleccionada de la siguiente manera: en la secuencia de ARNm, se selecciona una región localizada de 50 a 100 nucleótidos de los genes
 5 secuencia abajo del condón de inicio AUG o de los genes secuencia arriba del condón de terminación.

[0029] En esta región, se buscan las siguientes secuencias: AA (N19), CA (N19). Se calcula el porcentaje G/C para cada secuencia identificada. Idealmente, el contenido
 10 en G/C es el 50% pero debe ser menor del 70% y mayor del 30%.

Preferentemente, se evitarán las secuencias que contengan las siguientes repeticiones: AAA, CCC, GGG, TTT, AAAA, CCCC, GGGG, TTTT.

También se lleva a cabo una predicción de la accesibilidad de acuerdo con la estructura secundaria del ARNm. Un alineamiento de secuencias de tipo local,
 15 conocido como BLAST, (i.e. la base de datos de etiquetas de secuencias expresadas (dbEST) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica) se realiza también con la secuencia de nucleótidos que cumple mejor los criterios previos para asegurar que sólo se desactive un gen.

[0030] Con el fin de maximizar la interpretación del resultado, deberían tomarse las
 20 siguientes precauciones cuando se utilizan los ARNip:

- Probar siempre las hebras sencillas de con sentido y antisentido en experimentos separados.
- Probar un dúplex de ARNip descontrolado. Esto debería tener la misma composición de nucleótidos que su ARNip, pero una secuencia vacía de
 25 significado homóloga a cualquier otro gen (incluido el suyo).
- Si es posible, silenciar el mismo gen con dos dúplex de ARNip independientes para controlar la especificidad del proceso silenciador.

[0031] En la práctica, cada gen seleccionado se introduce como secuencia de
 30 nucleótidos en un programa de predicción que tiene en cuenta todas las variables descritas anteriormente para el diseño de oligonucleótidos óptimos. Este programa explora cualquier secuencia de nucleótidos del ARNm para determinar regiones susceptibles de ser seleccionadas como diana por el ARNip. El resultado de este análisis es una puntuación de posibles oligonucleótidos de ARNip. Las puntuaciones
 35 más altas se utilizan para diseñar oligonucleótidos de ARN bicatenarios (normalmente,

21 bp de longitud, aunque también son posibles otras longitudes) que habitualmente provienen de síntesis química.

[0032] Los nucleótidos de acuerdo con la invención pueden constar de uno o más oligonucleótidos modificados. Una o más modificaciones están dirigidas a incrementar la estabilidad o la disponibilidad de NAip. Se describen ejemplos de dichas modificaciones adecuadas en las publicaciones citadas a continuación, cada una de las cuales se incorpora en este documento por referencia. Ejemplos de dichas modificaciones de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, enlaces internucleotídicos de fosforotioato, 2'-O-metil ribonucleótidos, 2'-O-desoxi-fluoro ribonucleótidos, 2'-desoxi ribonucleótidos, nucleótidos de "base universal", nucleótidos 5-C-metilo e incorporación de restos abásicos desoxi invertidos, enlaces cruzados químicos entre las dos hebras complementarias de un ARNip y la modificación química de un 3' terminal de una hebra de un ARNip, modificaciones internas, por ejemplo, modificaciones de azúcar, modificaciones de la nucleobase y/o modificaciones de la estructura o cadena principal. 2'-fluoro ribonucleótidos modificados y 2'-desoxi ribonucleótidos.

[0033] Los estudios demuestran que la sustitución de los segmentos salientes de nucleótidos 3'-terminales de un dúplex de ARNip de 21 unidades, que tiene salientes 3' de dos nucleótidos, con desoxirribonucleótidos, no tiene un efecto adverso sobre la actividad de ARNi. Se ha indicado que la sustitución de hasta cuatro nucleótidos en cada extremo del ARNip con desoxirribonucleótidos se tolera bien, mientras que la sustitución completa con desoxirribonucleótidos da como resultado la ausencia de actividad de ARNi (Elbashir 2001). Además, Elbashir et al. también indican que la sustitución de ARNip con nucleótidos 2'-O-metilo suprime completamente la actividad de ARNi.

[0034] Se pueden utilizar nucleósidos modificados de afinidad como describe WO2005/044976. Esta publicación describe oligonucleótidos que constan de nucleósidos modificados con el fin de aumentar o disminuir la afinidad para su nucleótido complementario en el ARNm diana y/o en la hebra de ANip complementario.

[0035] GB2406568 describe oligonucleótidos modificados alternativos químicamente modificados para proporcionar resistencia mejorada a la degradación o absorción mejorada. Ejemplos de dichas modificaciones incluyen enlaces de internucleotídicos de fosforotioato, 2'-O-metil ribonucleótidos, 2'-desoxi-fluoro ribonucleótidos, 2'-desoxi ribonucleótidos, nucleótidos de "base universal", nucleótidos 5-C-metilo e incorporación de restos abásicos desoxi invertidos.

[0036] WO2004/029212 describe oligonucleótidos modificados para mejorar la estabilidad de ARNip o aumentar la eficacia en la selección como diana. Las modificaciones incluyen el enlace cruzado químico entre dos hebras complementarias de un ARNip y la modificación química de un 3' terminal de una hebra de un ARNip.

5 Las modificaciones preferentes son las internas, por ejemplo, modificaciones de azúcar, modificaciones de la nucleobase y/o modificaciones de la estructura o cadena principal. Se describen 2'-fluoro ribonucleótidos modificados y 2'-desoxi ribonucleótidos.

[0037] Además, WO2005/040537 también recita oligonucleótidos modificados que pueden ser utilizados en la invención.

10 **[0038]** Además de hacer uso del ANbc y del ANbc modificado, la presente invención puede utilizar AN de horquilla pequeña (ANhp); las dos hebras de la molécula ANip pueden ser conectadas por una región de enlaces, que puede ser un enlace de nucleótidos o un enlace de no nucleótidos.

[0039] De acuerdo con la invención, además del ANip, que es complementario a la
 15 secuencia en la región diana de ARNm, pueden utilizarse secuencias degeneradas de ANip para seleccionar como diana a regiones homólogas según la invención. Pueden diseñarse secuencias de ANip degenerativo de acuerdo con los métodos conocidos a las personas experimentadas. Por ejemplo, WO2005/045037 describe el diseño de moléculas de ANip para seleccionar como diana a dichas secuencias homólogas, por
 20 ejemplo, mediante la incorporación de pares de base no canónicas, por ejemplo, apareamientos incorrectos y/o pares de base con titubeo, que pueden proporcionar secuencias diana adicionales. En aquellos casos en los que se identifican apareamientos incorrectos, pueden utilizarse pares de base no canónicas (por ejemplo, apareamientos incorrectos y/o bases de titubeo) para generar moléculas de
 25 ANip que seleccionan como diana a más de una secuencia génica. En un ejemplo sin carácter limitativo, se utilizan pares de base, no canónicas, tales como pares de base UU y CC para generar moléculas de ANip que pueden seleccionar como diana a secuencias para diferenciar dianas que comparten homología de secuencia. Y es así, una ventaja de utilizar los ANip de la invención es que puede diseñarse un ANip
 30 sencillo para incluir una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótido que se conserva entre los genes homólogos. De esta manera, un ANip sencillo puede utilizarse para inhibir la expresión de más de un gen en lugar de utilizar más de una molécula de ANip para seleccionar como diana a genes diferentes.

35 **[0040]** Las moléculas de ANip preferentes de la invención son las bicatenarias. Una molécula de ANip de la invención puede comprender extremos romos, es decir, que no

incluyen ningún nucleótido saliente. En un modo de realización, las moléculas de ANip de la invención pueden constar de uno o más extremos romos. En modos de realización preferentes, las moléculas de ANip tienen salientes 3'. Las moléculas de ANip de la invención pueden constar de un dúplex de moléculas de ácido nucleico con salientes 3' de n nucleótidos ($5 \geq n \geq 1$). Elbashir (2001) demuestra que los dúplex de ARNip de 21 nucleótidos son más activos cuando contienen salientes dinucleotídicos 3' terminales.

[0041] Los oligonucleótidos candidatos son filtrados más a fondo para la conservación de la secuencia interespecies con el fin de facilitar la transición de los estudios clínicos con animales a los humanos. En los modos de realización preferidos de la invención, se utilizan oligonucleótidos conservados; lo que permite hacer uso de una secuencia de oligonucleótidos simple tanto en modelos animales como en ensayos clínicos con humanos.

[0042] La presente invención puede consistir en la administración de una o más especies de moléculas de ANip de modo simultáneo. Esta o más especies podrán seleccionarse para seleccionar como diana las mismas o diferentes especies de ARNm. Preferentemente, el ANip selecciona como diana a una secuencia seleccionada de la SEC ID 1 a la SEC ID 61 o a una secuencia que contenga de la SEC ID 1 a la SEC ID 61.

[0043] Los números de acceso GenBank que le corresponden a las dos transcripciones alternativas de la 11 beta-HSD se muestran en la Tabla 1. La presente invención permite la selección individual como diana de cada forma de transcripción. Por consiguiente, en un modo de realización, el ANip selecciona como diana la forma de empalme de la 11 beta-HSD tal y como se muestra en la Tabla 1.

[0044] En la tabla 2 se muestran las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas frente a las que se dirige el ARNi. Las secuencias que se muestran son las secuencias de ADN seleccionadas como diana por el ANip. Por lo tanto, la invención hace uso de los dúplex de AN con secuencias complementarias a las secuencias de ADN indicadas.

[0045] Las secuencias que se muestran en la Tabla 2 no son restrictivas. El ADN diana no necesita estar precedido necesariamente por AA o CA. Además, el ADN diana podría estar constituido por secuencias incluidas en la Tabla 2 flanqueadas por cualquier secuencia contigua.

[0046] En otro aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento de una afección del ojo, que consiste en administrar el ANip en las ocasiones que dicho ANip

es capaz de inhibir la expresión de la 11 beta-HSD1. El ANip se define de acuerdo con la invención.

5 **[0047]** En otro aspecto más, la invención también se refiere a un método de inhibir la expresión de 11beta-HSD1 que consiste en administrar un compuesto de ANip capaz de inhibir la expresión de la 11beta-HSD1. El ANip se define de acuerdo con la invención.

10 **[0048]** En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de ANip aislado que selecciona como diana a 11beta-HSD1 en el que el compuesto de ANip comprende una secuencia complementaria a una secuencia de nucleótidos seleccionada de la SEC ID 1 a la SEC ID 61. En un modo de realización, el compuesto de ANip puede consistir en una secuencia de un nucleótido seleccionada del grupo de la SEC ID N° 62 a la SEC ID N° 122. En particular, la invención se refiere a la molécula de ANip aislada que consta de una secuencia complementaria a una secuencia de nucleótido seleccionada de la SEC ID 1 a la SEC ID 61 o de la SEC ID N°62 a la 122 para el uso
15 como medicamento.

[0049] En el aspecto final, la invención se refiere a la composición farmacéutica que consta de un compuesto de ANip aislado como se describe en el presente documento. En un modo de realización, la composición farmacéutica consta de un compuesto de ANip aislado que selecciona como diana a la 11 beta-HSD1 en los que el compuesto
20 de ANip consta de una secuencia complementaria a una secuencia de nucleótido seleccionada de la SEC ID 1 a la SEC ID 61 o unas secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo de la SEC ID N° 62 a la SEC ID N° 122.

[0050] Las moléculas de ANip de la invención y las formulaciones o composiciones de las mismas pueden administrarse directamente o tópicamente (p.ej.: localmente) al ojo
25 tal y como se conoce generalmente en la materia. Por ejemplo, una molécula de ANip puede constar de un vehículo de suministro, incluyendo liposomas, para su administración a un sujeto. Los vehículos y los diluyentes y sus sales pueden estar presentes en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse a las células mediante una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitarse a, la
30 encapsulación en liposomas, por iontoforesis, o por incorporación en otros vehículos, tales como polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas, poli (lacti-co-glicólico) ácido (PLGA), y microesferas de PLCA, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteináceos. En otro modo de realización, las
35 moléculas de ácido nucleico de la invención también pueden formularse o formar complejos con polietilenimina y derivados de la misma, tales como derivados de la

polietilenimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o polietilenimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL).

[0051] Una molécula de ANip de la invención puede formar complejos con agentes disruptivos de membrana y/o un lípido catiónico o una molécula de lípido auxiliar.

5 **[0052]** Los sistemas de transmisión que se pueden utilizar con la invención incluyen, por ejemplo, geles acuosos y no acuosos, cremas, emulsiones múltiples, microemulsiones, liposomas, pomadas, disoluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, bases de hidrocarburo y polvos, y puede contener excipientes tales como solubilizadores, potenciadores de la permeación (p.ej.: ácidos grasos, ésteres de ácido
10 graso, alcoholes grasos y aminoácidos), y polímeros hidrófilos (p.ej.: poliacarboxilato y polivinilpirrolidona). En un modo de realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un liposoma o un potenciador transdérmico.

[0053] Una formulación farmacéutica de la invención está en una forma adecuada para la administración, p.ej.: administración sistemática o local, en una célula o en un
15 sujeto, incluidos, por ejemplo, los humanos. Las formas adecuadas dependen en parte del uso o de la vía de entrada, por ejemplo, oral, transdérmica, o por inyección. También existen otros factores conocidos por los expertos, e incluyen consideraciones tales como la toxicidad y formas que evitan que la composición o formulación ejerzan su efecto.

20 **[0054]** La presente invención también incluye composiciones preparadas para el almacenamiento o la administración que incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz de los compuestos deseados en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y diluyentes aceptables para su uso terapéutico son reconocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, pueden proporcionarse
25 conservantes; estabilizantes, colorantes y agentes aromatizantes. Estos incluyen benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. Además, pueden utilizarse antioxidantes y agentes de suspensión.

[0055] Una dosis eficaz farmacéuticamente es aquella dosis necesaria para prevenir, inhibir la aparición, o tratar (aliviar un síntoma en cierta medida, preferentemente todos
30 los síntomas) de un estado patológico. La dosis farmacéuticamente eficaz depende del tipo de enfermedad, la composición utilizada, la vía de administración, el tipo de mamífero a tratar, las características físicas del mamífero específico examinado, la medicación simultánea y otros factores que reconocerán los expertos en la materia médica.

35 **[0056]** Por lo general, se administra una cantidad entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg de

peso corporal/día de principios activos.

[0057] Las formulaciones de la invención pueden administrarse en formulaciones de dosificación unitarias que contienen portadores, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. Las formulaciones pueden tener una forma adecuada para su uso oral, por ejemplo, comprimidos, pastillas, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas a uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más de dichos agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes o agentes conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente atractivas y apetecibles. Los comprimidos contienen el principio activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos.

[0058] Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes; tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes disgregantes y de granulación, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina, o goma arábiga; y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar revestidos o pueden revestirse mediante técnicas conocidas. En algunos casos, dichos revestimientos pueden prepararse mediante técnicas conocidas para retrasar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y, de este modo, proporcionar una acción sostenida durante un periodo más prolongado. Por ejemplo, puede emplearse un material retardante tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

[0059] Las formulaciones para su uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blandas en las que el principio activo se mezcla con agua o con un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

[0060] Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en una mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes que pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de

óxido de alqueno con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como
5 monooleato de polioxietilensorbitano, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de polietilensorbitano. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes
10 edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

[0061] Las suspensiones oleosas pueden formularse mediante la suspensión de los principios activos en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral como la parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por
15 ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes y agentes aromatizantes para proporcionar preparaciones orales apetecibles. Estas composiciones pueden conservarse añadiendo un antioxidante como el ácido ascórbico.

[0062] Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo
20 mezclado con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes o agentes de suspensión adecuados se ilustran por los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, aromatizantes y
25 colorantes.

[0063] Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden presentarse en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o mezclas de los dos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo, goma arábiga o goma tragacanto,
30 fosfátidos de origen natural, por ejemplo, semilla de soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo, monooleato de sorbitano, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitano. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

[0064] Pueden formularse jarabes y elixires con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol, glocosa o sacarosa. Dichas formulaciones también

pueden contener un emoliente, un conservante y agentes aromatizantes y colorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleosa inyectable estéril.

5 **[0065]** Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida utilizando los agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente.

10 **[0066]** Una preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parentalmente aceptable no tóxico, por ejemplo, una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean de manera convencional aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Con este fin, puede emplearse cualquier aceite no volátil suave, incluido el mono-o diglicéridos sintéticos. Además, se utilizan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de
15 inyectables.

[0067] Las moléculas de ácido nucleico de la invención también pueden administrarse en forma de supositorios, por ejemplo, para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura normal, pero líquido a temperatura rectal y,
20 por lo tanto, se derretirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales incluyen manteca de cacao y polietilenglicoles.

[0068] Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden administrarse parentalmente en un medio estéril. Dependiendo del vehículo y de la concentración utilizados, el fármaco puede o bien suspenderse o bien disolverse en el vehículo. De
25 forma ventajosa, pueden disolverse adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes de tampón en el vehículo.

[0069] Se entiende que el nivel de dosis específico para cada sujeto particular depende de una diversidad de factores, incluidos la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de
30 administración, la vía de administración y la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se esté sometiendo a terapia.

[0070] Para la administración a animales no humanos, la composición también puede añadirse al pienso o al agua para beber del animal de modo que el animal ingiera una cantidad terapéuticamente apropiada junto con su dieta. También sería conveniente
35 presentar la composición como una mezcla previa para añadirla al pienso o al agua

para beber.

[0071] Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención también pueden administrarse a un sujeto en combinación con otros compuestos terapéuticos para aumentar el efecto terapéutico general. El uso de compuestos múltiples para tratar una indicación puede aumentar los efectos beneficiosos el tiempo que se reduce la presencia de efectos secundarios.

[0072] Como alternativa, determinadas moléculas de ANip de la presente invención pueden expresarse dentro de células a partir de promotores de eucariotas. Pueden suministrarse vectores recombinantes capaces de expresar las moléculas de ANip y persistir en las células diana. En su defecto, pueden utilizarse vectores que proporcionen la expresión transitoria de moléculas de ácido nucleico. Dichos vectores pueden administrarse repetidamente según sea necesario. Una vez expresada, la molécula de ANip interacciona con el ARNm diana y genera una respuesta de ARNi. La administración de vectores que expresan moléculas ANip puede ser sistemática, como mediante administración intravenosa o intramuscular, mediante la administración a células diana retiradas de un sujeto seguido de la reintroducción en el sujeto, o mediante cualquier otro medio que permitiría la introducción en la célula diana deseada.

20 Ejemplos

Obtener los dúplex de ARNip

[0073] Preferiblemente, los ARN se sintetizan químicamente utilizando fosforamiditas de ribonucleósido protegidas apropiadamente y un sintetizador de ADN/ARN convencional. La sustitución de una o ambas hebras de un dúplex de ARNip por oligoribonucleótidos 2'-desoxi o 2'-O-metil suprime el silenciamiento en extracto de mosca (Elbashir et al. 2001). Sin embargo, en células de los mamíferos, parece posible substituir el ARNip con sentido por oligoribonucleótido 2'-O-metil (Ge et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. Proc Natl Acad Sci U S A., 2003; 100(5):2718-23).

[0074] A conveniencia, los ARNip se obtienen de proveedores de síntesis de oligos de ARN comerciales, que venden productos de síntesis de ARN de diferente calidad y coste. En general, 21 nucleótidos de ARN no son difíciles de sintetizar y se proporcionan, sin inconvenientes, en una calidad adecuada para ARNi.

[0075] Entre los proveedores de reactivos de síntesis de ARN se incluyen: Proligo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, Colorado, EEUU), Glen Research (Sterling, Virginia, EEUU), ChemGenes (Ashland, Massachusetts, EEUU), y Cruachem (Glasgow, Reino Unido), Qiagen (Alemania), Ambion (EEUU) y Invitrogen (Escocia). Las empresas de síntesis de ARN anteriores están autorizadas a proporcionar ARNip con una licencia para la validación de dianas. En particular, nuestros proveedores de ARNip son Ambion, Dharmacon e Invitrogen, empresas que ofrecen los servicios de síntesis química de aduanas tradicionales para ARNip, y suministran ARNip con purificación por cromatografía líquida de alto rendimiento (de sus siglas en inglés, HPLC) y lo entregan en un formato seco junto con agua libre de ribonucleasa (RNasa). En las páginas web de los proveedores mencionados anteriormente, puede encontrarse un recurso online central para metodologías de ARNi y ARNip, junto con enlaces a servicios y productos adicionales relacionados con el ARNip

[0076] La fase de hibridación es necesaria cuando se trabaja con moléculas de ARN de hebra simple o monocatenarias. Es fundamental que todas las fases de manejo se lleven a cabo en condiciones libres de RNasa, estériles. Con el fin de hibridar los ARN, primero deben cuantificarse los oligos mediante absorción UV a 260 nanómetros (nm). Por consiguiente, se utiliza el siguiente protocolo basado en Elbashir et al (2001) para llevar a cabo la hibridación:

- Tomar alícuotas por separado y diluir cada oligo de ARN en una concentración de 50 μ M.
- Combinar 30 μ l de cada solución de oligo de ARN y 15 μ l de 5X tampón de hibridación. La concentración de tampón final es: acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM pH 7,4, acetato de magnesio 2mM). El volumen final es 75 μ l.
- Incubar la disolución durante 1 minuto a 90 °C, centrifugar el tubo durante 15 segundos, dejar reposar durante 1 hora a 37 °C, entonces usar a temperatura ambiente. La disolución puede almacenarse congelada a -20 °C y congelarse y descongelarse hasta en 5 ocasiones. La concentración final de dúplex de ARNip es normalmente 20 μ M.

Como alternativa, pueden adquirirse ARNbc ya hibridados de los proveedores.

[0077] También pueden utilizarse ácidos nucleicos químicamente modificados. Por ejemplo, un resumen de los tipos de modificación que pueden utilizarse se presenta en WO03/070744, el contenido del cual se incluye en el presente documento a modo de

referencia. Cabe prestar especial atención de la página 11 a la 21 de esta publicación. Pueden usarse otras modificaciones posibles como las anteriormente descritas. Los profesionales de la materia serán conscientes de otros tipos de modificación química que pueden incorporarse en las moléculas de ARN.

5

Sistema *in vitro*

[0078] Para comprobar la especificidad de interferencia por ARNip, se utilizan cultivos de células diferentes que expresan los genes diana tales como células del epitelio ciliar no pigmentadas (NPE), células de epitelio ciliar (células dendríticas y mucosa oral, del inglés OMDC), o células renales embrionarias (conocidas como HEK293). Como alternativa, se utilizan la línea celular de cáncer de vejiga (T-24), la línea celular de carcinoma de pulmón (A549) o los queratinocitos embrionarios humanos (HEK).

[0079] Las células se incuban con sus correspondientes dúplex de ARNip, y se lleva a cabo el análisis del silenciamiento de la expresión del gen diana. Con el fin de enlazar el recorte de ARNip con los fenotipos específicos en células cultivadas, es necesario demostrar la reducción de proteínas seleccionadas como diana o, al menos, demostrar la reducción de ARNm diana.

[0080] Los niveles de ARNm del gen diana se cuantifican mediante PCR (RT-PCR) cuantitativo en tiempo real. Además, los niveles de proteína se pueden determinar de diferentes modos reconocidos en la técnica, tales como el análisis de inmunotransferencia tipo Western o *Western blot* con anticuerpos específicos para la diana, que permite monitorizar directamente la reducción de la proteína seleccionada diana.

25

Transfección de dúplex de ARNip

[0081] Varios ejemplos de técnicas reconocidas en esta materia son los siguientes: podemos llevar a cabo una única transfección de dúplex de ARNip utilizando un lípido catiónico, tales como reactivo de transfección RNAiFect (Qiagen) y reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y un ensayo para el silenciamiento 24, 48 y 72 horas después de la transfección.

[0082] Puede realizarse un protocolo de transfección típica del siguiente modo: para un pocillo de una placa de 6 pocillos, transfectamos utilizando 100nM como concentración final de ARNip. Siguiendo el protocolo de RNAiFect, el día anterior a la

35

transfección, sembramos $2-4 \times 10^5$ células por pocillo en 3ml de un medio de cultivo apropiado, que contenga DNEM, suero al 10%, antibióticos y glutamina, e incubamos las células en condiciones de crecimiento normales (37°C y el 5% de CO_2). El día de la transfección, las células tienen que tener una confluencia del 30-50%. Diluimos 15 ul de dúplex de ARNip 20 uM (correspondiente a la concentración final de 100 nM) en 85 ul de tampón EC-R, para dar un volumen final de 100ul, y mezclamos con agitador vórtex. Para la formación de complejos, añadimos 19 ul de reactivo RNAiFect al ARNip diluido y mezclamos con pipeteo o agitador vórtex. Después de incubar las muestras durante 10-15 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos de transfección, añadimos los complejos gota a gota a las células con 2,9 ml de medio de cultivo nuevo con bajo contenido en antibióticos. Tras remover las placas para asegurar una distribución uniforme de los complejos de transfección, incubamos las células en sus condiciones de crecimiento normales. Al día siguiente, se retiran los complejos y se añade medio de crecimiento completo y nuevo. Con el fin de monitorizar el silenciamiento génico, se recogen las células a las 24, 48 y 72 horas después de la transfección. El protocolo del reactivo Lipofectamine 2000 es bastante similar. El día anterior a la transfección, sembramos $2-4 \times 10^5$ células por pocillo en 3ml de un medio de cultivo apropiado, que contenga DNEM, suero al 10%, antibióticos y glutamina, e incubamos las células en condiciones de crecimiento normales (37°C y el 5% de CO_2). El día de la transfección, las células tienen que tener una confluencia del 30-50%. Diluimos 12,5 ul de dúplex de ARNip 20 uM (correspondiente a la concentración final de 100 nM) en 250ul de DNEM, para dar un volumen final de 262,5ul, y mezclamos. También se diluyen 6ul de Lipofectamine 2000 en 250ul de DNEM y se mezclan. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se combinan el oligómero diluido y el reactivo Lipofectamine diluido para permitir la formación de complejos durante 20 minutos de incubación a temperatura ambiente. Más tarde, añadimos los complejos gota a gota en las células con 2 ml de medio de cultivo nuevo con bajo contenido en antibióticos y mezclamos cuidadosamente balanceando la placa hacia delante y hacia atrás, para asegurar la distribución uniforme de los complejos de transfección. Incubamos las células en sus condiciones de crecimiento normales y al día siguiente, se retiran los complejos y se añade un medio de cultivo completo y nuevo. Con el fin de monitorizar el silenciamiento génico, se recogen las células a las 24, 48 y 72 horas después de la transfección.

[0083] La eficacia de la transfección puede depender del tipo de célula, pero también del número de pases y la confluencia de las células. También son críticos el tiempo y la manera de formación de complejos de ARNip-liposoma (p.eg., inversión frente a

agitación con vórtex). Las bajas eficacias de transfección son la causa más frecuente de silenciamiento fallido. Una buena transfección no es un tema baladí y necesita examinarse con cuidado cada línea de células nueva que va a utilizarse. La eficacia de la transfección puede comprobarse mediante la transfección de genes indicadores, por ejemplo, un plásmido de expresión de EGFP conducido por CMV (p.ej.: de Clontech) o un plásmido de expresión de B-Gal y, después, se evalúa mediante contraste de fases y/o microscopia de fluorescencia al día siguiente.

Pruebas de dúplex de ARNip

10

[0084] Según la abundancia y el tiempo de vida (o renovación) de la proteína seleccionada como diana, un fenotipo silenciado puede ser visible tras 1 o 3 días, o incluso más tarde. En casos en los que no se observa ningún fenotipo, puede observarse la disminución de la proteína mediante inmunofluorescencia o inmunotransferencia tipo Western.

15

[0085] Después de las transfecciones, se tratan previamente las fracciones de ARN total extraídas con DNasa I y se usan para la transcripción inversa utilizando un cebador aleatorio. Se amplifica mediante PCR con un par de cebadores específicos que cubren al menos una unión exón-exón con el objetivo de controlar la amplificación de ANRm previos. También se necesita como control la RT/PCR de un ARNm no seleccionado como diana. La disminución eficaz de la reducción aún indetectable de ARNm de la proteína diana puede indicar que puede existir en la célula una gran reserva de proteína estable. Como alternativa, puede utilizarse la amplificación por PCR en tiempo real para comprobar de un modo más preciso la disminución o desaparición de ARNm. La PCR mediante transcriptasa inversa (RT) en tiempo real cuantifica la cantidad inicial del molde de la manera más específica, sensible y reproducible. La PCR en tiempo real monitoriza la fluorescencia emitida durante la reacción como indicador de la producción de amplicones durante cada ciclo de PCR. Esta señal aumenta en proporción directa con la cantidad de producto de PCR en una reacción. Mediante el registro de la cantidad de emisión de fluorescencia de cada ciclo, es posible monitorizar la reacción de PCR durante la fase exponencial en la que el primer aumento significativo de la cantidad de producto de PCR se correlaciona con la cantidad inicial del molde diana.

20

25

30

35

[0086] Con el fin de verificar el patrón de interferencia de los genes expresivos diferencialmente identificados en los cultivos de células, se realiza una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR) de acuerdo

con el protocolo del fabricante. Para la RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR), se utilizan aproximadamente 250 ng de ARN total para la transcripción inversa seguida de la amplificación por PCR con cebadores específicos para cada gen en la mezcla de reacción que contiene Master SYBR Green I. Las condiciones de PCR básicas constan de una etapa inicial de 30 minutos a 91 °C, seguida de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C, 10 segundos a 62 °C y 15 segundos a 72 °C. Se utilizan secuencias de cebador específicas correspondientes a cada gen diana. Se utiliza la cuantificación de ARNm de b-actina como control para la normalización de datos. Las comparaciones de la expresión génica relativas funcionan mejor cuando la expresión génica del control endógeno/interno elegido es más abundante y permanece constante, en proporción con el ARN total, entre las muestras. Mediante el uso de un control endógeno constante como referencia activa, la cuantificación de una diana de ARNm puede normalizarse para las diferencias en la cantidad de ARN total añadido a cada reacción.

15

Estudios en animales

[0087] El conejo neozelandés es la norma de oro en plataformas de experimentos diseñadas para el estudio de la PIO. Es fácil de manipular y tiene un ojo grande, similar en tamaño al órgano humano. Además, los utensilios actuales para medir la PIO no se adaptan al uso en animales con ojos pequeños, como los ratones y las ratas. Finalmente, los conejos tienen una PIO (en torno a 23 mm Hg) que puede reducir hasta el 40% su valor utilizando medicación hipotensiva comercial local. Por consiguiente, aunque es posible generar modelos de glaucoma en conejos (por ejemplo, mediante la obstrucción quirúrgica de las venas episcleróticas o la oclusión de la malla trabecular), hemos utilizado conejos normotensos ya que, en nuestras manos, la disminución farmacológica de la PIO puede medirse fácil y reproduciblemente.

30

Protocolo experimental

[0088] Se utilizaron conejos neozelandeses blancos normotensos (machos de 2-3 kg). Los animales permanecían en jaulas individuales con acceso libre a comida y agua. Se los enviaba a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas artificiales, para evitar oscilaciones circadianas no controladas de la PIO. La manipulación y el trato de los animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva del Consejo de las

35

Comunidades Europeas (86/609/EEC) y la declaración de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO) sobre el Uso de animales en investigaciones oftalmológicas y en ciencias de la visión.

5 **[0089]** Normalmente, los fármacos se administraban mediante la instalación de un pequeño volumen (usualmente de 40 µL) en la superficie de la córnea. Se trataban ojos contralaterales con el vehículo solo y podían utilizarse como controles en cada experimento para que no exista un fenómeno simpático con el otro ojo. Deben suprimirse múltiples experimentos en el mismo animal.

10 **[0090]** Las mediciones de la PIO se llevaron a cabo con un tonómetro de contacto (TONOPEN XL, Mentor, Norwell, Massachusetts). El tonómetro TonoPen es muy práctico gracias a su fiabilidad y tamaño pequeño. Las mediciones con este instrumento se llevaron a cabo con delicadeza aplicando el sensor del tonómetro en la superficie de la córnea. Se ha demostrado que este dispositivo es el tonómetro elegido para medir las presiones intraoculares dentro de la gama de 3 a 30 mm Hg en conejos
15 (Abrams et al. Comparison of three tonometers for measuring intraocular pressure in rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996 Apr;37(5):940-4.). Todas las mediciones estaban dentro de este intervalo: el valor de referencia de la presión intraocular era $17,0 \pm 0,39$ mm Hg (n = 100). Debido a los cambios de la PIO de la noche al día, todos los experimentos se llevaron a cabo a la misma hora para permitir una PIO más
20 estable y una comparación objetiva con el tratamiento de vehículo. Con el objetivo de evitar sufrimiento al animal, se anestesiaban los conejos tópicamente (oxibuprocaina/tetracaína 0,4%/1%, en una solución salina (1/4 v:v). La solución (10 µl) se aplicaba a la córnea antes de realizar cada medición de presión intraocular. Se aplicaba tópicamente ARNip o solución salina en la córnea en volúmenes de 40 µl.

25 **[0091]** El protocolo estándar para la aplicación de ARNip en conejos fue el siguiente. Las dosis de ARNip en la solución salina (0,9 % p/v) a un volumen final de 40 µl se aplicaban a un ojo cada día durante cuatro días consecutivos. El ojo contrario se tomó como control y se le instalaban 40 µl de solución salina estéril (0,9 % p/v), en las mismas ocasiones. La PIO se medía antes de cada aplicación y a las 2, 4 y 6 horas
30 siguientes a la instalación, durante 10 días. Las respuestas máximas se observaron entre el segundo y el tercer día. Con el fin de comparar el efecto del ARNip con otros compuestos hipotensivos, se probaron Xalatan (latanoprost 0,005%) y Trustop (Dorzolamida 2%) y se midió la PIO en las mismas condiciones. A los conejos se les trató según el protocolo estándar descrito anteriormente. Estos experimentos
35 demostraron el efecto máximo de dos ARNip en la reducción de la PIO en conejos neozelandeses normotensos. Los valores de la Figura 4 representan la media del

porcentaje de la reducción de la PIO sobre la medida de control (ojo contralateral con vehículo solo) y su error estándar (SD). Los ARNip utilizados son 11HSD/01: CCACAUCACCAACGCUUCUdTdT (SEC ID 133; secuencia de conejo homóloga a la humana SEC ID N° 100) y 11HSD/02: CGUCA AUGUAUCAACUdTdT (SEC ID 134; secuencia de conejo con el mejor resultado y sin secuencia humana revelada correspondiente).

[0092] Los resultados también muestran el efecto *in vivo* del ARNip 11HSD/02 en la reducción de la PIO en los conejos neozelandeses normotensos con el paso del tiempo (Figura 5). Cuatro aplicaciones consecutivas de 265 ug de ARNip produjeron una disminución de la PIO de 20,34 sobre la medida de control. Por el contrario, un ARNip descontrolado no tuvo ningún efecto en los niveles de la PIO. Cada valor representa la media de porcentaje de la reducción de la PIO sobre la medida de control (ojo contralateral con vehículo solo) en cuatro animales diferentes.

Reivindicaciones

1. Uso de un ANip que selecciona como diana a la 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 (11 beta-HSD1) y capaz de inhibir la expresión de la 11beta-HSD1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una
5 afección de ojo **caracterizada por** una presión intraocular alterada, en la que dicho medicamento se formula para una administración tópica en la superficie de la córnea de un paciente y es capaz de inhibir la expresión de la 11 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 en el ojo del paciente.
2. El uso de la reivindicación 1, en la que se selecciona la afección del ojo de
10 entre el grupo que comprende glaucoma, infección, inflamación, uveítis, retinopatía diabética y la expresión de enfermedades sistémicas.
3. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que la afección del ojo sea un glaucoma.
4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que ANip es
15 ARNip.
5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que ANip comprende uno o más oligonucleótidos modificados.
6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que se utilizan una pluralidad de especies de ANip.
7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que el gen
20 diana es la 11 beta-HSD1, y el ANip que selecciona como diana a una secuencia seleccionada de la SEC ID N°: 1 a la SEC ID N°: 61 o a una secuencia que comprende de la SEC ID N°: 1 a la SEC ID N°: 61.
8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que las
25 moléculas de ANip de la invención comprenden secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo de la SEC ID N° 62 a la SEC ID N°122.
9. Un compuesto de ANip aislado que selecciona como diana a la 11beta-HSD1 y capaz de inhibir la expresión de la 11 beta-HSD1, en el que el compuesto de ANip comprende una secuencia complementaria a una secuencia de
30 nucleótidos seleccionada de la SEC ID N°: 1 a la SEC ID N°: 61, para su uso en el tratamiento de una afección de ojo **caracterizada por** una presión intraocular alterada mediante la administración tópica del ANip en la superficie de la córnea.
10. Un compuesto de ANip aislado que selecciona como diana a la 11beta-HSD1 y
35 capaz de inhibir la expresión de la 11beta-HSD1, en el que el compuesto de ANip comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de la

SEC ID N° 62 a la SEC ID N° 122, para su uso en el tratamiento de una afección de ojo **caracterizada por** una presión intraocular alterada mediante la administración tópica del ANip en la superficie de la córnea.

- 5
11. El compuesto de ANip aislado para el uso según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en las que el ANip comprende un oligonucleótido modificado.
 12. El compuesto de ANip aislado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de la 9 a la 11, que además comprende salientes 3'.

Figura 1

Número de acceso	Definición
NM_005525	Hidroxiesteroide (11-beta) deshidrogenasa 1 (HSD11B1) de homo sapiens, variante de transcripción 1; ARNm
NM_181755	Hidroxiesteroide (11-beta) deshidrogenasa 1 (HSD11B1) de homo sapiens, variante de transcripción 2; ARNm

Figura 2

Hidroxiesteroide (11-beta) deshidrogenasa 1 (HSD 11B1)	
SEC ID 1	AAAATATCTCCTCCCCATT
SEC ID 2	AAATATCTCCTCCCCATTC
SEC ID 3	AATATCTCCTCCCCATTCT
SEC ID 4	ATATCTCCTCCCCATTCTG
SEC ID 5	TATCTCCTCCCCATTCTGG
SEC ID 6	ACGAGGAATTCAGACCAGA
SEC ID 7	CGAGGAATTCAGACCAGAG
SEC ID 8	TTCAGACCAGAGATGCTCC
SEC ID 9	GGAAAGAAAGTGATTGTCA
SEC ID 10	AGAAAGTGATTGTCACAGG
SEC ID 11	GAAAGTGATTGTCACAGGG
SEC ID 12	AGTGATTGTCACAGGGGCC
SEC ID 13	GTGATTGTCACAGGGGCCA
SEC ID 14	AGGGATCGGAAGAGAGATG
SEC ID 15	GGGATCGGAAGAGAGATGG
SEC ID 16	GAGAGATGGCTTATCATCT
SEC ID 17	GATGGGAGCCCATGTGGTG
SEC ID 18	AAGAACTCTACAGAAGGT
SEC ID 19	AGAACTCTACAGAAGGTG

SEC ID 20	GAAACTCTACAGAAGGTGG
SEC ID 21	ACTCTACAGAAGGTGGTAT
SEC ID 22	CTCTACAGAAGGTGGTATC
SEC ID 23	GGTGGTATCCCACTGCCTG
SEC ID 24	GACATGACCTTCGCAGAGC
SEC ID 25	TTTGTTGCCCAAGCAGGAA
SEC ID 26	GCAGGAAAGCTCATGGGAG
SEC ID 27	AGCTCATGGGAGGACTAGA
SEC ID 28	GCTCATGGGAGGACTAGAC
SEC ID 29	CCACATCACCAACACTTCT
SEC ID 30	AAGCATGGAAGTCAACTTC
SEC ID 31	AGCATGGAAGTCAACTTCC
SEC ID 32	GCATGGAAGTCAACTTCCT
SEC ID 33	GTCAACTTCCTCAGTTACG
SEC ID 34	CTTCCTCAGTTACGTGGTC
SEC ID 35	GCAGAGCAATGGAAGCATT
SEC ID 36	TGGAAGCATTGTTGTCGTC
SEC ID 37	GCATTGTTGTCGTCTCCTC
SEC ID 38	AGTGGCTTATCCAATGGTT
SEC ID 39	GTGGCTTATCCAATGGTTG
SEC ID 40	TGGTTGCTGCCTATTCTGC
SEC ID 41	GCAAGTTTGCTTTGGATGG

SEC ID 42	GTTTGCTTTGGATGGGTTC
SEC ID 43	AGGAATATTCAGTGTCCAG
SEC ID 44	GGAATATTCAGTGTCCAGG
SEC ID 45	TATTCAGTGTCCAGGGTCA
SEC ID 46	TGTATCAATCACTCTCTGT
SEC ID 47	TCACTCTCTGTGTTCTTGG
SEC ID 48	ACAGCCATGAAGGCAGTTT
SEC ID 49	CAGCCATGAAGGCAGTTTC
SEC ID 50	GGCAGTTTCTGGGATAGTC
SEC ID 51	GCAGCTCCAAAGGAGGAAT
SEC ID 52	AGGAGGAATGTGCCCTGGA
SEC ID 53	GGAGGAATGTGCCCTGGAG
SEC ID 54	TGTGCCCTGGAGATCATCA
SEC ID 55	GAAGTGTATTATGACAGCT
SEC ID 56	GTGTATTATGACAGCTCAC
SEC ID 57	ATCCATGCAGGAAGATCCT
SEC ID 58	TCCATGCAGGAAGATCCTG
SEC ID 59	GATCCTGGAATTTCTCTAC
SEC ID 60	TTTCTCTACTCAACGAGCT
SEC ID 61	CGAGCTATAATATGGACAG

Figura 3

Hidroxiesteroide (11-beta) deshidrogenasa 1 (HSD 11B1)	
SEC ID 62	5' AAAATATCTCCTCCCCATT 3'
	3' UUUUAUAGAGGAGGGGUA 5'
SEC ID 63	5' AAAATATCTCCTCCCCATT 3'
	3' UUUUAUAGAGGAGGGGUA 5'
SEC ID 64	5' AATATCTCCTCCCCATTCT 3'
	3' UUAUAGAGGAGGGGUAAGA 5'
SEC ID 65	5' ATATCTCCTCCCCATTCTG 3'
	3' UAUAGAGGAGGGGUAAGAC 5'
SEC ID 66	5' TATCTCCTCCCCATTCTGG 3'
	3' AUAGAGGAGGGGUAAGACC 5'
SEC ID 67	5' ACGAGGAATTCAGACCAGA 3'
	3' UGCUCUUAAGUCUGGUCU 5'
SEC ID 68	5' CGAGGAATTCAGACCAGAG 3'
	3' GCUCUUAAGUCUGGUCUC 5'
SEC ID 69	5' TTCAGACCAGAGATGCTCC 3'
	3' AAGUCUGGUCUCUACGAGG 5'
SEC ID 70	5' GGAAAGAAAGTGATTGTCA 3'
	3' CCUUUCUUUCACUAACAGU 5'
SEC ID 71	5' AGAAAGTGATTGTACAGG 3'
	3' UCUUUCACUAACAGUGUCC 5'
SEC ID 72	5' GAAAGTGATTGTACAGGG 3'
	3' CUUUCACUAACAGUGUCCC 5'
SEC ID 73	5' AGTGATTGTACAGGGGCC 3'
	3' UCACUAACAGUGUCCCCGG 5'
SEC ID 74	5' GTGATTGTACAGGGGCCA 3'
	3' CACUAACAGUGUCCCCGGU 5'
SEC ID 75	5' AGGGATCGGAAGAGAGATG 3'
	3' UCCCUAGCCUUCUCUCUAC 5'

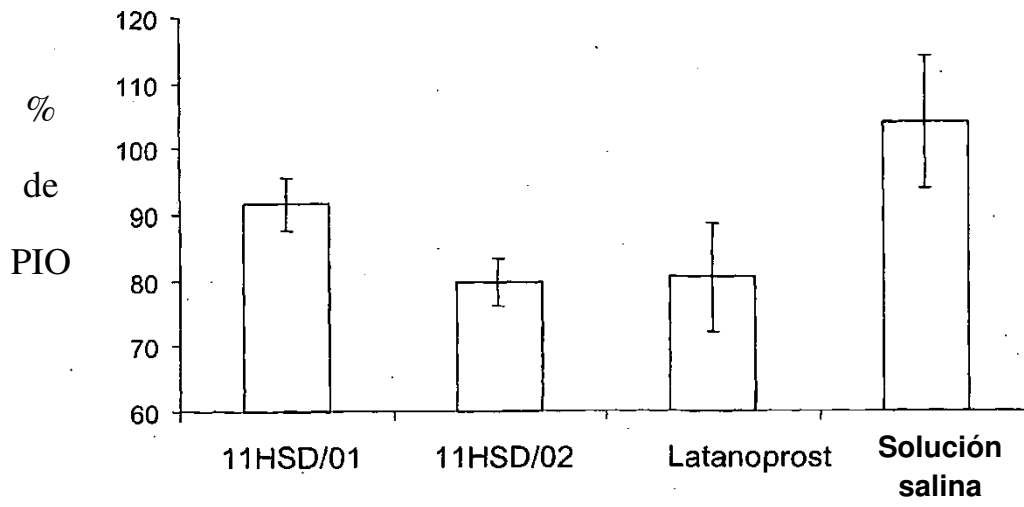
ES 2 403 305 T3

SEC ID 76	5' GGGATCGGAAGAGAGATGG 3'
	3' CCCUAGCCUUCUCUCUACC 5'
SEC ID 77	5' GAGAGATGGCTTATCATCT 3'
	3' CUCUCUACCGAAUAGUAGA 5'
SEC ID 78	5' GATGGGAGCCCATGTGGTG 3'
	3' CUACCCUCGGGUACACCAC 5'
SEC ID 79	5' AAGAACTCTACAGAAGGT 3'
	3' UUCUUUGAGAUGUCUCCA 5'
SEC ID 90	5' AGAAACTCTACAGAAGGTG 3'
	3' UCUUUGAGAUGUCUCCAC 5'
SEC ID 91	5' GAAACTCTACAGAAGGTGG 3'
	3' CUUUGAGAUGUCUCCACC 5'
SEC ID 92	5' ACTCTACAGAAGGTGGTAT 3'
	3' UGAGAUGUCUCCACCAUA 5'
SEC ID 93	5' CTCTACAGAAGGTGGTATC 3'
	3' GAGAUGUCUCCACCAUAG 5'
SEC ID 94	5' GGTGGTATCCCCTGCCTG 3'
	3' CCACCAUAGGGUGACGGAC 5'
SEC ID 95	5' GACATGACCTTCGCAGAGC 3'
	3' CUGUACUGGAAGCGUCUCG 5'
SEC ID 96	5' TTTGTTGCCCAAGCAGGAA 3'
	3' AAACAACGGGUUCGUCCUU 5'
SEC ID 97	5' GCAGGAAAGCTCATGGGAG 3'
	3' CGUCCUUUCGAGUACCCUC 5'
SEC ID 98	5' AGCTCATGGGAGGACTAGA 3'
	3' UCGAGUACCCUCCUGAUCU 5'
SEC ID 99	5' GCTCATGGGAGGACTAGAC 3'
	3' CGAGUACCCUCCUGAUCUG 5'
SEC ID 100	5' CCACATCACCAACTTCT 3'
	3' GGUGUAGUGGUUGUGAAGA 5'
SEC ID 101	5' AAGCATGGAAGTCAACTTC 3'
SEC ID 102	3' UUCGUACCUUCAGUUGAAG 5'
	5' AGCATGGAAGTCAACTTCC 3'

	3' UCGUACCUUCAGUUGAAGG	5'
	5' GCATGGAAGTCAACTTCCT	3'
SEC ID 103		
	3' CGUACCUUCAGUUGAAGGA	5'
	5' GTCAACTTCCTCAGTTACG	3'
SEC ID 104		
	3' CAGUUGAAGGAGUCA AUGC	5'
	5' CTTCCCTCAGTTACGTGGTC	3'
SEC ID 105		
	3' GAAGGAGUCA AUGCACCAG	5'
	5' GCAGAGCAATGGAAGCATT	3'
SEC ID 106		
	3' CGUCUCGUUACCUUCGUAA	5'
	5' TGGAAGCATTGTTGTCGTC	3'
SEC ID 107		
	3' ACCUUCGUAACAACAGCAG	5'
	5' GCATTGTTGTCGTCTCCTC	3'
SEC ID 108		
	3' CGUAACAACAGCAGAGGAG	5'
	5' AGTGGCTTATCCAATGGTT	3'
SEC ID 109		
	3' UCACCGAAUAGGUUACCAA	5'
	5' GTGGCTTATCCAATGGTTG	3'
SEC ID 110		
	3' CACCGAAUAGGUUACCAAC	5'
	5' TGGTTGCTGCCTATTCTGC	3'
SEC ID 111		
	3' ACCAACGACGGAUAGACG	5'
	5' GCAAGTTTGCTTTGGATGG	3'
SEC ID 112		
	3' CGUCAAACGAAACCUACC	5'
	5' GTTTGCTTTGGATGGGTTT	3'
SEC ID 113		
	3' CAAACGAAACCUACCCAAG	5'
	5' AGGAATATTCAGTGTCCAG	3'
SEC ID 114		
	3' UCCUUAUAAGUCACAGGUC	5'
	5' GGAATATTCAGTGTCCAGG	3'
SEC ID 115		
	3' CCUUAUAAGUCACAGGUCC	5'
	5' TATTCAGTGTCCAGGGTCA	3'
SEC ID 116		
	3' AUAAGUCACAGGUCCCAGU	5'
	5' TGTATCAATCACTCTCTGT	3'
SEC ID 117		
	3' ACAUAGUUAGUGAGAGACA	5'
	5' TCACTCTCTGTGTTCTTGG	3'
SEC ID 118		

SEC ID 119	3' AGUGAGAGACACAAGAACC 5'
	5' ACAGCCATGAAGGCAGTTT 3'
	3' UGUCGGUACUCCGUCAAA 5'
SEC ID 120	5' CAGCCATGAAGGCAGTTTC 3'
	3' GUCGGUACUCCGUCAAAG 5'
SEC ID 121	5' GGCAGTTTCTGGGATAGTC 3'
	3' CCGUCAAGACCCUAUCAG 5'
SEC ID 122	5' GCAGCTCCAAAGGAGGAAT 3'
	3' CGUCGAGGUUCCUCCUUA 5'
SEC ID 123	5' AGGAGGAATGTGCCCTGGA 3'
	3' UCCUCCUACACGGGACCU 5'
SEC ID 124	5' GGAGGAATGTGCCCTGGAG 3'
	3' CCUCCUACACGGGACCUC 5'
SEC ID 125	5' TGTGCCCTGGAGATCATCA 3'
	3' ACACGGGACCUCUAGUAGU 5'
SEC ID 126	5' GAAGTGTATTATGACAGCT 3'
	3' CUUCACAUAAUACUGUCGA 5'
SEC ID 127	5' GTGTATTATGACAGCTCAC 3'
	3' CACAUAAUACUGUCGAGUG 5'
SEC ID 128	5' ATCCATGCAGGAAGATCCT 3'
	3' UAGGUACGUCCUUCUAGGA 5'
SEC ID 129	5' TCCATGCAGGAAGATCCTG 3'
	3' AGGUACGUCCUUCUAGGAC 5'
SEC ID 130	5' GATCCTGGAATTTCTCTAC 3'
	3' CUAGGACCUAAAGAGAUG 5'
SEC ID 131	5' TTTCTCTACTCAACGAGCT 3'
	3' AAAGAGAUGAGUUGCUCGA 5'
SEC ID 132	5' CGAGCTATAATATGGACAG 3'
	3' GCUCGAUUAUUAUACCUGUC 5'

Figura 4.



	Media	SD
11HSD/01	91,6	3,88
11HSD/02	79,66	3,66
xalatan	80,34	8,32
solución salina	103,87	10,11

Figura 5

