

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 413 804**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2007 E 07797553 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 2018426**

54 Título: **Inhibición mediada por ARNi de estados relacionados con factor de necrosis tumoral- α**

30 Prioridad:

19.05.2006 US 801788 P

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

17.07.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**YANNI, JOHN M.;
CHATTERTON, JON E.;
SENCZYNA, DIANE MICHELLE;
GAMACHE, DANIEL A. y
MILLER, STEVEN T.**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 413 804 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 mediada por ARNi de estados relacionados con factor de necrosis tumoral- α

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de composiciones de ARN de interferencia para silenciar el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) silenciando el ARNm del receptor de TNF de superficie celular 1 de TNF α (TNFR1), o el ARNm de la enzima convertidora de TNF α (TACE/ADAM17). El silenciamiento de tales dianas de TNF α es útil para el tratamiento de pacientes que tienen un estado relacionado con TNF α o corren el riesgo de desarrollar un estado de este tipo.

Antecedentes de la invención

10 La inflamación se trata generalmente con un régimen antiinflamatorio convencional que incluye esteroides y/o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). La conjuntivitis alérgica, inflamación ocular, dermatitis, rinitis y asma se han tratado históricamente con un régimen de antihistamínicos orales, intranasales o tópicos además de esteroides orales o intranasales. Normalmente, un tratamiento sistémico requiere que se administren concentraciones superiores del compuesto farmacológico para proporcionar una concentración eficaz para alcanzar el sitio de tratamiento necesario. Se sabe que los compuestos antihistamínicos tienen actividad en el sistema nervioso central; la somnolencia y el secado de las membranas mucosas son un efecto secundario común del uso de antihistamínicos. Los AINE y esteroides tienen posibles efectos secundarios incluyendo aumento de la presión intraocular, catarata, glaucoma o queratitis ulcerativa periférica.

20 El ojo seco, también conocido como conjuntivitis seca o queratoconjuntivitis seca, es un trastorno oftalmológico común que implica descomposición de la película de lágrimas preocular, dando como resultado la deshidratación de la superficie externa expuesta del ojo. Hasta la fecha, el ojo seco se ha tratado con administración tópica de disoluciones de lágrimas artificiales. Algunas de estas disoluciones contienen sustancias mucomiméticas para reemplazar o reponer temporalmente la capa de mucina en pacientes deficientes en mucina. Se ha propuesto el uso de metilprednisolona en un tratamiento de "pulso" a corto plazo para tratar empeoramientos del ojo seco. Se requiere que la terapia de "pulso" propuesta evite complicaciones asociadas con la terapia con esteroides tradicional para estados inflamatorios tales como presión intraocular aumentada y formación de cataratas.

25 La citocina TNF α es una diana para la terapia antiinflamatoria de ojo seco y uveítis. En un modelo de conejo de ojo seco inducido por inflamación de las glándulas lagrimales, se han logrado la inhibición de la pigmentación de la córnea y la restauración de tiempo de ruptura lagrimal mediante la modulación específica de los niveles de TNF α de la superficie ocular. La terapia de ojo seco resultó inhibiendo la síntesis de TNF α (RDP58) o neutralizando específicamente TNF α usando un anticuerpo monoclonal (REMICADE®) o un receptor soluble (ENBREL®). Cada uno de estos tratamientos dirigidos a TNF α dio como resultado niveles de eficacia obtenidos con esteroides antiinflamatorios oculares tópicos.

30 La publicación de patente estadounidense 2005/0227935, publicada el 13 de octubre de 2005, concedida a McSwiggen *et al.* se refiere a inhibición mediada por ARN de interferencia de TNF y la expresión génica del receptor de TNF. Sin embargo, dicha publicación no enseña ninguna de las secuencias diana particulares para la interferencia de ARN tal como se proporciona en el presente documento.

Lindstedt *et al.* 2005 (The British Journal of Ophthalmology 89(5):533-536) describen la inhibición de TNF α mediante anticuerpos y el uso de tales anticuerpos en el tratamiento de inflamación ocular

40 Las realizaciones de la presente invención abordan la necesidad en la técnica de tratamientos adicionales para el ojo seco y la inflamación y proporcionan terapias alternativas para los mismos.

Sumario de la invención

45 La presente invención proporciona intervención, prevención o tratamiento altamente potente y eficaz de un estado ocular relacionado con TNF α sin efectos secundarios asociados a AINE o esteroides, en el que dicho estado ocular relacionado con TNF α es ojo seco, conjuntivitis alérgica o inflamación ocular. En un aspecto, la invención incluye tratar a un sujeto que tiene un estado ocular relacionado con TNF α o que corre el riesgo de desarrollar un estado ocular relacionado con TNF α administrando ARN de interferencia que silencia la expresión del ARNm de TACE o ARNm de TNFR1, interfiriendo así con el procesamiento proteolítico del precursor para TNF α , o interfiriendo con la unión de TNF α a su receptor de superficie celular, respectivamente, atenuando de ese modo la actividad de TNF α e impidiendo una cascada de acontecimientos relacionados con apoptosis e inflamación, en el que dicho estado ocular relacionado con TNF α es ojo seco, conjuntivitis alérgica o inflamación ocular.

Tal como se describe en el presente documento, estado relacionado con TNF α incluye estados tales como ojo seco y estados inflamatorios relacionados con TNF α . Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, estado inflamatorio relacionado con TNF α incluye estados tales como inflamación ocular, conjuntivitis alérgica,

dermatitis, rinitis y asma, por ejemplo, e incluye los cambios celulares que resultan de la actividad de $TNF\alpha$ que conduce directa o indirectamente al estado inflamatorio relacionado con $TNF\alpha$. Un estado relacionado con $TNF\alpha$ incluye particularmente estados oculares relacionados con $TNF\alpha$ tales como ojo seco, conjuntivitis alérgica e inflamación ocular. El ARN de interferencia descrito en el presente documento proporciona el silenciamiento de las dianas de $TNF\alpha$ ARNm de TACE o ARNm de TNFR1 mientras que se evitan efectos secundarios no deseados debidos a agentes no específicos.

En el presente documento se describe un método de atenuación de la expresión del ARNm de TACE de un sujeto. El método comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un portador farmacéuticamente aceptable, comprendiendo el ARN de interferencia una región de al menos 13 nucleótidos contiguos que tiene una complementariedad de secuencia de al menos el 90% con, o una identidad de secuencia de al menos el 90% con, los 13 penúltimos nucleótidos del extremo 3' de un ARNm que corresponde a una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 14 - SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 155 - SEQ ID NO: 201. La expresión de ARNm de TACE se atenúa de ese modo.

En el presente documento se describe también el tratamiento de un estado relacionado con $TNF\alpha$ en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos, y un portador farmacéuticamente aceptable, en el que el ARN de interferencia comprende una región de al menos 13 nucleótidos contiguos que tiene una complementariedad de secuencia de al menos el 90% con, o una identidad de secuencia de al menos el 90% con, los 13 penúltimos nucleótidos del extremo 3' de un ARNm que corresponde a una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 14 - SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 155 - SEQ ID NO: 201. El estado relacionado con $TNF\alpha$ se trata de ese modo.

En el presente documento se describe además un método de atenuación de la actividad de $TNF\alpha$ de un sujeto atenuando la expresión de ARNm de TACE o ARNm de TNFR1 del sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y un portador farmacéuticamente aceptable y el ARN de interferencia comprende una hebra de nucleótidos sentido, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos en el que la hebra antisentido se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 que comprende el nucleótido 297, 333, 334, 335, 434, 470, 493, 547, 570, 573, 618, 649, 689, 755, 842, 844, 846, 860, 878, 894, 900, 909, 910, 913, 942, 970, 984, 1002, 1010, 1053, 1064, 1137, 1162, 1215, 1330, 1334, 1340, 1386, 1393, 1428, 1505, 1508, 1541, 1553, 1557, 1591, 1592, 1593, 1597, 1604, 1605, 1626, 1632, 1658, 1661, 1691, 1794, 1856, 1945, 1946, 1947, 1958, 2022, 2094, 2100, 2121, 2263, 2277, 2347, 2349, 2549, 2578, 2595, 2606, 2608, 2629, 2639, 2764, 2766, 2767, 2769, 3027, 3028, 3261, 3264, 3284, 3313, 3317, 3332 ó 3337 o en el que la hebra antisentido se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 124, 328, 387, 391, 393, 395, 406, 421, 423, 444, 447, 455, 459, 460, 467, 469, 470, 471, 475, 479, 513, 517, 531, 543, 556, 576, 587, 588, 589, 595, 601, 602, 611, 612, 651, 664, 667, 668, 669, 677, 678, 785, 786, 788, 791, 792, 804, 813, 824, 838, 843, 877, 884, 929, 959, 960, 961, 963, 964, 965, 970, 973, 974, 1000, 1002, 1013, 1026, 1053, 1056, 1057, 1058, 1161, 1315, 1318, 1324, 1357, 1360, 1383, 1393, 1420, 1471, 1573, 1671, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2089, 2090, 2091, 2092 ó 2098. La expresión de ARNm de TACE se atenúa cuando la hebra antisentido se hibrida con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 tal como se mencionó anteriormente. La expresión de ARNm de TNFR1 se atenúa cuando la hebra antisentido se hibrida con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 tal como se mencionó anteriormente.

En el presente documento se describe además el tratamiento de un estado relacionado con $TNF\alpha$ en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos, y un portador farmacéuticamente aceptable, comprendiendo el ARN de interferencia una hebra de nucleótidos sentido, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos; en el que la hebra antisentido se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 que comprende el nucleótido 297, 333, 334, 335, 434, 470, 493, 547, 570, 573, 618, 649, 689, 755, 842, 844, 846, 860, 878, 894, 900, 909, 910, 913, 942, 970, 984, 1002, 1010, 1053, 1064, 1137, 1162, 1215, 1330, 1334, 1340, 1386, 1393, 1428, 1505, 1508, 1541, 1553, 1557, 1591, 1592, 1593, 1597, 1604, 1605, 1626, 1632, 1658, 1661, 1691, 1794, 1856, 1945, 1946, 1947, 1958, 2022, 2094, 2100, 2121, 2263, 2277, 2347, 2349, 2549, 2578, 2595, 2606, 2608, 2629, 2639, 2764, 2766, 2767, 2769, 3027, 3028, 3261, 3264, 3284, 3313, 3317, 3332 ó 3337. El estado relacionado con $TNF\alpha$ se trata de ese modo.

En el presente documento se describe además el tratamiento de un estado ocular relacionado con $TNF\alpha$ en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos, y un portador farmacéuticamente aceptable, comprendiendo el ARN de interferencia una hebra de nucleótidos sentido, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos; en el que la hebra antisentido se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que

comprende el nucleótido 124, 328, 387, 391, 393, 395, 406, 421, 423, 444, 447, 455, 459, 460, 467, 469, 470, 471, 475, 479, 513, 517, 531, 543, 556, 576, 587, 588, 589, 595, 601, 602, 611, 612, 651, 664, 667, 668, 669, 677, 678, 785, 786, 788, 791, 792, 804, 813, 824, 838, 843, 877, 884, 929, 959, 960, 961, 963, 964, 965, 970, 973, 974, 1000, 1002, 1013, 1026, 1053, 1056, 1057, 1058, 1161, 1315, 1318, 1324, 1357, 1360, 1383, 1393, 1420, 1471, 1573, 1671, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2089, 2090, 2091, 2092 ó 2098. El estado relacionado con TNF α se trata de ese modo.

También podría administrarse al sujeto un segundo ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos en una realización adicional; comprendiendo el segundo ARN de interferencia una hebra de nucleótidos sentido, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de complementariedad al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos en el que la hebra antisentido del segundo ARN de interferencia se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 que comprende un nucleótido tal como se mencionó anteriormente, o en el que la hebra antisentido se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 124, 328, 387, 391, 393, 395, 406, 421, 423, 444, 447, 455, 459, 460, 467, 469, 470, 471, 475, 479, 513, 517, 531, 543, 556, 576, 587, 588, 589, 595, 601, 602, 611, 612, 651, 664, 667, 668, 669, 677, 678, 785, 786, 788, 791, 792, 804, 813, 824, 838, 843, 877, 884, 929, 959, 960, 961, 963, 964, 965, 970, 973, 974, 1000, 1002, 1013, 1026, 1053, 1056, 1057, 1058, 1161, 1315, 1318, 1324, 1357, 1360, 1383, 1393, 1420, 1471, 1573, 1671, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2089, 2090, 2091, 2092 ó 2098.

Cuando un primer ARN de interferencia selecciona como diana SEQ ID NO: 1, el segundo ARN de interferencia puede seleccionar como diana o bien SEQ ID NO: 1 o bien SEQ ID NO: 2, y a la inversa, cuando un primer ARN de interferencia selecciona como diana SEQ ID NO: 2, el segundo ARN de interferencia puede seleccionar como diana o bien SEQ ID NO: 1 o bien SEQ ID NO: 2. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, pueden administrarse, un tercero, cuarto o más ARN de interferencia.

En el presente documento se describe también el tratamiento de un estado relacionado con TNF α en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de ARNip bicatenario que regula por disminución la expresión de un gen de TACE mediante interferencia de ARN, en el que cada hebra de la molécula de ARNip tiene independientemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 27 nucleótidos de longitud; y una hebra de la molécula de ARNip comprende una secuencia de nucleótidos que tiene complementariedad sustancial con un ARNm correspondiente al gen de TACE, de manera que la molécula de ARNip dirige la escisión del ARNm mediante interferencia de ARN.

En el presente documento se describe también el tratamiento de un estado ocular relacionado con TNF α en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de ARNip bicatenario que regula por disminución la expresión de un gen de TNFR1 mediante interferencia de ARN, en el que cada hebra de la molécula de ARNip tiene independientemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 27 nucleótidos de longitud; y una hebra de la molécula de ARNip comprende una secuencia de nucleótidos que tiene complementariedad sustancial con un ARNm correspondiente al gen de TNFR1 de manera que la molécula de ARNip dirige la escisión del ARNm mediante interferencia de ARN.

En el presente documento se describe además un método de atenuación de la expresión del ARNm de TACE del sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de un ARN de interferencia monocatenario y un portador farmacéuticamente aceptable. El ARN de interferencia monocatenario tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 que comprende el nucleótido 297, 333, 334, 335, 434, 470, 493, 547, 570, 573, 618, 649, 689, 755, 842, 844, 846, 860, 878, 894, 900, 909, 910, 913, 942, 970, 984, 1002, 1010, 1053, 1064, 1137, 1162, 1215, 1330, 1334, 1340, 1386, 1393, 1428, 1505, 1508, 1541, 1553, 1557, 1591, 1592, 1593, 1597, 1604, 1605, 1626, 1632, 1658, 1661, 1691, 1794, 1856, 1945, 1946, 1947, 1958, 2022, 2094, 2100, 2121, 2263, 2277, 2347, 2349, 2549, 2578, 2595, 2606, 2608, 2629, 2639, 2764, 2766, 2767, 2769, 3027, 3028, 3261, 3264, 3284, 3313, 3317, 3332 ó 3337, y el ARN de interferencia tiene una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta con la parte hibridante del ARNm correspondiente a SEQ ID NO: 1. La expresión de ARNm de TACE se atenúa de ese modo.

En el presente documento se describe además una composición que comprende un ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos, y que comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 14 - SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 155 - SEQ ID NO: 201, o un complemento de las mismas; y un portador farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento se describe también una composición que comprende un ARN de interferencia que consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos que corresponde a una cualquiera de SEQ ID NO: 59 - SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71 - SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 94 - SEQ ID NO: 154, o un complemento de las mismas; y un portador farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento se describe también el uso de cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento en la preparación de un medicamento para atenuar la expresión de ARNm de TACE o de ARNm de TNFR1 como método de atenuación de la actividad de TNF α y de ese modo tratar un estado relacionado con TNF α

tal como se expone en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

5 Con el fin de que se ilustre la manera en que se obtienen los objetos mencionados anteriormente y otras ventajas de la invención, se hará una descripción más particular de la invención brevemente descrita anteriormente con referencia a realizaciones específicas de la misma, que se ilustran, en los dibujos adjuntos. Entendiendo que estos dibujos sólo representan realizaciones típicas de la invención y por tanto no deben considerarse limitativos de su alcance, la invención se describirá con detalle y especificidad adicionales a través del uso de los dibujos adjuntos en los que:

10 La figura 1 proporciona una inmunotransferencia de tipo Western para TNFR1 de células GTM-3 transfectadas con ARNip de TNFR1 n.º 1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4, y un ARNip control libre de RISC, cada uno a 10 nM, 1 nM y 0,1 nM; un ARNip control que no selecciona como diana (NTG2) a 10 nM; y un control de tampón (-ARNip). Las flechas indican las posiciones de las bandas de TNFR1 de 55 kDa y de actina de 42 kDa.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

15 Las siguientes definiciones y explicaciones pretenden y están pensadas para controlar cualquier interpretación futura a menos que se modifique clara e inequívocamente en los siguientes ejemplos o cuando la aplicación del significado haga que cualquier interpretación carezca de sentido o carezca esencialmente de sentido. En casos en los que la interpretación del término haga que carezca de sentido o carezca esencialmente de sentido, la definición deberá tomarse del diccionario Webster, 3ª edición.

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

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

25 El término "ojo seco", también conocido como conjuntivitis seca o queratoconjuntivitis seca, es un trastorno oftalmológico común que implica descomposición de la película de lágrimas preocular, dando como resultado deshidratación de la superficie externa expuesta del ojo.

El término "inflamación ocular", tal como se usa en el presente documento, incluye por ejemplo iritis, uveítis, epiescleritis, escleritis, queratitis, endoftalmitis, blefaritis y estados inflamatorios iatrogénicos.

30 El término "conjuntivitis alérgica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a inflamación de la conjuntiva que es la membrana delicada que reviste los párpados y cubre la superficie expuesta de la esclerótica. El término "conjuntivitis alérgica" incluye, por ejemplo, queratoconjuntivitis atópica, conjuntivitis papilar gigante, conjuntivitis de la fiebre del heno, conjuntivitis alérgica perenne y queratoconjuntivitis vernal.

35 La expresión "una región de al menos 13 nucleótidos contiguos que tiene una complementariedad de secuencia de al menos el 90% con, o una identidad de secuencia de al menos el 90% con, los 13 penúltimos nucleótidos del extremo 3' de un ARNm que corresponde a uno cualquiera de (un identificador de secuencia)" permite una única sustitución de nucleótidos. Dos sustituciones de nucleótidos (es decir, 11/13 = 85% de identidad/complementariedad) no se incluyen en tal expresión.

40 El término "porcentaje de identidad" describe el porcentaje de nucleótidos contiguos en una primera molécula de ácido nucleico que son los mismos que en un conjunto de nucleótidos contiguos de la misma longitud en una segunda molécula de ácido nucleico. El término "porcentaje de complementariedad" describe el porcentaje de nucleótidos contiguos en una primera molécula de ácido nucleico que pueden experimentar apareamiento de bases en el sentido de Watson-Crick con un conjunto de nucleótidos contiguos en una segunda molécula de ácido nucleico.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "hibridación" significa y se refiere a un procedimiento en el que ácidos nucleicos monocatenarios con secuencias de bases complementarias o casi complementarias interaccionan para formar complejos unidos por puentes de hidrógeno denominados híbridos. Las reacciones de hibridación son sensibles y selectivas. *In vitro*, la especificidad de hibridación (es decir, rigurosidad) se controla por ejemplo mediante las concentraciones de sal o formamida en las disoluciones de prehibridación e hibridación y mediante la temperatura de hibridación; tales procedimientos se conocen bien en la técnica. En particular, se aumenta la rigurosidad reduciendo la concentración de sal, aumentando la concentración de formamida o elevando la temperatura de hibridación.

50 Por ejemplo, pueden producirse condiciones de alta rigurosidad a formamida a aproximadamente el 50% a de 37°C a 42°C. Pueden producirse condiciones de rigurosidad reducida a formamida a aproximadamente del 35% al 25% a 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 de aproximadamente 5-10°C menos que 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 °C = 81,5 + 16,6(log₁₀[Na⁺]) + 0,41 (% de G+C) - (600/N) en la que N es el número de bases en el híbrido, y [Na⁺] es la concentración de iones sodio en el tampón hibridación.

Las secuencias de ácido nucleico mencionadas en el presente documento se escriben en una 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 o bien ADN o bien ARN o bien 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 "T", particularmente en los extremos 3', aún cuando las bases "T" no se produzcan de manera natural en el ARN. "Ácido nucleico" incluye los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" y puede hacer referencia a una molécula monocatenaria o una molécula bicatenaria. Una molécula bicatenaria se forma mediante apareamiento de bases de Watson-Crick entre bases A y T, bases C y G, y entre bases A y U. Las hebras de una molécula bicatenaria pueden tener complementariedad parcial, sustancial o completa entre sí y formarán un híbrido dúplex, cuya fuerza de unión depende de la naturaleza y el grado de complementariedad de la secuencia de bases.

Una secuencia de ARNm se deduce fácilmente a partir de la secuencia de la secuencia de ADN correspondiente. Por ejemplo, SEQ ID NO: 1 proporciona la secuencia de la hebra sentido del ADN que corresponde al ARNm para TACE. La secuencia de ARNm es idéntica a la secuencia de la hebra sentido del ADN reemplazándose las bases "T" por bases "U". Por tanto, se conoce la secuencia de ARNm de TACE a partir de SEQ ID NO: 1 y se conoce el ARNm de TNFR1 a partir de SEQ ID NO: 2.

La interferencia de ARN (ARNi) es un procedimiento mediante el que se usa ARN bicatenario (ARNbc) para silenciar la expresión génica. Sin querer restringirse a la teoría, la ARNi comienza con la escisión de ARNbc más largos en ARN de interferencia pequeños (ARNip) mediante una enzima similar a ARNasa III, Dicer. Los ARNip son ARNbc que tienen habitualmente de aproximadamente 19 a 28 nucleótidos, o de 20 a 25 nucleótidos, o de 21 a 22 nucleótidos de longitud y a menudo contienen proyecciones en 3' de 2 nucleótidos, y extremos terminales de fosfato en 5' e hidroxilo en 3'. Una hebra del ARNip se incorpora en un complejo de ribonucleoproteína conocido como complejo silenciador inducido por ARN ("*RNA-induced silencing complex*", RISC). El RISC usa esta hebra de ARNip para identificar moléculas de ARNm que son al menos parcialmente complementarias a la hebra de ARNip incorporada, y entonces escinde estos ARNm diana o inhibe su traducción. Por tanto, la hebra de ARNip que se incorpora al RISC se conoce como hebra guía o hebra antisentido. La otra hebra del ARNip, conocida como hebra pasajera o hebra sentido, se elimina del ARNip y es al menos parcialmente homóloga al ARNm diana. Los expertos en la técnica reconocerán que, en principio, cualquier hebra de un ARNip puede incorporarse al RISC y funcionar como hebra guía. Sin embargo, el diseño de ARNip (por ejemplo, disminución de la estabilidad del dúplex de ARNip en el extremo 5' de la hebra guía deseada) puede favorecer la incorporación de la hebra guía deseada al RISC.

La escisión mediada por RISC de ARNm que tienen una secuencia al menos parcialmente complementaria a la hebra guía conduce a un aumento en el nivel en estado estacionario de ese ARNm y de la proteína correspondiente codificada por este ARNm. Alternativamente, RISC también puede disminuir la expresión de la proteína correspondiente mediante represión de la traducción sin escisión del ARNm diana. Otras moléculas de ARN y moléculas similares a ARN también pueden interactuar con RISC y silenciar la expresión génica. Los ejemplos de otras moléculas de ARN que pueden interactuar con RISC incluyen ARN en horquilla pequeños (ARNhp), ARNip monocatenarios, microARN (mARNi) y dúplex de Dicer-sustrato de 27 meros. El término "ARNip" tal como se usa en el presente documento se refiere a un ARN de interferencia bicatenario a menos que se indique lo contrario. Los ejemplos de moléculas similares a ARN que pueden interactuar con RISC incluyen moléculas de ARN que contienen uno o más nucleótidos químicamente modificados, uno o más desoxirribonucleótidos y/o una o más uniones distintas de fosfodiéster. Para los fines de la presente discusión, todas las moléculas de ARN o similares a ARN que pueden interactuar con RISC y participar en los cambios mediados por RISC en la expresión génica se denominarán "ARN de interferencia". Por tanto, los ARNip, ARNhp, mARNi y dúplex de Dicer-sustrato de 27 meros son subconjuntos de "ARN de interferencia".

El ARN de interferencia de las realizaciones de la invención parece actuar de manera catalítica para escindir el ARNm diana, 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 en tales condiciones de escisión.

La presente invención se refiere al uso de ARN de interferencia para inhibir la expresión del receptor de superficie celular de TNF α receptor 1 de TNF α (TNFR1) o la enzima convertidora de TNF α (TACE/ADAM17, denominada en el presente documento "TACE"), cuya inhibición reduce la actividad del factor de necrosis tumoral- α (TNF α). La unión de TNF α a su receptor de superficie celular, receptor 1 de TNF (TNFR1), activa una cascada de señalización que

afecta a una variedad de respuestas celulares incluyendo apoptosis e inflamación. El propio TNF α se expresa inicialmente como un precursor inactivo, unido a la membrana. La liberación de la forma activa de TNF α de la superficie celular requiere el procesamiento proteolítico del precursor mediante la enzima convertidora de TNF α (TACE/ADAM17), un miembro de la familia de 'desintegrina A y metaloproteasa' (ADAM).

- 5 Según la presente invención, la inhibición de la expresión de ARNm de TNFR1, ARNm de TACE o los ARNm tanto de TNFR1 como TACE reduce eficazmente la acción de TNF α . Además, los ARN de interferencia expuestos en el presente documento proporcionados exógenamente o expresados endógenamente son particularmente eficaces en el silenciamiento de ARNm de TNFR1 o ARNm de TACE.

10 *ARNm de enzima convertidora de factor de necrosis tumoral- α (TACE/ADAM17)*: La base de datos GenBank proporciona la secuencia de ADN para TACE con el número de registro NM_003183, proporcionada en la "lista de secuencias" como SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 1 proporciona la secuencia de la hebra sentido del ADN que corresponde al ARNm que codifica para TACE (con la excepción de bases "T" por bases "U"). La secuencia codificante para TACE es de desde los nucleótidos 184 - 2658.

15 Equivalentes de la secuencia de ARNm de TACE mencionada anteriormente son formas de corte y empalme alternativas, formas alélicas, isoenzimas o un cognado de las mismas. Un cognado es un ARNm de enzima convertidora de factor de necrosis tumoral- α de otra especie de mamífero que es homólogo a SEQ ID NO: 1 (es decir, un ortólogo).

20 *ARNm de receptor 1 de factor de necrosis tumoral (TNFR1)*: La base de datos GenBank proporciona la secuencia de ADN para TNFR1 con el número de registro NM_001065, proporcionada en la "lista de secuencias" como SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 2 proporciona la secuencia de la hebra sentido del ADN que corresponde al ARNm que codifica para TNFR1 (con la excepción de bases "T" por bases "U"). La secuencia codificante para TNFR1 es de desde los nucleótidos 282 - 1649.

25 Equivalentes de la secuencia de ARNm de TNFR1 mencionada anteriormente son formas de corte y empalme alternativas, formas alélicas, isoenzimas o un cognado de las mismas. Un cognado es un ARNm de receptor 1 de factor de necrosis tumoral de otras especies de mamíferos que es homólogo a SEQ ID NO: 2 (es decir, un ortólogo).

30 *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 la administración o expresión de una cantidad de ARN de interferencia (por ejemplo, un ARNip) para reducir la traducción del ARNm diana en proteína, o bien a través de la escisión del ARNm o bien a través de la inhibición directa de la traducción. La reducción en la expresión del ARNm diana o la proteína correspondiente se denomina comúnmente "inactivación" ("knock-down") y se notifica en relación con los niveles presentes tras la administración o expresión de un ARN control que no selecciona como diana (por ejemplo, un ARNip control que no selecciona como diana). Se contempla en las realizaciones del presente documento la inactivación 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 inactivación para los fines de la presente invención. En una realización, se administra un
35 único ARN de interferencia que selecciona como diana el ARNm de TACE o ARNm de TNFR1. En otras realizaciones, se administran dos o más ARN de interferencia que seleccionan como diana el ARNm de TACE o ARNm de TNFR1. En realizaciones adicionales, los ARN de interferencia que seleccionan como diana cada uno del ARNm de TACE y ARNm de TNFR1 se administran en combinación o en un intervalo de tiempo de modo que tengan efectos solapantes.

40 La inactivación se evalúa comúnmente midiendo los niveles de ARNm usando amplificación por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) o midiendo los niveles de proteína mediante inmunotransferencia de tipo Western o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El análisis del nivel de proteínas proporciona una evaluación de tanto la escisión del ARNm así como de la inhibición de la traducción. Las técnicas adicionales para medir la inactivación incluyen hibridación de la disolución de ARN, protección de nucleasas, hibridación de tipo
45 Northern, monitorización de la expresión génica con un microalineamiento, unión a anticuerpos, radioinmunoanálisis y análisis de células activadas por fluorescencia.

La inhibición de TACE o TNFR1 también puede determinarse *in vitro* evaluando los niveles de ARNm diana o los niveles de proteínas diana en, por ejemplo, células epiteliales de córnea humana tras la transfección de ARN de interferencia de TACE o TNFR1 tal como se describe más adelante.

50 La inhibición de la actividad de TNF α debida a la inhibición de la expresión del ARNm de TACE o de la expresión del ARNm de TNFR1 también se infiere en un ser humano o mamífero observando una mejora en un síntoma del estado relacionado con TNF α tal como mejora en síntomas relacionados con ojo seco, conjuntivitis alérgica, inflamación ocular, dermatitis, rinitis o asma. Una mejora en cualquiera de los síntomas de ojo seco, edema, picazón, inflamación o tolerancia a exposiciones ambientales, por ejemplo, es indicativo de la inhibición de la actividad de TNF α .
55

ARN de interferencia: En una realización de la invención, el ARN de interferencia (por ejemplo, ARNip) tiene una hebra sentido y una hebra antisentido, y las hebras sentido y antisentido comprenden una región de

complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos. En una realización adicional de la invención, el ARN de interferencia (por ejemplo, ARNip) tiene una hebra sentido y una hebra antisentido, y la hebra antisentido comprende una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con una secuencia diana del ARNm de TACE o ARNm de TNFR1, y la hebra sentido comprende una región de identidad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con una secuencia diana del ARNm de TACE o ARNm de TNFR1, respectivamente. En una realización adicional de la invención, el ARN de interferencia comprende una región de al menos 13, 14, 15, 16, 17 ó 18 nucleótidos contiguos que tiene porcentajes de complementariedad de secuencia con o que tiene porcentajes de identidad de secuencia con los penúltimos 13, 14, 15, 16, 17 ó 18 nucleótidos, respectivamente, del extremo 3' de la secuencia diana correspondiente dentro de un ARNm.

La longitud de cada hebra 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 hebra antisentido de un ARNip es el agente activo de guiado del ARNip porque la hebra antisentido se incorpora al RISC, permitiendo así que el RISC identifique los ARNm diana con complementariedad al menos parcial con la hebra de ARNip antisentido para la escisión o represión de la traducción.

Tal como se describe en el presente documento, se seleccionan secuencias diana de ARN de interferencia (por ejemplo, secuencias diana de ARNip) dentro de una secuencia de ARNm diana usando herramientas de diseño disponibles. Los ARN de interferencia que corresponden a una secuencia diana de TACE o TNFR1 se someten a prueba entonces mediante transfección de células que expresan el ARNm diana seguido por la evaluación de la inactivación tal como se describió anteriormente.

Se proporcionan técnicas para seleccionar secuencias diana para ARNip por Tuschl, T. *et al.*, "The siRNA User Guide", revisado el 6 de mayo de 2004, disponible en la página web de la Universidad Rockefeller; por el boletín técnico n.º 506, "siRNA Design Guidelines", Ambion Inc. en la página web de Ambion; y por otras herramientas de diseño basadas en Internet en, por ejemplo, las páginas web de Invitrogen, Dharmacon, Integrated DNA Technologies, Genscript o Proligo. Los parámetros de búsqueda iniciales pueden incluir contenidos en G/C de entre el 35% y el 55% y longitudes de ARNip de entre 19 y 27 nucleótidos. La secuencia diana puede estar ubicada en la región codificante o en las regiones no traducidas en 5' o 3' de los ARNm.

Se presenta una realización de una secuencia diana de ADN de 19 nucleótidos para ARNm de TACE en los nucleótidos de 297 a 315 de SEQ ID NO: 1:

5'-GCTCTCAGACTACGATATT-3' SEQ ID NO: 3.

Un ARNip de la invención para seleccionar como diana una secuencia de ARNm correspondiente de SEQ ID NO: 3 y que tiene hebras de 21 nucleótidos y una proyección en 3' de 2 nucleótidos es:

5'-GCUCUCAGACUACGAUJUUNN-3' SEQ ID NO: 4

3'-NNCGAGAGUCUGAUGCUAUAA-5' SEQ ID NO: 5.

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

Un ARNip de la invención para seleccionar como diana una secuencia de ARNm correspondiente de SEQ ID NO: 3 y que tiene hebras de 21 nucleótidos y una proyección UU en 3' en cada hebra es:

5'-GCUCUCAGACUACGAUJUUUU-3' SEQ ID NO: 6

3'-UUCGAGAGUCUGAUGCUAUAA-5' SEQ ID NO: 7.

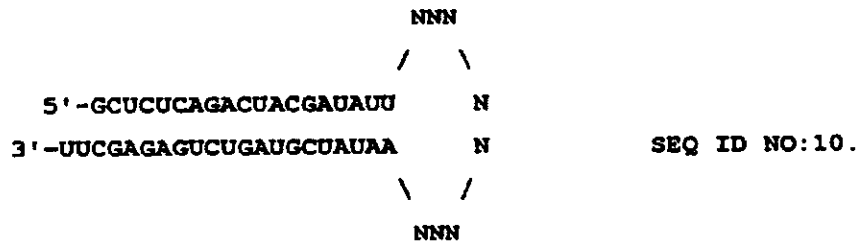
El ARN de interferencia también puede tener una proyección en 5' de nucleótidos o puede tener extremos romos. Un ARNip de la invención para seleccionar como diana una secuencia de ARNm correspondiente de SEQ ID NO: 3 y que tiene hebras de 19 nucleótidos y extremos romos es:

5'-GCUCUCAGACUACGAUJU-3' SEQ ID NO: 8

3'-CGAGAGUCUGAUGCUAUAA-5' SEQ ID NO: 9.

Las hebras de un ARN de interferencia bicatenario (por ejemplo, un ARNip) pueden conectarse para formar una estructura en horquilla o en tallo-bucle (por ejemplo, un ARNhp). Un ARNhp de la invención que selecciona como diana una secuencia de ARNm correspondiente de SEQ ID NO: 3 y que tiene una región de tallo bicatenario de

19 pb y una proyección UU en 3' es:

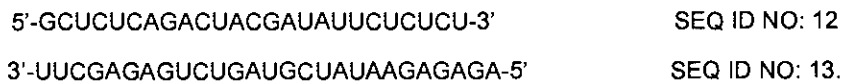


5 N es un nucleótido A, T, C, G, U, o una forma modificada conocida por un experto habitual en la técnica. El número de nucleótidos N en el bucle es un número entre e incluyendo de 3 a 23, o de 5 a 15, o de 7 a 13, o de 4 a 9, o de 9 a 11, o el número de nucleótidos N es 9. Algunos de los nucleótidos en el bucle pueden estar implicados en interacciones de pares de bases con otros nucleótidos en el bucle. Los ejemplos de secuencias de oligonucleótidos que pueden usarse para formar el bucle incluyen 5'-UUCAAGAGA-3' (Brummelkamp, T.R. *et al.* (2002) *Science* 296: 550) y 5'-UUUGUGUAG-S' (Castanotto, D. *et al.* (2002) *RNA* 8:1454). Un experto en la técnica reconocerá que el oligonucleótido de cadena sencilla resultante forma una estructura en tallo-bucle o en horquilla que comprende una región bicatenaria que puede interactuar con la maquinaria de ARNi.

10 La secuencia diana de ARNiP identificada anteriormente puede extenderse en el extremo 3' para facilitar el diseño de dúplex de Dicer-sustrato de 27 meros. La extensión de la secuencia diana de ADN de 19 nucleótidos (SEQ ID NO: 3) identificada en la secuencia de ADN de TACE (SEQ ID NO: 1) en 6 nucleótidos produce una secuencia diana de ADN de 25 nucleótidos presente en los nucleótidos de 297 a 321 de SEQ ID NO: 1:

15 5'-GCTCTCAGACTACGATATTCTCTCT-3' SEQ ID NO: 11.

Un dúplex de Dicer-sustrato de 27 meros de la invención para seleccionar como diana una secuencia de ARNm correspondiente de SEQ ID NO: 11 es:



20 Los dos nucleótidos en el extremo 3' de la hebra sentido (es decir, los nucleótidos CU de SEQ ID NO: 12) pueden ser desoxinucleótidos para un procesamiento potenciado. El diseño del dúplex de Dicer-sustrato de 27 meros a partir de secuencias diana de 19-21 nucleótidos, tal como se proporciona en el presente documento, se trata adicionalmente por la página web de Integrated DNA Technologies (IDT) y por Kim, D. -H. *et al.*, (febrero de 2005) *Nature Biotechnology* 23:2; 222-226.

25 Cuando se producen ARN de interferencia mediante síntesis química, la fosforilación en la posición 5' del nucleótido en el extremo 5' de una o ambas hebras (cuando están presentes) puede potenciar la eficacia del ARNiP y la especificidad del complejo RISC unido pero no se requiere puesto que la fosforilación puede producirse intracelularmente.

30 La tabla 1 enumera ejemplos de secuencias diana de ADN de TACE de SEQ ID NO: 1 a partir de las que se diseñan ARNiP de la presente invención de una manera tal como se expuso anteriormente. TACE codifica para la enzima convertidora de factor de necrosis tumoral- α , tal como se indicó anteriormente.

Tabla 1. Secuencias diana de TACE para ARNiP

Secuencia diana de TACE	n.º de nucleótido de inicio con referencia a SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:
-------------------------	---	------------

GCTCTCAGACTACGATATF	297	3
CCAGCAGCATTTCGGTAAGA	333	14
CAGCAGCATTTCGGTAAGAA	334	15
AGCAGCATTTCGGTAAGAAA	335	16
AGAGATCTACAGACTTCAA	355	17
GAAAGCGAGTACACTGTAA	493	18
CCATGAAGAACACGTGTAA	842	19
GAAGAACACGTGTAAATTA	846	20
ATCATCGCTTCTACAGATA	878	21
AGAGCAATTTAGCTTTGAT	1137	22
GGTTTGACGAGCACAAAGA	1330	23
TGATCCGGATGGTCTAGCA	1428	24
GCGATCACGAGAACAATAA	1508	25
GCAGTAAACAATCAATCTA	1541	26
CAATCTATAAGACCATTGA	1553	27
TTTCAAGAACGCAGCAATA	1591	28
TTCAAGAACGCAGCAATAA	1592	29
TCAAGAACGCAGCAATAAA	1593	30
TCATGTATCTGAACAACGA	1661	31
ACAGCGACTGCACGTTGAA	1691	32
GATTAATGCTACTTGCAAA	1794	33
CTGGAGTCCTGTGCATGTA	1945	34
TGGAGTCCTGTGCATGTAA	1946	35
GGAGTCCTGTGCATGTAAT	1947	36
CATGTAATGAAACTGACAA	1958	37
CTATGTCGATGCTGAACAA	2022	38
CAAATGTGAGAAACGAGTA	2100	39
GCATCGGTTTCGATTATCA	2347	40

ATCGGTTCCGATTATCAAA	2349	41
CCAAGTCATTGAGGATCT	2549	42
CCGGTCACCAGAAGTGAAA	2578	43
AAAGGCTGCCTCCTTTAAA	2595	44
TTTAAACTGCAGCGTCAGA	2608	45
AGATGCTGGTCATGTGTTT	2764	46
ATGCTGGTCATGTGTTTGA	2766	47
TGCTGGTCATGTGTTTGAA	2767	48
CTGGTCATGTGTTTGAACT	2769	49
TGTAATGAACCGCTGAATA	3027	50
GTAATGAACCGCTGAATAT	3028	51
CTAAGACTAATGCTCTCTA	3261	52
AGACTAATGCTCTCTAGAA	3264	53
CCTAACCACCTACCTTACA	3284	54
TACATGGTAGCCAGTTGAA	3313	55
TGGTAGCCAGTTGAATTTA	3317	56
TTTATGGAATCTACCAACT	3332	57
GGAATCTACCAACTGTTTA	3337	58
CATCAAGTACTGAACGTTT	434	155
TCGTGGTGGTGGATGGTAA	470	156
GAAAGCGAGTACACTGTAA	493	157
GAGCCTGACTCTAGGGTTC	547	158
CCACATAAGAGATGATGAT	570	159
CATAAGAGATGATGATGTT	573	160
CGAATATAACATAGAGCCA	618	161
GTTAATGATACCAAAGACA	649	162
CTGAAGATATCAAGAATGT	689	163
ATGAAGAGTTGCTCCCAA	755	164
ATGAAGAACACGTGTAAAT	844	165
AATTATTGGTGGTAGCAGA	860	166
ATCATCGCTTCTACAGATA	878	167

ATACATGGGCAGAGGGGAA	894	168
GGGCAGAGGGGAAGAGAGT	900	169
GGAAGAGAGTACAACACTACA	909	170
GAAGAGAGTACAACACTACAA	910	171
GAGAGTACAACACTACAAATT	913	172
GCTAATTGACAGAGTTGAT	942	173
CGGAACACTTCATGGGATA	970	174
GGATAATGCAGGTTTTAAA	984	175
AGGCTATGGAATACAGATA	1002	176
GAATACAGATAGAGCAGAT	1010	177
GGTAAAACCTGGTGAAAAG	1053	178
GTGAAAAGCACTACAACAT	1064	179
GAGGAAGCATCTAAAGTTT	1162	180
TATGGGAACTCTTGGATTA	1215	181
TGACGAGCACAAAGAATTA	1334	182
GCACAAAGAATTATGGTAA	1340	183
GGTTACAACCTCATGAATTG	1386	184
ACTCATGAATTGGGACATA	1393	185
GTGGCGATCACGAGAACAA	1505	186
CTATAAGACCATTGAAAGT	1557	187
GAACGCAGCAATAAAGTTT	1597	188
GCAATAAAGTTTGTGGGAA	1604	189
CAATAAAGTTTGTGGGAAC	1605	190
GAGGGTGGATGAAGGAGAA	1626	191
GGATGAAGGAGAAGAGTGT	1632	192
GCATCATGTATCTGAACAA	1658	193
CAGGAAATGCTGAAGATGA	1856	194
GAATGGCAAATGTGAGAAA	2094	195
GGATGTAATTGAACGATTT	2121	196
GTGGATAAGAAATTGGATA	2263	197
GGATAAACAGTATGAATCT	2277	198

CCTTTAAACTGCAGCGTCA	2606	199
CGTGTGACAGCAAAGAA	2629	200
GCAAAGAAACAGAGTGCTA	2639	201

La tabla 2 enumera ejemplos de secuencias diana de ADN de TNFR1 de SEQ ID NO: 2 a partir de las que se diseñan ARNip de la presente invención de una manera tal como se expuso anteriormente. TNFR1 codifica para el receptor 1 de factor de necrosis tumoral α , tal como se indicó anteriormente.

5

Tabla 2. Secuencias diana de TNFR1 para los ARNip

Secuencia diana de TACE	n.º de nucleótido de inicio con referencia a SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO:
ACCAGGCCGTGATCTCTAT	124	59
AATTCGATTGCTGTACCA	444	60
TCGATTTGCTGTACCAAGT	447	61
ACAAAGGAACCTACTTGTA	469	62
GAACCTACTTGTACAATGA	475	63
CTACTTGTACAATGACTGT	479	64
TGTGAGAGCGGCTCCTTCA	531	65
TCAGGTGGAGATCTCTTCT	611	66
CAGGTGGAGATCTCTTCTT	612	67
AGAACCAGTACCGGCATTA	667	68
GAACCAGTACCGGCATTAT	668	69
AACCAGTACCGGCATTATT	669	70
CCGGCATTATTGGAGTGAA	677	71
CGGCATTATTGGAGTGAAA	678	72
AGCCTGGAGTGCACGAAGT	843	73
CTCCTCTTCATTGGTTTAA	960	74
TTGGTTTAA TGTATCGCTA	970	75
GTTTAA TGTATCGCTACCA	973	76
TTTAA TGTATCGCTACCAA	974	77

AGTCCAAGCTCTACTCCAT	1000	78
GAGCTTGAAGGAACTACTA	1053	79
CTTGAAGGAACTACTACTA	1056	80
TTGAAGGAACTACTACTAA	1057	81
ACAAGCCACAGAGCCTAGA	1318	82
TGTACGCCGTGGTGGAGAA	1357	83
CCGTTGCGCTGGAAGGAAT	1383	84
TCTAAGGACCGTCCTGCGA	1671	85
CTAATAGAACTTGGCACT	2044	86
TAATAGAACTTGGCACTC	2045	87
AATAGAACTTGGCACTCC	2046	88
ATAGAACTTGGCACTCCT	2047	89
TAGAACTTGGCACTCCTG	2048	90
ATAGCAAGCTGAACTGTCC	2089	91
TAGCAAGCTGAACTGTCC	2090	92
AGCAAGCTGAACTGTCCCTA	2091	93
GCAAGCTGAACTGTCCCTAA	2092	94
TGAACTGTCCCTAAGGCAGG	2098	95
CAAAGGAACCTACTTGTAC	470	96
GAGCTTGAAGGAACTACTA	1053	97
CACAGAGCCTAGACACTGA	1324	98
TCCAAGCTCTACTCCATTG	1002	99
TGGAGCTGTTGGTGGGAAT	328	100
GACAGGGAGAAGAGAGATA	387	101
GGGAGAAGAGAGATAGTGT	391	102
GAGAAGAGAGATAGTGTGT	393	103
GAAGAGAGATAGTGTGTGT	395	104
GTGTGTGTCCCAAGGAAA	406	105
GAAAATATATCCACCCTCA	421	106
AAATATATCCACCCTCAA	423	107
CTGTACCAAGTGCCACAAA	455	108

ACCAAGTGCCACAAAGGAA	459	109
CCAAGTGCCACAAAGGAAC	460	110
CCACAAAGGAACCTACTTG	467	111
CAAAGGAACCTACTTGTAC	470	112
AAAGGAACCTACTTGTACA	471	113
GATACGGACTGCAGGGAGT	513	114
CGGACTGCAGGGAGTGTGA	517	115
TCCTTCACCGCTTCAGAAA	543	116
CAGAAAACCACCTCAGACA	556	117
TGCCTCAGCTGCTCCAAT	576	118
CTCCAATGCCGAAAGGAA	587	119
TCCAATGCCGAAAGGAAA	588	120
CCAATGCCGAAAGGAAAT	589	121
GCCGAAAGGAAATGGGTCA	595	122
AGGAAATGGGTGAGGTGGA	601	123
GGAAATGGGTGAGGTGGAG	602	124
GTGTGTGGCTGCAGGAAGA	651	125
GGAAGAACCAGTACCGGCA	664	126
CCATGCAGGTTTCTTTCTA	785	127
CATGCAGGTTTCTTTCTAA	786	128
TGCAGGTTTCTTTCTAAGA	788	129
AGGTTTCTTTCTAAGAGAA	791	130
GGTTTCTTTCTAAGAGAAA	792	131
AGAGAAAACGAGTGTGTCT	804	132
GAGTGTGTCTCCTGTAGTA	813	133
CTGTAGTAACTGTAAGAAA	824	134
AGAAAAGCCTGGAGTGCAC	838	135
TTGAGAAATGTTAAGGGCAC	877	136
TGTTAAGGGCACTGAGGAC	884	137
GGTCATTTTCTTTGGTCTT	929	138
CCTCCTCTTCATTGGTTTA	959	139

TCCTCTTCATTGGTTTAAT	961	140
CTCTTCATTGGTTTAATGT	963	141
TCTTCATTGGTTTAATGTA	964	142
CTTCATTGGTTTAATGTAT	965	143
TCCAAGCTCTACTCCATTG	1002	144
CTCCATTGTTTGTGGGAAA	1013	145
GGGAAATCGACACCTGAAA	1026	146
TGAAGGAACACTACTAAG	1058	147
ACCTCCAGCTCCACCTATA	1161	148
CCCACAAGCCACAGAGCCT	1315	149
ACGCCGTGGTGGAGAACGT	1360	150
GGAAGGAATTCGTGCGGCG	1393	151
TGAGCGACCACGAGATCGA	1420	152
GCGAGGCCCAATACAGCAT	1471	153
TGGGCTGCCTGGAGGACAT	1573	154

5 Tal como se mencionó en los ejemplos anteriores, un experto en la técnica puede usar la información de secuencias diana proporcionadas en las tablas 1 ó 2 para diseñar ARN de interferencia que tienen una longitud más corta o más larga que las secuencias proporcionadas en las tablas y haciendo referencia a la posición de secuencia en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y añadiendo o delecionando nucleótidos complementarios o casi complementarios a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, respectivamente.

10 La reacción de escisión de ARN diana guiada por ARNip y otras formas de ARN de interferencia es sumamente específica de secuencia. En general, ARNip que contiene una hebra de nucleótidos sentido idéntica en secuencia a una parte del ARNm diana y una hebra de nucleótidos antisentido exactamente complementaria a una parte del ARNm diana son realizaciones de ARNip para la inhibición de ARNm mencionados en el presente documento. Sin embargo, no se requiere una complementariedad de secuencia del 100% entre la hebra de ARNip antisentido y el ARNm diana, o entre la hebra de ARNip antisentido y la hebra de ARNip sentido para poner en práctica la presente invención. Por tanto, por ejemplo, la invención permite variaciones de secuencia que podrían esperarse debido a mutación genética, polimorfismo de cepas o divergencia evolutiva.

15 Tal como se describe en el presente documento, la hebra antisentido del ARNip tiene complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos con el ARNm diana. "Casi perfecta", tal como se usa en el presente documento, significa que la hebra antisentido del ARNip es "sustancialmente complementaria a", y la hebra sentido del ARNip es "sustancialmente idéntica" a al menos una parte del ARNm diana. "Idéntica", tal como conoce un experto habitual en la técnica, es el grado de relación de secuencia entre secuencias de nucleótidos tal como se determina haciendo coincidir el orden y la identidad de nucleótidos entre las secuencias. En una realización, la hebra antisentido de un ARNip que tiene el 80% y entre el 80% y hasta el 100% de complementariedad, por ejemplo, el 85%, el 90% o el 95% de complementariedad, con la secuencia de ARNm diana se consideran complementariedad casi perfecta y puede usarse en la presente invención. La complementariedad contigua "perfecta" es el apareamiento de bases de Watson-Crick convencional de pares de bases adyacentes. La complementariedad contigua "al menos casi perfecta" incluye complementariedad "perfecta" tal como se usa en el presente documento. Se diseñan métodos informáticos para determinar la identidad o complementariedad para identificar el mayor grado de coincidencia de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, BLASTN (Altschul, S.F., *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410).

30 La relación entre un ARNm diana (hebra sentido) y una hebra de un ARNip (la hebra sentido) es la de identidad. La hebra sentido de un ARNip se denomina también hebra pasajera, si está presente. La relación entre un ARNm diana (hebra sentido) y la otra hebra de un ARNip (la hebra antisentido) es la de complementariedad. La hebra antisentido de un ARNip se denomina también hebra guía.

La penúltima base en una secuencia de ácido nucleico que se escribe en una dirección de 5' a 3' es la siguiente a la

- última base, es decir, la base próxima a la base en 3'. Las penúltimas 13 bases de una secuencia de ácido nucleico escrita en una dirección de 5' a 3' son las últimas 13 bases de una secuencia próxima a la base en 3' y que no incluyen la base en 3'. De manera similar, las penúltimas 14, 15, 16, 17 ó 18 bases de una secuencia de ácido nucleico escrita en una dirección de 5' a 3' son las últimas 14, 15, 16, 17 ó 18 bases de una secuencia, respectivamente, próximas a la base en 3' y que no incluyen la base en 3'.
- 5 Tal como se describe en el presente documento, la región de nucleótidos contiguos es una región de al menos 13 nucleótidos contiguos que tienen una complementariedad de secuencia de al menos el 90% con, o una identidad de secuencia de al menos el 90% con, los 13 penúltimos nucleótidos del extremo 3' de un ARNm correspondiente a la secuencia identificada por cada identificador de secuencia.
- 10 Tal como se describe en el presente documento, la región de nucleótidos contiguos es una región de al menos 14 nucleótidos contiguos que tiene una complementariedad de secuencia de al menos el 85% con, o una identidad de secuencia de al menos el 85% con, los 14 penúltimos nucleótidos del extremo 3' de un ARNm correspondiente a la secuencia identificada por cada identificador de secuencia. En una expresión de este tipo se incluyen dos sustituciones de nucleótidos (es decir, 12/14 = 86% de identidad/complementariedad).
- 15 Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, la región de nucleótidos contiguos es una región de al menos 15, 16, 17 ó 18 nucleótidos contiguos que tiene una complementariedad de secuencia de al menos el 80% con, o una identidad de secuencia de al menos el 80% con, los 14 penúltimos nucleótidos del extremo 3' de un ARNm correspondiente a la secuencia del identificador de secuencia. En una expresión de este tipo se incluyen tres sustituciones de nucleótidos.
- 20 La secuencia diana en los ARNm que corresponden a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 puede estar en las regiones no traducidas en 5' o 3' del ARNm así como en la región codificante del ARNm.
- 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 forman pares de bases. En una realización de la invención, el ARN de interferencia comprende una proyección en 3' de TT o UU. En otra realización de la invención, el ARN de interferencia comprende al menos un extremo romo. Los extremos terminales tienen habitualmente un grupo fosfato en 5' o un grupo hidroxilo en 3'. En otras realizaciones, la hebra antisentido tiene un grupo fosfato en 5', y la hebra sentido tiene un grupo hidroxilo en 5'. Todavía en otras realizaciones, los extremos terminales se modifican adicionalmente mediante adición covalente de otras moléculas o grupos funcionales.
- 25 Las hebras sentido y antisentido del ARNip bicatenario pueden estar en una formación de dúplex de dos hebras individuales tal como se describió anteriormente o pueden ser una única molécula en la que las regiones de complementariedad forman pares de bases y están unidas covalentemente por un bucle en horquilla de modo que se forma una única hebra. Se cree que la horquilla se escinde intracelularmente mediante una proteína denominada Dicer formando un ARN de interferencia de dos moléculas de ARN que forman pares de bases individuales.
- 30 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 distinto de nucleótidos al ARN de interferencia, o bien en el extremo 5', el extremo 3' o bien internamente. Tales modificaciones se diseñan comúnmente para aumentar la resistencia a nucleasas de los ARN de interferencia, para mejorar la captación celular, para potenciar el direccionamiento celular, para ayudar al rastreo del ARN de interferencia, para mejorar adicionalmente la estabilidad, o para reducir el potencial de activación de la ruta de interferones. 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 por medio de un ligador pirrolidina, por ejemplo, también proporciona estabilidad a un ARNip.
- 35 Las modificaciones adicionales incluyen una molécula de biotina en el extremo 3' terminal, un péptido que se sabe que tiene propiedades de penetración en células, una nanopartícula, un peptidomimético, un colorante fluorescente o un dendrímero, por ejemplo.
- 40 Los nucleótidos pueden modificarse en su parte de base, en su parte de azúcar o en la parte de fosfato de la molécula y funcionan en realizaciones de la presente invención. Las modificaciones incluyen sustituciones con grupos alquilo, alcoxilo, amino, desaza, halo, hidroxilo, tiol, o una combinación de los mismos, por ejemplo. Los nucleótidos pueden sustituirse con análogos con mayor estabilidad tal como reemplazar un ribonucleótido por un desoxirribonucleótido, o tener modificaciones de azúcar tales como grupos 2'-OH reemplazador por grupos 2'-amino, grupos 2'-O-metilo, grupos 2'-metoxietilo, o un puente de 2'-O, 4'-C-metileno, 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 modificados con O y N. 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, por ejemplo, para potenciar la función, para mejorar la estabilidad o permeabilidad, o para dirigir la localización o el direccionamiento.
- 45 50 55
- Puede haber una región o regiones de la hebra de ARN de interferencia antisentido que no sea(n)

complementaria(s) a una parte de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Las regiones no complementarias pueden estar en los extremos 3', 5' o ambos de una región complementaria o entre dos regiones complementarias.

5 Pueden generarse ARN de interferencia exógenamente mediante síntesis química, mediante transcripción *in vitro* o mediante escisión de ARN bicatenario más largo con Dicer u otra nucleasa apropiada con actividad similar. Los ARN de interferencia sintetizados químicamente, producidos a partir de fosforamiditas de ribonucleósidos protegidos usando un sintetizador de ADN/ARN convencional, pueden obtenerse de proveedores comerciales tales como Ambion Inc. (Austin, TX), Invitrogen (Carlsbad, CA) o Dharmacon (Lafayette, CO). Los ARN de interferencia se purifican mediante extracción con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía o una combinación de los mismos, por ejemplo. Alternativamente, puede usarse ARN de interferencia con poca, si acaso alguna purificación, para evitar pérdidas debido al procesamiento de muestras.

10 También pueden expresarse endógenamente ARN de interferencia a partir de vectores de expresión virales o de plásmido o de casetes de expresión mínimos, por ejemplo, fragmentos generados por PCR que comprenden uno o más promotores y un molde o moldes apropiados para el ARN de interferencia. Los ejemplos de vectores de expresión a base de plásmidos disponibles comercialmente para ARNhp incluyen los miembros de la serie pSilencer (Ambion, Austin, TX) y pCpG-siRNA (InvivoGen, San Diego, CA). Pueden derivarse vectores virales para la expresión de ARN de interferencia a partir de una variedad de virus incluyendo adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus (por ejemplo, VIH, VIF y VAIE) y virus del herpes. Los ejemplos de vectores virales disponibles comercialmente para la expresión de ARNhp incluyen pSilencer adeno (Ambion, Austin, TX) y pLenti6/BLOCK-iT™-DEST (Invitrogen, Carlsbad, CA). La selección de vectores virales, los métodos para expresar el ARN de interferencia a partir del vector y los métodos de administración del vector viral están dentro de la experiencia habitual de un experto en la técnica. Los ejemplos de kits para la producción de casetes de expresión de ARNhp generados por PCR incluyen Silencer Express (Ambion, Austin, TX) y siXpress (Minis, Madison, WI). Puede administrarse un primer ARN de interferencia mediante expresión *in vivo* a partir de un primer vector de expresión que puede expresar el primer ARN de interferencia y puede administrarse un segundo ARN de interferencia mediante expresión *in vivo* a partir de un segundo vector de expresión que puede expresar el segundo ARN de interferencia, o pueden administrarse ambos ARN de interferencia mediante expresión *in vivo* a partir de un único vector de expresión que puede expresar ambos ARN de interferencia.

15 Pueden expresarse ARN de interferencia a partir de una variedad de promotores eucariotas conocidos por los expertos habituales en la técnica, incluyendo promotores pol III, tales como los promotores U6 o HI, o promotores pol II, tales como el promotor de citomegalovirus. Los expertos en la técnica reconocerán que estos promotores también pueden adaptarse para permitir una expresión inducible del ARN de interferencia.

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

20 Por ejemplo, pueden producirse condiciones de alta rigurosidad a formamida a aproximadamente el 50% a de 37°C a 42°C. Pueden producirse condiciones de rigurosidad reducida a formamida a aproximadamente del 35% al 25% a 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 de aproximadamente 5-10°C menos que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido en el que la T_m se determina para híbridos entre 19 y 49 pares de bases de longitud usando el siguiente cálculo: T_m °C = 81,5 + 16,6(log₁₀[Na⁺]) + 0,41 (% de G+C) - (600/N) en el que N es el número de bases en el híbrido y [Na⁺] es la concentración de iones sodio en el tampón hibridación.

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

30 *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 ARN de interferencia monocatenario (mc) efectúa el silenciamiento del ARNm, aunque menos eficazmente que el ARN bicatenario. Por tanto, las realizaciones de la presente invención también proporcionan la administración de un ARN de interferencia mc que se hibrida en condiciones fisiológicas con una parte de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 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 o SEQ ID NO: 2, respectivamente. El ARN de interferencia mc de la tabla 1 o tabla 2 tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos tal como para el ARN de interferencia bc mencionado anteriormente. El ARN de interferencia 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 u oligonucleótidos que tienen un grupo fosfato unido mediante enlace éster al hidroxilo C5 del azúcar (por ejemplo, ribosa, desoxirribosa o un análogo de las mismas) en el extremo 5' del polinucleótido u oligonucleótido.

Se sintetizan ARN de interferencia mc químicamente o mediante transcripción *in vitro* o se expresan endógenamente a partir de vectores o casetes de expresión tal como para ARN de interferencia bc. Pueden añadirse grupos fosfato en 5' mediante una cinasa, o un fosfato en 5' puede ser el resultado de escisión por nucleasas de un ARN. La administración es tal como para el ARN de interferencia bc. En una realización, se administran ARN de interferencia mc que tienen extremos protegidos y modificaciones resistentes a nucleasas para el silenciamiento. Los ARN de interferencia mc pueden secarse para su almacenamiento o disolverse en una disolución acuosa. La disolución puede contener tampones o sales para inhibir el apareamiento o para la estabilización.

ARN de interferencia en horquilla: Un ARN de interferencia en horquilla es una única molécula (por ejemplo, una única cadena de oligonucleótido) que comprende tanto las hebras sentido como antisentido de un ARN de interferencia en una estructura en tallo-bucle o en horquilla (por ejemplo, un ARNhp). Por ejemplo, pueden expresarse ARNhp a partir de vectores de ADN en los que los oligonucleótidos de ADN que codifican para una hebra de ARN de interferencia sentido se unen a los oligonucleótidos de ADN que codifican para la hebra de ARN de interferencia antisentido complementariamente inversa mediante un espaciador pequeño. Si es necesario para el vector de expresión elegido, pueden añadirse nucleótidos y T terminales en 3' que forman sitios de restricción. El transcrito de ARN resultante se pliega de nuevo sobre sí mismo para formar una estructura en tallo-bucle.

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

La administración puede ser directamente al ojo mediante administración al tejido ocular tal como administración periocular, conjuntiva, por debajo de la cámara de Tenon, intracamerar, intravítrea, intraocular, subretiniana, subconjuntival, retrobulbar, intracanalicular o supracoroidal; mediante inyección, 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 pomadas o gotas oculares tópicas; o mediante un dispositivo de liberación lenta en el fondo del saco o implantado adyacente a la esclerótica (transesclerótico) o dentro del ojo. La inyección intracamerar puede ser a través de la córnea hacia 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.

La administración puede ser directamente al oído mediante, por ejemplo, pomadas o gotas óticas tópicas, dispositivos de liberación lenta en el oído o implantados adyacentes al oído. La administración local incluye las vías de administración ótica, intramuscular, al interior de la cavidad timpánica e inyección intracoclear. Además, pueden administrarse agentes al oído interno mediante la colocación de Gelfoam, o producto adherente y absorbente similar, empapados con el ARN de interferencia frente a la membrana de comunicación del oído medio/interno o estructura adyacente.

La administración puede ser directamente a los pulmones, mediante, por ejemplo, una preparación aerosolizada, y mediante inhalación por medio de un inhalador o un nebulizador, por ejemplo.

Los modos de administración adicionales incluyen comprimidos, píldoras y cápsulas, todos los cuales pueden formularse por un experto habitual en la técnica.

Sujeto: Un sujeto que necesita tratamiento para un estado relacionado con $TNF\alpha$ o que corre el riesgo de desarrollar un estado relacionado con $TNF\alpha$ es un ser humano u otro mamífero que tiene un estado inflamatorio relacionado con $TNF\alpha$ o tiene ojo seco o corre el riesgo de desarrollar un estado inflamatorio relacionado con $TNF\alpha$ u ojo seco. Un estado inflamatorio relacionado con $TNF\alpha$ incluye, por ejemplo, conjuntivitis alérgica, inflamación ocular, dermatitis, rinitis o asma asociada con una actividad no deseada o inapropiada de $TNF\alpha$ tal como se menciona en el presente documento.

Estructuras oculares asociadas con un estado relacionado con $TNF\alpha$ pueden incluir el ojo, la retina, la coroides, el cristalino, la córnea, la malla trabecular, el iris, el nervio óptico, la papila óptica, la esclerótica, la cámara acuosa, la cámara vítrea, el cuerpo ciliar o un segmento posterior, por ejemplo.

Un sujeto también puede ser una célula ocular, cultivo celular, órgano o un tejido u órgano *ex vivo*.

Formulaciones y dosificación: Las formulaciones farmacéuticas comprenden ARN de interferencia, o sales de los mismos, de la invención hasta un 99% en peso mezclados con un medio portador 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.p pH 7,4
Agua purificada (libre de ARNasa)	c.s.p 100 ml

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

	Cantidad en % en peso
ARN de interferencia	hasta el 99; 0. 1-99; 0,1 - 50; 0,5 - 10,0
Fosfato de sodio monobásico	0,05
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 (libre de ARNasa)	c.s.p 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 (libre de ARNasa)	c.s.p hasta el 100%

5 Generalmente, una cantidad eficaz de los ARN de interferencia de realizaciones de la invención da como resultado una concentración extracelular en la superficie de la célula diana de desde 100 pM hasta 1000 nM, o desde 1 nM hasta 400 nM, o desde 5 nM hasta aproximadamente 100 nM, o de aproximadamente 10 nM. La dosis requerida para alcanzar esta concentración local variará dependiendo de varios factores incluyendo el método de administración, el sitio de administración, el número de capas de células entre el sitio de administración y la célula o tejido diana, si la administración es local o sistémica, etc. La concentración en el sitio de administración puede ser

considerablemente superior que en la superficie de la célula o tejido diana. Se administran composiciones tópicas a la superficie del órgano diana de una a cuatro veces al día, o en un programa de administración extendido tal como diariamente, semanalmente, bisemanalmente, mensualmente o más largo, según el criterio rutinario de un médico experto. El pH de la formulación es de aproximadamente pH 4-9, o de pH 4,5 a pH 7,4.

- 5 Se espera que el tratamiento terapéutico de pacientes con los ARNip dirigidos contra ARNm de TACE o ARNm de TNFR1 sea beneficioso con respecto a tratamientos con moléculas pequeñas aumentando la duración de la acción, permitiendo de ese modo una dosificación menos frecuente y un mayor cumplimiento del paciente.

Una cantidad eficaz de una formulación puede depender de factores tales como la edad, la raza y el sexo del sujeto, la gravedad del estado relacionado con TNF α , la tasa de recambio proteína/transcrito génico diana, la potencia del ARN de interferencia y la estabilidad del ARN de interferencia, por ejemplo. En una realización, el ARN de interferencia se administra por vía tópica a un órgano diana y alcanza un tejido que contiene ARNm de TACE o ARNm de TNFR1 a una dosis terapéutica mejorando de ese modo un proceso relacionado con TNF α .

10 *Portadores aceptables:* Un portador aceptable se refiere a los portadores que provocan como máximo, de poca a ninguna irritación ocular, proporcionan conservación adecuada si es necesario y administran uno o más ARN de interferencia de la presente invención en una dosificación homogénea. Un portador aceptable para la administración de ARN de interferencia de realizaciones de la presente invención incluye los reactivos de transfección basada en lípidos catiónicos TransIT[®]-TKO (Mirus Corporation, Madison, WI), LIPOFECTIN[®], Lipofectamine, OLIGOFECTAMINE[™] (Invitrogen, Carlsbad, CA) o DHARMAFECT[™] (Dharmacon, Lafayette, CO); policonaciones tales como polietilimina; péptidos catiónicos tales como Tat, poliarginina o penetratina (péptido Antp); o liposomas. Los liposomas se forman a partir de lípidos que forman vesículas convencionales y un esteroide, tal como colesterol, y pueden incluir por ejemplo una molécula de direccionamiento tal como un anticuerpo monoclonal que tiene afinidad de unión por antígenos de superficie de células endoteliales. Además, los liposomas pueden ser liposomas pegilados.

Los ARN de interferencia pueden administrarse en disolución, en suspensión o dispositivos de administración bioerosionables o no bioerosionables. Los ARN de interferencia pueden administrarse solos o como componentes de conjugados definidos, covalentes. Los ARN de interferencia también pueden complejarse con lípidos catiónicos, péptidos catiónicos o polímeros catiónicos; complejarse con proteínas, proteínas de fusión o dominios de proteínas con propiedades de unión a ácido nucleico (por ejemplo, protamina); o encapsularse en nanopartículas. Puede lograrse una administración específica de tejido o célula mediante la inclusión de un resto de direccionamiento apropiado tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Para administración oftálmica, ótica o pulmonar, puede combinarse un ARN de interferencia con conservantes, codisolventes, tensioactivos, potenciadores de la viscosidad, potenciadores de la penetración, tampones, cloruro de sodio o agua pulmonar, óptica y oftalmológicamente aceptables para formar una suspensión o disolución acuosa estéril. Pueden prepararse formulaciones de disolución disolviendo el ARN de interferencia en un tampón isotónico fisiológicamente aceptable. Además, las disoluciones pueden incluir un tensioactivo aceptable para ayudar en la disolución del inhibidor. Pueden añadirse agentes de formación de viscosidad, tales como hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona o similares a las composiciones de la presente invención para mejorar la retención del compuesto.

Con el fin de preparar una formulación de pomada estéril, se combina el ARN de interferencia con un conservante en un vehículo apropiado, tal como aceite mineral, lanolina líquida o vaselina blanca. Pueden prepararse formulaciones de gel estériles 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. 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 Cremephor y TWEEN[®] 80 (monolaurato de polioxietilensorbitano, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), en caso de que el ARN de interferencia sea menos penetrante en el órgano o tejido de interés.

Kits: También se describe en el presente documento un kit que incluye reactivos para atenuar la expresión de un ARNm tal como se menciona en el presente documento en una célula. El kit contiene un vector de expresión de ARNhp o un ARNip. Para vectores de expresión de ARNhp no virales y ARNip, el kit también puede contener un reactivo de transfección u otro vehículo de administración adecuado. Para vectores de expresión de ARNhp virales, el kit puede contener el vector viral y/o los componentes necesarios para la producción del vector viral (por ejemplo, una línea celular de empaquetamiento así como un vector que comprende el molde del vector viral y vectores auxiliares adicionales para el empaquetamiento). El kit también puede contener vectores de expresión de ARNhp o ARNip control negativo o positivo (por ejemplo, un ARNip control que no selecciona como diana o un ARNip que selecciona como diana un ARNm no relacionado). El kit también puede contener reactivos para evaluar la reducción del gen diana previsto (por ejemplo, cebadores y sondas para PCR cuantitativa para detectar el ARNm diana y/o anticuerpos contra la proteína correspondiente para inmunotransferencias de tipo Western). Alternativamente, el kit puede comprender una secuencia de ARNip o una secuencia de ARNhp y los materiales e instrucciones necesarios para generar el ARNip mediante transcripción *in vitro* o para construir un vector de expresión de ARNhp.

Se describe además una combinación farmacéutica en forma de kit que incluye, en combinación empaquetada, un medio portador adaptado para recibir un medio de envase en confinamiento estrecho con el mismo y un primer medio de envase que incluye una composición de ARN de interferencia y un portador aceptable. Tales kits pueden incluir además, si se desea, uno o más de diversos componentes de kit farmacéuticos convencionales, tales como, por ejemplo, envases con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, envases adicionales, etc., tal como resultará fácilmente evidente para los expertos en la técnica. También pueden incluirse en el kit instrucciones impresas, o bien como prospectos o bien como etiquetas, que indican las cantidades de los componentes que van a administrarse, directrices para su administración, y/o directrices para el mezclado de los componentes.

La capacidad del ARN de interferencia de TACE o TNFR1 para inactivar los niveles de la expresión de TACE o TNFR1 endógena en, por ejemplo, células epiteliales de córnea humana, se evalúa *in vitro* tal como sigue. Se siembran en placa células epiteliales de córnea humana transformadas, por ejemplo, la línea celular CEPI-17 (Offord *et al.* (1999) Invest Ophthalmol Vis Sci 40:1091-1101), 24 h antes de su transfección en medio de queratinocitos KGM (Cambrex, East Rutherford, NJ). Se realiza la transfección usando DharmaFECT™ 1 (Dharmacon, Lafayette, CO) según las instrucciones del fabricante a concentraciones de ARN de interferencia de TACE o TNFR1 que oscilan entre 0,1 nM - 100 nM. Se usan ARN de interferencia control que no seleccionan como diana y ARN de interferencia de lamina A/C (Dharmacon) como controles. Se evalúan los niveles de ARNm diana mediante qPCR 24 h tras la transfección usando, por ejemplo, cebadores directos e inversos TAQMAN® y un conjunto de sondas que abarcan el sitio diana (Applied Biosystems, Foster City, CA). Pueden evaluarse los niveles de proteína diana aproximadamente 72 h tras la transfección (tiempo real dependiente de la tasa de recambio de proteína) mediante inmunotransferencia tipo Western, por ejemplo. Los expertos en la técnica conocen bien técnicas convencionales para el aislamiento de proteínas y/o ARN a partir de células cultivadas. Para reducir la probabilidad de efectos no específicos, inespecíficos, se usa la concentración más baja posible de ARN de interferencia de TACE o TNFR1 que produce el nivel deseado de inactivación en una expresión de gen diana.

Ejemplo 1

ARN de interferencia para silenciar específicamente TNFR1 en células GTM-3

El presente estudio examina la capacidad del ARN de interferencia de TNFR1 para reducir los niveles de expresión de proteína TNFR1 endógena en células GTM-3 cultivadas.

Se logró la transfección de células GTM-3 (Pang, LH. *et al.* 1994. Curr. Eye Res. 13:51-63) usando concentraciones *in vitro* convencionales (0,1-10 nM) de ARNip de TNFR1, ARNip libre de RISC control (pi) n.º 1 o ARNip que no selecciona como diana control(pi) n.º 2 (NTC2) y reactivo de transfección DHARMAFECT® n.º 1 (Dharmacon, Lafayette, CO). Se disolvieron todos los ARNip en tampón de ARNip 1X, una disolución acuosa de KCl 20 mM, HEPES 6 mM (pH 7,5), MgCl₂ 0,2 mM. Las muestras control incluían un control de tampón en el que se reemplazó el volumen de ARNip por un volumen igual de tampón de ARNip 1X (-ARNip). Se llevaron a cabo inmunotransferencias de tipo Western usando un anticuerpo anti-TNFR1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) para evaluar la expresión de proteína TNFR1. Los ARNip de TNFR1 son ARN de interferencia bicatenarios que tienen especificidad por las siguientes dianas: TNFR1ip n.º 1 selecciona como diana la secuencia CAAAGGAACCUACUUGUAC (SEQ ID NO: 202) a partir de la que se deriva SEQ ID NO: 96; TNFR1ip n.º 2 selecciona como diana la secuencia GAGCUUGAAGGAACUACUA (SEQ ID NO: 203) a partir de la que se deriva SEQ ID NO: 97; TNFR1ip n.º 3 selecciona como diana la secuencia CACAGAGCCUAGACACUGA (SEQ ID NO: 204) a partir de la que se deriva SEQ ID NO: 98; TNFR1ip n.º 4 selecciona como diana la secuencia UCCAAGCUCUACUCCAUUG (SEQ ID NO: 205) a partir de la que se deriva SEQ ID NO: 99. Tal como se muestra mediante los datos en la figura 1, los ARNip de TNFR1ip n.º 1, TNFR1ip n.º 2 y TNFR1ip n.º 3 redujeron significativamente la expresión de proteína TNFR1 a las concentraciones de 10 nM y 1 nM en relación con los ARNip control, pero presentaban una eficacia reducida a 0,1 nM. Los ARNip de TNFR1ip n.º 2 y TNFR1ip n.º 3 eran particularmente eficaces. El ARNip de TNFR1ip n.º 4 también mostró una reducción dependiente de la concentración en la expresión de proteína TNFR1 tal como se esperaba.

Lista de secuencias

<110> Yanni, John M.

Chatterton, Jon E.

50 Senchyna, Diane Michelle

Gamache, Daniel A.

Miller, Steven T.

<120> Inhibición mediada por ARNi de estados relacionados con factor de necrosis tumoral alfa

<130> 45263-P019WO

<160> 205

5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 3572

10

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

acctgcactt ctgggggctg cgagcctggc ggtagaatct tcccagtagg cggcgcggga      60
gggaaaagag gattgagggg ctaggccggg cggatcccgt cctccccga tgtgagcagt      120
tttcogaaac cccgtcaggc gaaggctgcc cagagaggtg gagtccgtag cggggccggg      180
aacatgaggc agtctctcct attcctgacc agcgtggttc ctttcgtgct ggcgcgcga      240
cctccggatg acccgggctt cggccccac cagagactcg agaagcttga ttctttgctc      300
tcagactacg atattctctc ttatctaat atccagcagc attccgtaag aaaagagat      360
ctacagactt caacacatgt agaaacacta ctaactttt cagctttgaa aaggcatttt      420
aaattatacc tgacatcaag tactgaacgt tttcacaaa atttcaaggt cgtggtggtg      480
gatggtaaaa acgaaagcga gtacactgta aatggcagg acttcttcac tggacacgtg      540
gttgggtgagc ctgactctag ggttctagcc cacataagag atgatgatgt tataatcaga      600
atcaacacag atggggcga atataacata gagccacttt ggagatttgt taatgatacc      660
aaagacaaaa gaatgttagt ttataaactc gaagatatca agaatgtttc acgtttgcag      720
tctccaaaag tgtgtggtta tttaaaagtg gataatgaag agttgctccc aaaagggtta      780

gtagacagag aaccacctga agagcttgtt catcgagtga aaagaagagc tgaccagat      840
cccattgaag acacgtgtaa attattggtg gtagcagatc atcgttcta cagatacatg      900
ggcagagggg aagagagtac aactacaast tacttaatag agctaattga cagagttgat      960
gacatctatc ggaacacttc atgggataat gcaggtttta aaggctatgg aatacagata     1020
gagcagattc gcattctcaa gtctccaaa gaggtaaaaa ctggtgaaa gcaactaac     1080
atggcaaaaa gttacccaaa tgaagaaaag gatgcttggg atgtgaagat gttgctagag     1140
caatttagct ttgatatagc tgaggaagca tctaaagttt gcttggcaca ccttttcaaa     1200
taccaagatt ttgatatggg aactcttggg ttagcttatg ttggctctcc cagagcaaac     1260

```

15

agccatggag gtgtttgtcc aaagccttat tatagcccag ttgggaagaa aaatatctat 1320
 ttgaatagtg gtttgacgag cacaagaat tatggtaaa ccatccttac aaaggaagct 1380
 gacctggtta caactcatga attgggacat aattttggag cagaacatga tccggtggt 1440
 ctagcagaat gtgccccgaa tgaggccag ggagggaaat atgtcatgta tcccatagct 1500
 gtgagtggcg atcacgagaa caataagatg ttttcaact gcagtaaca atcaatctat 1560
 aagaccattg aaagtaggc ccaggagtgt tttcaagac gcagcaataa agtttgtggg 1620
 aactcgaggg tggatgagc gggagagtgt gatcctggca tcatgtatct gaacaagac 1680
 aactgctgca scagcagctg cacgttgaag gaaggtgtcc agtgcagtga caggaacagt 1740
 ccttgcctga aaaactgtca gtttgagact gcccagaag agtgcacgga gggattaat 1800
 gctacttgca aagcgtgtc ctactgcaca ggtaatagca gtgagtgcc gctccagga 1860
 aatgctgaaq atgacactgt ttgcttggat cttggcaagt gtaaggatgg gaatatcctc 1920
 cctttctgcy agagggaaac gcaagctggag tctgtgcat gtantgaac tgcacaatcc 1980
 tgcaaggtgt gctgcagggc cctttctggc cgtgtgtgc cctatgtcga tgotgaaca 2040
 aagaacttat ttttgaggaa aggaagccc tgtacagtga gattttgtga cctgaatggc 2100
 aatgtgaga aacagatca ggtgttaatt gaacgatttt gggatttcat tgaccagctg 2160
 agcatcaata cttttggaaa gtttttagca gacaacatcy ttgggtctgt cctggtttc 2220
 tcttgtatct tttggattcc tttcagcatt cttgtccatt gtgtgataa gaatttggat 2280
 aaacagtatg aatctctgtc tctgtttcac cccagtaacg tcaaatgct gacagcctg 2340
 gattctgat cggttogcat tctcaacc cttctctggc cccagactcc aggcgcctg 2400
 cggcctgccc ctgtgatccc ttgggcgcca gcagctccaa aactggacca ccagagatg 2460
 gacaccatcc aggaagacc cagcacagc tccatctatg scgaggatgg gtttgagaag 2520
 gacccttcc caaatagcag ccagctgccc agtcaettg aggatctcac ggaaccatccg 2580
 gtcaccagaa gtgaagggc tgcctccttt aaactgcagc gtcagaatcg tgtgacagc 2640
 aaagaaacag agtgctaatt tagttctcag ctcttctgac ttaagtgtgc aaatatctt 2700
 tatagattg acctacaaat caatcacagc ttgtattttg tgaagactgg gaagtgcctt 2760
 agcagatgct ggtcatgtgt ttgaacttc tgcaggtaaa cagtctctgt gtggtttggc 2820
 ccttctcctt ttgaagggt aaggtgagg tgaatctagc ttattttgag gctttcaggt 2880
 tttggtttt aaatatctt ttgacctgtg gtgcaaaagc agaaatata gctggattgg 2940
 gttatgaata tttacgtttt tgaattaa tcttttatat tgataacagc actgactagg 3000
 gaatgatca gtttttttt atacactgta atgaacgct gatatgagg catttggcat 3060
 ttatttgtga tgacaactgg aatagttttt ttttttttt ttttttttg ccttcaacta 3120
 aaacaaag agataaatct agtatcatt gtctctaaat tgtgggtcta tttctagtta 3180
 ttaccagag tttttatga gcagggaaa tatatatcta aatttagaaa tcttttgggt 3240

ES 2 413 804 T3

taatatggct cttcataatt ctaagactaa tgctctctag aaacctaacc acctacctta 3300
 cagtgagggc tatacatggg agccagttga atttatggaa tctaccaact gtttagggcc 3360
 ctgatttgct gggcagtttt tctgtatttt ataagtatct tcatgtatcc ctgttactga 3420
 tagggataca tgctcctaga aaattcacta ttggctggga gtggtggctc atgcctgtaa 3480
 tcccagcact tggagaggct gaggttgccg cactacactc cagcctgggt gacagagtga 3540
 gactctgcct caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 3572

<210> 2

<211> 2236

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

gctggtgcaa cactgcctca ctcttccctt occaccttct ctcccctcct ctctgcttta 60
 atttctcag aattctctgg actgaggctc cagttctggc etttgggggt caagatcact 120
 gggaccaggc cgtgatctct atgcccaggt ctcaaccctc aactgtcacc ccaaggcact 180
 tgggacgtcc tggacagacc gagtccggg aagcccagc actgccgctg ccacactgcc 240
 ctgagcccaa atgggggagt gagaggccat agctgtctgg catgggcctc tccaccgtgc 300
 ctgacctgct gctgccactg gtgctcctgg agctgttggg gggaaatata cctcagggg 360
 ttattggact ggtccctcac ctaggggaca gggagaagag agatagtgtg tgtccccaag 420
 gaaaatatat ccaccctcaa aataattoga tttgctgtac caagtgccac aaaggaacct 480
 actgttaca tgactgtcca ggcccggggc aggatacggc ctgcagggag tgtgagagcg 540
 gctcctcac cgcttcagaa aaccacctca gacactgcct cagctgctcc aaatgccgaa 600
 aggaaatggg tcaggtggag atctcttctt gcacagtgga ccgggacacc gtgtgtggct 660
 gcaggaagaa ccagtaccgg cattattgga gtgaaaacct tttccagtgc ttcaattgca 720

```

gectctgcoct caatgggacc gtgcacctct cctgccagga gaaacagaac accgtgtgca 780
cctgccatgc aggtttcttt ctaagagaaa acgagtgtgt ctctgtagt aactgtaaga 840
aaagcctgga gtgcacgaag ttgtgcctac ccagattga gaatgttaag ggcactgagg 900
actcaggcac cacagtgtg ttgcccctgy tcattttctt tggctcttgc cttttatccc 960
tcctcttcat tggtttaatg tatcgctacc aacggtgga gtccaagctc tactccattg 1020
tttgtgggaa atcgacacct gaaaaagagg gggagcttga aggaactact actaagcccc 1080
tggcccaaaa cccaagcttc agtcccactc caggcttcac ccccacctg ggttcagtc 1140
ccgtgccag ttccaacttc acctccagct ccacctatac ccccggtgac tgtccaact 1200
ttgcggctcc ccgcagagag gtggcaccac cctatcaggg ggctgacccc atccttgca 1260
cagccctcgc ctccgacccc atcccacc cccttcagaa gtgggaggac agcgcaccaca 1320
agccacagag cctagacact gatgacccc cgacgctgta cgccgtggtg gagaacgtgc 1380

ccccgttgcg ctggaaggaa ttctgctggc gcctagggct gagcgaccac gagatcgatc 1440
ggctggagct gcagaacggg cgctgcctgc gcgagcgca atacagcatg ctggcgacct 1500
ggagggggcg cacgccggcg cgcgaggcca cgctggagct gctgggacgc gtgctccgcg 1560
acatggacct gctgggctgc ctggaggaca tgcgagggc gctttgccc cccgcgccc 1620
tcccgcggc gccagctct ctcatgag gctgcgccc tggggcagc tctaaggacc 1680
gtcctgcgag atgccttcc aaccccactt tttctgaa aggaggggtc ctgcaggggc 1740
aagcaggagc tagcagccgc ctacttggg ctaacccctc gatgtacata gctttctca 1800
gctgcctgcg cgcgcccgc agtcagcgt gtgcgcgcg agagaggtgc gccgtgggt 1860
caagagcctg agtgggtggt ttgcgaggat gagggacgct atgcctcatg cccgttttg 1920
gtgtectca cagcaaggct gctcgggggc ccctggttcg tcctgagcc tttttcacag 1980
tgcataagca gttttttttg tttttgttt gttttgttt gtttttaaat caatcatgtt 2040
aactaatag aaacttggca ctctgtgcc ctctgcctgg acaagcat agcaagctga 2100
actgtcctaa ggcagggggc agcacggaac aatggggcct tcagctggag ctgtggactt 2160
ttgtacatac actaaattc tgaagttaaa gctctgctct tggaaaaaaa aaaaaaaaaa 2220
aaaaaaaaa aaaaaa 2236

```

<210> 3

5 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 3

gctctcagac tacgatatt

19

5

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Hebra sentido con NN en 3'

<220>

15

<221> misc_ARN

<222> (1)..(19)

<223> ribonucleótidos

<220>

20

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

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

<400> 4

25

gcucucagac uacgauauun n

21

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

30

<213> Artificial

<220>

<223> Hebra antisentido con NN en 3'

35

<220>

<221> misc_ARN

<222> (1)..(19)

<223> ribonucleótidos

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (20)..(21)

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

<400> 5

10

aaauaucguag ucugagagcn n

21

<210> 6

<211> 21

<212> ARN

15

<213> Artificial

<220>

<223> Hebra sentido

20

<400> 6

gcucucagac uacgauauuu u

21

<210> 7

<211> 21

25

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Hebra antisentido

30

<400> 7

aaauaucguag ucugagagcu u

21

<210> 8

35

<211> 19

<212> ARN

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Hebra sentido	
5	<400> 8	
	gcucucagac uacgauuu	19
	<210> 9	
10	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Hebra antisentido	
	<400> 9	
	aaauucguag ucugagagc	19
20	<210> 10	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Dúplex en horquilla con bucle	
	<220>	
	<221> misc_ARN	
30	<222> (1)..(19)	
	<223> ribonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_feature	
35	<222> (20)..(27)	
	<223> cualquiera, A, T/U, C, G	

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(48)
 5 <223> ribonucleótidos

 <400> 10
 gcucucagac uacgauauun nnnnnnaau aucguagucu gagagcuu **48**

 10 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Hebra sentido

 <400> 11
 gcucucagac uacgauauuc ucucu **25**

 20
 <210> 12
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 25
 <220>
 <223> Hebra sentido

 <400> 12
 gcucucagac uacgauauuc ucucu **25**

 30
 <210> 13
 <211> 27
 <212> ARN
 35 <213> Artificial

	<400> 16		
	agcagcattc ggtaagaaa		19
	<210> 17		
5	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
10	<223> Secuencia diana		
	<400> 17		
	agagatctac agacttcaa		19
15	<210> 18		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> Secuencia diana		
	<400> 18		
	gaaagcaggt acactgtaa		19
25	<210> 19		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> Secuencia diana		
	<400> 19		
35	ccatgaagaa cacgtgtaa		19

<210> 20

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 20

10

gaagaacacg tgtaaatta

19

<210> 21

<211> 19

<212> ADN

15

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

20

<400> 21

atcctcgctt ctacagata

19

<210> 22

<211> 19

25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

30

<400> 22

agagcaattt agctttgat

19

<210> 23

35

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

5

<400> 23

ggtttgacga gcacaaaga

19

<210> 24

10

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15

<223> Secuencia diana

<400> 24

tgatccggat ggtctagca

19

20

<210> 25

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 25

gcgatcacga gaacaataa

19

30

<210> 26

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 26

gcagtaaaca atcaatcta

19

5

<210> 27

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 27

caatctataa gaccattga

19

15

<210> 28

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 28

tttcaagaac gcagcaata

19

25

<210> 29

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Secuencia diana

35

<400> 29

ttcaagaacg cagcaataa

19

<210> 30

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

10

<400> 30

tcaagaacgc agcaataaa

19

<210> 31

15 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia diana

<400> 31

tcatgtatct gaacaacga

19

25 <210> 32

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 32

acagcgactg cacgttgaa

19

35

<210> 33

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 33

gattaatgct acttgcaaa

19

10

<210> 34

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 34

ctggagtcct gtgcatgta

19

20

<210> 35

<211> 19

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

30

<400> 35

tggagtcctg tgcattgaa

19

<210> 36

<211> 19

35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

5 <400> 36

ggagtctgt gcatgtaat

19

<210> 37

<211> 19

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

15

<400> 37

catgtaatga aactgacaa

19

<210> 38

20 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Secuencia diana

<400> 38

ctatgtcgat gctgaacaa

19

30 <210> 39

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 39

caaatgtgag aaacgagta

19

5 <210> 40

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 40

gcatecggttc gcattatca

19

15

<210> 41

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 41

atcggttcgc attatcaaa

19

25

<210> 42

<211> 19

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

35 <400> 42

ccaagtcatt tgaggatct

19

<210> 43

<211> 19

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

10 <400> 43

ccggtcacca gaagtgaaa

19

<210> 44

<211> 19

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

20

<400> 44

aaaggctgcc tcctttaa

19

<210> 45

25 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Secuencia diana

<400> 45

tttaaactgc agcgtcaga

19

35 <210> 46

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia diana

<400> 46

agatgctggt catgtgttt

19

10 <210> 47

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 47

atgctggtca tgtgtttga

19

20

<210> 48

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 48

30 **tgctggtcat gtgtttgaa**

19

<210> 49

<211> 19

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 49

5 **ctggtcatgt gtttgaact**

19

<210> 50

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

15 <400> 50

tgtaatgaac cgctgaata

19

<210> 51

<211> 19

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

25

<400> 51

gtaatgaacc gctgaatat

19

<210> 52

30 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Secuencia diana

<400> 52

ctaagactaa tgctctcta

19

<210> 53

5 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia diana

<400> 53

agactaatgc tctctagaa

19

15 <210> 54

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 54

cctaaccacc taccttaca

19

25

<210> 55

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 55

tacatggtag ccagttgaa

19

35

<210> 56

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 56

10

tggtagccag ttgaattta

19

<210> 57

<211> 19

<212> ADN

15

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

20

<400> 57

tttatggaat ctaccaact

19

<210> 58

<211> 19

25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

30

<400> 58

ggaatctacc aactgttta

19

<210> 59

35

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

5

<400> 59

accaggccgt gatctctat

19

<210> 60

10

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15

<223> Secuencia diana

<400> 60

aattcgattt gotgtacca

19

<210> 61

20

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25

<223> Secuencia diana

<400> 61

tcgatttgct gtaccaagt

19

30

<210> 62

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 62

acaaggaac ctacttgta

19

5

<210> 63

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 63

gaacctactt gtacaatga

19

15

<210> 64

<211> 19

<212> ADN

20

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

25

<400> 64

ctacttgtaac aatgactgt

19

<210> 65

<211> 19

30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

35

<400> 65

tgtgagagcg gctccttca

19

<210> 66

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

10

<400> 66

tcaggtggag atctcttct

19

<210> 67

15 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia diana

<400> 67

caggtggaga tctctctct

19

25 <210> 68

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 68

agaaccagta ccggcatta

19

35

<210> 69

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 69

gaaccagtac cggcattat

19

10

<210> 70

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 70

20 **aaccagtacc ggcattatt**

19

<210> 71

<211> 19

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

30 <400> 71

ccggcattat tggagtqaa

19

<210> 72

<211> 19

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

5 <400> 72

cggcattatt ggagtgaaa

19

<210> 73

<211> 19

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

15

<400> 73

agcctggagt gcacgaagt

19

<210> 74

20 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Secuencia diana

<400> 74

ctcctcttca ttggtttaa

19

30 <210> 75

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 75

ttggtttaat gtatcgcta

19

5 <210> 76

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 76

gtttaatgta tcgctacca

19

15

<210> 77

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 77

25

tttaatgtat cgctaccaa

19

<210> 78

<211> 19

<212> ADN

30

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

35

<400> 78

agtccaagct ctactccat

19

<210> 79

<211> 19

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

10 <400> 79

gagcttgaag gaactacta

19

<210> 80

<211> 19

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

20

<400> 80

cttgaaggaa ctactacta

19

<210> 81

25 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Secuencia diana

<400> 81

ttgaaggaac tactactaa

19

35 <210> 82

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia diana

<400> 82

acaagccaca gagcctaga

19

10 <210> 83

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 83

tgtacgccgt ggtggagaa

19

20

<210> 84

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 84

ccggttgcgct ggaaggaat

19

30

<210> 85

<211> 19

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 85

5 **tctaaggacc gtcctgcga**

19

<210> 86

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

15 <400> 86

ctaatagaaa cttggcact

19

<210> 87

<211> 19

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

25

<400> 87

taatagaaac ttggcactc

19

<210> 88

30 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Secuencia diana

	<400> 88		
	aatagaaact tggcactcc		19
	<210> 89		
5	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
10	<223> Secuencia diana		
	<400> 89		
	atagaaactt ggcactcct		19
15	<210> 90		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> Secuencia diana		
	<400> 90		
	tagaaacttg gcactcctg		19
25	<210> 91		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> Secuencia diana		
	<400> 91		
35	atagcaagct gaactgtcc		19

<210> 92

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 92

10

tagcaagctg aactgtcct

19

<210> 93

<211> 19

<212> ADN

15

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

20

<400> 93

agcaagctga actgtccta

19

<210> 94

<211> 19

25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

30

<400> 94

gcaagctgaa ctgtcctaa

19

<210> 95

35

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

5

<400> 95

tgaactgtcc taaggcagg

19

<210> 96

10

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15

<223> Secuencia diana

<400> 96

caaaggaacc tacttgtac

19

20

<210> 97

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 97

gagcttgaag gaactacta

19

30

<210> 98

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 98

cacagagcct agacactga

19

5

<210> 99

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 99

tccaagctct actccattg

19

15

<210> 100

<211> 19

<212> ADN

20

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

25

<400> 100

tggagctgtt ggtgggaat

19

<210> 101

<211> 19

30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

35

<400> 101

gacagggaga agagagata

19

<210> 102

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

10

<400> 102

gggagaagag agatagtgt

19

<210> 103

15 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia diana

<400> 103

gagaagagag atagtgtgt

19

25 <210> 104

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 104

gaagagagat agtgtgtgt

19

35

<210> 105

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 105

gtgtgtgtcc ccaaggaaa

19

10

<210> 106

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 106

20 **gaaaatatat ccaccctca**

19

<210> 107

<211> 19

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

30 <400> 107

aaatatatcc accctcaaa

19

<210> 108

<211> 19

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

5 <400> 108

ctgtaccaag tgccacaaa

19

<210> 109

<211> 19

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

15

<400> 109

accaagtgcc acaaaggaa

19

<210> 110

20 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Secuencia diana

<400> 110

ccaagtgccacaaaggaac

19

30 <210> 111

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 111

ccacaaaggaacctacttg

19

5 <210> 112

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 112

caaaggaacc tacttgtac

19

15

<210> 113

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 113

aaaggaacct acttgtaca

19

25

<210> 114

<211> 19

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

35 <400> 114

gatacggact gcagggagt

19

<210> 115

<211> 19

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

10 <400> 115

cggaactgcag ggagtgtga

19

<210> 116

<211> 19

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

20

<400> 116

tccttcaccg cttcagaaa

19

<210> 117

25 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Secuencia diana

<400> 117

cagaaaacca cctcagaca

19

35 <210> 118

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia diana

<400> 118

tgocctcagct gctccaaat

19

10 <210> 119

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 119

ctccaaatgc cgaaaggaa

19

20

<210> 120

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 120

30 **tccaaatgccgaaaggaaa**

19

<210> 121

<211> 19

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 121

5 **ccaaatgccg aaaggaaat**

19

<210> 122

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

15 <400> 122

gccgaaagga aatgggtca

19

<210> 123

<211> 19

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

25

<400> 123

aggaaatggg tcaggtgga

19

<210> 124

30 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Secuencia diana

<400> 124

ggaaatgggt caggtggag

19

<210> 125

5 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia diana

<400> 125

gtgtgtggct gcaggaaga

19

15 <210> 126

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 126

ggaagaacca gtaccggca

19

25

<210> 127

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 127

35 **ccatgcaggt ttctttcta**

19

<210> 128

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 128

10

catgcagggtt tctttctaa

19

<210> 129

<211> 19

<212> ADN

15

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

20

<400> 129

tgcagggttct tttctaaga

19

<210> 130

<211> 19

25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

30

<400> 130

aggtttcttt ctaagagaa

19

<210> 131

35

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

5

<400> 131

ggtttctttc taagagaaa

19

<210> 132

10

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15

<223> Secuencia diana

<400> 132

agagaaaacg agtgtgtct

19

20

<210> 133

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 133

gagtgtgtct cctgtagta

19

30

<210> 134

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 134

ctgtagtaac tgtaagaaa

19

5

<210> 135

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 135

15

agaaaagcct ggagtgcac

19

<210> 136

<211> 19

<212> ADN

20

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

25

<400> 136

ttgagaatgt taagggcac

19

<210> 137

<211> 19

30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

35

<400> 137

tgtaaagggc actgaggac

19

<210> 138

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

10

<400> 138

ggtcattttc tttggtcct

19

<210> 139

15 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia diana

<400> 139

cctcctcttc attggttta

19

25 <210> 140

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 140

tcctcttcat tggtttaat

19

35

<210> 141

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 141

cttttcattg gtttaattgt

19

10

<210> 142

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 142

tcttcattgg ttttaattga

19

20

<210> 143

<211> 19

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

30

<400> 143

cttcattggt ttaattgat

19

<210> 144

<211> 19

35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

5 <400>144

tccaagctct actccattg

19

<210> 145

<211> 19

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

15

<400> 145

ctccattggt tgtgggaaa

19

<210> 146

20 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Secuencia diana

<400> 146

gggaaatcga cacctgaaa

19

30 <210> 147

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 147

tgaaggaact actactaag

19

5 <210> 148

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 148

acctccagct ccacctata

19

15

<210> 149

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 149

25 **cccacaagcc acagagcct**

19

<210> 150

<211> 19

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

35 <400> 150

acgccgtggt ggagaacgt

19

<210> 151

<211> 19

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

10 <400> 151

ggaaggaatt cgtgcggcg

19

<210> 152

<211> 19

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

20

<400> 152

tgagcgacca cgagatcga

19

<210> 153

25 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Secuencia diana

<400> 153

gcgaggcgca atacagcat

19

35 <210> 154

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia diana

<400> 154

tgggctgcct ggaggacat

19

10 <210> 155

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 155

catcaagtac tgaacgttt

19

20

<210> 156

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 156

30 **tcgtggtggt ggatggtaa**

19

<210> 157

<211> 19

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 157

5 **gaaagcgaqt acactgtaa**

19

<210> 158

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

15 <400> 158

gagcctgact ctagggttc

19

<210> 159

<211> 19

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

25

<400> 159

ccacataaga gatgatgat

19

<210> 160

30 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Secuencia diana

<400> 160

cataagagat gatgatggt

19

<210> 161

5 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia diana

<400> 161

cgaatataac atagagcca

19

15 <210> 162

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 162

gttaatgata ccaagaca

19

25

<210> 163

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 163

35 **ctgaagatat caagaatgt**

19

<210> 164

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 164

10

atgaagagtt gctcccaaa

19

<210> 165

<211> 19

<212> ADN

15

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

20

<400> 165

atgaagaaca cgtgtaaat

19

<210> 166

<211> 19

25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

30

<400> 166

aattattggt ggtagcaga

19

<210> 167

35

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

5

<400> 167

atcatcgctt ctacagata

19

<210> 168

10

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15

<223> Secuencia diana

<400> 168

atacatgggc agagggaa

19

20

<210> 169

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 169

gggcagaggg gaagaggt

19

30

<210> 170

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 170

ggaagagagt acaactaca

19

5

<210> 171

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 171

15

gaagagagta caactacaa

19

<210> 172

<211> 19

<212> ADN

20

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

25

<400> 172

gagagtacaa ctacaaatt

19

<210> 173

<211> 19

30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

35

<400> 173

gctaattgac agagttgat

19

<210> 174

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

10

<400> 174

cggaacactt catgggata

19

<210> 175

15 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia diana

<400> 175

ggataatgca ggttttaaa

19

25 <210> 176

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 176

agqctatqqa atacagata

19

35

<210> 177

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 177

gaatcacagat agagcagat

19

10

<210> 178

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 178

ggtaaaacct ggtgaaaag

19

20

<210> 179

<211> 19

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

30

<400> 179

gtgaaaagca ctacaacat

19

<210> 180

<211> 19

35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

5 <400> 180

gaggaagcat ctaaagttt

19

<210> 181

<211> 19

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

15

<400> 181

tatggaact cttgatta

19

<210> 182

20 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Secuencia diana

<400> 182

tgacgagcac aaagaatta

19

30 <210> 183

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 183

gcacaaagaa ttatggtaa

19

5 <210> 184

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 184

ggttacaact catgaattg

19

15

<210> 185

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 185

25 **actcatgaat tggacata**

19

<210> 186

<211> 19

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

35 <400> 186

gtggcgatca cgagaacaa

19

<210> 187

<211> 19

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

10 <400> 187

ctataagacc attgaaagt

19

<210> 188

<211> 19

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

20

<400> 188

gaacgcagca ataaagttt

19

<210> 189

25 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Secuencia diana

<400> 189

gcaataaagt ttgtggaa

19

35 <210> 190

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia diana

<400> 190

caataaagtt tgtggaac

19

10 <210> 191

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 191

gagggtggat gaaggagaa

19

20

<210> 192

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 192

ggatgaagga gaagagtgt

19

30

<210> 193

<211> 19

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 193

5 **gcatcatgta tctgaacaa**

19

<210> 194

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

15 <400> 194

caggaaatgc tgaagatga

19

<210> 195

<211> 19

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

25

<400> 195

gaatggcaaa tgtgagaaa

19

<210> 196

30 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Secuencia diana

<400> 196

ggatgtaatt gaacgattt

19

<210> 197

5 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia diana

<400> 197

gtggataaga aattggata

19

15 <210> 198

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Secuencia diana

<400> 198

ggataaacag tatgaatct

19

25

<210> 199

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 199

35 **cctttaaact gcagcgtca**

19

	<210> 200	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5		
	<220>	
	<223> Secuencia diana	
	<400> 200	
10	cgtgttgaca gcaagaaa	19
	<210> 201	
	<211> 19	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia diana	
20	<400> 201	
	gcaagaaaac agagtgcta	19
	<210> 202	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia diana	
30		
	<400> 202	
	caaaggaacc uacuuguac	19
	<210> 203	
35	<211> 19	
	<212> ARN	

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia diana

5

<400> 203

gagcuugaag gaacuacua

19

<210> 204

10

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

15

<223> Secuencia diana

<400> 204

cacagagccu agacacuga

19

20

<210> 205

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia diana

<400> 205

uccaagcucu acuccaauug

19

30

REIVINDICACIONES

1. Un ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos, en donde el ARN de interferencia tiene como diana un ARNm que corresponde a una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 14 - SEQ ID NO: 58, y SEQ ID NO: 155 - SEQ ID NO: 201, para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado ocular relacionado con TNF α en un sujeto que lo necesita, en donde dicho estado es ojo seco, conjuntivitis alérgica o inflamación ocular.
2. Un ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos, comprendiendo el ARN de interferencia: una hebra de nucleótidos sentido, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos; en donde la hebra antisentido hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 que comprende el nucleótido 297, 333, 334, 335, 434, 470, 493, 547, 570, 573, 618, 649, 689, 755, 842, 844, 846, 860, 878, 894, 900, 909, 910, 913, 942, 970, 984, 1002, 1010, 1053, 1064, 1137, 1162, 1215, 1330, 1334, 1340, 1386, 1393, 1428, 1505, 1508, 1541, 1553, 1557, 1591, 1592, 1593, 1597, 1604, 1605, 1626, 1632, 1658, 1661, 1691, 1794, 1856, 1945, 1946, 1947, 1958, 2022, 2094, 2100, 2121, 2263, 2277, 2347, 2349, 2549, 2578, 2595, 2606, 2608, 2629, 2639, 2764, 2766, 2767, 2769, 3027, 3028, 3261, 3264, 3284, 3313, 3317, 3332 ó 3337; para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado ocular relacionado con TNF α en un sujeto que lo necesita, en donde dicho estado es ojo seco, conjuntivitis alérgica o inflamación ocular.
3. Un ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos, comprendiendo el ARN de interferencia: una hebra de nucleótidos sentido, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos; en donde la hebra antisentido hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comienza en el nucleótido 124, 328, 387, 391, 393, 395, 406, 421, 423, 444, 447, 455, 459, 460, 467, 469, 470, 471, 475, 479, 513, 517, 531, 543, 556, 576, 587, 588, 589, 595, 601, 602, 611, 612, 651, 664, 667, 668, 669, 677, 678, 785, 786, 788, 791, 792, 804, 813, 824, 838, 843, 877, 884, 929, 959, 960, 961, 963, 964, 965, 970, 973, 974, 1000, 1002, 1013, 1026, 1053, 1056, 1057, 1058, 1161, 1315, 1318, 1324, 1357, 1360, 1383, 1393, 1420, 1471, 1573, 1671, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2089, 2090, 2091 ó 2092 para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado ocular relacionado con TNF α en un sujeto que lo necesita, en donde dicho estado es ojo seco, conjuntivitis alérgica o inflamación ocular.
4. El ARN de interferencia para su uso según la reivindicación 2, que comprende además un segundo ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y que comprende: una hebra de nucleótidos sentido, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de complementariedad al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos; en donde la hebra antisentido del segundo ARN de interferencia hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comprende el nucleótido 124, 328, 387, 391, 393, 395, 406, 421, 423, 444, 447, 455, 459, 460, 467, 469, 470, 471, 475, 479, 513, 517, 531, 543, 556, 576, 587, 588, 589, 595, 601, 602, 611, 612, 651, 664, 667, 668, 669, 677, 678, 785, 786, 788, 791, 792, 804, 813, 824, 838, 843, 877, 884, 929, 959, 960, 961, 963, 964, 965, 970, 973, 974, 1000, 1002, 1013, 1026, 1053, 1056, 1057, 1058, 1161, 1315, 1318, 1324, 1357, 1360, 1383, 1393, 1420, 1471, 1573, 1671, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2089, 2090, 2091 ó 2092.
5. El ARN de interferencia para su uso según la reivindicación 3, que comprende además un segundo ARN de interferencia que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos y que comprende: una hebra de nucleótidos sentido, una hebra de nucleótidos antisentido y una región de complementariedad al menos casi perfecta de al menos 19 nucleótidos; en donde la hebra antisentido del segundo ARN de interferencia hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 2 que comprende el nucleótido 297, 333, 334, 335, 434, 470, 493, 547, 570, 573, 618, 649, 689, 755, 842, 844, 846, 860, 878, 894, 900, 909, 910, 913, 942, 970, 984, 1002, 1010, 1053, 1064, 1137, 1162, 1215, 1330, 1334, 1340, 1386, 1393, 1428, 1505, 1508, 1541, 1553, 1557, 1591, 1592, 1593, 1597, 1604, 1605, 1626, 1632, 1658, 1661, 1691, 1794, 1856, 1945, 1946, 1947, 1958, 2022, 2094, 2100, 2121, 2263, 2277, 2347, 2349, 2549, 2578, 2595, 2606, 2608, 2629, 2639, 2764, 2766, 2767, 2769, 3027, 3028, 3261, 3264, 3284, 3313, 3317, 3332 ó 3337, en donde el ARN de interferencia es para su administración al ojo del sujeto.
6. El ARN de interferencia para su uso según la reivindicación 2 ó 3, en donde la hebra de nucleótidos sentido y la hebra de nucleótidos antisentido están conectadas por una hebra de nucleótidos en bucle.
7. Una molécula de ARNip bicatenario que regula por disminución la expresión de un gen de TACE mediante interferencia de ARN, en donde: cada hebra de la molécula de ARNip tiene independientemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 27 nucleótidos de longitud; y una hebra de la molécula de ARNip comprende una secuencia de nucleótidos que tiene complementariedad sustancial con un ARNm correspondiente al gen de TACE de manera que la molécula de ARNip dirige la escisión del ARNm mediante interferencia de ARN para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado ocular relacionado con TNF α en un sujeto que lo necesita, en donde dicho estado es ojo seco, conjuntivitis alérgica o inflamación ocular.

8. Una molécula de ARNip bicatenario que regula por disminución la expresión de un gen de TNFR1 mediante interferencia de ARN, en la que: cada hebra de la molécula de ARNip tiene independientemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 27 nucleótidos de longitud; y una hebra de la molécula de ARNip comprende una secuencia de nucleótidos que tiene complementariedad sustancial con un ARNm correspondiente al gen de TNFR1 de manera que la molécula de ARNip dirige la escisión del ARNm mediante interferencia de ARN, para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado ocular relacionado con TNF α en un sujeto que lo necesita, en donde dicho estado es ojo seco, conjuntivitis alérgica o inflamación ocular.
9. Un ARN de interferencia monocatenario que tiene una longitud de 19 a 49 nucleótidos, en donde el ARN de interferencia monocatenario hibrida en condiciones fisiológicas con una parte del ARNm que corresponde a SEQ ID NO: 1 que comprende el nucleótido 297, 333, 334, 335, 434, 470, 493, 547, 570, 573, 618, 649, 689, 755, 842, 844, 846, 860, 878, 894, 900, 909, 910, 913, 942, 970, 984, 1002, 1010, 1053, 1064, 1137, 1162, 1215, 1330, 1334, 1340, 1386, 1393, 1428, 1505, 1508, 1541, 1553, 1557, 1591, 1592, 1593, 1597, 1604, 1605, 1626, 1632, 1658, 1661, 1691, 1794, 1856, 1945, 1946, 1947, 1958, 2022, 2094, 2100, 2121, 2263, 2277, 2347, 2349, 2549, 2578, 2595, 2606, 2608, 2629, 2639, 2764, 2766, 2767, 2769, 3027, 3028, 3261, 3264, 3284, 3313, 3317, 3332 ó 3337, y el ARN de interferencia tiene una región de complementariedad contigua al menos casi perfecta con la parte hibridante del ARNm correspondiente a SEQ ID NO: 1, para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado ocular relacionado con TNF α en un sujeto que lo necesita, en donde dicho estado es ojo seco, conjuntivitis alérgica o inflamación ocular.
10. El ARN de interferencia para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el ARN de interferencia se administra mediante expresión *in vivo* desde un vector de expresión que puede expresar el ARN de interferencia.
11. El ARN de interferencia para su uso según la reivindicación 3, en donde el ARN de interferencia se administra mediante un vector de expresión que puede expresar el ARN de interferencia *in vivo*, y en donde cada hebra de la molécula de ARNip tiene independientemente de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 21 nucleótidos de longitud.
12. El ARN de interferencia para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 10 y 11, en donde el ARN de interferencia es un ARNhp o un ARNip.

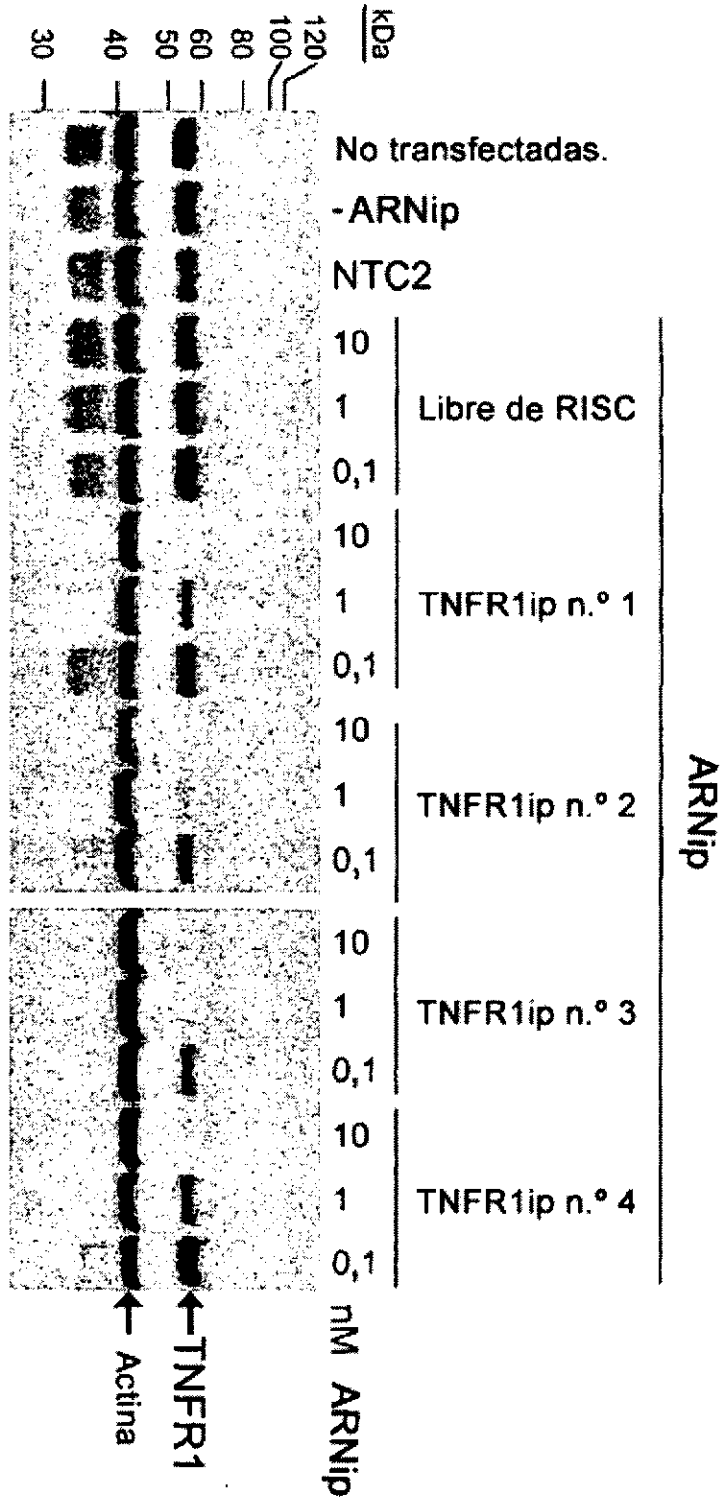


Figura 1