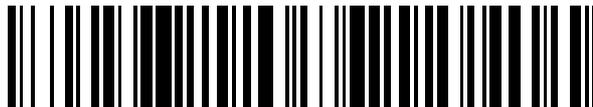


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 416**

51 Int. Cl.:

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2008 E 08827097 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2186528**

54 Título: **Producto farmacéutico que contiene un inhibidor de la expresión de HIF-1 alfa y HIF-2 alfa**

30 Prioridad:

06.08.2007 JP 2007204585

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

22.05.2014

73 Titular/es:

**SENJU PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
5-8, HIRANOMACHI 2-CHOME CHUO-KU
OSAKA-SHI, OSAKA 541-0046, JP**

72 Inventor/es:

**NAKAJIMA, TAKESHI;
NAKAJIMA, EMI y
AZUMA, MITSUYOSHI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 462 416 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

Producto farmacéutico que contiene un inhibidor de la expresión de HIF-1 alfa y HIF-2 alfa

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un medicamento que contiene una sustancia inhibidora de la expresión de HIF-1 α y HIF-2 α . Más particularmente, la presente invención se refiere a un agente terapéutico para enfermedades de la retina, que contiene un ácido nucleico capaz de inducir ARN interferente y similares.

Técnica anterior

10 Los factores inducibles por hipoxia 1 y 2 (HIF-1 y HIF-2) son heterodímeros que consisten en las subunidades α y β , y son factores de transcripción que tienen un dominio de hélice-bucle-hélice básica (bHLH) y un dominio PAS en común. La expresión y la actividad transcritora de HIF se incrementa notablemente cuando la concentración intracelular de oxígeno disminuye. El VEGF (factor de crecimiento celular endotelial vascular), la eritropoyetina, el transportador de glucosa y un gen que codifica la enzima de la glucólisis y similares (véase el documento no patente 1) se han identificado como genes diana transactivados por HIF.

15 La retinopatía diabética y la degeneración macular relacionada con la edad son enfermedades causadas por un factor que producen ceguera adquirida, y actualmente se desea el desarrollo de un medicamento que inhiba la angiogénesis que se observa en ambas enfermedades. En particular, se conoce que un aumento intraocular de VEGF es una de las causas de la inducción de la angiogénesis, y algunos antagonistas de VEGF están en desarrollo. HIF es un factor de transcripción que controla la expresión de VEGF, y se espera que un inhibidor de HIF también sea un agente inhibidor de la angiogénesis.

20 Estudios que utilizan ARNip (ARN interferente pequeño, del inglés siRNA) como inhibidor de HIF han reportado que la expresión de VEGF es inhibida por ARNip para HIF-1 α en células HeLa, células Hep3B y células Kelly (véase el documento no patente 2). Además, también se ha informado de que solo el ARNip para HIF-1 α inhibe la inducción de la expresión de VEGF debido a hipoxia en las células de cáncer de mama (MDA468), y no se produce una inhibición con ARNip para HIF-2 α (véase el documento no patente 3). Incluso cuando se utilizaron los ARNip para isoformas tanto de HIF-1 α como de 2 α en este sistema experimental, la inducción de la expresión de VEGF se inhibió solo hasta el mismo nivel que con el uso exclusivo de ARNip para HIF-1 α . En contraste, unos informes han documentado que solo el ARNip para HIF-2 α inhibe la inducción de la expresión de VEGF debido a hipoxia en células de cáncer de riñón (786-O), y el ARNip tanto para HIF-1 α como 2 α inhibe la expresión de VEGF en células de cáncer de riñón (Caki-1) que tienen un gen inhibidor tumoral VHL (von Hippel-Lindau) (véase el documento no patente 4). Tal y como se ha mencionado anteriormente, cuál de las dos isoformas de HIF está intensamente implicada en la producción de VEGF se considera que varía dependiendo de la célula.

35 Hasta ahora, se ha descrito el uso de ARNip y antisentido para HIF-1 α como un fármaco terapéutico contra la degeneración macular relacionada con la edad y la retinopatía diabética (véanse los documentos de patente 1 - 3). Sin embargo, el uso de ARNip y antisentido para HIF-2 α no se ha descrito según los conocimientos de los presentes inventores. Además, no se ha reportado que la inhibición de ambas isoformas HIF-1 α y HIF-2 α mejora notablemente la acción supresora de la producción de VEGF, en comparación con la inhibición de una de las isoformas, ni se ha reportado el uso de una composición que contiene ARNip(s) o antisentido(s) para ambas isoformas HIF-1 α y HIF-2 α contra enfermedades de la retina.

documento de patente 1: WO2007/002718

40 documento de patente 2: WO2004/042024

documento de patente 3: WO2006/050734

documento no patente 1: Semenza GL (1999), Ann. Rev. Cell. Dev. Biol. 15: 551-578

documento no patente 2: Christina W et al (2004) FASEB J 12: 1462-1464

documento no patente 3: Heidi MS et al (2004) Cancer Res 63: 6130-6134

45 documento no patente 4: Raju RR et al (2005) Molecular and Cellular Biology 25: 5675-5686

Descripción de la invención

Problemas que debe resolver la invención

50 Un objeto de la presente invención es proporcionar un producto farmacéutico que muestra un efecto terapéutico elevado en el tratamiento de enfermedades de la retina asociadas con la angiogénesis, tales como la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética y similares.

Medios para resolver los problemas

Teniendo en cuenta los problemas mencionados anteriormente, los presentes inventores han realizado estudios exhaustivos y han encontrado que la inhibición de ambas isoformas mediante la reacción de células del epitelio pigmentario de la retina con ARNip para HIF-1 α y ARNip para HIF-2 α , inhibe notablemente más la producción de VEGF que mediante la acción de ARNip para solo una de las isoformas, lo que dio como resultado la realización de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención es como se describe a continuación.

[1] Un agente terapéutico para una enfermedad de la retina, que comprende una sustancia que inhibe específicamente la expresión de HIF-1 α y una sustancia que inhibe específicamente la expresión de HIF-2 α , en donde la sustancia inhibidora mencionada anteriormente es ARNip.

[2] El agente terapéutico del apartado [1] mencionado anteriormente, en el que el ARNip mencionado anteriormente para HIF-1 α consiste en una cadena codificante que comprende una secuencia de 17 - 25 bases continuas de ARNm que se corresponde con la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 y una cadena no codificante, no codificante, que comprende una secuencia complementaria a la misma, y el ARNip mencionado anteriormente para HIF-2 α consiste en una cadena codificante que comprende una secuencia de 17 - 25 bases continuas de ARNm que se corresponde con la secuencia de bases de SEQ ID NO: 3 y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma.

[3] El agente terapéutico del apartado [2] mencionado anteriormente, en el que el ARNip mencionado anteriormente para HIF-1 α es el apartado (a) o (b) siguiente, y el ARNip para HIF-2 α es el apartado (c) o (d) siguiente:

(a) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NO: 17 - 20 y 31, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-1 α ;

(b) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases en donde una a varias bases se han añadido y/o se han eliminado del extremo 5' terminal y/o del extremo 3' terminal de la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 17 - 20 y 31, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-1 α ;

(c) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NO: 21, 22 y 35, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-2 α ;

(d) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases en la que una a varias bases se han añadido y/o se han eliminado del extremo 5' terminal y/o el extremo 3' terminal de la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 21, 22 y 35, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-2 α .

[4] El agente terapéutico de los apartados [2] o [3] mencionados anteriormente, en el que el ARNip mencionado anteriormente para HIF-1 α es cualquiera de los apartados (1-1) - (1-5) siguientes, y el ARNip para HIF- 2 α es cualquiera de los apartados (2-1) - (2-3) siguientes:

(1-1) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 5, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 11;

(1-2) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 6, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 12;

(1-3) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 7, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 13;

(1-4) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 8, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 14;

(1-5) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 29, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 30;

(2-1) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 9, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 15;

(2-2) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 10, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 16;

(2-3) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 33, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 34.

5 [5] El agente terapéutico de cualquiera de los apartados [1] - [4] mencionados anteriormente, en donde la enfermedad de la retina es la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética, la retinopatía del prematuro, la oclusión de la vena retiniana, la obstrucción de la arteria retiniana, el edema macular diabético o el glaucoma.

[6] El agente terapéutico del apartado [5] mencionado anteriormente, en el que la enfermedad de la retina es la degeneración macular relacionada con la edad o la retinopatía diabética.

10 [7] El uso de una sustancia que inhibe específicamente la expresión de HIF-1 α y de una sustancia que inhibe específicamente la expresión de HIF-2 α , para la producción de un agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad de la retina, en donde la sustancia inhibidora mencionada anteriormente es ARNip.

15 [8] El uso del apartado [7] mencionado anteriormente, en el que el ARNip mencionado anteriormente para HIF-1 α consiste en una cadena codificante que comprende una secuencia de 17 - 25 bases continuas de ARNm que se corresponde con la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, y el ARNip mencionado anteriormente para HIF-2 α consiste en una cadena codificante que comprende una secuencia de 17 - 25 bases continuas de ARNm que se corresponde con la secuencia de bases de SEQ ID NO: 3 y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma.

[9] El uso del apartado [8] mencionado anteriormente, en el que el ARNip mencionado anteriormente para HIF-1 α es el apartado (a) o (b) siguiente, y el ARNip para HIF-2 α es el apartado (c) o (d) siguiente:

20 (a) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 17 - 20 y 31, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-1 α ;

25 (b) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases en donde una a varias bases se han añadido y/o se han eliminado del extremo 5' terminal y/o del extremo 3' terminal de la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 17 - 20 y 31, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-1 α ;

30 (c) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NO: 21, 22 y 35, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-2 α ;

35 (d) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases en la que una a varias bases se han añadido y/o se han eliminado desde el extremo 5' terminal y/o del extremo 3' terminal de la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 21, 22 y 35, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-2 α

40 [10] El uso del apartado [8] o [9] mencionado anteriormente, en el que el ARNip mencionado anteriormente para HIF-1 α es cualquiera de los apartados (1-1) - (1-5) siguientes, y el ARNip para HIF-2 α es cualquiera de los apartados (2-1) - (2-3) siguientes:

(1-1) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 5, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 11;

(1-2) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 6, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 12;

45 (1-3) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 7, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 13;

(1-4) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 8, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 14;

50 (1-5) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 29, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 30;

(2-1) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 9, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 15;

(2-2) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 10, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 16;

(2-3) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 33, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 34.

5 [11] El uso de cualquiera de los apartados [7] - [10] mencionados anteriormente, en el que la enfermedad de la retina es la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética, la retinopatía del prematuro, la oclusión de la vena retiniana, la obstrucción de la arteria retiniana, el edema macular diabético o el glaucoma.

[12] El uso del apartado [11] mencionado anteriormente, en el que la enfermedad de la retina es la degeneración macular relacionada con la edad o la retinopatía diabética.

10 Efecto de la invención

Con el empleo del agente terapéutico para una enfermedad de la retina de la presente invención, el cual inhibe específicamente la expresión tanto de HIF-1 α como de HIF-2 α , se puede inhibir de manera eficaz la producción de VEGF en las células de la retina, en comparación con la inhibición de cualquiera de los dos. El efecto supresor sobre la producción de VEGF es sinérgico. Se puede esperar que el agente terapéutico para una enfermedad de la retina de la presente invención proporcione un efecto superior en comparación con los medicamentos de ácido nucleico convencionales.

Breve Descripción de los Dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra el nivel de expresión de HIF-1 α en células del EPR.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra el nivel de expresión de HIF-2 α en células del EPR.

20 La Fig. 3 es un gráfico que muestra el nivel de expresión de VEGF en células del EPR.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra el nivel de expresión de HIF-1 α en células del EPR.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra el nivel de expresión de HIF-2 α en células del EPR.

La Fig. 6 es un gráfico que muestra el nivel de expresión de VEGF en células del EPR.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra el nivel de expresión de VEGF en células del EPR.

25 Mejor modo de llevar a cabo la invención

El VEGF es un factor que actúa específicamente sobre los receptores (Flt-1, KDR/Flk-1, etc.) presentes en la superficie de las células endoteliales vasculares para incrementar la construcción de una red capilar sanguínea mediante el crecimiento, la migración y la formación de un lumen de células endoteliales vasculares, y tiene un papel extremadamente importante en el desarrollo de la angiogénesis (Ferrara, N. et al. *Kidney Int.* 1999, 56, 794-814). Además, se sabe que el VEGF es un factor importante para el control de la angiogénesis y la permeabilidad de los vasos sanguíneos en los tejidos oculares, y está implicado en enfermedades de la retina tales como la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética y similares (Shams, N. et al. *Ophthalmol. Clin. North. Am.* 2006, 19, 335-344). El agente terapéutico de la presente invención puede inhibir específicamente la expresión de HIF-1 α y HIF-2 α que controlan la expresión de VEGF aguas arriba, en las células obtenidas a partir de la retina, tales como células del epitelio pigmentario retinal, células de Müller y similares. Puesto que el agente terapéutico de la presente invención inhibe la producción de VEGF y controla el desarrollo de la angiogénesis, es útil como agente terapéutico para enfermedades de la retina, particularmente como agente terapéutico para enfermedades de la retina asociadas con la angiogénesis. Ejemplos específicos de enfermedades de la retina asociadas con la angiogénesis incluyen la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética, la retinopatía del prematuro, la oclusión de la vena retiniana, la obstrucción de la arteria retiniana, el edema macular diabético, el glaucoma (particularmente el glaucoma neovascular) y similares. Ya que es conocido que el aumento de VEGF en las células epiteliales del pigmento retinal es una de las causas de angiogénesis observada en la degeneración macular relacionada con la edad (Katrina et al. *Am. J. Pathol.* 2000, 157, 135-144), el agente terapéutico de la presente invención que muestra una acción inhibitoria mayor sobre la producción de VEGF en las células del epitelio pigmentario retinal, es particularmente útil como agente terapéutico para la degeneración macular relacionada con la edad.

En la presente invención, HIF-1 α y HIF-2 α son factores de transcripción obtenidos a partir de cualquier mamífero. Ejemplos de mamíferos incluyen seres humanos y mamíferos distintos de los seres humanos. Ejemplos de mamífero no humano incluyen animales experimentales tales como roedores (por ejemplo, ratón, rata, hámster, cobaya y similares), conejo y similares, animales domésticos tales como cerdo, vaca, cabra, caballo, oveja y similares, animales de compañía tales como perro, gato y similares, y primates tales como mono, orangután, chimpancé y similares. Para el tratamiento de enfermedades humanas, se prefiere HIF-1 α y HIF-2 α obtenidos a partir de ser humano. HIF-2 α también se denomina EPAS1 o HLF. Se conoce la secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos de HIF-1 α y de HIF-2 α humanos y, por ejemplo, la secuencia de bases (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID

NO: 2) de HIF-1 α (GenBank n $^{\circ}$ de orden NM_001530), y la secuencia de bases (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de HIF-2 α (GenBank n $^{\circ}$ de orden NM_001430) y similares están registradas y publicadas en GenBank.

5 El agente terapéutico de la presente invención contiene característicamente un ARNip que inhibe específicamente la expresión de HIF-1 α y un ARNip que inhibe específicamente la expresión de HIF-2 α .

10 La sustancia que inhibe específicamente la expresión de HIF-1 α , que está contenida en el agente terapéutico de la presente invención como un ingrediente activo, no está particularmente limitada mientras que actúe en el proceso de transcripción de HIF-1 α e inhiba específicamente la expresión del mismo y sea un ARNip para HIF-1 α . Además, la sustancia que inhibe específicamente la expresión de HIF-2 α , que está contenida en el agente terapéutico de la presente invención como un ingrediente activo, no está particularmente limitada mientras que actúe en el proceso de transcripción de HIF-2 α e inhiba específicamente la expresión del mismo y sea un ARNip para HIF-2 α . La sustancia inhibidora que se describe también es esta memoria incluye un ácido nucleico que induce ARNi, un ácido nucleico antisentido y una ribozima, y un vector de expresión de los mismos.

15 El ácido nucleico que induce ARNi mencionado anteriormente se refiere a un polinucleótido capaz de inducir ARN interferente al ser introducido en la célula, y es preferiblemente ARN o una molécula quimérica de ARN y ADN. El ARN interferente se refiere a un efecto del ARN que tiene una estructura de doble cadena que contiene la misma secuencia de bases que el ARNm (o una secuencia parcial de la misma) para inhibir la expresión del ARNm. Para conseguir el efecto del ARNi, por ejemplo, se utiliza preferentemente ARN que tiene una estructura de doble cadena que contiene la misma secuencia de bases que el ARNm diana, con al menos 19 bases contiguas (o una secuencia parcial de la misma). Mientras que muestre una actividad inhibidora de la expresión de HIF-1 α o HIF-2 α , se pueden sustituir varias bases del mismo o se puede utilizar un ARN más corto que las 19 bases de longitud. La estructura de doble cadena puede consistir en diferentes hebras de una cadena codificante y una cadena no codificante, o puede ser una cadena doble (ARNsh) formada por una estructura de bucle de tallo de un ARN. Ejemplos del ácido nucleico que induce ARNi incluyen ARNip, ARNmi y similares.

25 Teniendo en cuenta la fuerte actividad inhibidora de la transcripción, el ácido nucleico que induce el ARNi es preferentemente ARNip. El ARNip para HIF-1 α o HIF-2 α se puede dirigir a cualquier parte del ARNm de HIF-1 α o HIF-2 α . La molécula de ARNip para HIF-1 α o HIF-2 α no está particularmente limitada mientras que pueda inducir un efecto de ARNi y tiene, por ejemplo, 17 - 25 bases de longitud, preferiblemente 17 - 23 bases de longitud, más preferiblemente 17 - 21 bases de longitud. El ARNip para HIF-1 α o HIF-2 α es una cadena doble que contiene una cadena codificante y una cadena no codificante. Específicamente, el ARNip para HIF-1 α consiste en una cadena codificante que comprende una secuencia de 17 - 25 bases contiguas (preferiblemente 17 - 23, más preferiblemente 17 - 21) de ARNm que se corresponde con la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma. Preferiblemente, consiste en una cadena codificante que comprende una secuencia de 17 - 25 bases contiguas (preferiblemente 17 - 23, más preferiblemente 17 - 21) que se dirigen a la posición 906 $^{\text{a}}$ hasta 1478 $^{\text{a}}$ de SEQ ID NO: 1 y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma. El ARNip para HIF-2 α consiste en una cadena codificante que comprende una secuencia de 17 - 25 bases contiguas (preferiblemente 17 - 23, más preferiblemente 17 - 21) de ARNm que se corresponde con la secuencia de bases de SEQ ID NO: 3 y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma. Preferiblemente, consiste en una cadena codificante que comprende una secuencia de 17 - 25 bases contiguas (preferiblemente 17 - 23, más preferiblemente 17 - 21) que se dirigen a la posición 580 $^{\text{a}}$ hasta 4242 $^{\text{a}}$ de SEQ ID NO: 3 y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma. El ARNip para HIF-1 α o HIF-2 α tiene opcionalmente un extremo protuberante 5' terminal o 3' terminal en una o en ambas cadenas, cadena codificante y cadena no codificante. El extremo protuberante se forma por la adición de una a varias bases (por ejemplo, 1, 2 o 3) al extremo de la cadena codificante y/o de la cadena no codificante. El método para diseñar el ARNip es conocido por los expertos normales en la técnica, y una secuencia de bases apropiada de ARNip se puede seleccionar a partir de las secuencias de bases mencionadas anteriormente, mediante el uso de diversos programas informáticos de diseño o algoritmos de ARNip. Puesto que los ARNm de HIF-1 α y HIF-2 α son muy homólogos, también se puede seleccionar un ARNip capaz de dismantelar simultáneamente los dos ARNm. En este caso, el ácido nucleico contenido en el agente terapéutico de la presente invención puede ser de un tipo.

50 (1) ARNip para HIF-1 α

Una secuencia de ARNip específica para HIF-1 α es preferiblemente un ARN bicatenario definido por los siguientes apartados (a) o (b) basándose en la secuencia de bases de las SEQ ID NO: 17 - 20 o 31 siguientes.

55 (a) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 17 - 20 y 31, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que tiene opcionalmente un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-1 α ;

(b) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases en donde una a varias bases se han añadido y/o se han eliminado del extremo 5' terminal y/o del extremo 3' terminal de la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 17 - 20 y 31, y una cadena no codificante que compren-

de una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-1 α . Aquí, la adición y/o la delección de una a varias bases (por ejemplo, 1 - 5, preferiblemente 1 - 3, más preferiblemente 1 o 2) en el extremo 5' terminal y/o 3' terminal de la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 17 - 20 y 31, se puede lograr de tal manera que se asegura la identidad con una secuencia de bases parcial de una cadena codificante que codifica un gen de HIF-1 α y de una cadena no codificante de la misma, a fin de conservar la actividad inhibidora de la expresión de HIF-1 α .

Tabla 1

ARNip	Cadena codificante (SEQ ID NO)	Cadena no codificante* (SEQ ID NO)
HIF-1 α	5' -ggaac cugau gcuuu aacu-3' (17)	5' -aguua aagca ucagg uucc-3' (23)
HIF-1 α	5' -gggua aagaa caaaa caca-3' (18)	5' -ugugu uuugu ucuuu accc-3' (24)
HIF-1 α	5' -ggcag cagaa accua cugc-3' (19)	5' -gcagu agguu ucugc ugcc-3' (25)
HIF-1 α	5' -gcacg acuug auuuu cucc-3' (20)	5' -ggaga aauc aaguc gugc-3' (26)
HIF-1 α	5' -ccuca gugug gguau aaga-3' (31)	5' -ucuuu uacc acacu gagg-3' (32)

* la secuencia de la cadena no codificante es una realización para la secuencia de la cadena codificadora en la columna de la izquierda

De los ARNip para HIF-1 α , el ARNip que tiene un extremo protuberante es preferiblemente uno de los siguientes apartados (1-1) - (1-5) (el subrayado muestra el extremo protuberante):

(1-1) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 5 (5'-ggaac cugau gcuuu aacut-3'), y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 11 (5'-aguua aagca ucagg uucct-3');

(1-2) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 6 (5'-gggua aagaa caaaa cacatt-3'), y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 12 (5'-ugugu uuugu ucuuu accct-3');

(1-3) u un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID N °: 7 (5'-ggcagcagaaaccuacugct-3'), y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 13 (5'-gcaguagguuucugcugcct-3');

(1-4) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 8 (5'-gcacgacuugauuuucucct-3'), y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 14 (5'-ggagaaaucagucgugctg-3');

(1-5) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 29 (5'-ccucaguggguauaagatt-3'), y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 30 (5'-ucuuauaccacacugaggtt-3').

(2) ARNip para HIF-2 α

Una secuencia de ARNip específica para HIF-2 α es preferiblemente un ARN bicatenario definido por los apartados (c) o (d) siguientes basándose en la secuencia de bases de las siguientes SEQ ID NO: 21, 22 o 35.

(c) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NO: 21, 22 y 35, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-2 α ;

(d) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases en donde una a varias bases se han añadido y/o se han eliminado del extremo 5' terminal y/o del extremo 3' terminal de la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NO: 21, 22 y 35, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-2 α . Aquí, la adición y/o la delección de una a varias bases (por ejemplo, 1 - 5, preferiblemente 1 - 3, más preferiblemente 1 o 2) en el extremo 5' terminal y/o 3' terminal de la secuencia de bases, descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 21, 22 y 35, se puede lograr de tal manera que se asegura la identidad con una secuencia de bases parcial de una cadena codificante que codifica un gen de HIF-2 α y una cadena no codificante de la misma, a fin de conservar la actividad inhibidora de la expresión de HIF-2 α .

Tabla 2

ARNip	Cadena codificante (SEQ ID NO)	Cadena no codificante* (SEQ ID NO)
HIF-2 α	5' -cggag guguu cuaug agcu-3' (21)	5' -agcuc auaga acacc uccg-3' (27)
HIF-2 α	5' -gguuu uguug cuagc ccuu-3' (22)	5' -aaggg cuagc aaca aacc-3' (28)
HIF-2 α	5' -ggaca uagua ucuuu gacu-3' (35)	5' -aguca aagau acua gucc-3' (36)

* la secuencia de la cadena no codificante es una realización para la secuencia de la cadena codificante en la columna de la izquierda

- 5 De los ARNip para HIF-2 α , el ARNip que tiene un extremo protuberante es preferiblemente uno de los apartados (2-1) - (2-3) siguientes (el subrayado muestra el extremo protuberante):
- (2-1) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 9 (5'-cggag guguu cuaug agcutt-3'), y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 15 (5'-agcuc auaga acacc uccgtc-3');
- 10 (2-2) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 10 (5'-gguuu uguug cuagc ccuutt-3'), y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 16 (5'-aaggg cuagc aaca aacctt-3');
- (2-3) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 33 (5'-ggaca uagua ucuuu gacutt-3'), y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 34 (5'-aguca aagau acua gucctg-3').
- 15 El ácido nucleico antisentido para HIF-1 α o el ácido nucleico antisentido para HIF-2 α se refiere a un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases capaz de hibridarse, en condiciones fisiológicas, con un producto de la transcripción de células que expresan productos de la transcripción (ARNm o un producto inicial de la transcripción) de HIF-1 α o HIF-2 α , el cual puede inhibir la traducción del polipéptido codificado por el producto de la transcripción en un estado hibridado. El tipo de ácido nucleico antisentido puede ser ADN o ARN, o una quimera de ADN/ARN. El
- 20 ácido nucleico antisentido puede tener un enlace fosfodiéster de tipo natural o puede ser un nucleótido modificado tal como del tipo ácido tiofosfórico (P=O del enlace fosfato está sustituido por P=S), de tipo de 2'-O-metilo, que son estables frente a enzimas degradantes y similares. Otros elementos importantes para el diseño del ácido nucleico antisentido incluyen una mejora de la solubilidad en agua y la permeabilidad de la membrana celular y similares, y esto también se puede superar mediante un diseño en forma de dosificación, tal como el uso de liposomas y microesferas y similares. La longitud del ácido nucleico antisentido no está particularmente limitada siempre y cuando sea posible una hibridación específica con los productos de la transcripción de HIF-1 α o HIF-2 α (por ejemplo, ARNm correspondiente a la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3). Una secuencia corta puede contener
- 25 aproximadamente 15 bases, y una secuencia larga puede contener una secuencia complementaria a la secuencia completa del producto de la transcripción. Considerando la facilidad de la síntesis, el problema de la antigenicidad y similares se puede mencionar, por ejemplo, un oligonucleótido que consiste en aproximadamente 15 bases o más, preferiblemente aproximadamente de 15 a aproximadamente 30 bases, más preferiblemente de aproximadamente 18 bases a aproximadamente 30 bases. Además, el ácido nucleico antisentido puede ser uno que no solo inhibe la traducción mediante la hibridación con un producto de la transcripción de HIF-1 α o HIF-2 α , sino que también puede
- 30 inhibir la transcripción a ARNm mediante la unión con ADN bicatenario para formar una cadena triple (triplex). El ácido nucleico antisentido para HIF-1 α contiene preferiblemente la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NO: secuencia de bases 1 descrita en cualquiera de las SEQ ID NOs: 21, 22 y 35 - 20, 23 - 26, 31 y 32 (cuando el ácido nucleico antisentido es ADN, U es T). El ácido nucleico antisentido para HIF-2 α contiene preferiblemente la secuencia de bases descrita en cualquiera de las SEQ ID NOs: 21, 22, secuencia de bases 2 descrita en cualquiera de las SEQ ID NOs: 21, 22 y 35, 28, 35 y 36 (cuando el ácido nucleico antisentido es ADN, U es T).
- 35
- 40 En la presente memoria descriptiva, ser "complementaria" significa tener una complementariedad que no sea menor de aproximadamente 70%, preferiblemente no menor de aproximadamente 80%, más preferiblemente no menor de aproximadamente 90%, más preferiblemente no menor de aproximadamente 95%, lo más preferiblemente 100%, entre las secuencias de bases. La homología de la secuencia de bases en la presente memoria descriptiva se puede calcular con arreglo a las siguientes condiciones (valor esperado = 10; los huecos están permitidos; filtrado = ON; puntuación de apareamiento = 1; puntuación de desapareamiento = -3), utilizando un algoritmo de puntuación de la homología NCBI BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología).
- 45
- La "ribozima" mencionada anteriormente se refiere a ARN que tiene actividad enzimática para la escisión del ácido nucleico, pero la presente memoria descriptiva también incluye ADN, siempre y cuando haya una actividad enzimática específica de la secuencia para la escisión de ácido nucleico, ya que recientemente se ha aclarado que el oligoADN que tiene una secuencia de bases del sitio activo de la enzima, muestra de manera similar una actividad de escisión de ácido nucleico. Para ser precisos, la ribozima puede escindir específicamente ARNm que codifica HIF-1 α
- 50

o HIF-2 α o un producto inicial de la transcripción, dentro de la región codificadora (que incluye un sitio de intrón en caso de ser un producto inicial de la transcripción). La ribozima que tiene una mayor utilidad incluye ARN que realiza el mismo el corte y empalme observado en ARN infeccioso, tal como un viroide, virusoide y similar, y el tipo cabeza de martillo, tipo horquilla y similares son conocidos. El tipo cabeza de martillo presenta una actividad enzimática con aproximadamente 40 bases, y puede escindir específicamente solo un ARNm diana mediante la formación, con varias bases en ambos extremos (un total de aproximadamente 10 bases) adyacentes a la estructura de cabeza de martillo, de secuencias complementarias a los sitios de escisión deseados del ARNm. Cuando se utiliza la ribozima en forma de un vector de expresión que contiene un ADN que lo codifica, para favorecer la transferencia de un producto de la transcripción al citoplasma, también se puede formar una ribozima híbrida en la que se liga una secuencia de ARNt alterado (Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2788 (2001)).

Las sustancias inhibitoras específicas de HIF-1 α y HIF-2 α también se pueden proporcionar como vectores de expresión. Tales vectores de expresión contienen polinucleótidos que codifican sustancias inhibitoras específicas de HIF-1 α y HIF-2 α , y promotores ligados funcionalmente a los polinucleótidos.

El promotor mencionado anteriormente se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el tipo de ácido nucleico de la diana de expresión bajo su control y se pueden mencionar, por ejemplo, los promotores polIII (por ejemplo, promotor de ARNt, promotor U6, promotor H1), los promotores de mamífero (por ejemplo, promotor CMV, promotor CAG, promotor SV40).

El vector de expresión de la presente invención puede contener además un gen marcador para selección (gen que imparte resistencia a fármacos tales como tetraciclina, ampicilina, kanamicina, higromicina, fosfinotricina y similares, gen que complementa una mutación auxotrófica, etc.).

La estructura principal del vector de expresión de la presente invención no está particularmente limitada, siempre y cuando se puedan producir sustancias inhibitoras específicas de HIF-1 α y HIF-2 α en células de mamífero (humanas y similares). Por ejemplo, se puede mencionar un vector plasmídico y un vector vírico. Como vector preferible para la administración a mamíferos, se pueden mencionar vectores víricos tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, virus variolavacunal, virus de la viruela, virus de la polio, virus Sindbis, virus hemaglutinante de Japón y similares. Entre estos, se prefieren los vectores víricos obtenidos a partir de retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado o virus variolavacunal.

Como la dosis del agente terapéutico de la presente invención varía dependiendo del tipo o de la actividad del ingrediente activo, las especies animales que van a ser objeto de administración, la gravedad de la enfermedad del sujeto al que se va a administrar, la tolerancia a los fármacos, el peso corporal, la edad y similares, es por lo general desde aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1000 mg/kg para un adulto al día, en la cantidad de ingrediente activo.

El sujeto al que se va a administrar el agente terapéutico de la presente invención, incluye seres humanos y mamíferos distintos de los humanos, y ejemplos de mamíferos que no sean humanos incluyen animales de laboratorio, tales como roedores, como ratón, rata, hámster, conejillo de indias y similares, conejo y similares, animales domésticos tales como cerdo, vaca, cabra, caballo, oveja y similares, animales de compañía tales como perro, gato y similares, y primates tales como mono, orangután, chimpancé y similares.

El agente terapéutico de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral a los pacientes. La forma de administración es, por ejemplo, administración oral, administración tópica en el ojo (administración por instilación, administración intravítrea, administración subconjuntival, administración subtenoniana, etc.), administración intravenosa, administración transdérmica y similares, y, en caso necesario, se utiliza una forma de dosificación adecuada para la administración junto con un aditivo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de la forma de dosificación adecuada para la administración oral incluyen comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos y similares, y ejemplos de la forma de dosificación adecuada para la administración parenteral incluyen gotas para los ojos, pomada para los ojos, inyección, preparación adhesiva, loción, crema y similares. Se pueden preparar por técnicas convencionales utilizadas ampliamente en la técnica. La vía de administración y la forma de dosificación del agente terapéutico de la presente invención no están particularmente limitadas siempre y cuando se pueda proporcionar el efecto del tratamiento mencionado anteriormente. La vía de administración preferible es la administración tópica en el ojo, y la forma de dosificación de la misma es la inyección o gotas para los ojos.

Además, el agente terapéutico de la presente invención también se puede formular además de en forma de esas preparaciones, como una preparación para la implantación intraocular, preparación DDS (sistema de administración de fármacos) tal como una microesfera y similares.

Por ejemplo, cuando el agente terapéutico de la presente invención se usa como una inyección o gotas para los ojos, agentes estabilizantes (por ejemplo, bisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, edetato de sodio, citrato de sodio, ácido ascórbico, dibutilhidroxitolueno y similares), agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, macrogol, aceite de ricino hidrogenado y polioxietileno, y similares), agentes de suspensión (por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y similares), agentes emulsionantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona, lecitina de soja, lecitina de yema de huevo, aceite de ricino hidrogenado y polioxietileno, polisorbato 80 y similares), tampones (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón borato,

tampón carbonato, tampón citrato, tampón Tris, ácido glutámico, ácido épsilon-aminocaproico y similares), agentes espesantes (por ejemplo, derivados de celulosa hidrosolubles, tales como metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa y similares, sulfato de condroitina sódica, hialuronato de sodio, polímero de carboxivinilo, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, macrogol y similares), agentes conservantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, gluconato de clorhexidina, clorobutanol, alcohol bencílico, deshidroacetato de sodio, paraoxibenzoatos, edetato de sodio, ácido bórico y similares), agentes de isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerol, manitol, sorbitol, ácido bórico, glucosa, propilenglicol y similares), ajustadores de pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, ácido fosfórico, ácido acético y similares), agentes refrescantes (por ejemplo, 1-mentol, d-alcanfor, d-borneol, aceite de menta y similares), bases de ungüentos (vaselina blanca, lanolina purificada, parafina líquida, aceite vegetal (aceite de oliva, aceite de camelia, aceite de cacahuetes y similares) y similares, se pueden utilizar como aditivos. Aunque la cantidad de estos aditivos que se van a añadir varía dependiendo de la clase, el uso y similares de los aditivos que se van a añadir, se pueden añadir en concentraciones capaces de conseguir el objeto del aditivo.

El agente terapéutico de la presente invención también se puede formular usando un ácido nucleico tal como ARNip y similares, por un método de lipofección. Para el método de lipofección, se utiliza generalmente un liposoma preparado a base de fosfatidilserina. Ya que la fosfatidilserina tiene carga negativa, un lípido catiónico de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) (nombre comercial: TRANSFECTAM, Lipofectamina) que proporciona fácilmente liposomas más estables, se utiliza preferiblemente como un sustituto de la fosfatidilserina. Mediante la formación de un complejo de tal lípido catiónico y ácido nucleico que tiene una carga negativa, tal como ARNip y similares, un liposoma cargado positivamente en su conjunto se adsorbe a la superficie de células cargadas negativamente y se fusiona con la membrana celular, con lo que el ácido nucleico se puede introducir en las células.

Ejemplos

La presente invención se explica más detalladamente a continuación haciendo referencia a los Ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos.

Ejemplo de Formulación 1: Inyección para administración intravítrea

Una inyección para la administración intravítrea que se muestra a continuación, se prepara de acuerdo con un método convencional.

ARNip para HIF-1 α :

codificante-GGA ACC UGA UGC UUU AAC UTT (SEQ ID NO: 5) 1 mg
 antisentido-AGU UAA AGC AUC AGG UUC CTT (SEQ ID NO: 11) 1 mg

ARNip para HIF-2 α :

codificante-CGG AGG UGU UCU AUG AGC UTT (SEQ ID NO: 9) 1 mg
 antisentido-AGC UCA UAG AAC ACC UCC GTC (SEQ ID NO: 15) 1 mg

	dihidrógeno fosfato de sodio	0,1 g
35	cloruro de sodio	0,9 g
	hidróxido de sodio	e.q.
	agua purificada estéril	e.q.
	cantidad total	100 ml
		(pH 7)

Ejemplo de Formulación 2: Inyección para administración intravítrea

Una inyección para la administración intravítrea que se muestra a continuación, se prepara de acuerdo con un método convencional.

ARNip para HIF-1 α :

codificante-GGG UAA AGA ACA AAA CAC ATT (SEQ ID NO: 6) 0,1 mg
 antisentido-UGU GUU UUG UUC UUU ACC CTT (SEQ ID NO: 12) 0,1 mg

ARNip para HIF-2 α :

codificante-GGU UUU GUU GCU AGC CCU UTT (SEQ ID NO: 10) 0,1 mg

	antisentido-AAG GGC UAG CAA CAA AAC <u>CTT</u> (SEQ ID NO: 16)	0,1 mg
	dihidrógeno fosfato de sodio	0,1 g
	glicerol	2,5 g
	hidróxido de sodio	e.q.
5	<u>agua purificada estéril</u>	<u>e.q.</u>
	cantidad total	100 ml
		(pH 7)

Ejemplo de Formulación 3: Inyección para administración subtenoniana

10 Una inyección para la administración subtenoniana que se muestra a continuación, se prepara de acuerdo con un método convencional.

ARNip para HIF-1 α :

codificante-GGC AGC AGA AAC CUA CUG CTT (SEQ ID NO: 7) 5 mg

antisentido-GCA GUA GGU UUC UGC UGC CTT (SEQ ID NO: 13) 5 mg

ARNip para HIF-2 α :

15 codificante-GGA CAU AGU AUC UUU GAC UTT (SEQ ID NO: 33) 5 mg

antisentido-AGU CAA AGA UAC UAU GUC CTG (SEQ ID NO: 34) 5 mg

dihidrógeno fosfato de sodio 0,1 g

cloruro de sodio 0,9 g

hidróxido de sodio e.q.

20 agua purificada estéril e.q.

cantidad total 100 ml

(pH 7)

Ejemplo experimental 1: Efecto de ARNip para HIF sobre la inducción de la expresión de VEGF en células del epitelio pigmentario retinal (EPR)

25 1. Método

1) Transfección de ARNip para HIF a las células del EPR

30 Células EPR (ATCC, nombre de la célula: ARPE-19, n^o de catálogo: CRL-2302) se sembraron en una placa de 6 pocillos, se cultivaron hasta tener una densidad celular del 30-50%, y se cambiaron a un medio con poco suero (medio DMEM/F12 que contenía 0,1% de FBS, Invitrogen). Cada uno de los siguientes ARNip para HIF era un producto de Ambion (el subrayado muestra el extremo protuberante que consiste en la forma desoxi).

ARNip para HIF-1 α :

codificante-GGA ACC UGA UGC UUU AAC UTT (SEQ ID NO: 5),

antisentido-AGU UAA AGC AUC AGG UUC CTT (SEQ ID NO: 11),

ARNip para HIF-2 α :

35 codificante-CGG AGG UGU UCU AUG AGC UTT (SEQ ID NO: 9), y

antisentido-AGC UCA UAG AAC ACC UCC GTC (SEQ ID NO: 15)

40 Un complejo de un reactivo de transfección (RNAi MAX, Invitrogen) se formó agitando varios ARNips y reactivos de transfección en Opti-MEM (Invitrogen), seguido de una incubación durante 25 min. Posteriormente, las células del EPR se cultivaron en un medio controlado hasta tener una concentración final de cada ARNip de 5 nM durante 24 horas para transfectar el ARNip. La agrupación se realizó del modo siguiente.

(a) grupo de normoxia

(b) grupo de hipoxia

(c) grupo de hipoxia + grupo de fármacos (ARNip para HIF-1 α 5 nM)

(d) grupo de hipoxia + grupo de fármacos (ARNip para HIF-2 α 5 nM)

5 (e) grupo de hipoxia + grupo de fármacos (ARNip para HIF-1 α 5 nM + ARNip para HIF-2 α 5 nM)

2) Cultivo de células del EPR en el sistema de hipoxia

El ARNip para HIF se transfeció a células del EPR, y se sometieron a un cultivo hipóxico durante 1 día utilizando AnaeroPack for Cell (MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.) Las células cultivadas con una concentración normal de oxígeno se utilizaron como grupo de normoxia.

10 3) Extracción de ARN y PCR en tiempo real

El ARN total se extrajo con una solución de TRIzol (Invitrogen, nº de catálogo: 15596-026, 1 ml) a partir de las células del EPR sembradas en la placa de 6 pocillos. El método de extracción siguió el protocolo del folleto explicativo adjunto a la solución de TRIzol. A continuación, usando ADN libre (Ambion), se eliminó el ADN genómico contenido en el ARN total después de la extracción, y se realizó una reacción de transcripción inversa usando SuperScript II (Invitrogen) y un cebador aleatorio (Ambion). Después, la solución de ADNc obtenida se sometió a una reacción de PCR en tiempo real usando la mezcla TaqMan Universal PCR master (Applied Biosystems). Como cebador se utilizó un cebador para PCR en tiempo real TaqMan fabricado por Applied Biosystems (HIF-1 α : Hs00153153_m1, HIF-2 α : Hs01026142_m1, VEGF: Hs00173626_m1).

15

2. Resultados y discusión

20 Se examinó si la adición de cada uno de los ARNip para HIF-1 α , ARNip para HIF-2 α y ARNip mixto de las dos isoformas inhibía la hiperexpresión de VEGF debido a un tratamiento hipóxico, utilizando las células del EPR.

La Fig. 1 muestra el nivel de expresión de HIF-1 α . Con la adición de ARNip para HIF-1 α solo o ARNip mixto que consiste en las dos isoformas, se observó una inhibición de la expresión de HIF-1 α . Por otro lado, la Fig. 2 muestra el nivel de expresión de HIF-2 α , en donde la adición de ARNip para HIF-2 α solo, o ARNip mixto que consiste en las dos isoformas, mostró una inhibición de la expresión de HIF-2 α . En las mismas condiciones, se confirmó la inhibición de la expresión de VEGF, tal y como se muestra en la Fig. 3. Aunque la adición de ARNip para HIF-1 α de forma única mostraba una inhibición de la expresión de VEGF, el efecto supresor de la misma era insuficiente y era del 35%. Por otro lado, con el ARNip para HIF-2 α solo, no se observó en absoluto un efecto supresor. Sin embargo, un grupo suplementado con ambas isoformas tanto HIF-1 α como 2 α , mostró un efecto supresor de la expresión de VEGF notable, que ni siquiera se esperaba con una única adición, y la tasa de inhibición fue del 89%. Basándose de los resultados mencionados anteriormente, cuando se va a inhibir la angiogénesis en la retina mediante la inhibición de HIF, es deseable inhibir ambas isoformas, a diferencia de otras células.

25

Ejemplo Experimental 2: Efecto de ARNip para HIF sobre la inducción de la expresión de VEGF en células del epitelio pigmentario retinal (EPR)

35 1. Método

1) Transfección de ARNip para HIF a las células del EPR

Células del EPR (ATCC, nombre de la célula: ARPE-19, nº de catálogo: CRL-2302) se sembraron en una placa de 96 pocillos, y se cultivaron hasta tener una densidad celular del 30-50% para la transfección de ARNip. A continuación, el ARNip y un reactivo de transfección (RNAi MAX, Invitrogen) se agitaron en Opti-MEM (Invitrogen), y se incubaron durante 20 min para proporcionar un complejo de ARNip-RNAi MAX.

40

Los ARNip para HIF eran los siguientes productos de Ambion (se subraya el extremo protuberante que consiste en la forma desoxi).

ARNip para HIF-1 α :

codificante-CCU CAG UGU GGG UAU AAG ATT (SEQ ID NO: 29),

45 antisentido-UCU UAU ACC CAC ACU GAG GTT (SEQ ID NO: 30),

ARNip para HIF-2 α :

codificante-GGA CAU AGU AUC UUU GAC UTT (SEQ ID NO: 33), y

antisentido-AGU CAA AGA UAC UAU GUC CTG (SEQ ID NO: 34).

El medio se cambió a un medio exento de suero (medio DMEM o medio DMEM/F12, Invitrogen), se añadió cada uno de los ARNip a las células del EPR hasta tener una concentración final de 10 nM, y se realizó la transfección. La agrupación se realizó del modo siguiente.

(a) grupo de normoxia

5 (b) grupo de hipoxia

(c) grupo de hipoxia + grupo de fármacos (ARNip para HIF-1 α 5 nM)

(d) grupo de hipoxia + grupo de fármacos (ARNip para HIF-2 α 5 nM)

(e) grupo de hipoxia + grupo de fármacos (ARNip para HIF-1 α 5 nM + ARNip para HIF-2 α 5 nM)

2) Cultivo de células del EPR en el sistema de hipoxia

10 El ARNip para HIF se transfectó en células del EPR, y se sometió a un cultivo hipóxico durante 1 día utilizando AnaeroPack for Cell (MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.) para inducir la expresión de VEGF. Las células cultivadas con una concentración normal de oxígeno se utilizaron como grupo de normoxia.

3) Extracción de ARN y PCR en tiempo real

15 Después de completar el cultivo de hipoxia, el ARN total se extrajo con 50 μ L de solución de lisis (kit TaqMan Gene Expression Cell-to-CT, Applied Biosystems, n° de catálogo: AM1728) a partir de las células del EPR. El método de extracción siguió el protocolo del folleto explicativo adjunto a la solución de TRIzol. A continuación, se realizó una reacción de transcripción inversa utilizando 1x tampón RT y 1x mezcla enzimática RT (contenidos en el kit mencionado anteriormente) y la solución de ADNc obtenida se sometió a una reacción de PCR en tiempo real utilizando la mezcla TaqMan Gene Expression Master (contenida en el kit mencionado anteriormente). Como cebador se utilizó un cebador para PCR en tiempo real TaqMan fabricado por Applied Biosystems (HIF-1 α : Hs00153153_m1, HIF-2 α : Hs01026142_m1, VEGF: Hs00173626_m1).

20

2. Resultados y discusión

25 Se examinó si la adición de cada uno de ARNip para HIF-1 α , ARNip para HIF-2 α y ARNip mixto de las dos isoformas inhibía la hiperexpresión de VEGF debido a un tratamiento hipóxico, utilizando las células del EPR. La Fig. 4 muestra el nivel de expresión de HIF-1 α . Con la adición de ARNip para HIF-1 α solo o ARNip mixto que consiste en las dos isoformas, se observó una fuerte inhibición de la expresión de HIF-1 α . Por otro lado, la Fig. 5 muestra el nivel de expresión de HIF-2 α , en donde la adición de ARNip para HIF-2 α solo, o ARNip mixto que consiste en las dos isoformas, revelaba una inhibición de la expresión de HIF-2 α . En las mismas condiciones, se confirmó la inhibición de la expresión de VEGF tal y como se muestra en la Fig. 6. Un grupo suplementado con ARNip para HIF-1 α o ARNip para HIF-2 α por sí solo no mostró un efecto inhibitor de la expresión de VEGF. Por el contrario, un grupo suplementado con ARNip mixto que consistía en las dos isoformas, mostró un marcado efecto inhibitor de la expresión de VEGF.

30

Ejemplo Experimental 3: Efecto de ARNip para HIF sobre la inducción de la expresión de VEGF en células del epitelio pigmentario retinal (EPR)

35 1. Método

1) Transfección de ARNip para HIF a las células del EPR

El método experimental siguió el Ejemplo Experimental 2 y se realizó un experimento utilizando el siguiente ARNip de Ambion (se subrayan los extremos protuberantes que consisten en la forma desoxi).

ARNip para HIF-1 α :

40 codificante-gca cga cuu gau uuu cuc cTT (SEQ ID NO: 8),

antisentido-gga gaa aaU caa guc gug cTT (SEQ ID NO: 14),

ARNip para HIF-2 α :

codificante-ggu uuu guu g cu agc ccu uTT (SEQ ID NO: 10), y

antisentido-aag ggc uag caa caa caa cTC (SEQ ID NO: 16)

45 2. Resultados y discusión:

Como se muestra en la Fig. 7, un grupo suplementado con ARNip para HIF-1 α o ARNip para HIF-2 α por sí mismo no mostraba un efecto inhibitor de la expresión de VEGF. Por el contrario, un grupo suplementado con ARNip mixto

que consistía en las dos isoformas mostró claramente un fuerte efecto inhibidor de VEGF.

Aplicabilidad industrial

5 El agente terapéutico para una enfermedad de la retina de la presente invención puede inhibir de manera efectiva la producción de VEGF en las células de la retina, y se espera conseguir una eficacia superior de la dosis en el tratamiento de enfermedades de la retina asociadas con la angiogénesis, tales como la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética y similares, en comparación con los medicamentos de ácidos nucleicos convencionales.

Esta solicitud se basa en un documento de solicitud de patente nº 2007-204585 presentada en Japón (fecha de presentación: 6 de agosto de 2007).

10 Observaciones a la Lista de Secuencias

SEQ ID NO: 5: cadena codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 6: cadena codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 7: cadena codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 8: cadena codificante de ARNip para HIF-1 α humano

15 SEQ ID NO: 9: cadena codificante de ARNip para HIF-2 α humano

SEQ ID NO: 10: cadena codificante de ARNip para HIF-2 α humano

SEQ ID NO: 11: cadena no codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 12: cadena no codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 13: cadena no codificante de ARNip para HIF-1 α humano

20 SEQ ID NO: 14: cadena no codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 15: cadena no codificante de ARNip para HIF-2 α humano

SEQ ID NO: 16: cadena no codificante de ARNip para HIF-2 α humano

SEQ ID NO: 17: cadena codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 18: cadena codificante de ARNip para HIF-1 α humano

25 SEQ ID NO: 19: cadena codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 20: cadena codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 21: cadena codificante de ARNip para HIF-2 α humano

SEQ ID NO: 22: cadena codificante de ARNip para HIF-2 α humano

SEQ ID NO: 23: cadena no codificante de ARNip para HIF-1 α humano

30 SEQ ID NO: 24: cadena no codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 25: cadena no codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 26: cadena no codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 27: cadena no codificante de ARNip para HIF-2 α humano

SEQ ID NO: 28: cadena no codificante de ARNip para HIF-2 α humano

35 SEQ ID NO: 29: cadena codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 30: cadena no codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 31: cadena codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 32: cadena no codificante de ARNip para HIF-1 α humano

SEQ ID NO: 33: cadena codificante de ARNip para HIF-2 α humano

SEQ ID NO: 34: cadena no codificante de ARNip para HIF-2 α humano

SEQ ID NO: 35: cadena codificante de ARNip para HIF-2 α humano

SEQ ID NO: 36: cadena no codificante de ARNip para HIF-2 α humano

Listado de secuencias

5

<110> Senju Pharmaceutical Co., Ltd.

10

<120> Un medicamento que comprende sustancias para suprimir la expresión de HIF-1 alfa y HIF-2 alfa

<130> 091269

<150> JP-2007-204585

<151> 2007-08-06

15

<160> 36

<170> PatentIn version 3.3

20

<210> 1

<211> 3958

<212> DNA

<213> Homo sapiens

25

<220>

<221> CDS

<222> (285)..(2765)

30

<400> 1

ES 2 462 416 T3

gtgctgcctc gtctgagggg acaggaggat caccctcttc gtcgcttcgg ccagtgtgtc	60
gggctgggcc ctgacaagcc acctgaggag aggctcggag ccgggcccgg accccggcga	120
ttgccgcccg cttctctcta gtctcaagag gggtttcccg cctcgcaccc ccacctctgg	180
acttgccctt ccttctcttc tccgcgtgtg gagggagcca gcgcttaggc cggagcgagc	240
ctggggggccg cccgccgtga agacatcgcg gggaccgatt cacc atg gag ggc gcc	296
Met Glu Gly Ala 1	
ggc ggc gcg aac gac aag aaa aag ata agt tct gaa cgt cga aaa gaa	344
Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu Arg Arg Lys Glu	
5 10 15 20	
aag tct cga gat gca gcc aga tct cgg cga agt aaa gaa tct gaa gtt	392
Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys Glu Ser Glu Val	
25 30 35	
ttt tat gag ctt gct cat cag ttg cca ctt cca cat aat gtg agt tcg	440
Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His Asn Val Ser Ser	
40 45 50	
cat ctt gat aag gcc tct gtg atg agg ctt acc atc agc tat ttg cgt	488
His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg	
55 60 65	
gtg agg aaa ctt ctg gat gct ggt gat ttg gat att gaa gat gac atg	536
Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile Glu Asp Asp Met	
70 75 80	
aaa gca cag atg aat tgc ttt tat ttg aaa gcc ttg gat ggt ttt gtt	584
Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu Asp Gly Phe Val	

ES 2 462 416 T3

85	90	95	100	
atg gtt ctc aca gat gat ggt gac atg att tac att tct gat aat gtg Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile Ser Asp Asn Val 105 110 115				632
aac aaa tac atg gga tta act cag ttt gaa cta act gga cac agt gtg Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr Gly His Ser Val 120 125 130				680
ttt gat ttt act cat cca tgt gac cat gag gaa atg aga gaa atg ctt Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met Arg Glu Met Leu 135 140 145				728
aca cac aga aat ggc ctt gtg aaa aag ggt aaa gaa caa aac aca cag Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu Gln Asn Thr Gln 150 155 160				776
cga agc ttt ttt ctc aga atg aag tgt acc cta act agc cga gga aga Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr Ser Arg Gly Arg 165 170 175 180				824
act atg aac ata aag tct gca aca tgg aag gta ttg cac tgc aca ggc Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu His Cys Thr Gly 185 190 195				872
cac att cac gta tat gat acc aac agt aac caa cct cag tgt ggg tat His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro Gln Cys Gly Tyr 200 205 210				920
aag aaa cca cct atg acc tgc ttg gtg ctg att tgt gaa ccc att cct Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys Glu Pro Ile Pro 215 220 225				968
cac cca tca aat att gaa att cct tta gat agc aag act ttc ctc agt His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys Thr Phe Leu Ser 230 235 240				1016
cga cac agc ctg gat atg aaa ttt tct tat tgt gat gaa aga att acc Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp Glu Arg Ile Thr 245 250 255 260				1064
gaa ttg atg gga tat gag cca gaa gaa ctt tta ggc cgc tca att tat Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly Arg Ser Ile Tyr 265 270 275				1112
gaa tat tat cat gct ttg gac tct gat cat ctg acc aaa act cat cat Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr Lys Thr His His 280 285 290				1160
gat atg ttt act aaa gga caa gtc acc aca gga cag tac agg atg ctt Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln Tyr Arg Met Leu 295 300 305				1208
gcc aaa aga ggt gga tat gtc tgg gtt gaa act caa gca act gtc ata Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln Ala Thr Val Ile 310 315 320				1256
tat aac acc aag aat tct caa cca cag tgc att gta tgt gtg aat tac Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val Cys Val Asn Tyr 325 330 335 340				1304

ES 2 462 416 T3

gtt gtg agt ggt att att cag cac gac ttg att ttc tcc ctt caa caa	1352
Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe Ser Leu Gln Gln	
345 350 355	
aca gaa tgt gtc ctt aaa ccg gtt gaa tct tca gat atg aaa atg act	1400
Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp Met Lys Met Thr	
360 365 370	
cag cta ttc acc aaa gtt gaa tca gaa gat aca agt agc ctc ttt gac	1448
Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser Ser Leu Phe Asp	
375 380 385	
aaa ctt aag aag gaa cct gat gct tta act ttg ctg gcc cca gcc gct	1496
Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu Ala Pro Ala Ala	
390 395 400	
gga gac aca atc ata tct tta gat ttt ggc agc aac gac aca gaa act	1544
Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn Asp Thr Glu Thr	
405 410 415 420	
gat gac cag caa ctt gag gaa gta cca tta tat aat gat gta atg ctc	1592
Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn Asp Val Met Leu	
425 430 435	
ccc tca ccc aac gaa aaa tta cag aat ata aat ttg gca atg tct cca	1640
Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu Ala Met Ser Pro	
440 445 450	
tta ccc acc gct gaa acg cca aag cca ctt cga agt agt gct gac cct	1688
Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser Ser Ala Asp Pro	
455 460 465	
gca ctc aat caa gaa gtt gca tta aaa tta gaa cca aat cca gag tca	1736
Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro Asn Pro Glu Ser	
470 475 480	
ctg gaa ctt tct ttt acc atg ccc cag att cag gat cag aca cct agt	1784
Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp Gln Thr Pro Ser	
485 490 495 500	
cct tcc gat gga agc act aga caa agt tca cct gag cct aat agt ccc	1832
Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu Pro Asn Ser Pro	
505 510 515	
agt gaa tat tgt ttt tat gtg gat agt gat atg gtc aat gaa ttc aag	1880
Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val Asn Glu Phe Lys	
520 525 530	
ttg gaa ttg gta gaa aaa ctt ttt gct gaa gac aca gaa gca aag aac	1928
Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr Glu Ala Lys Asn	
535 540 545	
cca ttt tct act cag gac aca gat tta gac ttg gag atg tta gct ccc	1976
Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Ala Pro	
550 555 560	
tat atc cca atg gat gat gac ttc cag tta cgt tcc ttc gat cag ttg	2024
Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser Phe Asp Gln Leu	
565 570 575 580	

ES 2 462 416 T3

tca cca tta gaa agc agt tcc gca agc cct gaa agc gca agt cct caa	2072
Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser Ala Ser Pro Gln	
585 590 595	
agc aca gtt aca gta ttc cag cag act caa ata caa gaa cct act gct	2120
Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln Glu Pro Thr Ala	
600 605 610	
aat gcc acc act acc act gcc acc act gat gaa tta aaa aca gtg aca	2168
Asn Ala Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu Lys Thr Val Thr	
615 620 625	
aaa gac cgt atg gaa gac att aaa ata ttg att gca tct cca tct cct	2216
Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala Ser Pro Ser Pro	
630 635 640	
acc cac ata cat aaa gaa act act agt gcc aca tca tca cca tat aga	2264
Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser Ser Pro Tyr Arg	
645 650 655 660	
gat act caa agt cgg aca gcc tca cca aac aga gca gga aaa gga gtc	2312
Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala Gly Lys Gly Val	
665 670 675	
ata gaa cag aca gaa aaa tct cat cca aga agc cct aac gtg tta tct	2360
Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro Asn Val Leu Ser	
680 685 690	
gtc gct ttg agt caa aga act aca gtt cct gag gaa gaa cta aat cca	2408
Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu Glu Leu Asn Pro	
695 700 705	
aag ata cta gct ttg cag aat gct cag aga aag cga aaa atg gaa cat	2456
Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg Lys Met Glu His	
710 715 720	
gat ggt tca ctt ttt caa gca gta gga att gga aca tta tta cag cag	2504
Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr Leu Leu Gln Gln	
725 730 735 740	
cca gac gat cat gca gct act aca tca ctt tct tgg aaa cgt gta aaa	2552
Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp Lys Arg Val Lys	
745 750 755	
gga tgc aaa tct agt gaa cag aat gga atg gag caa aag aca att att	2600
Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln Lys Thr Ile Ile	
760 765 770	
tta ata ccc tct gat tta gca tgt aga ctg ctg ggg caa tca atg gat	2648
Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly Gln Ser Met Asp	
775 780 785	
gaa agt gga tta cca cag ctg acc agt tat gat tgt gaa gtt aat gct	2696
Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys Glu Val Asn Ala	
790 795 800	
cct ata caa ggc agc aga aac cta ctg cag ggt gaa gaa tta ctc aga	2744
Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu Glu Leu Leu Arg	
805 810 815 820	
gct ttg gat caa gtt aac tga gctttttctt aatttcattc ctttttttgg	2795

ES 2 462 416 T3

Ala Leu Asp Gln Val Asn
825

acactgggtgg ctactacct aaagcagtct atttatattt tctacatcta attttagaag 2855
cctggctaca atactgcaca aacttgggta gttcaatttt tgatccccctt tctacttaat 2915
ttacattaat gctctttttt agtatgttct ttaatgctgg atcacagaca gctcattttc 2975
tcagtttttt ggtatttaaa ccattgcatt gcagtagcat catttttaaaa aatgcacctt 3035
tttattttatt tatttttggc tagggagttt atcccttttt cgaattattt ttaagaagat 3095
gccaatataa tttttgtaag aaggcagtaa cttttcatca tgatcatagg cagttgaaaa 3155
atttttacac cttttttttc acattttaca taaataataa tgctttgccca gcagtagctg 3215
gtagccacaa ttgcacaata tattttctta aaaaatacca gcagttactc atggaatata 3275
ttctgcggtt ataaaactag tttttaagaa gaaatttttt ttggcctatg aaattgttaa 3335
acctggaaca tgacattggt aatcatataa taatgattct taaatgctgt atggtttatt 3395
atttaaatgg gtaaagccat ttacataata tagaaagata tgcatatata tagaaggat 3455
gtggcattta ttggataaa attctcaatt cagagaaatc atctgatggt tctatagtca 3515
ctttgccagc tcaaaagaaa acaataccct atgtagttgt ggaagtttat gctaatttg 3575
tgtaactgat attaaaccta aatgttctgc ctaccctggt ggtataaaga tttttgagc 3635
agactgtaaa caagaaaaaa aaaatcatgc attcttagca aaattgccta gtatgttaat 3695
ttgctcaaaa tacaatgttt gattttatgc actttgtcgc tattaacatc ctttttttca 3755
tgtagatttc aataattgag taattttaga agcattattt taggaatata tagttgtcac 3815
agtaaataatc ttgttttttc tatgtacatt gtacaaattt ttcattcctt ttgctctttg 3875
tggttggatc taacactaac tgtattgttt tgttacatca aataaacatc ttctgtggac 3935
caggaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 3958

<210> 2
<211> 826
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
1 5 10 15

Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
20 25 30

Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
35 40 45

10

ES 2 462 416 T3

Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
 50 55 60

Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
 65 70 75 80

Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
 85 90 95

Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
 100 105 110

Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
 115 120 125

Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
 130 135 140

Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
 145 150 155 160

Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
 165 170 175

Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu
 180 185 190

His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro
 195 200 205

Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys
 210 215 220

Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys
 225 230 235 240

Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp
 245 250 255

Glu Arg Ile Thr Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly
 260 265 270

Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr
 275 280 285

ES 2 462 416 T3

Lys Thr His His Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln
 290 295 300
 Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln
 305 310 315 320
 Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val
 325 330 335
 Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe
 340 345 350
 Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp
 355 360 365
 Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser
 370 375 380
 Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu
 385 390 395 400
 Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn
 405 410 415
 Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn
 420 425 430
 Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu
 435 440 445
 Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser
 450 455 460
 Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro
 465 470 475 480
 Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp
 485 490 495
 Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu
 500 505 510
 Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val
 515 520 525

ES 2 462 416 T3

Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr
 530 535 540

Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu
 545 550 555 560

Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser
 565 570 575

Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser
 580 585 590

Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln
 595 600 605

Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu
 610 615 620

Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala
 625 630 635 640

Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser
 645 650 655

Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala
 660 665 670

Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro
 675 680 685

Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu
 690 695 700

Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg
 705 710 715 720

Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr
 725 730 735

Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp
 740 745 750

Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln
 755 760 765

Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly

ES 2 462 416 T3

tcc gaa gcc gaa gct gac cag cag atg gac aac ttg tac ctg aaa gcc	770
Ser Glu Ala Glu Ala Asp Gln Gln Met Asp Asn Leu Tyr Leu Lys Ala	
80 85 90	
ttg gag ggt ttc att gcc gtg gtg acc caa gat ggc gac atg atc ttt	818
Leu Glu Gly Phe Ile Ala Val Val Thr Gln Asp Gly Asp Met Ile Phe	
95 100 105 110	
ctg tca gaa aac atc agc aag ttc atg gga ctt aca cag gtg gag cta	866
Leu Ser Glu Asn Ile Ser Lys Phe Met Gly Leu Thr Gln Val Glu Leu	
115 120 125	
aca gga cat agt atc ttt gac ttc act cat ccc tgc gac cat gag gag	914
Thr Gly His Ser Ile Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu	
130 135 140	
att cgt gag aac ctg agt ctc aaa aat ggc tct ggt ttt ggg aaa aaa	962
Ile Arg Glu Asn Leu Ser Leu Lys Asn Gly Ser Gly Phe Gly Lys Lys	
145 150 155	
agc aaa gac atg tcc aca gag cgg gac ttc ttc atg agg atg aag tgc	1010
Ser Lys Asp Met Ser Thr Glu Arg Asp Phe Phe Met Arg Met Lys Cys	
160 165 170	
acg gtc acc aac aga gcc cgt act gtc aac ctc aag tca gcc acc tgg	1058
Thr Val Thr Asn Arg Gly Arg Thr Val Asn Leu Lys Ser Ala Thr Trp	
175 180 185 190	
aag gtc ttg cac tgc acg ggc cag gtg aaa gtc tac aac aac tgc cct	1106
Lys Val Leu His Cys Thr Gly Gln Val Lys Val Tyr Asn Asn Cys Pro	
195 200 205	
cct cac aat agt ctg tgt ggc tac aag gag ccc ctg ctg tcc tgc ctc	1154
Pro His Asn Ser Leu Cys Gly Tyr Lys Glu Pro Leu Leu Ser Cys Leu	
210 215 220	
atc atc atg tgt gaa cca atc cag cac cca tcc cac atg gac atc ccc	1202
Ile Ile Met Cys Glu Pro Ile Gln His Pro Ser His Met Asp Ile Pro	
225 230 235	
ctg gat agc aag acc ttc ctg agc cgc cac agc atg gac atg aag ttc	1250
Leu Asp Ser Lys Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Met Asp Met Lys Phe	
240 245 250	
acc tac tgt gat gac aga atc aca gaa ctg att ggt tac cac cct gag	1298
Thr Tyr Cys Asp Asp Arg Ile Thr Glu Leu Ile Gly Tyr His Pro Glu	
255 260 265 270	
gag ctg ctt ggc cgc tca gcc tat gaa ttc tac cat gcg cta gac tcc	1346
Glu Leu Leu Gly Arg Ser Ala Tyr Glu Phe Tyr His Ala Leu Asp Ser	
275 280 285	
gag aac atg acc aag agt cac cag aac ttg tgc acc aag ggt cag gta	1394
Glu Asn Met Thr Lys Ser His Gln Asn Leu Cys Thr Lys Gly Gln Val	
290 295 300	
gta agt ggc cag tac cgg atg ctc gca aag cat ggg ggc tac gtg tgg	1442
Val Ser Gly Gln Tyr Arg Met Leu Ala Lys His Gly Gly Tyr Val Trp	
305 310 315	

ES 2 462 416 T3

Thr	Pro	Gln	His	Cys	Phe	Ser	Ala	Met	Thr	Asn	Ile	Phe	Gln	Pro	Leu		
	560					565					570						
gcc	cct	gta	gcc	ccg	cac	agt	ccc	ttc	ctc	ctg	gac	aag	ttt	cag	cag	2258	
Ala	Pro	Val	Ala	Pro	His	Ser	Pro	Phe	Leu	Leu	Asp	Lys	Phe	Gln	Gln		
575					580					585					590		
cag	ctg	gag	agc	aag	aag	aca	gag	ccc	gag	cac	cgg	ccc	atg	tcc	tcc	2306	
Gln	Leu	Glu	Ser	Lys	Lys	Thr	Glu	Pro	Glu	His	Arg	Pro	Met	Ser	Ser		
				595					600					605			
atc	ttc	ttt	gat	gcc	gga	agc	aaa	gca	tcc	ctg	cca	ccg	tgc	tgt	ggc	2354	
Ile	Phe	Phe	Asp	Ala	Gly	Ser	Lys	Ala	Ser	Leu	Pro	Pro	Cys	Cys	Gly		
			610					615					620				
cag	gcc	agc	acc	cct	ctc	tct	tcc	atg	ggg	ggc	aga	tcc	aat	acc	cag	2402	
Gln	Ala	Ser	Thr	Pro	Leu	Ser	Ser	Met	Gly	Gly	Arg	Ser	Asn	Thr	Gln		
		625					630					635					
tgg	ccc	cca	gat	cca	cca	tta	cat	ttt	ggg	ccc	aca	aag	tgg	gcc	gtc	2450	
Trp	Pro	Pro	Asp	Pro	Pro	Leu	His	Phe	Gly	Pro	Thr	Lys	Trp	Ala	Val		
	640					645					650						
ggg	gat	cag	cgc	aca	gag	ttc	ttg	gga	gca	gcg	ccg	ttg	ggg	ccc	cct	2498	
Gly	Asp	Gln	Arg	Thr	Glu	Phe	Leu	Gly	Ala	Ala	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro		
655					660					665					670		
gtc	tct	cca	ccc	cat	gtc	tcc	acc	ttc	aag	aca	agg	tct	gca	aag	ggt	2546	
Val	Ser	Pro	Pro	His	Val	Ser	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Ser	Ala	Lys	Gly		
				675					680					685			
ttt	ggg	gct	cga	ggc	cca	gac	gtg	ctg	agt	ccg	gcc	atg	gta	gcc	ctc	2594	
Phe	Gly	Ala	Arg	Gly	Pro	Asp	Val	Leu	Ser	Pro	Ala	Met	Val	Ala	Leu		
			690					695					700				
tcc	aac	aag	ctg	aag	ctg	aag	cga	cag	ctg	gag	tat	gaa	gag	caa	gcc	2642	
Ser	Asn	Lys	Leu	Lys	Leu	Lys	Arg	Gln	Leu	Glu	Tyr	Glu	Glu	Gln	Ala		
		705					710					715					
ttc	cag	gac	ctg	agc	ggg	ggg	gac	cca	cct	ggt	ggc	agc	acc	tca	cat	2690	
Phe	Gln	Asp	Leu	Ser	Gly	Gly	Asp	Pro	Pro	Gly	Gly	Ser	Thr	Ser	His		
		720					725					730					
ttg	atg	tgg	aaa	cgg	atg	aag	aac	ctc	agg	ggt	ggg	agc	tgc	cct	ttg	2738	
Leu	Met	Trp	Lys	Arg	Met	Lys	Asn	Leu	Arg	Gly	Gly	Ser	Cys	Pro	Leu		
735					740					745					750		
atg	ccg	gac	aag	cca	ctg	agc	gca	aat	gta	ccc	aat	gat	aag	ttc	acc	2786	
Met	Pro	Asp	Lys	Pro	Leu	Ser	Ala	Asn	Val	Pro	Asn	Asp	Lys	Phe	Thr		
				755					760					765			
caa	aac	ccc	atg	agg	ggc	ctg	ggc	cat	ccc	ctg	aga	cat	ctg	ccg	ctg	2834	
Gln	Asn	Pro	Met	Arg	Gly	Leu	Gly	His	Pro	Leu	Arg	His	Leu	Pro	Leu		
			770					775					780				
cca	cag	cct	cca	tct	gcc	atc	agt	ccc	ggg	gag	aac	agc	aag	agc	agg	2882	
Pro	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ile	Ser	Pro	Gly	Glu	Asn	Ser	Lys	Ser	Arg		
		785					790					795					
ttc	ccc	cca	cag	tgc	tac	gcc	acc	cag	tac	cag	gac	tac	agc	ctg	tcg	2930	
Phe	Pro	Pro	Gln	Cys	Tyr	Ala	Thr	Gln	Tyr	Gln	Asp	Tyr	Ser	Leu	Ser		

ES 2 462 416 T3

gagcagctgg tccagaccag ccctgcagcc cccactcagc cggcagccag atggccccgc 4501
aaggcctcca gggatggccc ctagccacag gccctggctg aggtctctgg gtcggtcagt 4561
gacatgtagg taggaagcac tgaaaatagt gttcccagag cactttgcaa ctccctgggt 4621
aagagggacg acacctctgg tttttcaata ccaattacat ggaacttttc tgtaatgggt 4681
acaatgaaga agtttctaaa aacacacaca aagcacattg ggccaactat ttagtaagcc 4741
cggatagact tattgccaaa aacaaaaaat agctttcaaa agaaatttaa gttctatgag 4801
aaattcctta gtcatggtgt tgcgtaaadc atattttagc tgcacggcat taccacacac 4861
agggtggcag aacttgaagg gttactgacg tgtaaagtct ggtatttgat ttcctgtgtg 4921
tgttgccctg gcattaaggg cattttaccc ttgcagtttt actaaaacac tgaaaaatat 4981
tccaagcttc atattaaccc tacctgtcaa cgtaacgatt tcatgaacgt tattatattg 5041
tcgaattcct actgacaaca ttataactgt atgggagctt aactttataa ggaaatgtat 5101
tttgacactg gtatcttatt aaagtattct gatcctaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5161
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 5186

<210> 4

<211> 870

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Thr Ala Asp Lys Glu Lys Lys Arg Ser Ser Ser Glu Arg Arg Lys
1 5 10 15

Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Cys Arg Arg Ser Lys Glu Thr Glu
20 25 30

Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Glu Leu Pro Leu Pro His Ser Val Ser
35 40 45

Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Ile Met Arg Leu Ala Ile Ser Phe Leu
50 55 60

Arg Thr His Lys Leu Leu Ser Ser Val Cys Ser Glu Asn Glu Ser Glu
65 70 75 80

Ala Glu Ala Asp Gln Gln Met Asp Asn Leu Tyr Leu Lys Ala Leu Glu
85 90 95

10 Gly Phe Ile Ala Val Val Thr Gln Asp Gly Asp Met Ile Phe Leu Ser
100 105 110

ES 2 462 416 T3

Glu Asn Ile Ser Lys Phe Met Gly Leu Thr Gln Val Glu Leu Thr Gly
 115 120 125

His Ser Ile Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Ile Arg
 130 135 140

Glu Asn Leu Ser Leu Lys Asn Gly Ser Gly Phe Gly Lys Lys Ser Lys
 145 150 155 160

Asp Met Ser Thr Glu Arg Asp Phe Phe Met Arg Met Lys Cys Thr Val
 165 170 175

Thr Asn Arg Gly Arg Thr Val Asn Leu Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val
 180 185 190

Leu His Cys Thr Gly Gln Val Lys Val Tyr Asn Asn Cys Pro Pro His
 195 200 205

Asn Ser Leu Cys Gly Tyr Lys Glu Pro Leu Leu Ser Cys Leu Ile Ile
 210 215 220

Met Cys Glu Pro Ile Gln His Pro Ser His Met Asp Ile Pro Leu Asp
 225 230 235 240

Ser Lys Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Met Asp Met Lys Phe Thr Tyr
 245 250 255

Cys Asp Asp Arg Ile Thr Glu Leu Ile Gly Tyr His Pro Glu Glu Leu
 260 265 270

Leu Gly Arg Ser Ala Tyr Glu Phe Tyr His Ala Leu Asp Ser Glu Asn
 275 280 285

Met Thr Lys Ser His Gln Asn Leu Cys Thr Lys Gly Gln Val Val Ser
 290 295 300

Gly Gln Tyr Arg Met Leu Ala Lys His Gly Gly Tyr Val Trp Leu Glu
 305 310 315 320

Thr Gln Gly Thr Val Ile Tyr Asn Pro Arg Asn Leu Gln Pro Gln Cys
 325 330 335

Ile Met Cys Val Asn Tyr Val Leu Ser Glu Ile Glu Lys Asn Asp Val
 340 345 350

ES 2 462 416 T3

Glu Ser Lys Lys Thr Glu Pro Glu His Arg Pro Met Ser Ser Ile Phe
595 600 605

Phe Asp Ala Gly Ser Lys Ala Ser Leu Pro Pro Cys Cys Gly Gln Ala
610 615 620

Ser Thr Pro Leu Ser Ser Met Gly Gly Arg Ser Asn Thr Gln Trp Pro
625 630 635 640

Pro Asp Pro Pro Leu His Phe Gly Pro Thr Lys Trp Ala Val Gly Asp
645 650 655

Gln Arg Thr Glu Phe Leu Gly Ala Ala Pro Leu Gly Pro Pro Val Ser
660 665 670

Pro Pro His Val Ser Thr Phe Lys Thr Arg Ser Ala Lys Gly Phe Gly
675 680 685

Ala Arg Gly Pro Asp Val Leu Ser Pro Ala Met Val Ala Leu Ser Asn
690 695 700

Lys Leu Lys Leu Lys Arg Gln Leu Glu Tyr Glu Glu Gln Ala Phe Gln
705 710 715 720

Asp Leu Ser Gly Gly Asp Pro Pro Gly Gly Ser Thr Ser His Leu Met
725 730 735

Trp Lys Arg Met Lys Asn Leu Arg Gly Gly Ser Cys Pro Leu Met Pro
740 745 750

Asp Lys Pro Leu Ser Ala Asn Val Pro Asn Asp Lys Phe Thr Gln Asn
755 760 765

Pro Met Arg Gly Leu Gly His Pro Leu Arg His Leu Pro Leu Pro Gln
770 775 780

Pro Pro Ser Ala Ile Ser Pro Gly Glu Asn Ser Lys Ser Arg Phe Pro
785 790 795 800

Pro Gln Cys Tyr Ala Thr Gln Tyr Gln Asp Tyr Ser Leu Ser Ser Ala
805 810 815

His Lys Val Ser Gly Met Ala Ser Arg Leu Leu Gly Pro Ser Phe Glu
820 825 830

Ser Tyr Leu Leu Pro Glu Leu Thr Arg Tyr Asp Cys Glu Val Asn Val
835 840 845

Pro Val Leu Gly Ser Ser Thr Leu Leu Gln Gly Gly Asp Leu Leu Arg
850 855 860

Ala Leu Asp Gln Ala Thr
865 870

<210> 5

<211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-1 alfa

<220>
 <221> característica_misc
 10 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

<400> 5

15 **ggaaccugau gcuuuuacun n 21**

<210> 6
 <211> 21
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-1 alfa

25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

30 <400> 6

ggguaaagaa caaacacacn n 21

<210> 7
 35 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-1 alfa

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (20)..(21)
 45 <223> n = desoxitimidina

<400> 7

ggcagcagaa accuacugcn n 21

50 <210> 8
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-1 alfa

<220>
 60 <221> característica_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

<400> 8

65

gcacgacuug auuuucuccn n 21

5 <210> 9
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-2 alfa

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

<400> 9

cggagguguu cuaugagcun n 21

20 <210> 10
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-2 alfa

30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

<400> 10

35 gguuuuguug cuagcccuun n 21

40 <210> 11
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-1 alfa

50 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

<400> 11

aguuaaagca ucagguuccn n 21

55 <210> 12
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-1 alfa

<220>
 <221> característica_misc

<222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

 <400> 12
 5 uguguuuuugu uuuuuacccn n 21

 <210> 13
 <211> 21
 10 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-1 alfa
 15

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina
 20

 <400> 13

 gcaguagguu ucugugccn n 21

 25 <210> 14
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-1 alfa

 <220>
 <221> característica_misc
 35 <222> (20).. (20)
 <223> n = desoxitimidina

 <220>
 <221> característica_misc
 40 <222> (21)..(21)
 <223> n = desoxiguanosina

 <400> 14

 45 ggagaaaauc aaguogugcn n 21

 <210> 15
 <211> 21
 <212> ARN
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-2 alfa

 55 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (20)..(20)
 <223> n = desoxitimidina

 60 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (21)..(21)
 <223> n = desoxicitidina

 65 <400> 15

agcucauaga acaccucogn n 21
 5 <210> 16
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-2 alfa
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (20)..(21)
 15 <223> n = desoxitimidina
 <400> 16
aagggcuagc aacaaaaccn n 21
 20 <210> 17
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-1 alfa
 <400> 17
 30 **ggaaccugau gcuuuaacu 19**
 <210> 18
 <211> 19
 35 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-1 alfa
 <400> 18
ggguaaagaa caaacaca 19
 45 <210> 19
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-1 alfa
 <400> 19
 55 **ggcagcagaa accuacugc 19**
 <210> 20
 <211> 19
 <212> ARN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-1 alfa
 65 <400> 20

gcacgacuug auuuucucc 19

5 <210> 21
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-2 alfa

<400> 21

cggagguguu cuaugagcu 19

15 <210> 22
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-2 alfa

<400> 22

25 gguuuuguug cuagccuu 19

30 <210> 23
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-1 alfa

<400> 23

aguuaaaagca ucagguucc 19

40 <210> 24
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-1 alfa

<400> 24

50 uguguuuuugu uuuuuaccc 19

55 <210> 25
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-1 alfa

60 <400> 25

gcaguagguu ucugcugcc 19

<210> 26

<211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-1 alfa

<400> 26

10 ggagaaaauc aagucuguc 19

<210> 27
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-2 alfa

20 <400> 27

agcucauaga acaccucog 19

<210> 28
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-2 alfa

30 <400> 28

aagggcuagc aacaaaacc 19

<210> 29
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-1 alfa

40 <220>

<221> característica_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

45 <400> 29

ccucagugug gguauaagan n 21|

<210> 30
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-1 alfa

60 <220>

<221> característica_misc
 <222> (20)..(21)

65

<223> n = desoxitimidina
 <400> 30

5 **ucuuauaccc acacugaggn n 21**

<210> 31
 <211> 19
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-1 alfa

15 <400> 31

ccucagugug gguauaaga 19

<210> 32
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-1 alfa

<400> 32

ucuuauaccc acacugagg 19

30 <210> 33
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cadena codificante de ARNip para HIF-2 alfa

<220>
 40 <221> característica_misc
 <222> (20)..(21)
 <223> n = desoxitimidina

<400> 33

45 **ggacauagua ucuuugacun n 21**

<210> 34
 <211> 21
 50 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-2 alfa

55 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (20)..(20)
 <223> n = desoxitimidina

60 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (21)..(21)
 <223> n = desoxiguanosina

65

<400> 34

aguc~~aa~~agau acuauguc~~cn~~ n 21

- 5 <210> 35
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> cadena codificante de ARNip para HIF-2 alfa

<400> 35

15 ggacauagua ucuuugacu 19

- <210> 36
- <211> 19
- <212> ARN
- 20 <213> Artificial

- <220>
- <223> cadena no codificante de ARNip para HIF-2 alfa

25 <400> 36

aguc~~aa~~agau acuaugucc 19

REIVINDICACIONES

1. Un agente terapéutico para una enfermedad de la retina, que comprende un ARNip para HIF-1 α y un ARNip para HIF-2 α .
2. El agente terapéutico según la reivindicación 1, en el que el ARNip mencionado anteriormente para HIF-1 α consiste en una cadena codificante que comprende una secuencia de 17 - 25 bases continuas de ARNm que se corresponde con la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, y el ARNip mencionado anteriormente para HIF-2 α consiste en una cadena codificante que comprende una secuencia de 17 - 25 bases continuas de ARNm que se corresponde a la secuencia de bases de SEQ ID NO: 3 y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma.
3. El agente terapéutico según la reivindicación 2, en el que el ARNip mencionado anteriormente para HIF-1 α es el (a) o (b) siguiente, y el ARNip para HIF-2 α es el (c) o (d) siguiente:
- (a) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 17 - 20 y 31, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-1 α ;
- (b) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases en donde una a varias bases se han añadido y/o se han eliminado del extremo 5' terminal y/o del extremo 3' terminal de la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 17 - 20 y 31, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-1 α ;
- (c) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NO: 21, 22 y 35, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-2 α ;
- (d) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases en la que una a varias bases se han añadido y/o se han eliminado desde el extremo 5' terminal y/o el extremo 3' terminal de la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 21, 22 y 35, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-2 α .
4. El agente terapéutico según la reivindicación 2 o 3, en el que el ARNip mencionado anteriormente para HIF-1 α es cualquiera de los (1-1) - (1-5) siguientes, y el ARNip para HIF-2 α es cualquiera de los (2-1) - (2-3) siguientes:
- (1-1) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 5, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 11;
- (1-2) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 6, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 12;
- (1-3) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 7, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 13;
- (1-4) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 8, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 14;
- (1-5) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 29, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 30;
- (2-1) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 9, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 15;
- (2-2) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 10, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 16;
- (2-3) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 33, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 34.
5. El agente terapéutico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la enfermedad de la retina es la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética, la retinopatía del prematuro, la oclusión de la vena retiniana, la obstrucción de la arteria retiniana, el edema macular diabético o el glaucoma.
6. El agente terapéutico según la reivindicación 5, en donde la enfermedad de la retina es la degeneración

macular relacionada con la edad o la retinopatía diabética.

7. Uso de un ARNip para HIF-1 α y un ARNip para HIF-2 α , para la producción de un agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad de la retina.

5 8. El uso según la reivindicación 7, en el que el mencionado ARNip para HIF-1 α consiste en una cadena codificante que comprende una secuencia de 17 - 25 bases continuas de ARNm que se corresponde con la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, y el ARNip mencionado anteriormente para HIF-2 α consiste en una cadena codificante que comprende una secuencia de 17 - 25 bases continuas de ARNm que se corresponde con la secuencia de bases de SEQ ID NO: 3 y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementarias a la misma.

10 9. El uso según la reivindicación 8, en el que el ARNip mencionado anteriormente para HIF-1 α es el (a) o (b) siguiente, y el ARNip para HIF-2 α es el (c) o (d) siguiente:

15 (a) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 17 - 20 y 31, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-1 α ;

20 (b) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases en donde una a varias bases se han añadido y/o se han eliminado del extremo 5' terminal y/o del extremo 3' terminal de la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 17 - 20 y 31, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-1 α ;

(c) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NO: 21, 22 y 35, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-2 α ;

25 (d) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que comprende una secuencia de bases en la que una a varias bases se han añadido y/o se han eliminado desde el extremo 5' terminal y/o el extremo 3' terminal de la secuencia de bases descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 21, 22 y 35, y una cadena no codificante que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un extremo protuberante en la cadena codificante y/o en la cadena no codificante, y tiene actividad inhibidora de la expresión de HIF-2 α .

30 10. El uso según la reivindicación 8 o 9, en el que el ARNip mencionado anteriormente para HIF-1 α es cualquiera de los (1-1) - (1-5) siguientes, y el ARNip para HIF-2 α es cualquiera de los (2-1) - (2-3) siguientes:

(1-1) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 5, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 11;

35 (1-2) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 6, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 12;

(1-3) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 7, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 13;

(1-4) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 8, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 14;

40 (1-5) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 29, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 30;

(2-1) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 9, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 15;

45 (2-2) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 10, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 16;

(2-3) un ARN bicatenario compuesto por una cadena codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 33, y una cadena no codificante que consiste en la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 34.

50 11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la enfermedad de la retina es la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética, la retinopatía del prematuro, la oclusión de la vena retiniana, la obstrucción de la arteria retiniana, el edema macular diabético o el glaucoma, preferiblemente en donde la enfermedad de la retina es la degeneración macular relacionada con la edad o la retinopatía diabética.

FIG. 1

Expresión de HIF-1 α en células del EPR

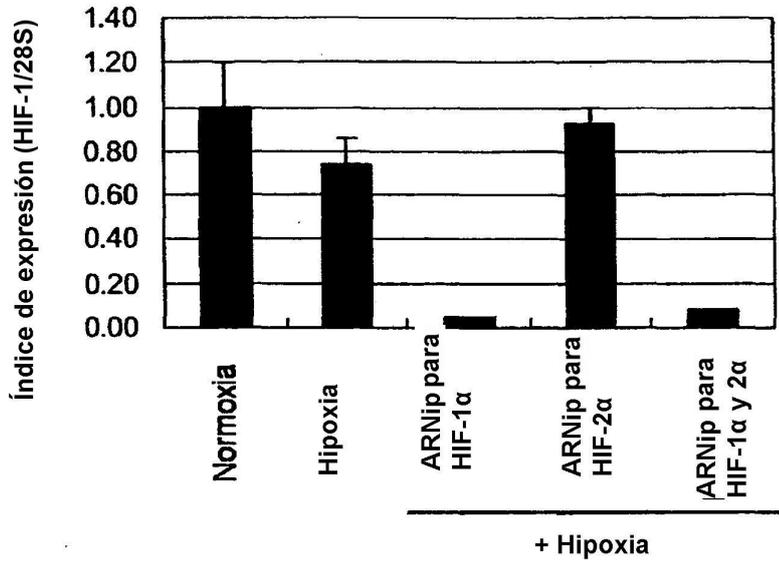


FIG. 2

Expresión de HIF-2 α en células del EPR

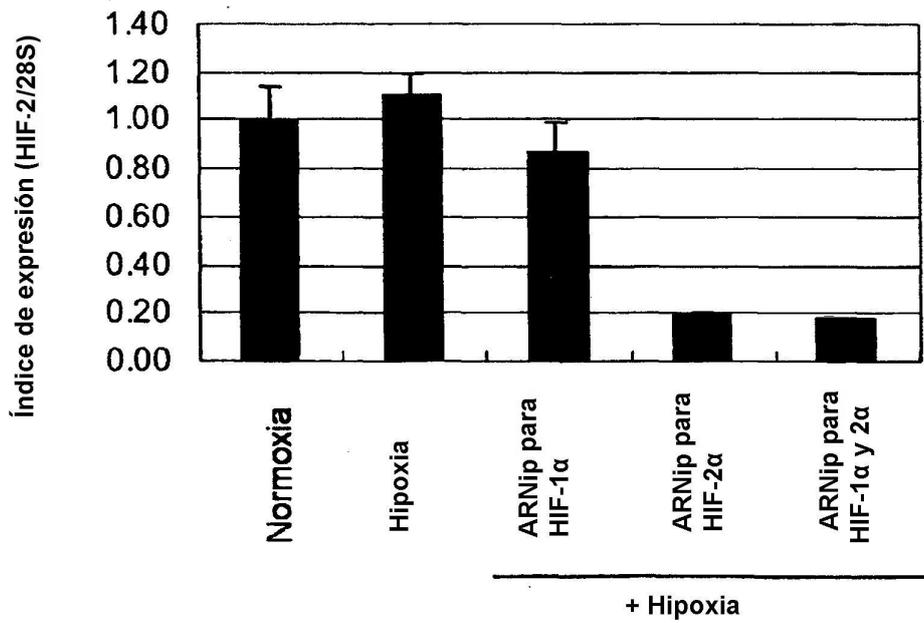


FIG. 3

Expresión de VEGF en células del EPR

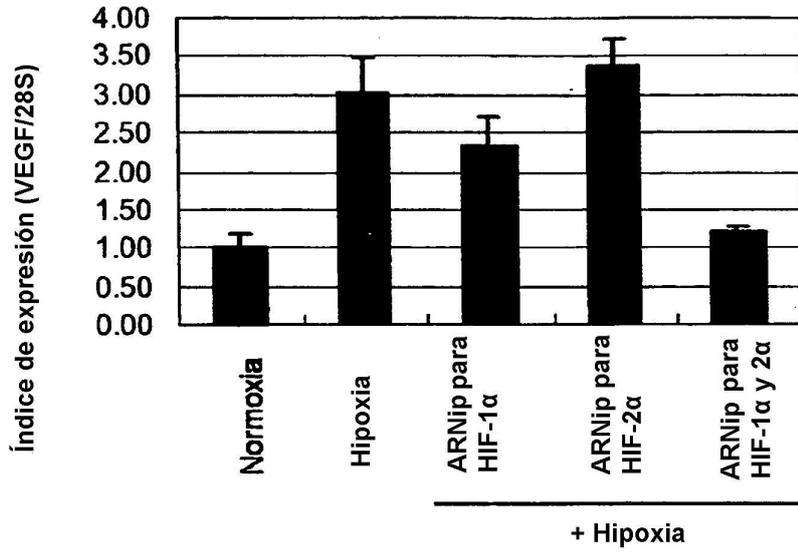


FIG. 4

Expresión de HIF-1α en células del EPR

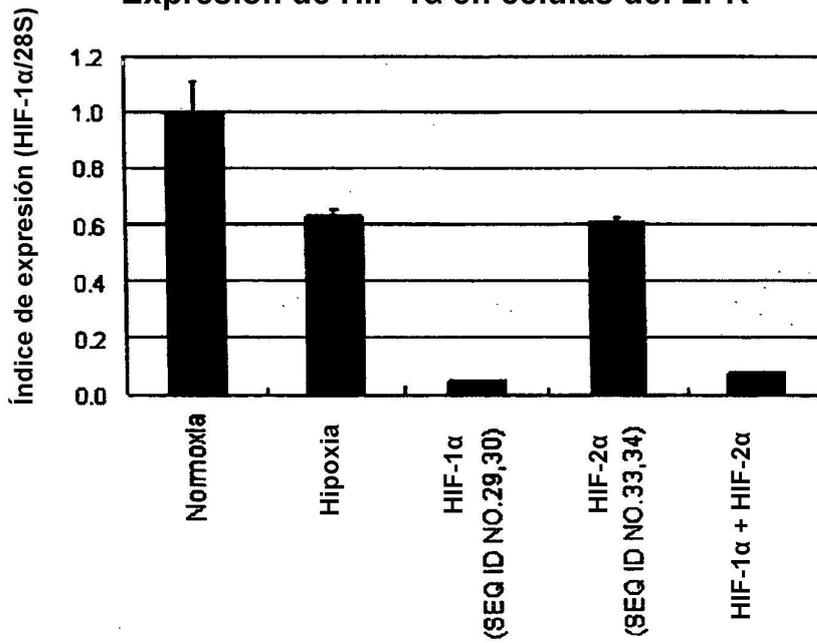


FIG. 5

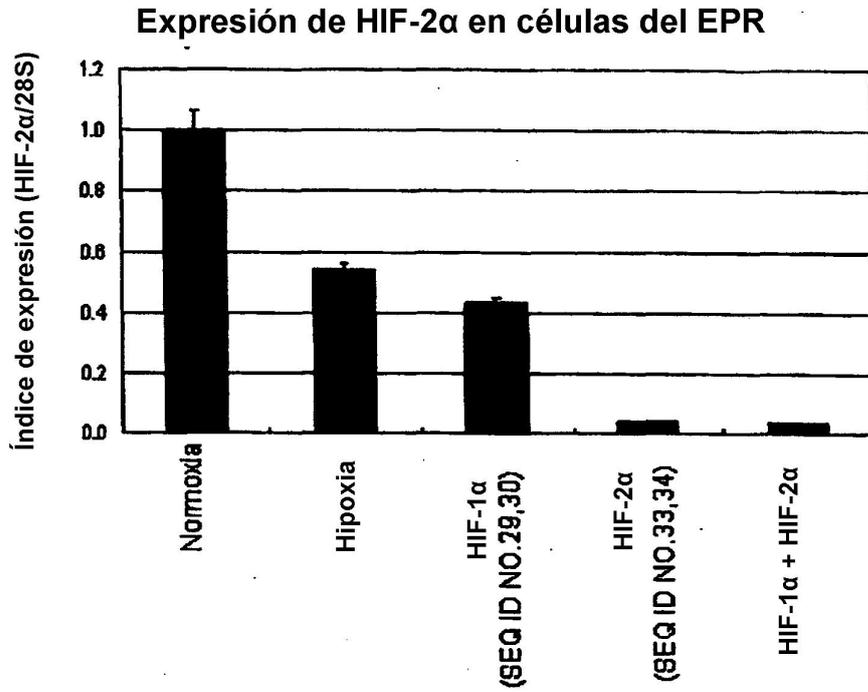


FIG. 6

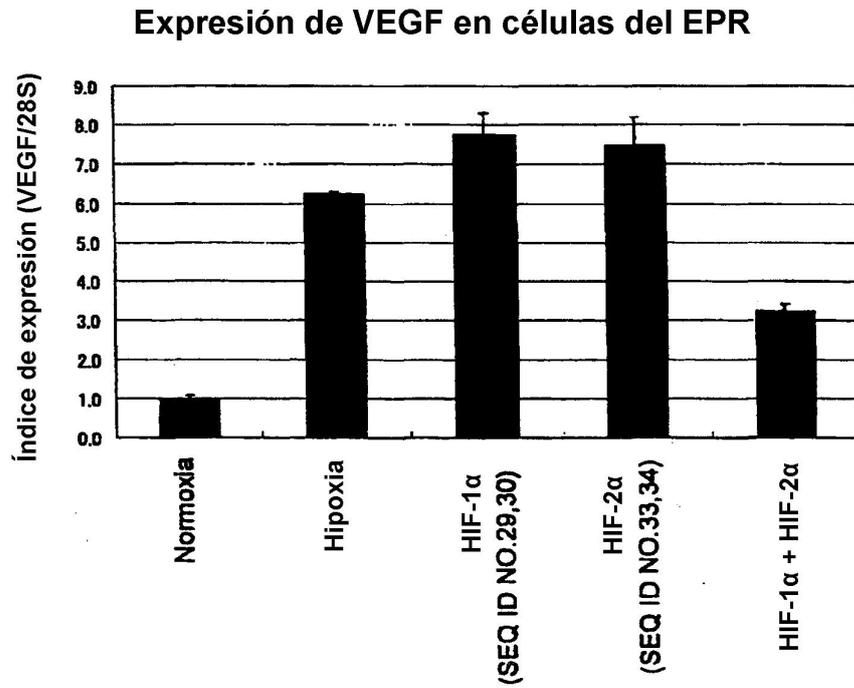


FIG. 7

