

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 984**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/711 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2009** **E 09748890 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016** **EP 2350279**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de trastornos oculares**

30 Prioridad:

22.10.2008 US 196995 P

11.11.2008 US 198931 P

15.02.2009 WO PCT/IL2009/000179

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

17.03.2016

73 Titular/es:

QUARK PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
6501 Dumbarton Circle
Fremont, California 94555, US

72 Inventor/es:

FEINSTEIN, ELENA;
ALPERT, EVGENIA;
METT, IGOR;
BAR-ILAN, AMIR;
SPIVAK, IGOR;
KALINSKI, HAGAR y
SLAGER, NETANJA

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 563 984 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

Métodos para el tratamiento de trastornos oculares

Solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de las Solicitudes de la Patente Provisional de los Estados Unidos Nos. 61/196995 presentada el 22 de octubre de 2008 y 61/198931 presentada el 11 de noviembre de 2008 y de la Solicitud de la Patente Internacional No. PCT/IL2009/000179 presentada el 15 de febrero de 2009.

Referencia a la lista de secuencias

10 Las secuencias descritas en la especificación (SEQ ID NOS: 1-33,596) se están presentado con esta solicitud a través del sistema de presentación electrónica (EFS) de USPTO en un archivo de texto titulado "188-PCT2.ST25.txt" creado el 20 de octubre de 2009, el tamaño de archivo es de 5952 KB y se incorporan en este documento como referencia en su totalidad.

Campo de la invención

15 La presente invención se relaciona con un método no invasivo de tratamiento de un trastorno ocular en un sujeto en necesidad del mismo que comprende la etapa de administrar por vía tópica a la superficie del ojo del sujeto una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido terapéutico dirigido a un gen diana asociado con la pérdida de la célula ganglionar de la retina en la retina del sujeto. Adicionalmente, la invención se relaciona con un método no invasivo para promover la supervivencia de las células ganglionares de la retina en sujetos que padezcan una enfermedad, trastorno o lesión ocular.

Antecedentes de la invención

20 La administración de compuestos del ácido nucleico a tejido de la retina y, en particular, a las células ganglionares de la retina presenta un desafío de suministro de fármaco grande. Hasta ahora, se ha considerado que las gotas para los ojos son útiles principalmente para el tratamiento de los trastornos del fragmento anterior, ya que se ha demostrado que los ácidos nucleicos no pasan la córnea y concentraciones insuficientes de fármacos alcanzan el tejido ocular posterior (revisado en del Amo and Urtti, 2008. Drug Discov Today 13(3/4):135-143; Fattal and Bochot, 2006. Adv Drug Del Rev 56:1203-1223).

30 Una célula ganglionar de la retina (RGC) es un tipo de neurona situada cerca de la superficie interna de la retina del ojo. Las células ganglionares de la retina reciben información visual desde los fotorreceptores y colectivamente transmiten información visual desde la retina hasta varias regiones en el cerebro. Además, sigue existiendo la necesidad de método no invasivo para inhibir la pérdida de células ganglionares de la retina en un sujeto en necesidad del mismo. Diversas enfermedades y trastornos oculares se caracterizan por la muerte de las células ganglionares de la retina (RGC). De acuerdo con lo anterior, sigue existiendo una necesidad de un método no invasivo para inhibir la pérdida de células ganglionares de la retina (RGC) en sujetos que sufren de una enfermedad ocular, un trastorno ocular o una lesión ocular o están en riesgo de desarrollar una enfermedad ocular, un trastorno ocular, o una lesión ocular caracterizada y/o medie por la degeneración o muerte de las células ganglionares de la retina (RGC).

35 Resumen de la invención

40 La presente invención describe métodos no invasivos de tratamiento de enfermedades, trastornos y lesiones oculares que están asociados con la degeneración o muerte de las células ganglionares de la retina (RGC) y composiciones útiles en los métodos. Los métodos según se revelan comprenden administrar por vía tópica a la superficie del ojo de un sujeto, una composición de oligonucleótido terapéutico útil en la promoción de la supervivencia de las células ganglionares de la retina en un sujeto. Hasta ahora, se han administrado los oligonucleótidos al tejido ocular de la retina por la administración sistémica o inyección intravítrea, métodos asociados con efectos secundarios perjudiciales y pobre cumplimiento del paciente, respectivamente. La presente invención provee composiciones oftálmicas tópicas que comprenden un oligonucleótido, y su uso en métodos no invasivos para reducir la expresión de un gen diana asociado con la pérdida de las células ganglionares de la retina en la retina de un sujeto, para el rescate de las células ganglionares de la retina de apoptosis y para el tratamiento de trastornos oculares.

La presente invención está dirigida a un oligorribonucleótido, que es un compuesto de ARN bicatenario que tiene la estructura:

5' iB - GCCAGAAUGUGGAACUCCU 3' (cadena sentido; SEQ ID NO: 9015)

3' CGGUCUUACACCUUGAGGA 5' (cadena antisentido; SEQ ID NO: 9516)

en donde cada A, C, U, y G es un ribonucleótido y cada ribonucleótido consecutivo se une al siguiente ribonucleótido mediante un enlace fosfodiéster;

5 en donde las cadenas sentido comprende, contar desde el extremo 5', un ribonucleótido no modificado en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 19, una L-desoxicitidina en la posición 18, y una caperuza 5' abásica invertida; y

en donde la cadena antisentido comprende, contar desde el extremo 5', un ribonucleótido modificado en azúcar 2'-O-Me en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 y un ribonucleótido no modificado en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 16 y 18.

10 La presente invención también está dirigida al uso en la terapia del oligorribonucleótido en cuestión.

En un aspecto, la presente invención provee un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método de administración no invasivo a un tejido de la retina en un sujeto que padece un trastorno, enfermedad o lesión ocular que comprende la aplicación por vía tópica de una composición oftálmica que comprende el oligonucleótido, a la superficie del ojo del sujeto.

15 En otro aspecto, la presente invención provee un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método de administración no invasivo de un oligonucleótido a una célula ganglionar de la retina en un sujeto que padece un trastorno ocular que comprende la aplicación por vía tópica de una composición oftálmica que comprende el oligonucleótido, a la superficie del ojo del sujeto.

20 En incluso otro aspecto, la presente invención provee un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método para atenuar la expresión de un gen diana asociado con la pérdida de una célula ganglionar de la retina en la retina en un sujeto que sufre de una enfermedad, trastorno o lesión ocular, que comprende administrar por vía tópica (no invasiva) a la superficie del ojo del sujeto una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido dirigido al producto de ARNm diana del gen diana, en una cantidad y durante un período de tiempo eficaz para atenuar la expresión del gen en la retina del sujeto.

25 En un aspecto adicional, la presente invención provee un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método para tratar un sujeto que sufre de pérdida de células ganglionares de la retina o daño de las células ganglionares de la retina y proporcionar neuroprotección ocular a un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o lesión ocular. El método comprende administrar por vía tópica a la superficie del ojo del sujeto, una composición farmacéutica oftálmica que comprende al menos un oligonucleótido dirigido a un gen diana en la retina del sujeto, en
30 una cantidad y durante un período de tiempo eficaz para inhibir la pérdida de las células ganglionares de la retina o daño de las células ganglionares de la retina en el sujeto.

35 En diversas realizaciones, la composición farmacéutica oftálmica se formula como una crema, una espuma, una pasta, un ungüento, una emulsión, una solución líquida incluyendo unas gotas para los ojos, un gel, spray, una suspensión, una microemulsión, microesferas, microcápsulas, nanoesferas, nanopartículas, vesículas lipídicas, liposomas, vesículas poliméricas, un parche, o una lente de contacto. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula como unas gotas para los ojos. En realizaciones preferidas, la composición oftálmica se va a administrar en el ojo, por ejemplo, mediante la instilación de unas gotas para los ojos o por administración de una niebla.

El ARNm ocular diana se selecciona a partir de un polinucleótido de ARNm establecido en una cualquiera de SEQ ID NOS: 1-2.

40 El gen diana se selecciona a partir de un gen transcrito en un polinucleótido del ARNm establecido en una cualquiera de SEQ ID NOS: 1-2.

45 En algunas realizaciones, el al menos un oligonucleótido se selecciona desde ARNip modificado químicamente, ARNip no modificado, antisentido, ribozima, miARN y ARNhc. En realizaciones preferidas, el al menos un oligonucleótido es un ARNip modificado químicamente. Los oligonucleótidos sentido y antisentido del ARNip se seleccionan a partir de pares de oligonucleótidos sentido y antisentido correspondientes establecidos en SEQ ID NOS: 9015 y 9516.

50 En algunas realizaciones, el trastorno, enfermedad o lesión ocular se selecciona entre glaucoma, ojo seco, la retinopatía diabética DR), edema macular diabético (DME) o degeneración macular relacionada con la edad (AMD). En otras realizaciones, el trastorno, enfermedad o lesión ocular es la neuritis óptica, oclusión de la vena central de la retina, oclusión de una rama de la vena retiniana (BRVO). En otras realizaciones el trastorno, enfermedad o lesión ocular es la retinitis pigmentosa (RP), neuropatía óptica isquémica o lesión del nervio óptico. En realizaciones adicionales el

trastorno, enfermedad o lesión ocular es la retinopatía de la prematuridad (ROP), degeneración del ganglio de la retina, degeneración macular, neuropatía óptica hereditaria, neuropatía óptica metabólica, neuropatía óptica debido a un agente tóxico o neuropatía causada por reacciones adversas a los medicamentos o la deficiencia de vitamina. En aún otra realización, el trastorno es la pérdida de visión asociada a un tumor.

5 En diversas realizaciones el al menos un compuesto de ARNip se administra al ojo de un sujeto como una solución líquida, incluyendo unas gotas para los ojos. En diversas realizaciones de la presente invención provee un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método para atenuar la expresión de un gen ocular diana asociado con la pérdida de una célula ganglionar de la retina en un sujeto que sufre de una enfermedad, trastorno o lesión ocular, que comprende aplicar por vía tópica a la superficie del ojo del sujeto de una composición farmacéutica oftálmica formulada como unas gotas para los ojos.

10 En diversas realizaciones, la expresión de un ARNm ocular diana se atenúa en unas células oculares en la retina de un sujeto que padece una enfermedad, trastorno o lesión ocular. En diversas realizaciones la célula ocular incluye, pero no es limitada a una célula acinar de la glándula lagrimal, una célula ductal de la glándula lagrimal, una célula ganglionar de la retina (RGC), una célula del epitelio pigmentario de la retina (RPE), una célula corioidea, una célula de la córnea, una célula del proceso ciliar o una célula de la red trabecular o una combinación de las mismas.

15 La presente descripción revela un método para inhibir la pérdida de una célula ganglionar de la retina en un sujeto, que comprende administrar de forma no invasiva a la superficie del ojo del sujeto de una composición oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip que regula la expresión de un gen diana asociado con la pérdida de la célula ganglionar de la retina en la retina del sujeto, inhibiendo de este modo la pérdida de una célula ganglionar de la retina. En ciertas realizaciones dos o más genes diana son inhibidores de la expresión por el método de acuerdo con la invención. En ciertas realizaciones la atenuación de la expresión de al menos un gen diana (ARNm ocular) asociado con la pérdida de la célula ganglionar de la retina en la retina del sujeto confiere a las propiedades neuroprotectoras de los ojos. El al menos un gen diana ocular se selecciona de SEQ ID NO: 1-2.

20 En una realización, el trastorno ocular es el glaucoma. Por lo tanto, la presente invención provee un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método para inhibir la pérdida de una célula ganglionar de la retina en un sujeto que sufre de glaucoma que comprende aplicar por vía tópica (no invasiva) a la superficie del ojo del sujeto una composición oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip que reduce la expresión de un gen diana (ARNm ocular diana) asociado con la pérdida de la célula ganglionar de la retina en la retina del sujeto, inhibiendo de este modo la pérdida de una célula ganglionar de la retina en el ojo del sujeto. En realizaciones preferidas, el ARNip se modifica químicamente. En algunas realizaciones, el ARNip modificado químicamente atenúa la expresión del gen (ARNm ocular diana) en la retina del ojo del sujeto. En otras realizaciones, el ARNip modificado químicamente atenúa la expresión de ARNm ocular diana en el nervio óptico del ojo del sujeto. En ciertas realizaciones la atenuación de la expresión de al menos un gen diana (ARNm ocular) asociado con la pérdida de la célula ganglionar de la retina en la retina del sujeto es eficaz para tratar el glaucoma. El al menos un gen diana es CASP2 (SEQ ID NO: 1-2). En algunas realizaciones las cadenas sentido y antisentido del ARNip es el par de secuencias de oligonucleótidos expuestos en las SEQ ID NOS: 9015 y 9516.

25 En otra realización, el trastorno ocular es el ojo seco. Por lo tanto, la presente descripción revela un método para inhibir la pérdida de una célula ganglionar de la retina en un sujeto que padece ojo seco. El método comprende administrar por vía tópica (no invasiva) a la superficie del ojo del sujeto una composición oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip que reduce la expresión de un gen diana (ARNm ocular diana) asociado con la pérdida de la célula ganglionar de la retina en la retina del sujeto, inhibiendo de este modo la pérdida de una célula ganglionar de la retina en el ojo del sujeto. En realizaciones preferidas, el ARNip se modifica químicamente. En ciertas realizaciones la atenuación de la expresión de al menos un ARNm ocular diana es eficaz para tratar el trastorno de ojo seco. En ciertas realizaciones la atenuación de la expresión de al menos un gen diana asociado con la pérdida de las células ganglionares de la retina es eficaz para reducir los síntomas de ojo seco. En ciertas realizaciones, el al menos un gen diana (ARNm ocular diana) se expresa en las células ganglionares de la retina en el ojo del sujeto. En ciertas realizaciones, el al menos un gen diana (ARNm ocular diana) se expresa en la glándula lagrimal en el ojo del sujeto. En ciertas realizaciones, el al menos un gen diana se selecciona desde la Tabla A2 publicada en una cualquiera de SEQ ID NO: 5 (p53), SEQ ID NO:8 - 10 (LRDD), SEQ ID NO:26 - 27 (SHC1) y SEQ ID NO:30 - 44 (FAS y ligando FAS). En algunas realizaciones el gen diana se selecciona de FAS, ligando FAS (FASL), p53, LRDD, PARP1, AIF (factor inductor de apoptosis), NOS1, NOS2A, XIAP y SHC1-SHC. En ciertas realizaciones preferidas el gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO:36 - SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO:44. En algunas realizaciones las cadenas sentido y antisentido del ARNip se seleccionan a partir de pares de secuencias de oligonucleótidos establecidas en SEQ ID NOS: 13,225-15,224.

30 En otra realización, el trastorno ocular es AMD, DR o DME. Por lo tanto, la presente invención provee un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método para inhibir la pérdida de una célula ganglionar de la retina en un sujeto que padece AMD, DR o DME. El método comprende administrar por vía tópica (no invasiva) a la superficie del

ojo del sujeto, una composición oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip que reduce la expresión de un gen diana (ARNm ocular diana) asociado con la pérdida de la célula ganglionar de la retina en la retina del sujeto, inhibiendo de este modo la pérdida de una célula ganglionar de la retina en el ojo del sujeto. En realizaciones preferidas, el ARNip se modifica químicamente. En ciertas realizaciones la atenuación de la expresión de al menos un gen diana asociado con la pérdida de las células ganglionares de la retina es eficaz para tratar AMD, DR o DME. En ciertas realizaciones la atenuación de la expresión de al menos un gen diana asociado con la pérdida de las células ganglionares de la retina es eficaz para reducir los síntomas de la AMD, DR o DME. En ciertas realizaciones, la administración de al menos un ARNip atenúa la expresión de al menos un gen diana (ARNm ocular diana) en una célula ganglionar de la retina en el ojo del sujeto. En ciertas realizaciones, la administración de al menos un ARNip atenúa la expresión de al menos un gen diana (ARNm ocular diana) en la coroides en el ojo del sujeto. El gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NOS: 1-2.

En una realización adicional, el trastorno ocular es retinitis pigmentosa (RP). Por lo tanto, la presente descripción revela un método para inhibir la pérdida de una célula ganglionar de la retina en un sujeto que padece RP. El método comprende administrar por vía tópica (no invasiva) a la superficie del ojo del sujeto una composición oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip que reduce la expresión de un gen diana (ARNm ocular diana) asociado con la pérdida de la célula ganglionar de la retina en la retina del sujeto, inhibiendo de este modo la pérdida de una célula ganglionar de la retina en el ojo del sujeto. En realizaciones preferidas, el ARNip se modifica químicamente. En ciertas realizaciones la atenuación de la expresión de al menos un gen diana asociado con la pérdida de las células ganglionares de la retina es eficaz para RP. En ciertas realizaciones la atenuación de la expresión de al menos un gen diana asociado con la pérdida de las células ganglionares de la retina es eficaz para reducir los síntomas de la RP. En ciertas realizaciones, el al menos un ARNm ocular diana es producto de un gen seleccionado de un gen enumerado en la Tabla A4 que se transcribe en el ARNm expuesto en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 3, 14, 26-35, 54-57. En algunas realizaciones, el ARNm ocular diana es producto de un gen seleccionado del grupo que consiste en CASP1, CASP3, CASP12, RTP801, RTP801L, CAPNS1, PARP1, AIF, NOS1, NOS2, XIAP y SHC1-SHC. En ciertas realizaciones preferidas el ARNip se dirige al ARNm expuesto en SEQ ID NOS:56-57.

En otro aspecto, la descripción revela un método de rescate de una de las células ganglionares de la retina de la apoptosis en un sujeto, que comprende aplicar de forma no invasiva a la superficie del ojo del sujeto una composición oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip para un gen diana en la retina del sujeto, rescatando de ese modo las células ganglionares de la retina de la apoptosis en el sujeto. En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. En algunas realizaciones, el gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1- 58.

En otro aspecto, la descripción revela un método para promover la supervivencia de una célula ganglionar de la retina en un sujeto que muestra signos o síntomas de una neuropatía ocular, que comprende administrar de forma no invasiva a la superficie del ojo del sujeto una composición oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip para un gen diana en la retina del sujeto, promoviendo así la supervivencia de una célula ganglionar de la retina en el sujeto. En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. En ciertas realizaciones los signos o síntomas de una neuropatía ocular están mediadas por apoptosis. En algunas realizaciones, el gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1- 58. En diversas realizaciones los oligonucleótidos sentido y antisentido del ARNip se seleccionan a partir de los correspondientes oligonucleótidos sentido y antisentido expuestos en las SEQ ID NOS: 59-33,596.

En incluso otro aspecto, la invención se dirige a un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de una enfermedad ocular asociada con la muerte de una célula ganglionar de la retina en un sujeto, que comprende aplicar de forma no invasiva a la superficie del ojo del sujeto una composición oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip para un gen diana en la retina del sujeto, evitando de ese modo, tratar o aliviar los efectos de una enfermedad ocular asociada con la muerte de una célula ganglionar de la retina en el sujeto. En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. El gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-2. En diversas realizaciones los oligonucleótidos sentido y antisentido del ARNip son pares de los correspondientes oligonucleótidos sentido y antisentido establecidos en SEQ ID NOS: 9015 y 9516.

Otro aspecto de la invención provee un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método para tratar o prevenir la muerte de las células ganglionares de la retina en un sujeto, que comprende aplicar de forma no invasiva a la superficie del ojo del sujeto una composición farmacéutica oftálmica que comprende: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip a un gen diana en la retina del sujeto, y (b) un excipiente o portador o mezcla farmacéuticamente aceptable de los mismos, y de este modo tratar o prevenir la muerte de células ganglionares de la retina en el sujeto . En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. El gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-2. En diversas realizaciones, los oligonucleótidos sentido y antisentido del ARNip son los correspondientes oligonucleótidos sentido y antisentido expuestos en las SEQ ID NOS: 9015 y 9516.

- 5 En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método de prevención de la muerte de células ganglionares de la retina mediada por la presión intraocular elevada (IOP) en el ojo de un sujeto, que comprende administrar de forma no invasiva a la superficie del ojo del sujeto una composición oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip para un gen diana en la retina del sujeto, evitando de este modo la muerte de la célula ganglionar de la retina en el sujeto. En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. En una realización particular de acuerdo con este método, el sujeto está afectado por glaucoma. El gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-2. En diversas realizaciones los oligonucleótidos sentido y antisentido del ARNip son los correspondientes oligonucleótidos sentido y antisentido establecido en SEQ ID NOS: 9015 y 9516.
- 10 La presente invención provee además un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método para retrasar, prevenir o rescatar una célula de la retina de la muerte en un sujeto que padece IOP elevada que comprende aplicar de forma no invasiva a la superficie del ojo del sujeto una composición oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip para un gen diana asociado con la muerte de la RGC en la retina del sujeto, retrasando así, la prevención o el rescate de la célula de la retina de una lesión o la muerte y en donde la presión intraocular (IOP) permanece sustancialmente elevada. En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. En una realización particular de acuerdo con este método, el sujeto está afectado por glaucoma. El gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-2. En diversas realizaciones, los oligonucleótidos sentido y antisentido del ARNip son los correspondientes oligonucleótidos sentido y antisentido expuestos en las SEQ ID NOS: 9015 y 9516.
- 15 La presente invención provee además un oligonucleótido en cuestión para uso en un método para tratar un sujeto que padece pérdida de células ganglionares de la retina o daño de las células ganglionares de la retina, que comprende administrar de forma no invasiva a la superficie del ojo del sujeto una composición oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip para un gen diana en la retina del sujeto, tratando de este modo el sujeto o reduciendo la muerte de células ganglionares de la retina en el sujeto. En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. El gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-2. En diversas realizaciones los oligonucleótidos sentido y antisentido del ARNip son los correspondientes oligonucleótidos sentido y antisentido expuestos en SEQ ID NOS: 9015 y 9516.
- 20 La presente invención provee además un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método para reducir la pérdida de células ganglionares de la retina y proporcionar neuroprotección ocular a un sujeto en necesidad del mismo, que comprende aplicar de forma no invasiva a la superficie del ojo del sujeto una composición oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip para un gen diana en la retina del sujeto, reduciendo así la pérdida de células ganglionares de la retina y proporcionando neuroprotección ocular al sujeto. En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. El gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-2. En diversas realizaciones los oligonucleótidos sentido y antisentido del ARNip son los correspondientes pares de oligonucleótidos sentido y antisentido expuestos en SEQ ID NOS:9015 y 9516.
- 25 La presente invención provee además un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método para prevenir la pérdida de campo visual asociada con la pérdida de las células ganglionares de la retina en un sujeto, que comprende administrar de forma no invasiva a la superficie del ojo del sujeto una composición oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip para un gen diana en la retina del sujeto, evitando de este modo la pérdida del campo visual en el sujeto. En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. El gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1- 58. En diversas realizaciones los oligonucleótidos sentido y antisentido del ARNip se seleccionan a partir de los correspondientes pares de oligonucleótidos sentido y antisentido expuestos en SEQ ID NOS: 9015 y 9516.
- 30 En otro aspecto, la presente invención provee un oligorribonucleótido en cuestión para uso en una composición oftálmica para el tratamiento no invasivo de una enfermedad ocular asociada con la pérdida de una célula ganglionar de la retina en un sujeto, que comprende: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip para un gen diana en la retina del sujeto, y (b) un excipiente o portador o mezcla farmacéuticamente aceptable de los mismos. En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. El gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1- 58. En diversas realizaciones los oligonucleótidos sentido y antisentido del ARNip y los correspondientes pares de oligonucleótidos sentido y antisentido expuestos en SEQ ID NOS:9015 y 9516.
- 35 En incluso otro aspecto, la presente invención provee una composición farmacéutica oftálmica tópica para el tratamiento no invasivo de una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual, que comprende: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos de un ARNip para un gen diana en la retina del sujeto, en donde el gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, y (b) un excipiente o portador o mezcla farmacéuticamente aceptable de los mismos. En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. En diversas realizaciones los oligonucleótidos sentido y antisentido ARNip son los correspondientes pares de oligonucleótidos sentido y antisentido expuestos en SEQ ID NOS:9015 y 9516.
- 40
- 45
- 50
- 55

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica oftálmica tópica para uso en el tratamiento de un sujeto afectado con la enfermedad ocular asociada con la muerte de las células ganglionares de la retina, que comprende: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos de un ARNip para un gen diana en la retina del sujeto, en donde el gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1- 2, y (b) un excipiente o portador o mezcla farmacéuticamente aceptable de los mismos. En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. En diversas realizaciones los oligonucleótidos sentido y antisentido del ARNip son los correspondientes pares de oligonucleótidos sentido y antisentido expuestos en SEQ ID NOS:9015 y 9516.

En diversas realizaciones la enfermedad ocular se selecciona de un grupo que comprende glaucoma, ojo seco, retinopatía diabética (DR), edema macular diabético (DME), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), neuritis óptica, oclusión de la vena central de la retina, oclusión de una rama de la vena retiniana, neuropatía óptica isquémica, lesión del nervio óptico, retinopatía del prematuro (ROP) o retinitis pigmentosa (RP), degeneración ganglionar de la retina, degeneración macular, neuropatía óptica hereditaria, neuropatía óptica metabólica, neuropatía debido a un agente tóxico o la causada por las reacciones adversas a los fármacos o deficiencia de vitamina; y la composición se formula como una crema, una espuma, una pasta, un ungüento, una emulsión, una solución líquida, unas gotas para los ojos, un gel, spray, una suspensión, una microemulsión, microesferas, microcápsulas, nanoesferas, nanopartículas, vesículas lipídicas, liposomas, vesículas poliméricas, un parche, un inserto biológico. En una realización preferida, la composición se formula como unas gotas para los ojos.

En otro aspecto la invención se relaciona con una preparación farmacéutica envasada, que comprende: (a) una composición farmacéutica de acuerdo con la invención en un contenedor; y (b) instrucciones para usar la composición para tratar una enfermedad ocular. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip para un gen diana en la retina del sujeto que padece una enfermedad ocular. En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. El gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1- 2. En diversas realizaciones los oligonucleótidos sentido y antisentido ARNip son los correspondientes oligonucleótidos sentido y antisentido expuestos en SEQ ID NOS:9015 y 9516. En una realización particular de acuerdo con este aspecto de la invención, la composición farmacéutica es para el tratamiento no invasivo de una enfermedad ocular asociada con la pérdida de una célula ganglionar de la retina en un sujeto. En otra realización particular de acuerdo con este aspecto la invención, la composición farmacéutica es para el tratamiento no invasivo de una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual. En aún otra realización particular de acuerdo con este aspecto la invención, la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento de un sujeto afectado con la enfermedad ocular asociada con la muerte de las células ganglionares de la retina.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para promover la supervivencia de las células ganglionares de la retina en un sujeto. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip para un gen diana en la retina del sujeto que padece una enfermedad ocular. En realizaciones preferidas, el al menos un ARNip es uno modificado químicamente. El gen diana establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 1- 2. En diversas realizaciones los oligonucleótidos sentido y antisentido del ARNip son los correspondientes pares de oligonucleótidos sentido y antisentido expuestos en SEQ ID NOS: 9015 y 9516. En una realización particular de acuerdo a este aspecto de la invención, la composición farmacéutica es para el tratamiento no invasivo de una enfermedad ocular asociada con la pérdida de una célula ganglionar de la retina en un sujeto. En otra realización particular de acuerdo con este aspecto la invención, la composición farmacéutica es para el tratamiento no invasivo de una enfermedad ocular asociada con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual. En aún otra realización particular de acuerdo con este aspecto de la invención, la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento de un sujeto afectado con la enfermedad ocular asociada con la muerte de las células ganglionares de la retina.

En algunas realizaciones, la composición incluye un agente potenciador de la viscosidad. Un agente potenciador de la viscosidad se selecciona entre, por ejemplo, un polímero hidrófilo incluyendo celulosa y derivados de celulosa, metilcelulosa y derivados de metilcelulosa. Tales agentes incluyen metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, derivados de los mismos, y combinaciones de los mismos y sus sales. En algunas realizaciones, el agente potenciador de la viscosidad es la metilcelulosa. En ciertas realizaciones se provee el agente potenciador de la viscosidad a una concentración de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 4%, en otras realizaciones el agente potenciador de la viscosidad se provee a una concentración de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 3%, o a una concentración de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 2%.

En algunas realizaciones, la composición incluye un agente que provee el equilibrio osmótico, o un surfactante. Tales agentes incluyen glicerol, etilenglicol, poli(etilenglicol), propilenglicol, sorbitol, manitol, monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos. La presente invención provee además un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método para tratar el glaucoma en un sujeto en necesidad de tratamiento que comprende administrar por vía tópica (no invasiva) a la

5 superficie del ojo del sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip para un gen diana en el ojo del sujeto, en una cantidad eficaz para tratar el glaucoma. En ciertas realizaciones preferidas, el ARNip es ARNip modificado químicamente. En ciertas realizaciones, el al menos un ARNip inhibe la expresión de al menos un gen expresado en la retina del ojo del sujeto. En ciertas realizaciones la inhibición de al menos un gen confiere a las propiedades neuroprotectoras de los ojos. El al menos un gen es CASP2 (SEQ ID NO: 1-2). En algunas realizaciones las cadenas sentido y antisentido del ARNip son las secuencias establecidas en SEQ ID NOS: 9015 y 9516.

10 La presente descripción revela además un método para tratar ojo seco en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende aplicar por vía tópica (no invasiva) a la superficie del ojo del sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip que inhibe la expresión de al menos un gen expresado en el ojo del sujeto en una cantidad eficaz para reducir los síntomas de ojo seco. En ciertas realizaciones preferidas, el ARNip es ARNip modificado químicamente. En ciertas realizaciones, el al menos un gen se expresa en la glándula lagrimal en el sujeto. En ciertas realizaciones, el al menos un gen se selecciona de la Tabla A2 establecido en una cualquiera de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8-10, SEQ ID NO: 26 - 27 y SEQ ID NO: 30 - 44. En algunas realizaciones el gen se selecciona de FAS, ligando FAS (FASL), p53, LRDD, PARP1, AIF (factor inductor de apoptosis), NOS1, NOS2A, XIAP y SHC1-SHC. En ciertas realizaciones preferidas el gen se transcribe en ARNm establecido en una cualquiera de SEQ ID NO:36 - SEQ ID NO:44. En algunas realizaciones las cadenas sentido y antisentido del ARNip se seleccionan a partir de una cualquiera de las secuencias en las Tablas 16-17 establecidas en SEQ ID NOS: 13,225-15,224.

20 La presente invención provee además un oligorribonucleótido en cuestión para uso en un método para tratar AMD, DR o DME en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar por vía tópica (no invasiva) a la superficie del ojo del sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip que inhibe la expresión de al menos un gen expresado en el ojo en el sujeto en una cantidad eficaz para reducir los síntomas de AMD, DR o DME. En ciertas realizaciones preferidas, el ARNip es ARNip modificado químicamente. En ciertas realizaciones, el al menos un ARNip inhibe la expresión de al menos un gen expresado en la coroides en el ojo del sujeto. El al menos un ARNm ocular diana establecido en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-2.

25 En una realización adicional, el trastorno ocular es retinitis pigmentosa (RP). Por lo tanto, la presente descripción revela un método para atenuar la expresión de un ARN ocular diana en el ojo de un sujeto que padece RP. El método comprende aplicar por vía tópica (no invasiva) a la superficie del ojo del sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip para un gen diana en el ojo del sujeto. En ciertas realizaciones preferidas, el ARNip es ARNip modificado químicamente. En ciertas realizaciones la atenuación de la expresión de al menos un gen diana (ARNm ocular diana) es eficaz para tratar RP. En ciertas realizaciones la atenuación de al menos un ARNm ocular diana es eficaz para reducir los síntomas de RP. En ciertas realizaciones, el al menos un ARNm diana es producto de un gen seleccionado de un gen enumerados en la Tabla A4 que se transcribe en el ARNm expuesto en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 3, 14, 26-35, 54-57. En algunas realizaciones, el ARNm ocular diana es producto de un gen seleccionado del grupo que consiste en CASP1, CASP3, CASP12, RTP801, RTP801L, CAPNS1, PARP1, AIF, NOS1, NOS2, XIAP y SHC1-SHC. En ciertas realizaciones preferidas el ARNip se dirige al ARNm expuesto en SEQ ID NOS:56-57.

30 En diversas realizaciones el al menos un ARNip se modifica químicamente. En diversas realizaciones el al menos un ARNip comprende un número suficiente de nucleótidos consecutivos que tienen una secuencia de suficiente homología con una secuencia del ácido nucleico presente dentro del ARNm diana para hibridar con el ARNm y atenuar la expresión del ARNm en el ojo del sujeto.

40 En diversas realizaciones, el al menos un ARNip comprende un número suficiente de nucleótidos consecutivos que tienen una secuencia de suficiente homología con una secuencia del ácido nucleico presente en el gen para hibridar con el gen y reducir o inhibir la expresión del gen en el ojo del sujeto.

Breve descripción de las figuras

45 Las figuras 1A-1B (a título ilustrativo): Imágenes representativas del DDIT4 ARNip marcado con Cy3 incorporado en retina de murino después de la administración de gotas para los ojos.

Las figuras 2A-2C (a título ilustrativo): Imágenes representativas del DDIT4 ARNip marcado con Cy3 incorporado en células ductales y acinares de la glándula lagrimal de murino después de la administración de gotas para los ojos.

Las figuras 3A-3C (a título ilustrativo): Evolución temporal de acumulación de Cy3-ARNip en coroides de rata después de la administración de gotas para los ojos, después de 1 y 4 horas después de la administración.

50 La figura 4 (a título ilustrativo): Administración de Cy3-ARNip a la red trabecular y el cuerpo ciliar una hora después de la administración de gotas para los ojos al ojo.

- Las figuras 5A-5B (a título ilustrativo): Microscopía confocal (x60 aumentos) de la retina 1 hora después de la administración de gotas para los ojos de QM5 - ARNip dirigido al gen p53. ARNip en la retina (células del epitelio pigmentario de la retina, células ganglionares de la retina) se muestra con fluorescencia Cy3.
- 5 Las figuras 6A-6B (a título ilustrativo) son imágenes representativas de DDIT4 ARNip marcado con Cy3 incorporado en la retina de ratones. La figura 6B muestra la acumulación de DDIT4_1 Cy3-ARNip 1 hora después de la administración de gotas para los ojos. Coroides, capa nuclear externa, RPE y capa del segmento exterior de las células fotorreceptoras muestran tinción con Cy3.
- La figura 7 (a título ilustrativo) muestra acumulación de DDIT4_1 Dy-649/C6-ARNip después de 1 hora de la administración de gotas para los ojos en células de RGC mediante el uso de tinción Dy-649/C6.
- 10 La figura 8A-8C representa administración del control ARNip FITC CNL_1RD/CNL_1FD y scrambled3'cy3-CNL_1 a los tejidos de la retina por diferentes métodos de tinción.
- Las figuras 9A-9B muestran la administración de diferentes estructuras de Casp2 a los tejidos de la retina del ratón.
- Las figuras 10A -10B (a título ilustrativo) muestran administración de TGASEII-FAM y HNOEL-FAM.
- 15 La figura 11 (a título ilustrativo) muestra la administración en la retina de ARNip contra p53 en PBS como grupo de control positivo.
- Las figuras 12A-12B muestran que en animales intactos o cuando la administración ED sin ARNip no se obtiene ninguna señal fluorescente en la retina.
- 20 Las figuras 13A-13D (a título ilustrativo) proporcionan los resultados de un experimento que muestra modificación genética de p53 en la retina. Las figuras 13A-13B muestran curvas estándar para la medición de los niveles de proteína de p53. Las figuras 13C-13D muestran modificación genética de p53 de la retina mediante gotas para los ojos.
- Descripción detallada de la invención
- La presente invención provee composiciones tópicas de oligonucleótidos y métodos no invasivos de uso de los mismos para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos oculares. En particular, la invención provee su uso en métodos para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos oculares asociados con la expresión del gen en el
- 25 ojo de un sujeto que padece la enfermedad o trastorno.
- La presente invención se basa en parte en el descubrimiento inesperado de que la administración tópica de forma no invasiva de composiciones de ARNip dirigidas a ciertos tejidos oculares y tipos de células y es activa en las células y los tejidos cuando se administran por vía tópica a la superficie del ojo. El descubrimiento es sorprendente en vista de los obstáculos conocidos para administrar ARNip y provee métodos no invasivos como una alternativa realista a la
- 30 administración intravítrea o sistémica.
- Para que las moléculas de ARNip sean eficaces en el ARNm de silenciamiento de un gen diana, el ARNip requiere tres niveles de focalización: al tejido diana, al tipo de célula diana y al compartimiento subcelular diana. La presente invención ahora revela los métodos no invasivos de tratamiento de enfermedades y trastornos oculares.
- 35 La presente invención se refiere en general a compuestos que reducen la expresión de los genes expresados en las células oculares, particularmente a nuevos ARN interferentes pequeños (ARNip), y al uso de estos ARNip nuevos en el tratamiento de un sujeto que padece de condiciones médicas asociadas con la expresión de esos genes en los tejidos y las células del ojo.
- Los métodos para atenuar la expresión de un ARNm ocular diana y los métodos de tratamiento de trastornos en el ojo se discuten en este documento en detalle, y cualquiera de dichas moléculas y/o composiciones se pueden emplear de
- 40 manera beneficiosa en el tratamiento de un sujeto que padece cualquiera de dichas condiciones.
- Los ARNip de la presente invención poseen estructuras y modificaciones que pueden aumentar la actividad, aumentar la estabilidad, y/o minimizar la toxicidad; las nuevas modificaciones de los ARNip de la presente invención pueden aplicarse beneficiosamente para duplicar las secuencias de ARN bicatenario útiles en la prevención o atenuación de la expresión del gen diana, en particular, los genes diana discutidos en este documento.
- 45 Los detalles de un ejemplo no limitado de genes diana por indicación se presentan en las Tablas A1- A4, a continuación.

ES 2 563 984 T3

Tabla A1: Genes diana para el tratamiento del glaucoma

Gen	Nombre completo y gen humano ID/SEQ ID NO. para polinucleótido del ARNm
CASP2	<p>caspara 2, peptidasa de cisteína relacionada con la apoptosis</p> <p>gi 39995058 ref NM_032982.2 (SEQ ID NO:1)</p> <p>gi 39995060 ref NM_032983.2 (SEQ ID NO:2)</p>
RTP801	<p>Transcripción inducible del daño de ADN Homo sapiens 4 (DDIT4), ARNm</p> <p>gi 56676369 ref NM_019058.2 (SEQ ID NO:3)</p>
ASPP1	<p>proteína fosfatasa 1, subunidad (inhibidora) reguladora 13B (PPP1R13B)</p> <p>gi 121114286 ref NM_015316.2 (SEQ ID NO:4)</p>
p53	<p>proteína tumor p53 gi:120407067,NM_000546.2 (SEQ ID NO:5)</p>
TP53BP2	<p>proteína tumor p53 proteína de enlace, 2</p> <p>gi 112799848 ref NM_001031685.2 (SEQ ID NO:6)</p> <p>gi 12799845 ref NM_005426.2 (SEQ ID NO:7)</p>
LRDD	<p>repeticiones ricas en leucina y dominio de muerte que contiene</p> <p>variante 2 gi 61742781 ref NM_018494.3 (SEQ ID NO:8)</p> <p>variante 1 gi 61742783 ref NM_145886.2 (SEQ ID NO:9)</p> <p>variante 3 gi 61742785 ref NM_145887.2 (SEQ ID NO:10)</p>
CYBA	<p>citocromo b-245, alfa polipéptido</p> <p>gi 68509913 ref NM_000101.2 (SEQ ID NO:11)</p>
BNIP3	<p>proteína interactuante de 19kDa E1B adenovirus/BCL2 3</p> <p>gi 7669480 ref NM_004052.2 (SEQ ID NO:12)</p>
RAC1	<p>sustrato de toxina botulínica C3 relacionada con ras 1 (familia rho, proteína de enlace GTP pequeña)</p> <p>(gi 38505164 ref NM_198829.1) (SEQ ID NO:13)</p>
RTP801L	<p>Transcripción inducible del daño de ADN Homo sapiens 4-like (DDIT4L), ARNm</p> <p>gi 34222182 ref NM_145244.2 (SEQ ID NO:14)</p>
SPP1	<p>fosfoproteína secretada 1</p> <p>variante 1 gi 91206461 ref NM_001040058.1 (SEQ ID NO:15)</p> <p>variante 2 gi 38146097 ref NM_000582.2 (SEQ ID NO:16)</p> <p>variante 3 gi 91598938 ref NM_001040060.1 (SEQ ID NO:17)</p>
SOX9	<p>Homo sapiens SRY (región determinante del sexo Y)-caja 9 (displasia campomélica, autosomal sex-inversa) (SOX9), ARNm</p> <p>gi 37704387 ref NM_000346.2 (SEQ ID NO:18)</p>

ES 2 563 984 T3

ACHE	Acetilcolinesterasa Homo sapiens (grupo sanguíneo Yt) (ACHE), variante E4-E6, ARNm gi 88999567 ref NM_000665.3 (SEQ ID NO:19) variante E4-E5, ARNm gi 88999566 ref NM_015831.2 (SEQ ID NO:20)
ADRB1	Receptor, beta-1, adrenérgico Homo sapiens (ADRB1), ARNm gi 110349783 ref NM_000684.2 (SEQ ID NO:21)
HTRA2	Htra serina peptidasa 2 v 1 gi:73747817, NM_013247 (SEQ ID NO:22) v 2 gi:73747818, NM_145074 (SEQ ID NO:23)
KEP1	proteína 1 asociada con ECH similar a Kelch v 1 gi:45269144 NM_203500 (SEQ ID NO:24) v 2 gi:45269143 NM_012289 (SEQ ID NO:25)
SHC1-SHC	dominio 2 homología Src que contiene prot. 1 transformante v 1 gi: 194239661 NM_183001 (SEQ ID NO:26) v 2 gi: 194239660 NM_003029 (SEQ ID NO:27)
CAPNS1	calpaina Homo sapiens, subunidad 1 pequeña (CAPNS1), variante 1, ARNm gi 51599152 ref NM_001749.2 (SEQ ID NO:28) variante 2, ARNm gi 51599150 ref NM_001003962.1 (SEQ ID NO:29)
PARP1	poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 Homo sapiens (PARP1), ARNm gi 156523967 ref NM_001618.3 (SEQ ID NO:30)
AIF (AIFM1)	factor inductor de apoptosis Homo sapiens, asociado con la mitocondria, 1 variante 4, ARNm gi 195927003 ref NM_001130846.1 (SEQ ID NO:31) variante 5, ARNm gi 195927005 ref NM_001130847.1 (SEQ ID NO:32)
NOS1	sintasa del óxido nítrico 1 Homo sapiens (neuronal) (NOS1), ARNm gi 194239671 ref NM_000620.2 (SEQ ID NO:33)
NOS2A	Homo sapiens sintasa del óxido nítrico 2, inducible (NOS2), ARNm gi 206597519 ref NM_000625.4 (SEQ ID NO:34)
XIAP	inhibidor unido a X de apoptosis Homo sapiens (XIAP), ARNm gi 32528298 ref NM_001167.21 (SEQ ID NO:35)

ES 2 563 984 T3

Tabla A2: Genes diana para tratamiento de ojo seco

Gen	Nombre completo y gen humano ID
FAS	CD95, superfamilia del receptor del TNF, miembro 6 v 1. gi 23510419 ref NM_000043.3 (SEQ ID NO:36) v 3. gi 23510422 ref NM_152872.1 (SEQ ID NO:37) v 2. gi 23510420 ref NM_152871.1 (SEQ ID NO:38) v 4. gi 23510424 ref NM_152873.1 (SEQ ID NO:39) v 8. gi 23510426 ref NM_152874.1 (SEQ ID NO:40) v 5. gi 23510428 ref NM_152875.1 (SEQ ID NO:41) v 7. gi 23510433 ref NM_152877.1 (SEQ ID NO:42) v 6. gi 23510430 ref NM_152876.1 (SEQ ID NO:43)
ligando FAS	superfamilia del TNF, miembro 6 (FASL) gi 4557328 ref NM_000639.1 (SEQ ID NO:44)
p53	proteína tumor p53 gi8400737, NM_000546.2 (SEQ ID NO:5)
LRDD	repeticiones ricas en leucina y dominio de muerte que contiene gi 61742781 ref NM_018494.3 (SEQ ID NO:8) gi 61742783 ref NM_145886.2 (SEQ ID NO:9) gi 61742785 ref NM_145887.2 (SEQ ID NO:10)
PART1	poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) Homo sapiens, ARNm gi 156523967 ref NM_001618.3 (SEQ ID NO:30)
AIF (AIFM1)	Factor inductor de apoptosis, asociado con la mitocondria, 1 Homo sapiens variante 4, ARNm gi 195927003 ref NM_001130846.1 (SEQ ID NO:31) variante 5, ARNm gi 195927005 ref NM_001130847.1 (SEQ ID NO:32)
NOS1	sintasa del óxido nítrico 1 (neuronal) (NOS1), Homo sapiens ARNm gi 194239671 ref NM_000620.2 (SEQ ID NO:33)
NOS2A	sintasa del óxido nítrico 2, inducible (NOS2), Homo sapiens ARNm gi 206597519 ref NM_000625.4 (SEQ ID NO:34)
XIAP	inhibidor de apoptosis unido a X (XIAP), Homo sapiens ARNm gi 32528298 ref NM_001167.2 (SEQ ID NO:35)
SHC1-SHC	Src dominio homología 2 que contiene transformante prot. 1

ES 2 563 984 T3

	v 1 gi: 194239661 NM_183001 (SEQ ID NO:26)
	v 2 gi: 194239660 NM_003029 (SEQ ID NO:27)

Tabla A3: Genes diana para tratamiento de DR, DME, AMD

Gen	Nombre completo y gen humano ID
LGALS3	lectina galactósido-enlace soluble 3 v1 gi:115430222 NM_002306 (SEQ ID NO:45) v2 gi:115430224 NR_003225 (SEQ ID NO:46)
SLC2A1	familia de portador de soluto 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 1 gi 166795298 ref NM_006516.1 (SEQ ID NO:49)
SLC2A2	familia de portador de soluto 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 2 gi 4557850 ref NM_000340.1 (SEQ ID NO:50)
SLC2A3	Homo sapiens familia de portador de soluto 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 3 (GLUT3) gi 221136810 ref NM_006931.1 (SEQ ID NO:51)
SLC5A1	familia de portador de soluto 5 (sodio/glucosa cotransportadora), miembro 1 gi 208973247 ref NM_000343.2 (SEQ ID NO:52)
SORD	sorbitol deshidrogenasa ARNm gi 156627570 ref NM_003104.3 (SEQ ID NO:53)
CTSD	Homo sapiens catepsina D (CTSD) gi 23110949 ref NM_001909.3 (SEQ ID NO:47)
CASP2	caspasa 2, peptidasa de cisteína relacionada con la apoptosis gi 39995058 ref NM_032982.2 (SEQ ID NO:1) gi 39995060 ref NM_032983.2 (SEQ ID NO:2)
RTP801	Transcripción inducible del daño de ADN Homo sapiens 4 (DDIT4), ARNm gi 56676369 ref NM_019058.2 (SEQ ID NO:3)
p53	proteína tumor p53 gi8400737, NM_000546.2 (SEQ ID NO:5)
TP53BP2	proteína tumor p53 proteína de enlace, 2 gi 112799848 ref NM_001031685.2 (SEQ ID NO:6) gi 112799845 ref NM_005426.2 (SEQ ID NO:7)
LRDD	repeticiones ricas en leucina y dominio de muerte que contiene gi 61742781 ref NM_018494.3 (SEQ ID NO:8)

ES 2 563 984 T3

	gi 61742783 ref NM_145886.2 (SEQ ID NO:9) gi 61742785 ref NM_145887.2 (SEQ ID NO:10)
BNIP3	proteína interactuante de 19kDa E1B adenovirus/BCL2 3 gi 7669480 ref NM_004052.2 (SEQ ID NO:12)
RAC1	sustrato de toxina botulínica C3 relacionada con ras 1 (familia rho, proteína de enlace GTP pequeña) (gi 38505164 ref NM_198829.1) (SEQ ID NO:13)
AKR1B1	aldo-keto reductasa familia 1, miembro B1 (aldosa reductasa) gi 24497579 ref NM_001628.2 (SEQ ID NO:48)
KEAP1	proteína 1 asociada con ECH similar a Kelch v 1 gi:45269144 NM_203500 (SEQ ID NO:24) v 2 gi:45269143 NM_012289 (SEQ ID NO:25)
PARP1	Homo sapiens poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1), ARNm gi 156523967 ref NM_001618.3 (SEQ ID NO:30)
AIF(AIFM1)	Homo sapiens factor inductor de apoptosis, asociado con la mitocondria, 1 variante 4, ARNm gi 195927003 ref NM_001130846.1 (SEQ ID NO:31) variante 5, ARNm gi 195927005 ref NM_001130847.1 (SEQ ID NO:32)
NOS1	Homo sapiens sintasa del óxido nítrico 1 (neuronal) (NOS1), ARNm gi 194239671 ref NM_000620.2 (SEQ ID NO:33)
NOS2A	Homo sapiens sintasa del óxido nítrico 2, inducible (NOS2), ARNm gi 206597519 ref NM_000625.4 (SEQ ID NO:34)
XIAP	Homo sapiens inhibidor de apoptosis unido a X (XIAP), ARNm gi 32528298 ref NM_001167.2 (SEQ ID NO:35)
SHC1- SHC	Src dominio de homología 2 que contiene prot. 1transformante v 1 gi: 194239661 NM_183001 (SEQ ID NO:26) v 2 gi: 194239660 NM_003029 (SEQ ID NO:27)

Tabla A4: Ejemplos de genes diana para tratamiento de retinitis pigmentosa (RP)

Gen	Nombre completo y gen humano ID
CASP1	Homo sapiens caspasa 1, peptidasa de cisteína relacionada con la apoptosis (interleucina 1, beta, convertasa) (CASP1), ARNm variante epsilon, gi 73622117 ref NM_033295.2 (SEQ ID NO:54) variante alfa, gi 73622114 ref NM_033292.2 (SEQ ID NO:55)

ES 2 563 984 T3

CASP3	Homo sapiens caspasa 3, peptidasa de cisteína relacionada con la apoptosis (CASP3), ARNm variante alfa, gi 73622121 ref NM_004346.3 (SEQ ID NO:56) variante beta, gi 73622122 ref NM_032991.2 (SEQ ID NO:57)
CASP12	Homo sapiens caspasa 12 variante zeta (CASP12) ARNm, secuencia completa; empalmado alternativamente gi 20069120 gb AF486846.1 (SEQ ID NO:58)
RTP801	Transcripción inducible del daño de ADN Homo sapiens 4 (DDIT4), ARNm gi 56676369 ref NM_019058.2 (SEQ ID NO:3)
RTP801L	Transcripción inducible del daño de ADN Homo sapiens 4-like (DDIT4L), ARNm gi 34222182 ref NM_145244.2 (SEQ ID NO:14)
CAPNS1	Homo sapiens calpaina, subunidad 1 pequeña (CAPNS1), variante 1, ARNm gi 51599152 ref NM_001749.2 (SEQ ID NO:28) variante 2, ARNm gi 51599150 ref NM_001003962.1 (SEQ ID NO:29)
PARP1	Homo sapiens poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1), ARNm gi 156523967 ref NM_001618.3 (SEQ ID NO:30)
AIF (AIFM1)	Homo sapiens factor inductor de apoptosis, asociado con la mitocondria, 1 variante 4, ARNm gi 195927003 ref NM_001130846.1 (SEQ ID NO:31) variante 5, ARNm gi 195927005 ref NM_001130847.1 (SEQ ID NO:32)
NOS1	Homo sapiens sintasa del óxido nítrico 1 (neuronal) (NOS1), ARNm gi 194239671 ref NM_000620.2 (SEQ ID NO:33)
NOS2A	Homo sapiens sintasa del óxido nítrico 2, inducible (NOS2), ARNm gi 206597519 ref NM_000625.4 (SEQ ID NO:34)
XIAP	Homo sapiens inhibidor de apoptosis unido a X (XIAP), ARNm gi 32528298 ref NM_001167.2 (SEQ ID NO:35)
SHC1- SHC	Src homología 2 dominio que contiene transformante prot. 1 v 1 gi: 194239661 NM_183001 (SEQ ID NO:26) v 2 gi: 194239660 NM_003029 (SEQ ID NO:27)

"Variante" o "v" se refieren a la variante de transcripción.

5

Las tablas A1-A4 proporcionan el gi (identificador GenInfo) y los números de registro para un ejemplo de secuencias de polinucleótidos de ARNm humano. Los inhibidores de oligonucleótidos de la presente invención se dirigen a CASP2. La inhibición de los genes de las Tablas A1, A2, A3 y A4 es útil en el tratamiento de, *inter alia*, glaucoma, ojo seco, retinopatía diabética (DR), edema macular diabético (DME), degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y retinitis pigmentosa (RP), respectivamente.

Definiciones

Por conveniencia ciertos términos empleados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones se describen en este documento.

5 Se debe señalar que, como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen las formas plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Cuando se describen aspectos o realizaciones de la invención en términos de grupos de Markush u otra agrupación de alternativas, los expertos en el arte reconocerán que la invención también se describe de este modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo.

10 Un "inhibidor" es un compuesto que es capaz de reducir la expresión de un gen o la actividad del producto de dicho gen en una medida suficiente para lograr un efecto biológico o fisiológico deseado. El término "inhibidor" tal como se utiliza en este documento se relaciona con uno o más de un inhibidor de oligonucleótido, incluyendo ARNip, antisentido, ARNhc, miARN y ribozimas. La inhibición también puede ser denominada como la atenuación de la expresión de ARNm, reducción de la expresión, o para interferencia por ARN (ARNi), silenciamiento. Los inhibidores revelados en este documento son compuestos de ARNip modificados químicamente que incorporan modificaciones tales como
15 cambios en la unidad estructural de azúcar y/o la unidad estructural base y/o los enlaces entre los nucleótidos en la estructura de oligonucleótido.

20 El término "inhibir" o "atenuar" tal como se utiliza en este documento se relaciona con la reducción de la expresión de un gen, una variante o producto del mismo o la actividad del producto de dicho gen en una medida suficiente para lograr un efecto biológico o fisiológico deseado. La inhibición puede ser completa o parcial. Por ejemplo "inhibición" del gen CASP2 significa inhibición de la expresión del gen (transcripción o traducción) o actividad del polipéptido de una o más de las variantes reveladas en cualquier Tabla A1 o A3 o un SNP (polimorfismo de nucleótido único) u otras variantes de los mismos.

El "tejido ocular" se refiere a cualquier tejido asociado con la estructura del ojo y está destinado a incluir, de manera no limitante, la esclerótica, la córnea, la corioide, la retina, la glándula lagrimal, y el nervio óptico.

25 La "célula ocular" se relaciona con cualquier célula asociada con las estructuras del aparato de ojo y lagrimal y está destinada a incluir, de una manera no limitante, célula ganglionar de la retina, una célula del epitelio pigmentario de la retina, una célula de la córnea, conjuntiva, cámara anterior, iris, proceso ciliar, retina, corioide y células de la corioide, la red trabecular, y similares. Por ejemplo, la red trabecular incluye la red uveal interior, la red corneoescleral y el tejido yuxtacanalicular. La glándula lagrimal incluye la glándula lagrimal per se, el punto lagrimal inferior y superior, el canal lagrimal inferior y superior, el saco lagrimal y similares.
30

Como se utiliza en este documento, los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se pueden usar indistintamente y se refieren a secuencias de nucleótidos que comprenden ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). También se debe entender que los términos incluyen, como equivalentes, análogos de ya sea ARN o ADN hechos de análogos de nucleótidos. A lo largo de esta solicitud las secuencias de ARNm se establecen como la representación de los genes correspondientes. Los términos "secuencia de polinucleótidos de ARNm" y el ARNm se utilizan indistintamente.
35

"Oligonucleótido", "oligorribonucleótido" u "oligómero" se relacionan con un desoxirribonucleótido o secuencia de ribonucleótidos de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos. Cada nucleótido del ADN o ARN de la secuencia puede ser, independientemente, natural o sintético, y/o modificado o no modificado. Las modificaciones incluyen cambios en la unidad estructural de azúcar, la unidad estructural base y/o los enlaces entre nucleótidos en el oligonucleótido. Los compuestos de la presente invención abarcan moléculas que comprenden desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos modificados, ribonucleótidos modificados y combinaciones de los mismos.
40

La presente invención provee métodos y composiciones para inhibir la expresión de un gen diana *in vivo*. En general, el método incluye administrar por vía tópica oligorribonucleótidos, en particular los ARN interferentes pequeños (es decir, ARNip) o un material de ácido nucleico que puede producir ARNip en una célula, para dirigir un ARNm de los genes expuestos en las Tablas A1- A4; en una cantidad suficiente para reducir la expresión de un gen diana por un mecanismo de interferencia de ARN. En particular, el método puede ser utilizado para inhibir la expresión del gen para el tratamiento de un sujeto que padece un trastorno o enfermedad ocular relacionada con la expresión de ese gen en el tejido ocular o célula. De acuerdo con la presente invención, las moléculas de ARNip o inhibidores del gen diana se utilizan como fármacos para tratar diversas patologías oculares.
45
50

Se entiende que "nucleótido" abarca desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, que pueden ser naturales o sintéticos, y/o modificados o no modificados. Las modificaciones incluyen cambios y sustituciones a la unidad estructural de azúcar, la unidad estructural base y/o los enlaces internucleotídicos.

5 Como se utiliza en este documento, los términos "análogo de nucleótido sin apareamiento" significa un análogo de nucleótidos que comprende una unidad estructural de apareamiento no-base incluyendo, pero no limitando a: 6 adenosina desaminasa (Nebularina), 4-Me-indol, 3-nitropirrol, 5- nitroindol, Ds, Pa, N3-Me ribo U, N3-Me riboT, N3-Me dC, N3-Me-dT, N1-Me-dG, N1-Me-dA, N3-etil-dC, N3-Me dC. En algunas realizaciones el análogo de nucleótido de apareamiento no-base es un ribonucleótido. En otras realizaciones este es un desoxirribonucleótido.

10 Todos los análogos de, o modificaciones a, un nucleótido/oligonucleótido se pueden emplear con la presente invención, a condición de que dicho análogo o modificación no afecte sustancialmente de forma negativa la estabilidad y la función del nucleótido/oligonucleótido. Las modificaciones aceptables incluyen modificaciones de la unidad estructural de azúcar, modificaciones de la unidad estructural base, modificaciones en los enlaces internucleotídicos y combinaciones de los mismos.

15 Lo que algunas veces se denomina en la presente invención como un "nucleótido abásico" o "análogo de nucleótido abásico" se denomina más correctamente como un pseudo-nucleótido o una unidad estructural no convencional. Un nucleótido es una unidad monomérica de ácido nucleico, que consta de un azúcar ribosa o desoxirribosa, un fosfato y una base (adenina, guanina, timina, o citosina en el ADN; adenina, guanina, uracilo, o citosina en el ARN). Un nucleótido modificado comprende una modificación en uno o más del azúcar, fosfato y/o base. El pseudo-nucleótido abásico carece de una base, y por lo tanto no es estrictamente un nucleótido.

20 El término "unidad estructural de protección" como se utiliza en este documento incluye unidad estructural ribosa abásica, unidad estructural de desoxirribosa abásica, modificaciones de ribosa abásica y unidades estructurales desoxirribosas abásicas incluyendo modificaciones 2' O alquilo; ribosa abásica invertida y unidades estructurales de desoxirribosa abásicas y modificaciones de las mismas; C6-imino-Pi; un nucleótido espejo incluyendo ADN-L y ARN-L; 25 5'OMe nucleótido; y análogos de nucleótidos incluyendo 4', 5'- metileno nucleótido; 1- (β -D-eritrofuranosil) nucleótido; 4'-tio nucleótido, nucleótido carbocíclico; 5'-amino-alquil fosfato; 1,3-diamino-2-propil fosfato, 3-aminopropil fosfato; 6-aminoheptil fosfato; 12-aminododecil fosfato; hidroxipropil fosfato; 1,5-anhidrohexitol nucleótido; alfa-nucleótido; treopentofuranosil nucleótido; 3',4'-seco nucleótido acíclico; 3,4-dihidroxibutil nucleótido; 3,5-dihidroxipentil nucleótido, unidad estructural 5'-5'-invertida abásica; 1,4-butanodiol fosfato; 5'-amino; y unidades estructurales 5'-mercapto y metilfosfonato en puente o no en puente. Un ribonucleótido 2'-O-metil modificado en el azúcar también se conoce como 30 2'- OMe modificado en el azúcar o ribonucleótido 2'-OMe modificado.

Ciertas unidades de protección preferidas son las unidades estructurales de ribosa abásica o desoxirribosa abásica; unidades estructurales de ribosa abásica invertida o desoxirribosa abásica; C6-amino-Pi; un nucleótido espejo incluyendo ADN-L y ARN-L.

35 El término "unidad estructural no convencional", como se usa en este documento se relaciona con unidad estructural de ribosa abásica, una unidad estructural de desoxirribosa abásica, un desoxirribonucleótido, un desoxirribonucleótido modificado, un nucleótido espejo, un análogo de nucleótido apareamiento no-base y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace 2'-5' internucleotídico fosfato; ácidos nucleicos en puente incluyendo LNA y ácidos nucleicos en puente con etileno.

40 La unidad estructural de desoxirribosa abásica incluye, por ejemplo, desoxirribosa-3'-fosfato abásica; 1,2-didesoxi-D-ribofuranosa-3'-fosfato; 1,4-anhidro-2-desoxi-D-ribitol-3'-fosfato. La unidad estructural de desoxirribosa abásica invertida incluye desoxirribo abásica invertida; 3', 5' desoxiabásica 5'-fosfato invertida.

45 En el contexto de la presente invención, un nucleótido "espejo" (también denominado como un spieglemer), es un análogo de nucleótido con quiralidad inversa a la de los nucleótidos de origen natural o empleados comúnmente, i.e., una imagen especular del nucleótido de origen natural o comúnmente empleado. El nucleótido espejo es un ribonucleótido (ARN-L) o un desoxirribonucleótido (ADN-L) y puede comprender además al menos una modificación de azúcar o de base y/o una modificación del esqueleto, tal como una unidad estructural de fosforotioato o fosfonato. La patente de los Estados Unidos No. 6,602,858 revela catalizadores del ácido nucleico que comprende al menos una sustitución del L-nucleótido. Los nucleótidos espejo incluye, por ejemplo, ADN-L (L-desoxiadenosina-3'-fosfato (espejo dA); L-desoxirribo citidina-3'-fosfato (espejo dC); L-desoxi guanosina-3'-fosfato (espejo dG); L- deoxirribo timidina- 3'-fosfato (espejo dT) y ARN-L (L-ribo adenosina-3'-fosfato (espejo rA); L-ribocitidina-3'-fosfato (espejo rC); L-riboguanosina-3'-fosfato (espejo rG); L-ribouracil-3'-fosfato (espejo dU)

50 El desoxirribonucleótido modificado incluye, por ejemplo, ADN 5'OMe (5-metil-desoxirriboguanosina-3'-fosfato), que puede ser útil como un nucleótido en la posición 5' terminal (posición número 1); PACE (desoxirriboadenina 3'

fosfonoacetato, desoxirribocitidina 3' fosfonoacetato, desoxirriboguanosina 3' fosfonoacetato, desoxirribotimidina 3' fosfonoacetato.

Los ácidos nucleicos en puente incluyen LNA (2'-O, 4'-C-metileno en puente ácido nucleico adenosina 3' monofosfato, 2'-O, 4'-C-metileno en puente ácido nucleico 5-metil-citidina 3' monofosfato, 2'-O, 4'-C-metileno en puente ácido nucleico guanosina 3' monofosfato, 5-metil-uridina (o timidina) 3' monofosfato); y ENA (2'-O, 4'-C-etileno en puente ácido nucleico adenosina 3' monofosfato, 2'-O, 4'-C-etileno en puente ácido nucleico 5-metil-citidina 3' monofosfato, 2'-O, de 4'-C-etileno en puente ácido nucleico guanosina 3' monofosfato, 5-metil-uridina (o timidina) 3' monofosfato).

En algunas realizaciones de la presente divulgación una unidad estructural no convencional preferida es una unidad estructural de ribosa abásica, una unidad estructural de desoxirribosa abásica, un desoxirribonucleótido, un nucleótido espejo, y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace 2'-5' internucleotídico fosfato.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención provee compuestos inhibidores de oligonucleótidos que comprenden los nucleótidos no modificados y modificados. El compuesto comprende al menos un nucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en una modificación de azúcar, una modificación de base y una modificación de enlace internucleotídico y puede contener ADN, y los nucleótidos modificados tales como LNA (ácido nucleico bloqueado) incluyendo ENA (ácido nucleico en puente con etileno); PNA (ácido nucleico peptídico); arabinósido; PACE (fosfonoacetato y derivados de los mismos), espejo de nucleótidos o nucleótidos con un azúcar de 6 carbonos.

El compuesto comprende una modificación en 2' en la unidad estructural de azúcar de al menos un ribonucleótido ("modificación de azúcar 2").

Otras modificaciones de estabilización son también posibles (por ejemplo, nucleótidos modificados adicionados a un extremo 3' o 5' de un oligómero). En algunas realizaciones, el esqueleto de los oligonucleótidos se modifica y comprende entidades de fosfato-D-ribosa, pero también puede contener entidades tiosulfato-D-ribosa, triéster, tioato, esqueleto en puente 2'-5' (también puede ser denominado como 5'-2'), enlace internucleotídico modificado PACE o cualquier otro tipo de modificación.

Otras modificaciones incluyen adiciones a los extremos 5' y/o 3' de los oligonucleótidos. Tales modificaciones en los extremos pueden ser lípidos, péptidos, azúcares u otras moléculas.

Las posibles modificaciones en el residuo de azúcar son múltiples e incluyen 2'-O alquilo, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico glicol (GNA), ácido nucleico treosa (TNA), arabinósido; alritol (ANA) y otros azúcares de 6 miembros incluyendo morfolinol y ciclohexinilos.

Los compuestos de LNA se describen en la Publicación de la Patente Internacional Nos. WO 00/47599, WO 99/14226, y WO 98/39352. Ejemplos de compuestos de ARNip que comprenden nucleótidos LNA se revelan en Elmen et al., (NAR 2005. 33(1):439-447) y en la Publicación de la Patente Internacional No. WO 2004/083430. Análogos de nucleótidos con anillo de seis miembros se revelan en Allart, et al (Nucleosides & Nucleotides, 1998, 17:1523-1526; and Perez-Perez, et al., 1996, Bioorg. and Medicinal Chem Letters 6:1457-1460) oligonucleótidos que comprenden análogos de nucleótidos con anillo de seis miembros incluyendo monómeros de nucleótidos hexitol y alritol se revelan en la Solicitud de la Aplicación de la Patente Internacional No. WO 2006/047842.

También son posibles modificaciones del esqueleto, tales como etilo (resultando en un triéster fosfo-etilo); propilo (resultando en un triéster fosfo-propilo); y butilo (resultando en un triéster fosfo-butilo). Otras modificaciones del esqueleto incluyen esqueletos poliméricos, esqueletos cíclicos, esqueletos acíclicos, esqueletos tiosulfato-D-ribosa, amidatos y derivados fosfonoacetato. Ciertas estructuras incluyen compuestos de ARNip que tienen uno o una pluralidad de enlaces 2'-5' internucleotídicos (puentes o esqueleto).

La presente invención también se relaciona con compuestos que reducen la expresión de varios genes, en particular con nuevos compuestos de ARN interferente pequeño (ARNip), y con el uso de estos nuevos ARNip en el tratamiento de diversas enfermedades oculares y condiciones médicas del ojo.

Para cada gen existe una lista separada de secuencias de oligómeros de 19-mer, que se priorizan en función de su puntuación en el algoritmo propietario como las mejores secuencias para dirigir la expresión de genes humanos. Las secuencias de ARNip de 21 o 23-mer se pueden generar por la extensión 5' y/o 3' de las secuencias de 19-mer reveladas en este documento. Dicha extensión es preferiblemente complementaria a la secuencia de ARNm correspondiente. Ciertos oligómeros de 23-mer fueron ideados por este método donde el orden de la prioridad es el orden de la correspondiente 19-mer. La tabla B provee los correspondientes oligonucleótidos sentido y antisentido humanos útiles en la preparación de ARNip. Las abreviaturas de las especies cruzadas son: Ms: Ratón, Rb: Conejo, Chmp: chimpancé, Mnk: Mono, Chn: chinchilla, GP: cobaya.

Enfermedades oculares

La administración tópica de los compuestos terapéuticos de oligonucleótidos es útil en el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades y trastornos oculares. Algunos de los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento de pacientes que sufren de enfermedades y trastornos en los que la neuroprotección del nervio óptico sería de beneficio, por ejemplo, en:

5

1. glaucoma primario/secundario de ángulo abierto
2. esclerosis múltiple (neuritis óptica)
3. oclusión central o de una rama de la vena retiniana
4. neuropatía óptica isquémica (en el estado epiléptico, infección VIH-1)

10

5. lesión del nervio óptico
6. tumores que se extienden en la región supraselar (por encima de la silla turca)
7. tumores yuxta quiasmáticos (la pérdida visual asociada con la compresión del quiasma óptico por tumores de la hipófisis puede ser transitoria o permanente, posiblemente relacionada con el grado de degeneración retrógrada irreversible a las células ganglionares de la retina.

15

8. Retinoblastoma

Glaucoma primario de ángulo abierto

La mayoría de los casos de glaucoma son la forma conocida como glaucoma primario de ángulo POAG, también llamado glaucoma crónico de ángulo abierto). POAG resulta de una acumulación de líquido del humor acuoso dentro de la cámara anterior del ojo que resulta de la presión intraocular (IOP). La IOP elevada, que se puede medir mediante un ensayo de "tonometría", los resultados de fluido que entra en el ojo y no lo suficientemente fluido que sale del ojo. Normalmente, el fluido entra en el ojo por que filtra hacia fuera de los vasos sanguíneos en el cuerpo ciliar. Este líquido finalmente hace su camino más allá de la lente del cristalino, a través de la pupila (la abertura central en el iris), y en el ángulo irido-corneal, el ángulo anatómico formado donde el iris y la córnea se unen. A continuación, el fluido pasa a través de la red trabecular en el ángulo y sale del ojo a través del canal de Schlemm.

20

Si exceso de fluido entra en el ojo, o si la red trabecular "drenaje" está obstruido (por ejemplo, con desechos o células) de modo que no suficiente fluido abandona el ojo, la presión se acumula en lo que se conoce como " glaucoma de ángulo abierto". El glaucoma de ángulo abierto también puede ser causado cuando la parte posterior del iris se adhiere a la superficie anterior de la lente que crea un "bloqueo pupilar", y la prevención de fluido intraocular pase a través de la pupila hacia la cámara anterior.

25

Si el ángulo entre el iris y la córnea es demasiado estrecho o es aún cerrado, entonces el líquido se acumula, provocando aumento de la presión en lo que se conoce como "glaucoma de ángulo cerrado."

30

El glaucoma no tratado finalmente conduce a la atrofia óptica y ceguera.

Glaucoma de tensión normal

La presión ocular intraocular es normal (entre 12 - 22 mm de Hg) en aproximadamente 25 - 30% de los casos de glaucoma en los Estados Unidos, una condición conocida como glaucoma de tensión normal. (En Japón, las tasas pueden ser tan altas como 70%). Otros factores están presentes que causan daño al nervio óptico, pero no afectan la IOP.

35

Glaucoma de ángulo cerrado

El glaucoma de ángulo cerrado (también llamado glaucoma de ángulo cerrado) es responsable del 15% de todos los casos de glaucoma. Es menos común que POAG en los EE.UU., pero constituye casi la mitad de los casos de glaucoma en el mundo debido a su mayor prevalencia entre los asiáticos. El iris es empujado contra la lente, a veces pegado a él, cerrando el ángulo de drenaje. Esto puede ocurrir muy pronto, lo que resulta en un aumento inmediato de la presión. A menudo ocurre en personas genéticamente susceptibles cuando la pupila se contrae repentinamente. Glaucoma de ángulo cerrado también puede ser crónica y progresiva, una condición menos común.

40

45

Glaucoma Congénito

El glaucoma congénito, en el cual los canales de drenaje del ojo no se desarrollan correctamente, está presente desde el nacimiento. Es muy poco frecuente, que ocurre en aproximadamente 1 de cada 10,000 recién nacidos. Esto puede ser una condición hereditaria y, a menudo se puede corregir con microcirugía.

- 5 En un aspecto, la presente descripción revela un método para atenuar la expresión de un ARNm ocular diana en el ojo de un sujeto que padece glaucoma, que comprende administrar por vía tópica (no invasiva) a la superficie del ojo del sujeto una cantidad eficaz de al menos un ARNip modificado químicamente y un portador farmacéuticamente aceptable. El al menos un ARNm ocular diana es un producto de CASP2. En una realización actualmente preferida el ARNip está formulado para su administración como gotas para los ojos. El ARNm ocular diana establecido en la SEQ ID NOS: 1-2.
- 10 En otro aspecto, la presente descripción revela un método para tratar el glaucoma en un sujeto en necesidad de tratamiento, que comprende administrar por vía tópica (no invasiva) a la superficie del ojo del sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip modificado químicamente que inhibe la expresión de un gen diana en el ojo del sujeto. El gen es CASP2. En una realización actualmente preferida el ARNip está formulado para su administración como gotas para los ojos. El ARNm ocular diana expuesto en la SEQ ID NOS: 1-2.

15 Neuritis óptica

- La neuritis óptica es una inflamación del nervio óptico que puede afectar la parte del nervio y el disco dentro del globo ocular (papilitis) o la parte de detrás del globo ocular (neuritis óptica retrobulbar). La neuritis óptica puede ser causada por cualquiera de los siguientes: enfermedades desmielinizantes, tales como la esclerosis múltiple o encefalomiелitis infecciosa posterior; infecciones virales o bacterianas sistémicas, incluyendo las complicaciones de las enfermedades inflamatorias (por ejemplo, sinusitis, meningitis, tuberculosis, sífilis, coriorretinitis, inflamación orbital); enfermedades nutricionales y metabólicas (por ejemplo, diabetes, anemia perniciosa, hipertiroidismo); neuropatía óptica hereditaria de Leber, una rara forma de neuropatía óptica hereditaria que afecta principalmente a los jóvenes; toxinas (tabaco, metanol, quinina, arsénico, salicilatos, plomo); y trauma.
- 20

Atrofia óptica.

- 25 La atrofia óptica es una pérdida hereditaria o adquirida del trastorno de la visión que resulta de la degeneración del nervio óptico y las fibras nerviosas de la vía óptica. Puede ser adquirida a través de oclusiones de la vena central de la retina o de la arteria, cambios de arteriosclerosis, puede ser secundaria a la enfermedad degenerativa de la retina, pueden ser resultado de la presión contra el nervio óptico, o pueden estar relacionada con enfermedades metabólicas (por ejemplo, diabetes), trauma, glaucoma, o toxicidad (al alcohol, tabaco u otras sustancias tóxicas). La degeneración y
- 30 atrofia de fibras del nervio óptico es irreversible, aunque se han visto que las inyecciones de esteroides intravenosos ralentizan el proceso en algunos casos.

Edema de papila

- 35 Una hinchazón del disco óptico (papila), más comúnmente debido a un aumento de la presión intracraneal (inducido por tumor), hipertensión maligna, o trombosis de la vena central de la retina. La condición generalmente es bilateral, la cabeza del nervio es muy elevada y se hincha, y la respuesta de la pupila por lo general es normal. La visión no se ve afectada inicialmente y no hay dolor al movimiento de los ojos. La atrofia del nervio óptico secundaria y la pérdida de la visión permanente, pueden ocurrir si la causa primaria del edema de papila se deja sin tratar.

Neuropatía óptica isquémica (ION)

- 40 Una enfermedad de ceguera con severidad resultante de la pérdida del suministro de sangre arterial en el nervio óptico (por lo general en un ojo), como resultado de los trastornos oclusivos de las arterias de nutrientes. La neuropatía óptica puede ser anterior, lo que provoca un edema pálido del disco óptico, o posterior, en la cual el disco óptico no está hinchado y la anomalía se produce entre el globo ocular y el quiasma óptico. La neuropatía óptica isquémica anterior generalmente causa una pérdida de visión que puede ser repentina u ocurrir durante varios días. La neuropatía óptica isquémica posterior es poco común, y el diagnóstico depende en gran medida de la exclusión de otras causas,
- 45 principalmente derrame cerebral y tumor cerebral.

Otras enfermedades y condiciones incluyen ojo seco, retinopatía diabética, edema macular diabético y retinitis pigmentosa.

Ojo seco

5 El ojo seco, también conocido como queratoconjuntivitis seca o queratitis seca, es un problema común generalmente como resultado de una disminución en la producción de la película lagrimal que lubrica los ojos. La mayoría de los pacientes con ojo seco experimentan malestar, y no hay pérdida de la visión; aunque en los casos más severos, la córnea puede resultar dañada o infectada.

El ojo seco es una enfermedad multifactorial de las lágrimas y la superficie ocular que da lugar a los síntomas de malestar, trastornos visuales, y la inestabilidad de la película lagrimal con daño potencial de la superficie ocular. Se acompaña de aumento de la osmolaridad de la película lagrimal y la inflamación de la superficie ocular.

10 La glándula lagrimal es un tejido multilobular compuesto de células acinares, ductales y mioepiteliales. Las células acinares representan el 80% de las células presentes en la glándula lagrimal y son el sitio para la síntesis, almacenamiento, y la secreción de proteínas. Varias de estas proteínas tienen propiedades antibacterianas (lisozima, lactoferrina) o factor de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante α , factor de crecimiento de queratocitos) que son cruciales para la salud de la superficie ocular. La función primaria de las células ductales es modificar el fluido primario secretado por las células acinares y para secretar agua y electrolitos. Las células mioepiteliales contienen múltiples procesos, que rodean el área basal de las células acinares y ductales, y se cree que contraen y forzar el fluido fuera de los conductos y sobre la superficie ocular.

Mecanismos de disfunción de la glándula lagrimal

20 La apoptosis, el desequilibrio hormonal, la producción de autoanticuerpos, las alteraciones en las moléculas de señalización, disfunción de los nervios, y aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias se han propuesto como posibles mediadores de la insuficiencia de la glándula lagrimal. Uno de los principales síntomas de síndrome de sjögren es ojo seco. La apoptosis de las células epiteliales acinares y ductales de las glándulas lagrimales se ha propuesto como un posible mecanismo responsable de la alteración de la función secretora (Manganelli and Fietta, Semin Arthritis Rheum. 2003. 33(1):49-65). Sin desear estar limitado por la teoría, la muerte apoptótica de las células epiteliales puede ser debido a la activación de varias vías de apoptosis que implican (Apo-1/CD95), FasL (FasL/CD95L), Bax, caspasas, perforin, y células T citotóxicas granzima B. a través de la liberación de proteasas, tales como la perforina y la granzima b, o la interacción de FasL expresado por las células T con Fas en las células epiteliales, puede conducir a la apoptosis de las células acinares.

30 El tratamiento actual para el ojo seco es fundamentalmente local y sintomático, tal como: suplementación de lágrimas con lubricantes; retención de lágrimas con terapias como la oclusión de los puntos lagrimales, gafas de cámara de humedad o lentes de contacto; estimulación de lágrimas, por ejemplo, por secretagogos; sustitutos de lágrimas biológicas; terapia anti-inflamatoria (ciclosporina, corticosteroides, tetraciclinas); y ácidos grasos esenciales dietéticos.

Retinopatía diabética

La retinopatía diabética es una complicación de la diabetes y una causa principal de ceguera. Ocurre cuando la diabetes daña los pequeños vasos sanguíneos dentro de la retina. La retinopatía diabética tiene cuatro etapas:

- 35 - Retinopatía no proliferativa leve: microaneurismas en los vasos sanguíneos de la retina.
- Retinopatía no proliferativa moderada. A medida que la enfermedad progresa, algunos vasos sanguíneos que nutren la retina se bloquean.
- Retinopatía no proliferativa severa. Muchos más vasos sanguíneos se bloquean, despojando varias áreas de la retina de un suministro de sangre, que es superada por el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos.
- 40 - Retinopatía proliferativa. Los nuevos vasos sanguíneos crecen a lo largo de la retina y a lo largo de la superficie del gel vítreo.

Cuando los vasos dejan escapar sangre, pueden dar lugar a la pérdida severa de la visión e incluida la ceguera.

Durante el embarazo, la retinopatía diabética puede ser un problema para las mujeres con diabetes.

45 En un aspecto, la presente descripción revela un método para atenuar la expresión de un ARNm ocular diana en el ojo de un sujeto que padece retinopatía diabética, que comprende administrar por vía tópica (no-invasiva) a la superficie del ojo del sujeto una cantidad eficaz de al menos un ARNip modificado químicamente y un portador farmacéuticamente aceptable. El ARNm ocular diana es el producto de un gen humano que tiene ARNm establecido en una cualquiera de

SEQ ID NOS:1-2. En una realización actualmente preferida el ARNip se formula para la administración como gotas para los ojos.

5 En otro aspecto, la presente descripción revela un método de tratamiento de la retinopatía diabética en un sujeto en necesidad de tratamiento, que comprende administrar por vía tópica (no-invasiva) a la superficie del ojo del sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip modificado químicamente que inhibe la expresión de un gen diana en el ojo del sujeto. El gen diana es un gen humano que tiene ARNm establecido en cualquiera de SEQ ID NOS: 1-2. En una realización actualmente preferida el ARNip está formulado para la administración en forma de gotas para los ojos.

10 Sin querer limitarse a la teoría, los vasos sanguíneos dañados por la retinopatía diabética pueden causar pérdida de la visión de dos maneras: se pueden desarrollar vasos sanguíneos anormales y frágiles y fugas de sangre en el centro del ojo, visión borrosa. Esta es la retinopatía proliferativa y es la cuarta y más avanzada etapa de la enfermedad. El fluido puede filtrarse en el centro de la mácula, dando como resultado visión borrosa. Esta condición se conoce como edema macular. Puede ocurrir en cualquier etapa de la retinopatía diabética, aunque es más probable que ocurra cuando la enfermedad progresa y se conoce como edema macular diabético (DME).

15 Degeneración macular relacionada con la edad (AMD)

20 La causa más común de disminución de la visión, mejor corregida, en personas mayores de 65 años de edad en los Estados Unidos es el trastorno de la retina conocido como la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). El área del ojo afectada por AMD es la mácula, una pequeña área en el centro de la retina, compuesto principalmente de células fotorreceptoras. A medida que avanza AMD, la enfermedad se caracteriza por la pérdida de la visión central, aguda. La llamada AMD "seca" representa aproximadamente el 85% - 90% de los pacientes con AMD e implica alteraciones en la distribución de pigmento de los ojos, pérdida de fotorreceptores y disminución de la función de la retina debido a la atrofia global de las células. La AMD "húmeda" implica proliferación de vasos coroideos anormales que conducen a la formación de coágulos o cicatrices en el espacio subretiniano. Por lo tanto, la aparición de AMD "húmeda" se produce debido a la formación de una red neovascular coroidea anormal (neovascularización coroidea, CNV) debajo de la retina neural. Los vasos sanguíneos recién formados son excesivamente permeables. Esto conduce a la acumulación de líquido subretiniano y la sangre conduce a la pérdida de la agudeza visual. Con el tiempo, se produce una pérdida total de la retina funcional en la región involucrada, como una gran cicatriz disciforme que involucra las formas de retina y coroideas. Mientras que los pacientes con AMD seca pueden retener visión de calidad disminuida, la AMD húmeda a menudo resulta en ceguera. (Hamdi & Kenney, *Frontiers in Bioscience*, e305-314, May 2003).

30 En un aspecto la presente descripción revela un método para atenuar la expresión de un ARNm ocular diana en el ojo de un sujeto que padece AMD o DME, que comprende administrar por vía tópica (no-invasiva) a la superficie del ojo del sujeto una cantidad eficaz de al menos un ARNip modificado químicamente y un portador farmacéuticamente aceptable. El ARNm ocular diana es producto de un gen humano enumerado en la Tabla A3, que tiene ARNm establecido en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-2. En una realización actualmente preferida el ARNip se formula para la administración como gotas para los ojos.

35 En otro aspecto la presente descripción revela un método de tratamiento de AMD o DME en un sujeto en necesidad de tratamiento, que comprende administrar por vía tópica (no-invasiva) a la superficie del ojo del sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip modificado químicamente que inhibe la expresión de un gen diana en el ojo del sujeto. El gen diana es un gen humano que tiene ARNm establecido en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-2. En una realización actualmente preferida el ARNip se formula para la administración como gotas para los ojos.

Condiciones oculares adicionales para ser tratadas por los compuestos de la presente invención

Condiciones virales y bacterianas

45 Las condiciones virales y bacterianas relacionadas con los tejidos oculares pueden ser tratadas por los compuestos de la presente invención. La conjuntivitis y otras enfermedades o condiciones del párpado pueden ser tratados, en particular, mediante la administración de acuerdo con los métodos de la presente invención, tales como oligonucleótidos ARNip cuyos genes diana que son esenciales para la replicación y/o la supervivencia de los organismos que causan tales condiciones.

Pérdida de la visión asociada con tumores

50 En otro aspecto, la presente invención provee un método para tratar la pérdida de visión asociada con un tumor en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar por vía tópica y no invasiva a la superficie del ojo del sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ARNip modificado químicamente que inhibe la expresión de al menos un gen asociado con el tumor en el sujeto en una cantidad eficaz para tratar la pérdida de la visión.

Los tumores que causan la pérdida de la visión, de acuerdo con la presente invención, incluyen tanto los tumores malignos (cánceres) y tumores benignos. Los tumores incluyen tumores de cualquier tejido ocular o cualquier tipo de célula ocular, incluyendo, pero no limitando a, tumores coroideos, tumores conjuntivales, tumores de párpados, tumores infiltrativos intraoculares, tumores del iris, tumores metastásicos oculares, tumores del nervio óptico, tumores orbitales y los tumores de la retina. Más específicamente, una lista no exhaustiva de los tumores y cánceres que la presente invención tiene como objetivo tratar incluye tumores coroideos como hemangioma coroideo, melanoma coroideo, metástasis coroidea, Nevo coroideo, osteoma coroideo, melanoma de cuerpo ciliar y Nevo de Ota; Los tumores conjuntivales, como el sarcoma de Kaposi conjuntival, dermoide epibulbar, linfoma de la conjuntiva, melanoma y PAM con atipia, tumores conjuntivales pigmentados, pinguéculo, Pterigión, carcinoma escamoso y la neoplasia intraepitelial de la conjuntiva; Tumores de párpados como carcinoma basocelular, hemangioma capilar, hidrocistoma, nevo en el borde del párpado, queratosis seborreica, melanoma maligno del párpado, carcinoma sebáceo del párpado y carcinoma escamoso del párpado; Tumores infiltrativos intraoculares tales como leucemia linfocítica crónica, coroidopatía infiltrativa y linfoma intraocular; Tumores del iris tales como metástasis uveal anterior, quistes del iris, melanocitoma del iris, melanoma del iris y quiste perla del iris; Tumores metastásicos oculares tales como metástasis melanoma coroideo; Tumores del nervio óptico, como el melanoma coroideo que afecta el nervio óptico, metástasis circumpapillary con neuropatía óptica, melanocitoma del nervio óptico y vaina meningioma del nervio óptico; tumores orbitales como el carcinoma adenoide quístico de la glándula lagrimal, hemangioma cavernoso de la órbita, linfangioma de la órbita, Mucocele orbitario, Pseudotumor orbitario, rabdomiosarcoma de la órbita, hemangioma periocular de la niñez y Pseudotumor esclerosante de la órbita; Tumores de la retina, tales como hipertrofia de la retina pigmento epitelial (RPE), Tumores del epitelio pigmentario de la retina (EPR), Retinoblastoma y Angioma von Hippel.

Composiciones farmacéuticas

Si bien puede ser posible que los compuestos de oligonucleótidos de la presente invención sean administrados como el compuesto químico bruto, es preferible administrarlos como una composición farmacéutica. De acuerdo con lo anterior, la presente invención provee una composición farmacéutica que comprende uno o más de los compuestos de la invención; y un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede comprender una mezcla de dos o más oligonucleótidos diferentes/ARNip.

La invención provee además una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención unido de forma covalente o no covalente a uno o más compuestos de la descripción en una cantidad eficaz para inhibir uno o más genes como se revela anteriormente; y un portador farmacéuticamente aceptable. El compuesto puede ser procesado intracelularmente por complejos celulares endógenos para producir uno o más oligoribonucleótidos de la invención.

La invención provee además una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y uno o más de los compuestos de la invención en una cantidad eficaz para reducir la expresión en un gen humano en un ojo de un sujeto que padece una enfermedad o trastorno ocular.

La presente invención también provee un proceso para preparar una composición farmacéutica, que comprende:

proporcionar uno o más compuestos de la invención; y

mezclar dicho compuesto con un portador farmacéuticamente aceptable.

El portador farmacéuticamente aceptable se selecciona preferiblemente por un experto en el arte para administración oftalmológica.

En diversas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención comprende al menos un compuesto de ARNip de la invención, o una sal del mismo, hasta 99% en peso, mezclado con un medio portador oftálmico fisiológicamente aceptable tal como agua, cloruro de sodio, solución reguladora, solución salina (por ejemplo, solución salina reguladora con fosfato (PBS)), manitol, y similares, y combinaciones de los mismos, para formar una solución acuosa, suspensión o solución oftálmica estéril.

La composición farmacéutica comprende además opcionalmente al menos un conservante oftalmológicamente aceptable, tal como, por ejemplo, cloruro de benzalconio. Además, la composición farmacéutica oftálmica puede incluir un surfactante oftalmológicamente aceptable para ayudar a disolver el ARNip.

La composición farmacéutica oftálmica de la invención se puede preparar disolviendo o mezclando uno o más de los ARN interferentes con un portador oftalmológicamente aceptable, tal como, por ejemplo, una solución reguladora acuosa isotónica fisiológicamente aceptable.

En una realización preferida, el compuesto de ARNip utilizado en la preparación de una composición oftalmológica se mezcla con un portador oftalmológicamente aceptable en una dosis farmacéuticamente eficaz. En ciertas realizaciones preferidas, el portador oftalmológicamente aceptable es PBS.

5 En algunas realizaciones las composiciones farmacéuticas oftálmicas de la invención comprenden además agentes adicionales farmacéuticamente activos o una combinación de agente farmacéuticamente activo, tales como fármacos no esteroides anti-inflamatorios, corticosteroides, antibióticos, y similares.

10 Adicionalmente, la descripción revela un método para inhibir la expresión de un gen de la presente invención en al menos un 20% en comparación con un control que comprende poner en contacto una transcripción de ARNm del gen de la presente invención con uno o más de los compuestos de la invención. En algunas realizaciones un compuesto de ARNip activo inhibe la expresión de genes a un nivel de al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60% o 70% en comparación con el control. En ciertas realizaciones preferidas la inhibición es a un nivel de al menos 75%, 80% o 90% en comparación con el control.

Terapia de combinación

15 Los compuestos de la presente invención se pueden administrar solos o en combinación con otro agente terapéutico útil en el tratamiento de un trastorno o enfermedad ocular.

En algunas realizaciones las composiciones farmacéuticas oftálmicas de la invención comprenden además agentes farmacéuticamente activos adicionales o una combinación de agente farmacéuticamente activo, tal como oligonucleótidos, por ejemplo, ARNip, fármaco no esteroide anti-inflamatorio, corticosteroides, antibiótico, y similares.

20 En una realización, la co-administración de dos o más agentes terapéuticos logra un efecto sinérgico, i.e., un efecto terapéutico que es mayor que la suma de los efectos terapéuticos de los componentes individuales de la combinación. En otra realización, la co-administración de dos o más agentes terapéuticos logra un efecto aditivo.

25 Los ingredientes activos que comprenden una terapia de combinación se pueden administrar juntos a través de una forma de dosificación única o por administración separada de cada agente activo. En ciertas realizaciones, el primer y segundo agentes terapéuticos se administran en una sola forma de dosificación. Los agentes se pueden formular en una única solución para la administración tópica. Alternativamente, el primer agente terapéutico y los segundos agentes terapéuticos se pueden administrar como composiciones separadas. El primer agente activo se puede administrar al mismo tiempo que el segundo agente activo o el primer agente activo se puede administrar intermitentemente con el segundo agente activo. La cantidad de tiempo entre la administración del primero y segundo agente terapéutico se puede ajustar para lograr el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, el segundo agente terapéutico se puede administrar sólo unos pocos minutos (por ejemplo, 1, 2, 5, 10, 30, o 60 min) o varias horas (por ejemplo, 2, 4, 6, 10, 12, 24, o 36 hr) después de la administración del primer agente terapéutico. En ciertas realizaciones, puede ser ventajoso administrar más de una dosis de uno de los agentes terapéuticos entre administraciones del segundo agente terapéutico. Por ejemplo, el segundo agente terapéutico se puede administrar a las 2 horas y luego de nuevo a las 10 horas después de la administración del primer agente terapéutico. Alternativamente, puede ser ventajoso administrar más de una dosificación del primer agente terapéutico entre administraciones del segundo agente terapéutico. En ciertas realizaciones, se prefiere que los efectos terapéuticos de cada ingrediente activo se solapen durante al menos una parte de la duración de cada agente terapéutico de forma que el efecto terapéutico global de la terapia de combinación es atribuible en parte a los efectos combinados o sinérgicos de la terapia de combinación.

Administración

40 Las moléculas de ARNip como se describe en este documento se entregan al tejido diana del ojo mediante la aplicación directa de las moléculas preparadas con un portador o un diluyente.

45 El término "ARNip desnudo" se relaciona con moléculas de ARNip que están libres de cualquier vehículo de administración o formulación que actúa para ayudar, promover o facilitar la entrada en la célula, incluyendo secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, lipofectina o agentes precipitantes y similares. Por ejemplo, ARNip en PBS o una formulación oftalmológica aceptable es "ARNip desnudo". En ciertas realizaciones de la invención, el ARNip se administra como ARNip desnudo. Para ciertas aplicaciones, puede ser deseable una formulación que aumente el tiempo de residencia del ARNip en el ojo o senos nasales, por ejemplo, mediante la adición de un polímero o agente potenciador de la viscosidad.

50 Se han desarrollado sistemas de administración dirigidos específicamente a la administración mejorada y potenciada del ARNip en células de mamífero, (véase, por ejemplo, Shen et al FEBS Let. 2003, 539:111-114; Xia et al., Nat. Biotech. 2002, 20:1006-1010; Reich et al., Mol. Vision 2003, 9: 210-216; Sorensen et al., J. Mol. Biol. 2003. 327: 761-766; Lewis et al., Nat. Gen. 2002, 32: 107-108 y Simeoni et al., NAR 2003, 31,11: 2717-2724).

Los portadores, solventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, así como los portadores de implantes se refieren generalmente a rellenos inertes, sólidos no tóxicos o líquidos, diluyentes o material de encapsulación que no reaccionan con los ingredientes activos de la invención y se incluyen liposomas y microesferas. Ejemplos de sistemas de administración útiles en la presente invención incluyen las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,225,182; 5,169,383; 5,167,616; 4,959,217; 4,925,678; 4,487,603; 4,486,194; 4,447,233; 4,447,224; 4,439,196; y 4,475,196. Muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos son bien conocidos para los expertos en el arte.

Una revisión de las consideraciones a tener en cuenta en la preparación de una composición farmacéutica para la administración ocular tópica o la administración intranasal, se puede encontrar en Bar-Ilan and Neumann, en Textbook of Ocular Pharmacology, Zimmerman et al eds., Lippencott-Raven 1997.

Las rutas de administración tópica se emplean preferiblemente para proporcionar al sujeto una dosis eficaz de los compuestos terapéuticos de ARNip. Las formas de dosificación pueden incluir dispersiones, suspensiones, soluciones, ungüentos y similares. En ciertas realizaciones preferidas, la composición farmacéutica de la invención comprende al menos un ARNip se administra como gotas para los ojos. En otra realización, la composición farmacéutica de la invención que comprende al menos un ARNip se administra como un aerosol o neblina. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,052,985 revela los aplicadores de pulverización oftálmicos.

En ciertas realizaciones de la presente invención, el ARNip alcanza su célula diana localmente, por ejemplo, contacto directo o por difusión a través de las células, tejido o fluido intracelular. El ARNip o las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran y se dosifican de acuerdo con la buena práctica médica, teniendo en cuenta la condición clínica del paciente individual, la enfermedad que se va a tratar, la programación de administración, edad, sexo, peso corporal del paciente y otros factores conocidos por los médicos.

La "dosis terapéuticamente eficaz" para los propósitos en este documento se determina por lo tanto mediante consideraciones tales como se conocen en la técnica. La dosis debe ser eficaz para conseguir una mejora incluyendo, pero no limitando a un curso de mejora de la enfermedad, recuperación más rápida, mejora de los síntomas, la eliminación de los síntomas y otros indicadores como se seleccionan como medidas apropiadas por los expertos en el arte. El ARNip de la invención se puede administrar en una sola dosis o en dosis múltiples.

En general, la dosis activa del compuesto para los seres humanos está en el intervalo de 1ng/kg a aproximadamente 20-100 mg/kg de peso corporal por día, preferiblemente aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 2-10 mg/kg de peso corporal por día, en un régimen de una dosis por día o dos o tres o más veces por día para un régimen de una sola dosis o múltiples dosis. En ciertas realizaciones los compuestos de ARNip se formulan para aplicación por vía tópica en el ojo en forma de gotas para los ojos y comprenden aproximadamente 5 µg/µl a aproximadamente 60 µg/µl en volumen de la composición, aproximadamente 6.6 µg/µl en volumen de la composición, aproximadamente 25 µg/µl en volumen de la composición, aproximadamente 33.3 µg/µl en volumen de la composición, aproximadamente 50 µg/µl en volumen de la composición.

El pH de la formulación es de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 8, o aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 7, o desde aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 6. En ciertas realizaciones el pH es aproximadamente pH 5.9, aproximadamente pH 6.15, aproximadamente pH 6.25, aproximadamente pH 6.3, aproximadamente pH 6.5, aproximadamente pH 7.25. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía tópica a la superficie del ojo. Cabe señalar que el compuesto preferiblemente se aplica como el compuesto o como la sal farmacéuticamente aceptable del ingrediente activo en combinación con portadores farmacéuticamente aceptables, solventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y/o vehículos. Como se revela en este documento el método preferido de administración es la aplicación por vía tópica de una composición oftálmica al ojo.

Las formas líquidas se pueden preparar por gotas o spray. Las composiciones líquidas incluyen soluciones acuosas, con y sin co-solventes orgánicos, suspensiones acuosas u oleosas, emulsiones con aceites comestibles, así como vehículos farmacéuticos similares.

Estos compuestos se pueden administrar a seres humanos y otros animales para terapia por cualquier ruta de administración apropiada para el ojo, como, por ejemplo, un spray o gotas, y por vía tópica, como mediante ungüentos, o gotas.

Métodos de tratamiento

En un aspecto, la presente descripción se relaciona con un método para el tratamiento de un sujeto en necesidad de tratamiento para una enfermedad o trastorno ocular asociado con la expresión de un gen enumerado en las Tablas A1-A4 en el ojo del sujeto, que comprende administrar por vía tópica y no invasiva al sujeto una cantidad de un ARNip

modificado químicamente que inhibe la expresión de al menos uno de los genes. En ciertas realizaciones preferidas se administra más de un compuesto de ARNip a uno o más de un gen diana.

En realizaciones preferidas, el sujeto que está siendo tratado es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos incluyendo humanos.

- 5 Los métodos revelados en este documento comprenden administrar por vía tópica y no invasiva al ojo del sujeto uno o más compuestos inhibidores que reducen la expresión de los genes de las Tablas A1-A4; y, en particular ARNip en una dosis terapéuticamente eficaz de modo que se trate así al sujeto.

10 El término "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o retrasar, atenuar el trastorno ocular relacionado como se indica anteriormente. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya experimentan la enfermedad o condición, aquellos propensos a tener la enfermedad o condición, y aquellos en los que se ha de evitar la enfermedad o condición. Los compuestos de la invención se pueden administrar antes, durante o después de la aparición de la enfermedad o condición de los ojos o síntomas asociado con el mismo. En los casos donde el tratamiento es para el propósito de la prevención, a continuación, la presente invención se relaciona con un método para retardar la aparición de o evitar el desarrollo de la enfermedad o trastorno.

15 Los trastornos oculares incluyen retinopatía oculta zonal aguda externa, síndrome de Adie, degeneración macular relacionada con la edad, ambliopía, aniridia, anisocoria, anoftalmos, afaquia, blefaritis, blefaroptosis, blefaroespasma, ceguera, catarata, chalazión, coriorretinitis, coroideremia, coloboma, enfermedades de la conjuntiva, conjuntivitis, enfermedades de la córnea, distrofias de la córnea, edema de la córnea, úlcera de la córnea, edema macular diabético, 20 retinopatía diabética, diplopía, distiquiasis, síndromes de ojo seco, síndrome de retracción de duane, ectropión, endoftalmitis, entropión, esotropía, síndrome de exfoliación, exotropía, anomalías oculares, neoplasias del ojo, síndrome general de fibrosis, glaucoma, atrofia girata, hemianopsia, síndrome hermannski-pudlak, orzuelo, síndrome de Horner, hipermetropía, hifema, iritis, síndrome de kearns-sayer, queratitis, queratocono, enfermedades del aparato lagrimal, obstrucción del conducto lagrimal, enfermedades de la lente, degeneración macular, nistagmus, trastornos de la motilidad ocular, patológica, enfermedades nervio motor ocular común, oftalmoplejía, atrofia óptica, enfermedades 25 del nervio óptico, hereditarias, neuritis óptica, neuropatía óptica isquémica, celulitis orbitaria, edema de papila, presbicia, pterigión, trastornos de la pupila, errores de refracción, desprendimiento de retina, enfermedades de la retina, oclusión venosa retiniana, retinoblastoma, retinitis pigmentosa, retinopatía del prematuro, retinosquiasis, escleritis, escotoma, estrabismo, síndrome de Sjögren, queratitis punteada superficial de Thygeson, tracoma, uveítis.

30 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos útiles en los métodos descritos en este documento son oligonucleótidos bicatenarios y compuestos de ARNip e incluyen compuestos no modificados y modificados químicamente y/o estructuralmente.

35 La selección y síntesis del ARNip correspondiente a los genes conocidos se ha informado ampliamente; véase, por ejemplo, Ui-Tei et al., *J Biomed Biotechnol.* 2006; 65052; Chalk et al., *BBRC.* 2004, 319(1):264-74; Sioud & Leirdal, *Met. Mol Biol.* 2004, 252:457-69; Levenkova et al., *Bioinform.* 2004, 20(3):430-2; Ui-Tei et al., *NAR.* 2004, 32(3):936-48. Para ejemplos de la utilización y producción de ARNip modificado véase, por ejemplo, Braasch et al., *Biochem.* 2003, 42(26):7967-75; Chiu et al., *RNA.* 2003, 9(9):1034-48; Publicaciones PCT Nos. WO 2004/015107 y WO 02/44321 y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,898,031 y 6,107,094.

40 La presente invención provee oligonucleótidos bicatenarios (por ejemplo, ARNip), que reducen la expresión de un gen deseado. Un ARNip de la invención es un oligorribonucleótido dúplex en el cual la cadena sentido se deriva de la secuencia de ARNm del gen deseado, y la cadena antisentido es complementaria a la cadena sentido. En general, alguna desviación de la secuencia de ARNm diana se tolera sin comprometer la actividad de ARNip (véase, por ejemplo, Czauderna et al., *NAR.* 2003, 31(11):2705-2716). Un ARNip de la invención inhibe la expresión del gen a nivel post-transcripcional con o sin la destrucción del ARNm. Sin estar ligado por la teoría, el ARNip se puede dirigir al ARNm 45 para la escisión y la degradación específica y/o puede inhibir la traducción del mensaje dirigido.

En algunos aspectos el ARNip tiene extremos romos, i.e., 5' y 3' están ausentes, en uno o ambos extremos. Más específicamente, el ARNip puede tener extremos romos en el extremo definido por el extremo 5' de la primera cadena y el extremo 3' de la segunda cadena, y/o el extremo definido por el extremo 3' de la primera cadena y el extremo 5' de la segunda cadena.

50 En otros aspectos, al menos, una de las dos cadenas puede tener una proyección de al menos un nucleótido en el extremo 5'; la proyección puede consistir de al menos un desoxirribonucleótido. Al menos una de las cadenas también puede tener opcionalmente una proyección de al menos un nucleótido en el extremo 3'. La proyección puede consistir de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 nucleótidos.

La longitud del ARN dúplex es de 19 ribonucleótidos. Además, la longitud de cada cadena es 19, ribonucleótidos.

La complementariedad entre dicha primera cadena y el ácido nucleico diana es perfecta (100%). En algunos aspectos las cadenas son sustancialmente complementarias, i.e., que tienen uno, dos o hasta tres desajustes entre dicha primera cadena y el ácido nucleico diana. Sustancialmente complementaria se relaciona con la complementariedad de más de aproximadamente 84%, con otra secuencia. Por ejemplo, en una región dúplex que consta de 19 pares de bases un apareamiento erróneo resulta en 94.7% de complementariedad, dos apareamientos erróneos resultan en aproximadamente 89.5% de complementariedad y 3 apareamientos erróneos resulta en aproximadamente 84.2% de complementariedad, lo que hace la región dúplex sustancialmente complementaria. De acuerdo con lo anterior sustancialmente idéntica se relaciona con la identidad de más de aproximadamente 84%, a otra secuencia.

La primera cadena y la segunda cadena pueden estar unidas por una estructura de bucle, que puede estar compuesta de un polímero de ácido nucleico tales como, *inter alia*, polietilenglicol. Alternativamente, la estructura de bucle puede estar compuesta de un ácido nucleico, incluyendo ribonucleótidos modificados y no modificados y desoxirribonucleótidos modificados y no modificados.

Además, el extremo 5' de la primera cadena del ARNip puede estar unido con el extremo 3' de la segunda cadena, o el extremo 3' de la primera cadena puede estar unida con el extremo 5' de la segunda cadena, siendo dicho enlace a través de un enlazante de ácido nucleico que tiene por lo general una longitud entre 2-100 nucleobases, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 nucleobases.

En aspectos preferidos de los compuestos de la invención que tienen ribonucleótidos alternantes modificados en al menos una de las cadenas antisentido y sentido del compuesto, para los oligómeros 19-mer y 23-mer de los ribonucleótidos en los extremos 5' y 3' de la cadena antisentido se modifican en sus residuos de azúcar, y los ribonucleótidos en los extremos 5' y 3' de la cadena codificante son no modificados en sus residuos de azúcar. Para oligómeros 21-mer los ribonucleótidos en los extremos 5' y 3' de la cadena sentido se modifican en sus residuos de azúcar, y los ribonucleótidos en los extremos 5' y 3' de la cadena antisentido son no modificados en sus residuos de azúcar, o pueden tener una modificación adicional opcional en el extremo 3'. Como se mencionó anteriormente, se prefiere que el nucleótido medio de la cadena antisentido es no modificado.

Adicionalmente, la descripción revela un ARNip que comprende una molécula de ácido nucleico bicatenario en donde 1, 2, o 3 de los nucleótidos en una cadena o ambas cadenas están sustituidos proporcionando así al menos un apareamiento erróneo de pares de bases. Los nucleótidos sustituidos en cada cadena están preferiblemente en la región terminal de una cadena o de ambas cadenas.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la cadena antisentido y sentido del oligonucleótido/ARNip son fosforilados sólo en el extremo 3' y no en el extremo 5'. De acuerdo con otra realización preferida de la invención, las cadenas antisentido y sentido son no fosforiladas. De acuerdo con todavía otra realización preferida de la invención, el 5' más ribonucleótido en la cadena sentido se modifica para suprimir cualquier posibilidad de fosforilación en 5' *in vivo*.

Cualquier secuencia de ARNip revelada en este documento se puede preparar que tenga cualquiera de las modificaciones/estructuras reveladas en este documento. La combinación de la secuencia más estructura es nueva y puede ser utilizado en el tratamiento de las condiciones reveladas en este documento.

Estructuras de ARNip

La selección y síntesis de ARNip correspondiente a los genes conocidos se ha informado ampliamente; (véase, por ejemplo, Ui-Tei et al., J Biomed Biotech. 2006; 2006: 65052; Chalk et al., BBRC. 2004, 319(1): 264-74; Sioud & Leirdal, Met. Mol Biol.; 2004, 252:457-69; Levenkova et al., Bioinform. 2004, 20(3):430-2; Ui-Tei et al., NAR. 2004, 32(3):936-48).

Para ejemplos del uso de, y producción de ARNip modificado, véase, por ejemplo, Braasch et al., Biochem. 2003, 42(26):7967-75; Chiu et al., RNA, 2003, 9(9):1034-48; publicaciones PCT WO 2004/015107 (atugen AG) y WO 02/44321 (Tuschl et al). Las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,898,031 y 6,107,094, enseñan oligómeros modificados químicamente. Las Publicaciones de las Patentes de los Estados Unidos Nos. 2005/0080246 y 2005/0042647 se relacionan con compuestos oligoméricos que tienen un motivo alternante y compuestos de ARNhc que tienen enlaces de internucleósido modificados químicamente, respectivamente.

Otras modificaciones han sido reveladas. Se mostró que la inclusión de una unidad estructural 5'-fosfato mejora la actividad de ARNip en embriones de *Drosophila* (Boutla, et al., Curr. Biol. 2001, 11:1776-1780) y es necesaria para la función de ARNip en células HeLa humanas (Schwarz et al., Mol. Cell, 2002, 10:537-48). Amarzguioui et al., (NAR, 2003, 31(2):589-95) mostró que la actividad de ARNip dependía de la colocación de las modificaciones de 2'-O-metil (2'-OMe). Holen et al (NAR. 2003, 31(9):2401-07) informan que un ARNip que tiene un pequeño número de nucleósidos

modificados en 2'-OMe dieron buena actividad en comparación con el tipo salvaje, pero que la disminución de la actividad como los números de nucleósidos modificados en 2'-OME se incrementó. Chiu and Rana (RNA. 2003, 9:1034-48) enseña que la incorporación de nucleósidos modificados en 2'-OME en la cadena sentido o antisentido (cadenas totalmente modificadas) reduce con severidad la actividad del ARNip relativa a la del ARNip no modificado. Se informó que la colocación de un grupo 2'-OMe en el extremo 5' en la cadena antisentido para limitar con severidad la actividad, mientras que la colocación en el extremo 3' de la cadena complementaria y en ambos extremos de la cadena sentido fue tolerada (Czauderna et al., NAR. 2003, 31(11):2705-16; WO 2004/015107). Las moléculas de la presente invención ofrecen una ventaja de que son no tóxicos y se pueden formular como composiciones farmacéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades.

Los nucleótidos se pueden seleccionar de bases de origen natural o modificadas sintéticas. Las bases de origen natural incluyen adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. Las bases modificadas de nucleótidos incluyen inosina, xantina, hipoxantina, 2- aminoadenina, 6-metilo, 2-propilo y otras alquilo adeninas, uracilo 5-halo, citosina 5-halo, citosina 6-aza y timina 6-aza, pseudo-uracilo, 4- tiouracilo, 8-halo adenina, 8-aminoadenina, adenina 8-tiol, 8-tioalquil adeninas, 8-hidroxi adenina y otras adeninas 8-sustituidas, guaninas 8-halo, 8-amino guanina, guanina 8-tiol, 8 guaninas tioalquilo, guanina 8- hidroxi y otras guaninas sustituidas, otros aza y desaza adeninas, otros aza y desaza guaninas, uracilo 5-trifluorometilo y 5- trifluoro citosina. 5-halo uracilo, 5-halo citosina, 6-aza citosina y 6-aza timina, pseudo-uracilo, 4-tiouracilo, 8-halo adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol adenina, 8-tioalquil adeninas, 8-hidroxi adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-halo guaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8-tioalquil guaninas, 8- hidroxi guanina y otras guaninas sustituidas, otras aza y deaza adeninas, otras aza y deaza guaninas, 5-trifluorometil uracilo y 5- trifluoro citosina. Las moléculas que comprenden una o más unidades estructurales abásicas (no convencional o pseudonucleótido) están abarcadas por la presente invención, así como moléculas que comprenden ARN alternante y nucleótidos de ADN.

Además, los análogos de polinucleótidos se pueden preparar en donde la estructura de uno o más nucleótidos fundamentalmente se alteran y adaptan mejor como reactivos terapéuticos o experimentales. Un ejemplo de un análogo de nucleótido es un ácido nucleico peptídico (PNA), en donde el esqueleto de fosfato desoxirribosa (o ribosa) en ADN (o ARN) se sustituye con un esqueleto de poliamida que es similar al encontrado en péptidos. Los análogos de PNA han demostrado ser resistentes a la degradación enzimática y para tener vidas prolongadas *in vivo* e *in vitro*.

Las posibles modificaciones en el residuo de azúcar son múltiples e incluyen 2'-O alquilo, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico glicol (GNA), treosa ácido nucleico (TNA), arabinósido, alritol (ANA) y otros, azúcares de 6 miembros incluyendo morfolinos, y ciclohexinilos. Además, dichas moléculas pueden contener adicionalmente modificaciones en el azúcar, tales como 2' alquilo, 2' fluoro, 2'O alilo, 2'amina y 2'alcoxi. En este documento se discuten modificaciones adicionales de azúcar.

Los compuestos de LNA se describen en la Publicación de la Patente Internacional Nos. WO 00/47599, WO 99/14226, y WO 98/39352. Ejemplos de compuestos de ARNip que comprenden nucleótidos LNA se describen en Elmen et al., (NAR 2005. 33(1):439-447) y en la Publicación de Patente PCT No. WO 2004/083430.

Los compuestos de la presente invención se pueden sintetizar utilizando uno o más nucleótidos invertidos, por ejemplo, timidina invertida o adenina invertida (por ejemplo, véase Takei, et al., 2002. JBC 277(26):23800-06).

También son posibles modificaciones del esqueleto, tales como etilo (resultando en un triéster fosfo-etilo); propilo (resultando en un triéster fosfo-propilo); y butilo (resultando en un triéster fosfo-butilo). Otras modificaciones del esqueleto incluyen estructuras poliméricas, redes troncales cíclicas, esqueletos acíclicos, esqueletos tiofosfato-D-ribosa, amidatos y derivados fosfonoacetato. Ciertas estructuras incluyen compuestos de ARNip que tienen uno o una pluralidad de enlaces 2'-5' internucleotídicos (puentes o esqueleto).

Además, las moléculas de ácido nucleico inhibitoras de la presente descripción pueden comprender uno o más brechas y/o una o más muescas y/o uno o más apareamientos erróneos. Sin desear estar limitado por la teoría, brechas, muescas y apareamientos erróneos tienen la ventaja de desestabilizar parcialmente el ácido nucleico/ARNip, por lo que puede ser más fácilmente procesada por la maquinaria celular endógena tal como DICER, DROSHA o RISC en sus componentes inhibidores.

Las moléculas de la presente invención pueden comprender ARNip, ARNip sintético, ARNhc y ARNhc sintético, además de otras secuencias de ácido nucleico o moléculas que codifican tales moléculas u otras moléculas de nucleótidos inhibidores.

Los compuestos de la presente invención pueden comprender además una modificación final. Un grupo de biotina puede estar unido a cualquiera de la mayoría de nucleótidos 5' o la mayoría de 3' de la primera y/o segunda cadena o a ambos de los extremos. En una realización más preferida, el grupo de biotina se acopla a un polipéptido o una proteína. También está dentro del alcance de la presente invención que el polipéptido o proteína se une a través de cualquiera de las otras modificaciones mencionadas anteriormente.

Las diversas modificaciones del extremo como se revela en este documento se localizan preferiblemente en la unidad estructural de ribosa de un nucleótido del ácido nucleico como se describe en este documento. Más particularmente, la modificación del extremo puede estar unida a o sustituir cualquiera de los grupos OH de la unidad estructural de ribosa, incluyendo, pero no limitando a la posición 2'OH, 3'OH y 5'OH, a condición de que el nucleótido modificado de este modo sea un nucleótido terminal. Abásica invertida o abásica son nucleótidos, ya sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que no tienen una unidad estructural de nucleobase. Este tipo de compuesto, *inter alia*, se describe en Sternberger, et al., (Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2002.12, 131-43).

En el contexto de la presente invención, una brecha en un ácido nucleico se relaciona con la ausencia de uno o más nucleótidos internos en una cadena, mientras que una muesca en un ácido nucleico se relaciona con la ausencia de un enlace internucleotídico entre dos nucleótidos adyacentes en una cadena. Cualquiera de las moléculas de la presente invención puede contener una o más brechas y/o una o más muescas. Además, se provee mediante la presente invención un ARNip codificado por cualquiera de las moléculas descritas en este documento, un vector que codifica cualquiera de las moléculas reveladas en este documento, y una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las moléculas reveladas en este documento o los vectores que las codifican; y un portador farmacéuticamente aceptable.

Moléculas particulares que se van a administrar de acuerdo con los métodos de la presente invención se describen a continuación bajo el título "motivos estructurales". En aras de la claridad, cualquiera de estas moléculas se puede administrar de acuerdo con cualquiera de los métodos de la presente invención.

Motivos estructurales

Como se revela en este documento los compuestos de ARNip que son química y/o estructuralmente modificados de acuerdo con una de las siguientes modificaciones establecidas en las estructuras a continuación o como ARNip en tándem o ARN en forma de estrella (véase más abajo) son útiles en los métodos de la presente descripción. Los pares de oligonucleótidos sentido y antisentido, establecidos en las SEQ ID NOS: 59-33596, son útiles en la preparación de los correspondientes compuestos de ARNip.

En un aspecto la presente descripción revela un compuesto establecido como estructura (A):

(A) 5' (N)_x - Z 3' (cadena antisentido)

3' Z'-(N')_y 5' (cadena sentido)

en donde cada uno de N y N' es un nucleótido seleccionado a partir de un ribonucleótido no modificado, un ribonucleótido modificado, un desoxirribonucleótido no modificado y un desoxirribonucleótido modificado;

en donde cada uno de (N)_x y (N')_y es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

en donde cada uno de x y y es un número entero entre 18 y 40;

en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente tiene 1-5 nucleótidos consecutivos unidos covalentemente en el extremo 3' de la cadena en la cual está presente; y y en donde la secuencia de (N)_x comprende una secuencia antisentido sustancialmente complementaria a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en el ARNm de un gen expresado en la retina y asociado con una enfermedad o trastorno ocular. En algunas realizaciones el ARNm establecido en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58.

En ciertos aspectos la presente descripción revela un compuesto que tiene la estructura B

(B) 5' (N)_x 3' cadena antisentido

3' (N')_y 5' cadena sentido

en donde cada uno de (N)_x y (N')_y es un oligómero en el cual cada N o N' consecutivo es un ribonucleótido no modificado o un ribonucleótido modificado unido al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

en donde cada uno de x y y =19, 21 o 23 y (N)_x y (N')_y son completamente complementarios en donde ribonucleótidos alternantes en cada uno de (N)_x y (N')_y comprende ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar;

en donde la secuencia de (N')_y es una secuencia complementaria para (N)_x; y en donde la secuencia de (N)_x comprende una secuencia antisentido sustancialmente complementaria a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en el ARNm establecido en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58.

5 En algunas realizaciones cada uno de (N)_x y (N')_y es independientemente fosforilado o no-fosforilado en los extremos 3' y 5'.

En ciertos aspectos de la descripción, los ribonucleótidos alternantes se modifican en ambas cadenas antisentido y sentido del compuesto.

En ciertos aspectos en donde cada uno de x y y =19 o 23, cada N en los extremos 3' y 5' de (N)_x es modificado; y cada N' en los extremos 3' y 5' de (N')_y es no modificado.

10 En ciertos aspectos en donde cada uno de x y y =21, cada N en los extremos 3' y 5' de (N)_x es no modificado; y cada N' en los extremos 3' y 5' de (N')_y es modificado.

En realizaciones particulares, cuando x y y =19, el ARNip consiste en un ribonucleótido 2'-OMe modificado en el azúcar en el primer, tercer, quinto, séptimo, noveno, undécimo, decimotercero, decimoquinto, decimoséptimo y decimonoveno nucleótido de la cadena antisentido (N)_x, y ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar en el segundo, cuarto, sexto, octavo, décimo, duodécimo, decimocuarto, decimosexto y decimoctavo nucleótido de la cadena sentido (N')_y. En diversas realizaciones estos compuestos de ARNip particulares son romos en ambos extremos.

15 En algunas realizaciones estos compuestos de ARNip particulares son romos en ambos extremos.

En algunos aspectos, la presente descripción revela un compuesto que tiene la estructura (C):

(C) 5' (N)_x-Z 3' cadena antisentido

3' Z'-(N')_y 5' cadena sentido

20 en donde cada uno de N y N' es un nucleótido independientemente seleccionado a partir de un ribonucleótido no modificado, un ribonucleótido modificado, un desoxirribonucleótido no modificado y un desoxirribonucleótido modificado;

en donde cada uno de (N)_x y (N')_y es un oligómero en el cual cada nucleótido consecutivo se une al siguiente nucleótido mediante un enlace covalente y cada uno de x y y es un número entero entre 18 y 40;

25 en donde en (N)_x los nucleótidos son no modificados o (N)_x comprende ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar alternantes y ribonucleótidos no modificados; y en donde el ribonucleótido situado en la posición media de (N)_x que es modificado o no 2'-O-Me modificado en el azúcar, preferiblemente no modificado;

en donde (N')_y comprende ribonucleótidos no modificados que además comprenden un nucleótido modificado en una posición terminal o penúltima, en donde el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en un nucleótido espejo, un nucleótido bicíclico, un nucleótido modificado en 2'-azúcar, un nucleótido altritol, o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE;

30 en donde (N')_y comprende ribonucleótidos no modificados que además comprenden un nucleótido modificado en una posición terminal o penúltima, en donde el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en un nucleótido espejo, un nucleótido bicíclico, un nucleótido modificado en 2'-azúcar, un nucleótido altritol, o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE;

en donde si más de un nucleótido se modifica en (N')_y, los nucleótidos modificados pueden ser consecutivos;

en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente tiene 1-5 desoxirribonucleótidos unidos covalentemente al extremo 3' de cualquier oligómero al que está unido;

35 en donde la secuencia de (N')_y y comprende una secuencia sustancialmente complementaria a (N)_x; y en donde la secuencia de (N)_x comprende una secuencia antisentido sustancialmente complementaria a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en el ARNm establecido en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-58.

40 En realizaciones particulares, x=y=19 y en (N)_x cada ribonucleótido modificado es uno 2'-OMe modificado en el azúcar y el ribonucleótido situado en el medio de (N)_x es no modificado. De acuerdo con lo anterior, en un compuesto en donde x=19, (N)_x comprende ribonucleótidos modificados en 2'-O-metil azúcar en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. En otras realizaciones, (N)_x comprende ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 5. En otras realizaciones, (N)_x comprende ribonucleótidos modificados en 2'-OMe en las posiciones 2, 4, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 6. En otras realizaciones, (N)_x comprende ribonucleótidos modificados en 2'-OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o

45 en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o

abásico invertido, por ejemplo, en la posición 15. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos modificados en 2'-OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 14. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos modificados en 2'-OMe en las posiciones 1, 2, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 5. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos modificados en 2'-OMe en las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 6. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos modificados en 2'-OMe en las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 15.

En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos modificados en 2'-OMe en las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 14. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos modificados en 2'-OMe en las posiciones 2, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 5. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos modificados en 2'-OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 14, 16, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 15. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos modificados en 2'-OMe en las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14, 16, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 15. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos modificados en 2'-OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 7. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar en las posiciones 2, 4, 6, 11, 13, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 8. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 9. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos modificados en 2'- OMe azúcar en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 10. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar en las posiciones 2, 4, 6, 8, 13, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 11. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 12. En otras realizaciones, (N)x comprende ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 15, 17 y 19 y además puede comprender al menos un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, por ejemplo, en la posición 13.

En incluso otras realizaciones (N)x comprende al menos un apareamiento erróneo de nucleótidos con respecto al gen diana. En ciertas realizaciones preferidas, (N)x comprende un único apareamiento erróneo de nucleótidos en la posición 5, 6, o 14. En una realización de la estructura (C), al menos dos nucleótidos en cualquiera o ambos extremos 5' y 3' de (N')y se unen mediante un enlace 2'-5' fosfodiéster. En ciertas realizaciones preferidas $x=y=19$ o $x=y=23$; en (N)x los nucleótidos alternantes entre ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar y ribonucleótidos no modificados, y el ribonucleótido situado en el medio de (N)x siendo no modificado; y tres nucleótidos en el extremo 3' de (N')y se unen por dos enlaces 2'-5' fosfodiéster (establecido en este documento como estructura I). En otras realizaciones preferidas, $x=y=19$ o $x=y=23$; en (N)x los nucleótidos alternantes entre ribonucleótidos modificados en 2'- OMe azúcar y ribonucleótidos no modificados, y el ribonucleótido situado en el medio de (N)x siendo no modificado; y cuatro nucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y se unen por tres enlaces 2'-5' fosfodiéster. En una realización adicional, un nucleótido adicional situado en la posición media de (N)y es 2'-OMe modificado en el azúcar. En otra realización preferida, en (N)x los nucleótidos alternantes entre ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar y ribonucleótidos no modificados, y en (N')y cuatro nucleótidos consecutivos en el extremo 5' se unen por tres enlaces 2'-5' fosfodiéster y el nucleótido del extremo 5' o dos o tres nucleótidos consecutivos en el extremo 5' comprende modificaciones 3'- O-metil (3'-OMe).

En ciertas realizaciones preferidas de la estructura C, $x = y = 19$ y en (N')y, al menos una posición comprende un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido, preferiblemente de cinco posiciones comprenden un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido. En diversas realizaciones, las siguientes posiciones comprenden un abásico o abásico invertido: las posiciones 1 y 16-19, las posiciones 15-19, las posiciones 1-2 y 17-19, las posiciones 1-3 y 18-19, las posiciones 1-4 y 19 y las posiciones 1-5. (N')y puede comprender además al menos un nucleótido LNA.

En ciertas realizaciones preferidas de la estructura C, $x = y = 19$ y en (N')y el nucleótido en al menos una posición de nucleótidos comprende un nucleótido espejo, un desoxirribonucleótido y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace 2'-5' internucleotídico;

- 5 En ciertas realizaciones preferidas de la estructura C, $x = y = 19$ y (N')y comprende un nucleótido espejo. En diversas realizaciones el nucleótido espejo es un nucleótido ADN-L. En ciertas realizaciones, el ADN-L es L-desoxirribocitidina. En algunas realizaciones (N')y comprende ADN-L en la posición 18. En otras realizaciones (N')y comprende ADN-L en las posiciones 17 y 18. En ciertas realizaciones (N')y comprende sustituciones ADN-L en las posiciones 2 y en una o ambas de las posiciones 17 y 18. En ciertas realizaciones (N')y comprende además un nucleótido de caperuza del extremo 5' tal como ADN 5'-O-metilo o un pseudo-nucleótido abásico o abásico invertido como una proyección.
- 10 En incluso otras realizaciones (N')y comprende al menos un apareamiento erróneo de nucleótidos con respecto al gen diana. En ciertas realizaciones preferidas, (N')y comprende un único apareamiento erróneo de nucleótidos en la posición 6, 14, o 15.
- 15 En incluso otras realizaciones (N')y comprende un ADN en la posición 15 y ADN-L en una o ambas de las posiciones 17 y 18. En esta estructura, la posición 2 puede comprender además un ADN-L o un pseudo-nucleótido abásico.
- Otras realizaciones de la estructura C se contemplan en donde $x = y = 21$ o en la que $x = y = 23$; en estas realizaciones las modificaciones para (N')y discutidas anteriormente en lugar de estar en las posiciones 15, 16, 17, 18 están en las posiciones 17, 18, 19, 20 para 21 mer y en las posiciones 19, 20, 21, 22 para 23 mer; del mismo modo las modificaciones en una o ambas de las posiciones 17 y 18 están en una o ambas de las posiciones 19 o 20 para un 21 mer y una o ambas de las posiciones 21 y 22 para un 23 mer. Todas las modificaciones en el 19 mer se ajustan de manera similar para los 21 y 23 mer.
- 20 De acuerdo con diversas realizaciones de la estructura (C), en (N')y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos en el extremo 3' están unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos. En una realización preferida, cuatro nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')y están unidas por tres 2'-5' enlaces fosfodiéster, en donde uno o más de los 2' -5' nucleótidos que forman los 2'-5' enlaces fosfodiéster comprenden además una modificación 3'-O-metilo en el azúcar. Preferiblemente el nucleótido del extremo 3' de (N')y comprende una modificación 3'-O-metilo en el azúcar. En ciertas realizaciones preferidas de la estructura C, $x=y=19$ y en (N')y dos o más nucleótidos consecutivos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19 comprenden un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace 2'-5' internucleotídico. En diversas realizaciones el nucleótido que forma el enlace 2'-5' internucleotídico comprende una 3' desoxirribosa nucleótido o un 3' metoxi nucleótido. En algunas realizaciones los nucleótidos en las posiciones 17 y 18 en (N')y se unen mediante un enlace 2'-5' internucleotídico. En otras realizaciones los nucleótidos en las posiciones 16, 17, 18, 16-17, 17-18, o 16-18 en (N')y se unen mediante un enlace 2'-5' internucleotídico.
- 25 En ciertas realizaciones (N')y comprende un ADN-L en la posición 2 y enlaces 2'-5' internucleotídicos en las posiciones 16, 17, 18, 16-17, 17-18, o 16-18. En ciertas realizaciones (N')y comprende enlaces 2'-5' internucleotídicos en las posiciones 16, 17, 18, 16-17, 17-18, o 16-18 y un nucleótido de caperuza del extremo 5'.
- 30 De acuerdo con diversas realizaciones de la estructura (C), en (N')y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos consecutivos en ya sea extremos o 2-8 nucleótidos modificados en cada uno de los extremos 5' y 3' son independientemente nucleótidos espejo. En algunas realizaciones el nucleótido espejo es un L-ribonucleótido. En otras realizaciones el nucleótido espejo es un L-desoxirribonucleótido. El nucleótido espejo puede ser modificado además en la unidad estructural de azúcar o base o en un enlace internucleotídico.
- 35 En una realización preferida de la estructura (C), el nucleótido del extremo 3' o dos o tres nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')y son L-desoxirribonucleótidos.
- 40 En otras realizaciones de la estructura (C), en (N')y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos en ya sea extremos o 2 -8 nucleótidos modificados en cada uno de los extremos 5' y 3' son independientemente nucleótidos 2' modificados en el azúcar. En algunas realizaciones la modificación 2' en el azúcar comprende la presencia de una unidad estructural amino, fluoro, alcoxi o alquilo. En ciertas realizaciones la modificación 2' en el azúcar comprende una unidad estructural metoxi (2'-OMe).
- 45 En una serie de realizaciones preferidas, tres, cuatro o cinco nucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y comprenden la modificación 2'-OMe. En otra realización preferida, tres nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')y comprenden la modificación 2'-O-metilo.
- 50 En algunas realizaciones de la estructura (C), en (N')y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos en ya sea extremos o 2-8 nucleótidos modificados en cada uno de los extremos 5' y 3' son independientemente nucleótidos bicíclicos. En diversas realizaciones el nucleótido bicíclico es un ácido nucleico bloqueado (LNA). Un 2'-O, 4'-C-etileno-ácido nucleico en puente (ENA) es una especie de LNA (véase abajo).
- En diversas realizaciones (N')y comprende nucleótidos modificados en el extremo 5' o en ambos de los extremos 3' y 5'.

5 En algunas realizaciones de la estructura (C), al menos dos nucleótidos en cualquiera o ambos extremos 5' y 3' de (N')y se unen por modificaciones del esqueleto P-etoxi. En ciertas realizaciones preferidas $x=y=19$ o $x=y=23$; en (N)x los nucleótidos alternantes entre ribonucleótidos modificados y ribonucleótidos no modificados, cada ribonucleótido modificado siendo modificado de modo que tenga un 2'-O-metil en su azúcar y el ribonucleótido situado en la posición media de (N)x siendo no modificado; y cuatro nucleótidos consecutivos en el extremo 3' o en el extremo 5' de (N')y se unen por tres modificaciones en el esqueleto P-etoxi. En otra realización preferida, tres nucleótidos consecutivos en el extremo 3' o en el extremo 5' de (N')y se unen por dos modificaciones en el esqueleto P-etoxi.

10 En algunas realizaciones de la estructura (C), en (N')y 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, ribonucleótidos consecutivos en cada uno de los extremos 5' y 3' son independientemente nucleótidos espejo, nucleótidos unidos por el enlace 2'-5' fosfodiéster, nucleótidos 2' modificados en el azúcar o nucleótido bicíclico. En una realización, la modificación en los extremos 3' y 5' de (N')y es idéntica. En una realización preferida, cuatro nucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y se unen por tres enlaces 2'-5' fosfodiéster y tres nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')y se unen por dos enlaces 2'-5' fosfodiéster. En otra realización, la modificación en el extremo 5' de (N')y es diferente desde la modificación en el extremo 3' de (N')y. En una realización específica, los nucleótidos modificados en el extremo 5' de (N')y son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en el extremo 3' de (N')y se unen por el enlace 2'-5' fosfodiéster. En otra realización específica, tres nucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y son nucleótidos LNA y tres nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')y se unen por dos enlaces 2'-5' fosfodiéster. En (N)x los nucleótidos alternantes entre ribonucleótidos modificados y ribonucleótidos no modificados, cada ribonucleótido modificado siendo modificado de modo que tenga un 2'-O-metil sobre su azúcar y el ribonucleótido situado en el medio de (N)x siendo no modificado, o los ribonucleótidos en (N)x siendo no modificado

25 En otra realización de la estructura (C), la presente invención provee un compuesto en donde $x=y=19$ o $x=y=23$; en (N)x los nucleótidos alternantes entre ribonucleótidos modificados y ribonucleótidos no modificados, cada ribonucleótido modificado siendo modificado de modo que tenga un 2'-O-metil sobre su azúcar y el ribonucleótido situado en el medio de (N)x siendo no modificado; tres nucleótidos en el extremo 3' de (N')y se unen por dos enlaces 2'-5' fosfodiéster y tres nucleótidos en el extremo 5' de (N')y son LNA tales como ENA.

En otra realización de la estructura (C), cinco nucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y comprende la modificación en 2'-O-metil azúcar y dos nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')y son ADN-L.

30 En incluso otro aspecto, la presente descripción revela un compuesto en donde $x=y=19$ o $x=y=23$; (N)x consiste de ribonucleótidos no modificados; tres nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')y se unen por dos enlaces 2'-5' fosfodiéster y tres nucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y son LNA tal como ENA.

35 De acuerdo con otras realizaciones de la estructura (C), en (N')y el nucleótido del extremo 5' o 3', o 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos consecutivos ya sea en nucleótidos extremo o 1-4 modificados en cada uno de los extremos 5' y 3' son independientemente nucleótidos fosfonocarboxilato o fosfinocarboxilato (nucleótidos PACE). En algunas realizaciones los nucleótidos PACE son desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones preferidas en (N')y, 1 o 2 nucleótidos consecutivos en cada uno de los extremos 5' y 3' son nucleótidos PACE. Ejemplos de nucleótidos PACE y análogos se revelan en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,693,187 y 7,067,641 ambas incorporadas por referencia.

En aspectos adicionales, la presente descripción revela un compuesto que tiene la estructura (D):

(D) 5' (N)x -Z 3' cadena antisentido

3' Z'-(N')y 5' cadena sentido

40 en donde cada uno de N y N' es un nucleótido seleccionado a partir de un ribonucleótido no modificado, un ribonucleótido modificado, un desoxirribonucleótido no modificado o un desoxirribonucleótido modificado;

en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligómero en el cual cada nucleótido consecutivo se une al siguiente nucleótido mediante un enlace covalente y cada uno de x y y es un número entero entre 18 y 40;

45 en donde (N)x comprende ribonucleótidos no modificados que además comprenden un nucleótido modificado en el extremo 3' o penúltima posición, en donde el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido altritol, o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE;

50 en donde (N')y comprende ribonucleótidos no modificados que además comprenden un nucleótido modificado en el extremo 5' o penúltima posición, en donde el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido altritol, o un nucleótido

unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE;

en donde en cada uno de (N)x y (N')y nucleótidos modificados y no modificados no son alternantes;

5 en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente tiene 1-5 desoxiribonucleótidos unidos covalentemente en el extremo 3' de cualquier oligómero al cual están unidos;

en donde la secuencia de (N')y es una secuencia sustancialmente complementaria a (N)x; y en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido que tiene complementariedad sustancial a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en el ARNm establecido en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58.

10 En una realización de la estructura (D), $x=y=19$ o $x=y=23$; (N)x comprende ribonucleótidos no modificados en los cuales dos nucleótidos consecutivos unidos mediante un enlace 2'-5' internucleotídico en el extremo 3'; y (N')y comprende ribonucleótidos no modificados en los cuales dos nucleótidos consecutivos unidos mediante un enlace 2'-5' internucleotídico en el extremo 5'.

15 En algunas realizaciones, $x=y=19$ o $x=y=23$; (N)x comprende ribonucleótidos no modificados en los cuales tres nucleótidos consecutivos en el extremo 3' se unen entre sí por dos enlaces 2'-5' fosfodiéster; y (N')y comprende ribonucleótidos no modificados en los cuales cuatro nucleótidos consecutivos en el extremo 5' se unen entre sí por tres enlaces 2'-5' fosfodiéster (establecido en este documento como estructura II).

20 De acuerdo con diversas realizaciones de la estructura (D) 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 3' de (N)x y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 5' de (N')y se unen por los enlaces 2'-5' internucleotídicos.

De acuerdo con una realización preferida de la estructura (D), cuatro nucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y se unen por tres enlaces 2'-5' fosfodiéster y tres nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')x se unen por dos enlaces 2'-5' fosfodiéster. Tres nucleótidos en el extremo 5' de (N')y y dos nucleótidos en el extremo 3' de (N')x también puede comprender modificaciones 3'-O-metilo.

25 De acuerdo con diversas realizaciones de la estructura (D), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 3' de (N)x y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 5' de (N')y son independientemente nucleótidos espejo. En algunas realizaciones el espejo es un L-ribonucleótido. En otras realizaciones el nucleótido espejo es L-desoxirribonucleótido.

30 En otras realizaciones de la estructura (D), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 3' de (N)x y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 5' de (N')y son independientemente nucleótidos 2' modificados en el azúcar. En algunas realizaciones la modificación 2' en el azúcar comprende la presencia de una unidad estructural amino, fluoro, alcoxi o alquilo. En ciertas realizaciones la modificación 2' en el azúcar comprende una
35 unidad estructural metoxi (2'- OMe).

En una realización preferida de la estructura (D), cinco nucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y comprenden la modificación 2'-O-metilo y cinco nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')x comprende la modificación 2'-O-metilo. En otra realización preferida de la estructura (D), diez nucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y comprende la modificación 2'-O-metilo y cinco nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')x comprende la
40 modificación 2'-O- metilo. En otra realización preferida de la estructura (D), trece nucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y comprenden la modificación 2'-O-metilo y cinco nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')x comprende la modificación 2'-O-metilo.

45 En algunas realizaciones de la estructura (D), en (N')y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 3' de (N)x y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 5' de (N')y son independientemente un nucleótido bicíclico. En diversas realizaciones el nucleótido bicíclico es un ácido nucleico bloqueado (LNA) tal como un ácido nucleico en puente (ENA) con 2'-O, 4'- C-etileno.

50 En diversas realizaciones de la estructura (D), (N')y comprende un nucleótido modificado seleccionado a partir de un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido alritol o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE;

En diversas realizaciones de la estructura (D), (N)x comprende un nucleótido modificado seleccionado a partir de un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido alritrol o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE;

5 En realizaciones en donde cada uno de los extremos 3' y 5' de la misma cadena comprende un nucleótido modificado, la modificación en los extremos 3' y 5' es idéntica. En otra realización, la modificación en el extremo 5' es diferente de la modificación en el extremo 3' de la misma cadena. En una realización específica, los nucleótidos modificados en el extremo 5' son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en el extremo 3' de la misma cadena se unen por el enlace 2'- 5' fosfodiéster.

10 En una realización específica de la estructura (D), cinco nucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y comprenden la modificación 2'-O-metilo y dos nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')y son ADN-L. Adicionalmente, el compuesto además puede comprender cinco nucleótidos modificados en 2'-O-metilo consecutivos en el extremo 3' de (N')x.

15 En diversas realizaciones de la estructura (D), los nucleótidos modificados en (N)x son diferentes de los nucleótidos modificados en (N')y. Por ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos 2' modificados en el azúcar y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos. En otro ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos. En otro ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos espejo.

20 En aspectos adicionales la presente descripción revela un compuesto que tiene la estructura (E):

(E) 5' (N)x-Z 3' cadena antisentido

3' Z'-(N')y 5' cadena sentido

en donde cada uno de N y N' es un nucleótido seleccionado a partir de un ribonucleótido no modificado, un ribonucleótido modificado, un desoxirribonucleótido no modificado o un desoxirribonucleótido modificado;

25 en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligómero en el cual cada nucleótido consecutivo se une al siguiente nucleótido mediante un enlace covalente y cada uno de x y y es un número entero entre 18 y 40;

30 en donde (N)x comprende ribonucleótidos no modificados que además comprenden un nucleótido modificado en el extremo 5' o penúltima posición, en donde el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido alritrol, o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE;

35 en donde (N')y comprende ribonucleótidos no modificados que además comprenden un nucleótido modificado en el extremo 3' o penúltima posición, en donde el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido alritrol, o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE;

en donde en cada uno de (N)x y (N')y los nucleótidos modificados y no modificados no son alternantes;

en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente tiene 1-5 desoxirribonucleótidos unidos covalentemente en el extremo 3' de cualquier oligómero al cual está unido;

40 en donde la secuencia de (N')y es una secuencia sustancialmente complementaria a (N)x; y en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido que tiene complementariedad sustancial a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en el ARNm establecido en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58.

En ciertas realizaciones preferidas el nucleótido final en el extremo 5' de (N)x es no modificado.

45 De acuerdo con diversas realizaciones de la estructura (E) 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 5' de (N)x, iniciando preferiblemente en la penúltima posición 5', y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 3' de (N')y se unen por los enlaces 2'-5' internucleotídicos.

5 De acuerdo con diversas realizaciones de la estructura (E), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 5' de (N)x, iniciando preferiblemente en la penúltima posición 5', y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 3' de (N')y son independientemente nucleótidos espejo. En algunas realizaciones el espejo es un L-ribonucleótido. En otras realizaciones el nucleótido espejo es L-desoxirribonucleótido.

10 En otras realizaciones de la estructura (E), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 5' de (N)x, iniciando preferiblemente en la penúltima posición 5', y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 3' de (N')y son independientemente nucleótidos 2' modificados en el azúcar. En algunas realizaciones la modificación 2' en el azúcar comprende la presencia de una unidad estructural amino, un fluoro, un alcoxi o un alquilo. En ciertas realizaciones la modificación 2' en el azúcar comprende una unidad estructural metoxi (2'-OMe).

15 En algunas realizaciones de la estructura (E), en (N')y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos iniciando en la posición final o penúltima del extremo 5' de (N)x, iniciando preferiblemente en la penúltima posición 5', y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos comenzando en la la posición final o penúltima de los extremos 3' de (N')y son independientemente un nucleótido bicíclico. En diversas realizaciones el nucleótido bicíclico es un ácido nucleico bloqueado (LNA) tales como un ácido nucleico en puente (ENA) con 2'-O, 4'-C-etileno.

20 En diversas realizaciones de la estructura (E), (N')y comprende nucleótidos modificados seleccionado a partir de un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido altritol, un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por una modificación del esqueleto P-alcoxi o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE en el extremo 3' o en cada uno de los extremos 3' y 5'.

25 En diversas realizaciones de la estructura (E), (N)x comprende un nucleótido modificado seleccionado a partir de un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido altritol, o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE en el extremo 5' o en cada uno de los extremos 3' y 5'.

30 En una realización donde ambos extremos 3' y 5' de la misma cadena comprenden un nucleótido modificado, la modificación en los extremos 3' y 5' es idéntica. En otra realización, la modificación en el extremo 5' es diferente desde la modificación en el extremo 3' de la misma cadena. En una realización específica, los nucleótidos modificados en el extremo 5' son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en el extremo 3' de la misma cadena se unen por el enlace 2'- 5' fosfodiéster.

35 En diversas realizaciones de la estructura (E), los nucleótidos modificados en (N)x son diferentes de los nucleótidos modificados en (N')y. Por ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos 2' modificados en el azúcar y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos. En otro ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos. En otro ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos espejo.

En aspectos adicionales la presente descripción revela un compuesto que tiene la estructura (F):

40 (F) 5' (N)x -Z 3' cadena antisentido
3' Z'-(N')y 5' cadena sentido

en donde cada uno de N y N' es un nucleótido seleccionado a partir de un ribonucleótido no modificado, un ribonucleótido modificado, un desoxirribonucleótido no modificado o un desoxirribonucleótido modificado;

en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligómero en el cual cada nucleótido consecutivo se une al siguiente nucleótido mediante un enlace covalente y cada uno de x y y es un número entero entre 18 y 40;

45 en donde cada uno de (N)x y (N')y comprende ribonucleótidos no modificados en los cuales cada uno de (N)x y (N')y independientemente comprende un nucleótido modificado en el extremo 3' o penúltima posición en donde el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por una modificación del esqueleto P-alcoxi o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace 2'- 5' fosfodiéster;

50 en donde en cada uno de (N)x y (N')y nucleótidos modificados y no modificados no son alternantes;

en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente tiene 1-5 desoxiribonucleótidos unidos covalentemente en el extremo 3' de cualquier oligómero al cual están unidos;

en donde la secuencia de (N')y es una secuencia sustancialmente complementaria a (N)x; y en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido que tiene complementariedad sustancial a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en ARNm establecidos en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58.

5

En algunas realizaciones de la estructura (F), $x=y=19$ o $x=y=23$; (N')y comprende ribonucleótidos no modificados en los cuales dos nucleótidos consecutivos en el extremo 3' comprenden dos desoxiribonucleótidos espejo consecutivos; y (N)x comprende ribonucleótidos no modificados en los cuales un nucleótido en el extremo 3' comprende un desoxiribonucleótido espejo (establecido como estructura III).

10

De acuerdo con diversas realizaciones de la estructura (F) 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos de forma independiente que inician en la última y penúltima posición de los extremos 3' de (N)x y (N')y se unen por los enlaces 2'-5' internucleotídicos.

De acuerdo con una realización preferida de la estructura (F), tres nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')y se unen por dos enlaces 2'-5' fosfodiéster y tres nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N)x se unen por dos enlaces 2'-5' fosfodiéster.

15

De acuerdo con diversas realizaciones de la estructura (F), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos consecutivos de forma independiente que inician en la última y penúltima posición de los extremos 3' de (N)x y (N')y son independientemente nucleótidos espejo. En algunas realizaciones el nucleótido espejo es un L-ribonucleótido. En otras realizaciones el nucleótido espejo es un L-desoxirribonucleótido.

20

En otras realizaciones de la estructura (F), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos de forma independiente que inician en la última y penúltima posición de los extremos 3' de (N)x y (N')y son independientemente nucleótidos 2' modificados en el azúcar. En algunas realizaciones la modificación 2' en el azúcar comprende la presencia de una unidad estructural amino, un fluoro, un alcoxi o un alquilo. En ciertas realizaciones la modificación 2' en el azúcar comprende una unidad estructural metoxi (2'- OMe).

25

En algunas realizaciones de la estructura (F), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos de forma independiente que inician en la última y penúltima posición de los extremos 3' de (N)x y (N')y son independientemente un nucleótido bicíclico. En diversas realizaciones el nucleótido bicíclico es un ácido nucleico bloqueado (LNA) tales como un ácido nucleico en puente (ENA) con 2'-O, 4'-Cetileno.

30

En diversas realizaciones de la estructura (F), (N')y comprende un nucleótido modificado seleccionado a partir de un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido alritol, o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE en el extremo 3' o a ambos de los extremos 3' y 5'.

En diversas realizaciones de la estructura (F), (N)x comprende un nucleótido modificado seleccionado a partir de un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido alritol, o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE en el extremo 3' o en cada uno de los extremos 3' y 5'.

35

En una realización donde cada uno de los extremos 3' y 5' de la misma cadena comprende un nucleótido modificado, la modificación en los extremos 3' y 5' es idéntica. En otra realización, la modificación en el extremo 5' es diferente de la modificación en el extremo 3' de la misma cadena. En una realización específica, los nucleótidos modificados en el extremo 5' son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en el extremo 3' de la misma cadena se unen por el enlace 2'- 5' fosfodiéster.

40

En diversas realizaciones de la estructura (F), los nucleótidos modificados en (N)x son diferentes de los nucleótidos modificados en (N')y. Por ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos 2' modificados en el azúcar y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos. En otro ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos. En otro ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos espejo.

45

En aspectos adicionales la presente descripción revela un compuesto que tiene la estructura (G)

5' (N)x-Z 3' cadena antisentido

3' Z'-(N')y 5' cadena sentido

en donde cada uno de N y N' es un nucleótido seleccionado a partir de un ribonucleótido no modificado, un ribonucleótido modificado, un desoxirribonucleótido no modificado o un desoxirribonucleótido modificado;

5 en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligómero en el cual cada nucleótido consecutivo se une al siguiente nucleótido mediante un enlace covalente y cada uno de x y y es un número entero entre 18 y 40;

10 en donde cada uno de (N)x y (N')y comprende ribonucleótidos no modificados en los cuales cada uno de (N)x y (N')y independientemente comprende un nucleótido modificado en el extremo 5' o penúltima posición en donde el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por una modificación del esqueleto P-alcoxi o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace 2'-5' fosfodiéster;

en donde para (N)x el nucleótido modificado preferiblemente está en la penúltima posición del extremo 5';

en donde en cada uno de (N)x y (N')y nucleótidos modificados y no modificados no son alternantes;

en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente tiene 1-5 desoxirribonucleótidos unidos covalentemente en el extremo 3' de cualquier oligómero al cual están unidos;

15 en donde la secuencia de (N')y es una secuencia sustancialmente complementaria a (N)x; y en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido que tiene complementariedad sustancial a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en el ARNm establecido en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58.

En algunas realizaciones de la estructura (G), x=y=19.

20 De acuerdo con diversas realizaciones de la estructura (G) 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos de forma independiente que inician en la última y penúltima posición del extremo 5' de (N)x y (N')y se unen por los enlaces 2'-5' internucleotídicos. Para (N)x los nucleótidos modificados iniciando preferiblemente en la penúltima posición del extremo 5'.

25 De acuerdo con diversas realizaciones de la estructura (G), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos consecutivos de forma independiente que inician en la última y penúltima posición del extremo 5' de (N)x y (N')y son independientemente nucleótidos espejo. En algunas realizaciones el nucleótido espejo es un L-ribonucleótido. En otras realizaciones el nucleótido espejo es un L-desoxirribonucleótido. Para (N)x los nucleótidos modificados iniciando preferiblemente en la penúltima posición del extremo 5'.

30 En otras realizaciones de la estructura (G), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos de forma independiente que inician en la última y penúltima posición del extremo 5' de (N)x y (N')y son independientemente nucleótidos 2' modificados en el azúcar. En algunas realizaciones la modificación 2' en el azúcar comprende la presencia de una unidad estructural amino, un fluoro, un alcoxi o un alquilo. En ciertas realizaciones la modificación 2' en el azúcar comprende una unidad estructural metoxi (2'- OMe). En algunas realizaciones preferidas los nucleótidos modificados consecutivos iniciando preferiblemente en la penúltima posición del extremo 5' de (N)x.

35 En una realización preferida de la estructura (G), cinco ribonucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y comprende una modificación 2'-O-metilo y un ribonucleótido en la penúltima posición 5' de (N')x comprende una modificación 2'-O metilo. En otra realización preferida de la estructura (G), cinco ribonucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y comprenden una modificación 2'-O-metilo y dos ribonucleótidos consecutivos en la posición del extremo 5' de (N')x comprende una modificación 2'-O-metilo.

40 En algunas realizaciones de la estructura (G), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos de forma independiente que inician en la última y penúltima posición del extremo 5' de (N)x y (N')y son nucleótidos bicíclicos. En diversas realizaciones el nucleótido bicíclico es un ácido nucleico bloqueado (LNA) tales como un ácido nucleico en puente (ENA) con 2'-O, 4'-C-etileno. En algunas realizaciones preferidas los nucleótidos modificados consecutivos iniciando preferiblemente en la penúltima posición del extremo 5' de (N)x.

45 En diversas realizaciones de la estructura (G), (N')y comprende un nucleótido modificado seleccionado a partir de un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido alritol, o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE en el extremo 5' o en cada uno de los extremos 3' y 5'.

En diversas realizaciones de la estructura (G), (N)x comprende un nucleótido modificado seleccionado a partir de un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido altritol, o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE en el extremo 5' o en cada uno de los extremos 3' y 5'.

5 En una realización donde cada uno de los extremos 3' y 5' de la misma cadena comprende un nucleótido modificado, la modificación en los extremos 3' y 5' es idéntica. En otra realización, la modificación en el extremo 5' es diferente desde la modificación en el extremo 3' de la misma cadena. En una realización específica, los nucleótidos modificados en el extremo 5' son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en el extremo 3' de la misma cadena se unen por el enlace 2'-5' fosfodiéster. En diversas realizaciones de la estructura (G), los nucleótidos modificados en (N)x son diferentes de los nucleótidos modificados en (N')y. Por ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos 2' modificados en el azúcar y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos. En otro ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos. En otro ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos espejo.

En aspectos adicionales, la presente descripción revela un compuesto que tiene la estructura (H):

(H) 5' (N)x -Z 3' cadena antisentido
3' Z'-(N')y 5' cadena sentido

20 en donde cada uno de N y N' es un nucleótido seleccionado a partir de un ribonucleótido no modificado, un ribonucleótido modificado, un desoxirribonucleótido no modificado o un desoxirribonucleótido modificado;

en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligómero en el cual cada nucleótido consecutivo se une al siguiente nucleótido mediante un enlace covalente y cada uno de x y y es un número entero entre 18 y 40;

25 en donde (N)x comprende ribonucleótidos no modificados que además comprenden un nucleótido modificado en el extremo 3' o penúltima posición o el extremo 5' o penúltima posición, en donde el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido altritol, o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE;

30 en donde (N')y comprende ribonucleótidos no modificados que además comprenden un nucleótido modificado en una posición interna, en donde el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en un nucleótido bicíclico, un nucleótido 2' modificado en el azúcar, un nucleótido espejo, un nucleótido altritol, o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico seleccionado a partir de un enlace 2'-5' fosfodiéster, un enlace P-alcoxi o un enlace PACE;

en donde en cada uno de (N)x y (N')y los nucleótidos modificados y no modificados no son alternantes;

35 en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente tiene 1-5 desoxirribonucleótidos unidos covalentemente en el extremo 3' de cualquier oligómero al cual están unidos;

en donde la secuencia de (N')y es una secuencia sustancialmente complementaria a (N)x; y en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido que tiene complementariedad sustancial a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en ARNm establecidos en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58.

40 En una realización de la estructura (H), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos de forma independiente que inician en la última y penúltima posición del extremo 3' o el extremo 5' o ambos extremos de (N)x son independientemente nucleótidos 2' modificados en el azúcar, nucleótidos bicíclicos, nucleótidos espejo, nucleótidos altritol o nucleótidos unidos a un nucleótido adyacente mediante un enlace 2'-5' fosfodiéster y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos internos consecutivos en (N')y son independientemente nucleótidos 2' modificados en el azúcar, nucleótidos bicíclicos, nucleótidos espejo, nucleótidos altritol o nucleótidos unidos a un nucleótido adyacente mediante un enlace 2'-5' fosfodiéster. En algunas realizaciones la modificación 2' en el azúcar comprende la presencia de una unidad estructural amino, un fluoro, un alcoxi o un alquilo. En ciertas realizaciones el ribonucleótido 2' modificado en el azúcar comprende una unidad estructural metoxi (2'-OMe).

45 En otra realización de la estructura (H), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos de forma independiente que inician en la última y penúltima posición del extremo 3' o el extremo 5' o 2-8 nucleótidos consecutivos en cada uno de los extremos 5' y 3' de (N')y son independientemente nucleótidos 2' modificados en el azúcar,

nucleótido bicíclicos, nucleótidos espejo, nucleótidos alritol o nucleótidos unidos a un nucleótido adyacente mediante un enlace 2'-5' fosfodiéster, y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos internos consecutivos en (N)x son independientemente nucleótidos 2' modificados en el azúcar, nucleótido bicíclicos, nucleótidos espejo, nucleótidos alritol o nucleótidos unidos a un nucleótido adyacente mediante un enlace 2'-5' fosfodiéster.

- 5 En una realización en donde cada uno de los extremos 3' y 5' de la misma cadena comprende un nucleótido modificado, la modificación en los extremos 3' y 5' es idéntica. En otra realización, la modificación en el extremo 5' es diferente de la modificación en el extremo 3' de la misma cadena. En una realización específica, los nucleótidos modificados en el extremo 5' son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en el extremo 3' de la misma cadena se unen por el enlace 2'-5' fosfodiéster.
- 10 En diversas realizaciones de la estructura (H), los nucleótidos modificados en (N)x son diferentes de los nucleótidos modificados en (N')y. Por ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos 2' modificados en el azúcar y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos. En otro ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos. En otro ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos unidos por los enlaces 2'-5' internucleotídicos y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos espejo.

En una realización preferida de la estructura (H), $x=y=19$; tres ribonucleótidos consecutivos en las posiciones de 9-11 nucleótidos 9-11 de (N')y comprenden la modificación 2'-O-metilo y cinco ribonucleótidos consecutivos en la posición del extremo 3' de (N')x comprenden la modificación 2'-O-metilo.

La presente invención provee un compuesto que tiene la estructura (I) establecida a continuación:

- 20 (I) 5' (N)x - Z 3' (cadena antisentido)
3' Z'-(N')y- z" 5' (cadena sentido)

en donde cada uno de N y N' es un ribonucleótido que puede ser no modificado o modificado, o una unidad estructural no convencional;

- 25 en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

en donde Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente tiene de forma independiente 1-5 nucleótidos consecutivos unidos covalentemente en el extremo 3' de la cadena en la cual está presente;

en donde z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección unida covalentemente en el extremo 5' de (N')y;

- 30 en donde $x = y = 19$;

en donde (N)x comprende ribonucleótidos modificados y no modificados, cada ribonucleótido modificado que tiene un 2'-O-metilo sobre su azúcar, en donde N en el extremo 3' de (N)x es un ribonucleótido modificado, (N)x comprende al menos cinco ribonucleótidos modificados alternantes que comienzan en el extremo 3' y al menos nueve ribonucleótidos modificados en total y cada N restante es un ribonucleótido no modificado;

- 35 en donde en (N')y al menos una unidad estructural no convencional está presente, cuya unidad estructural no convencional puede ser una unidad estructural ribosa abásica, una unidad estructural desoxirribosa abásica, un desoxirribonucleótido modificado o no modificado, un nucleótido espejo, y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace 2'-5' internucleotídico fosfato; y

- 40 en donde la secuencia de (N)x es sustancialmente complementaria a la secuencia de (N')y; y en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido que tiene complementariedad sustancial a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en ARNm establecidos en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-2.

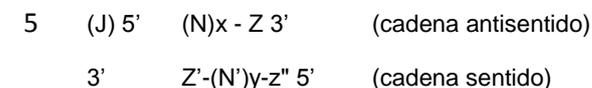
La al menos una unidad estructural no convencional está presente en las posiciones 18 en (N')y.

La unidad estructural no convencional es una unidad estructural ADN-L.

- 45 En la estructura (I) (N)x comprende nueve ribonucleótidos modificados alternantes que además comprenden un nucleótido 2'O modificado en la posición 2. (N)x comprende ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19.

En diversas realizaciones z'' está presente y se selecciona de una unidad estructural ribosa abásica, una unidad estructural desoxirribosa; una unidad estructural ribosa abásica invertida, una unidad estructural desoxirribosa; C6-amino-Pi; un nucleótido espejo.

En otro aspecto la presente descripción revela un compuesto que tiene la estructura (J) establecido a continuación:



en donde cada uno de N y N' es un ribonucleótido que puede ser no modificado o modificado, o una unidad estructural no convencional;

10 en donde cada uno de (N)_x y (N')_y es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

en donde Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente tiene de forma independiente 1-5 nucleótidos consecutivos unido covalentemente en el extremo 3' de la cadena en la cual está presente;

en donde z'' puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección unida covalentemente en el extremo 5' de (N')_y;

15 en donde $x = 18$ a 27 ;

en donde $y = 18$ a 27 ;

en donde (N)_x comprende ribonucleótidos modificados o no modificados, y opcionalmente al menos una unidad estructural no convencional;

20 en donde en (N')_y al menos una unidad estructural no convencional está presente, cuya unidad estructural no convencional puede ser una unidad estructural ribosa abásica, una unidad estructural desoxirribosa abásica, un desoxirribonucleótido modificado o no modificado, un nucleótido espejo, un análogo de nucleótido de pares de no bases o un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace 2'-5' internucleotídico fosfato; y

25 en donde la secuencia de (N)_x es sustancialmente complementaria a la secuencia de (N')_y; y en donde la secuencia de (N)_x comprende una secuencia antisentido que tiene complementariedad sustancial a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en ARNm establecidos en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58.

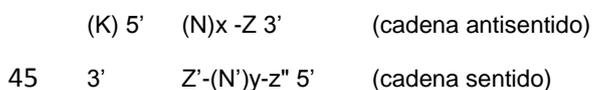
En algunas realizaciones $x = y = 19$. En otras realizaciones $x = y = 23$. En algunas realizaciones preferidas (N)_x comprende ribonucleótidos modificados y no modificados, y al menos una unidad estructural no convencional.

30 En algunas realizaciones en (N)_x el N en el extremo 3' es un ribonucleótido modificado y (N)_x comprende al menos 8 ribonucleótidos modificados. En otras realizaciones al menos 5 de los al menos 8 ribonucleótidos modificados son alternantes que comienzan en el extremo 3'. En algunas realizaciones (N)_x comprende una unidad estructural abásica en una de las posiciones 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.

35 En algunas realizaciones la al menos una unidad estructural no convencional en (N')_y está presente en las posiciones 15, 16, 17, o 18. En algunas realizaciones la unidad estructural no convencional se selecciona de un nucleótido espejo, una unidad estructural ribosa abásica y una unidad estructural desoxirribosa abásica. En algunas realizaciones preferidas la unidad estructural no convencional es un nucleótido espejo, preferiblemente una unidad estructural ADN-L. En algunas realizaciones una unidad estructural ADN-L está presente en la posición 17, posición 18 o posiciones 17 y 18. En otras realizaciones la al menos una unidad estructural no convencional en (N')_y es una unidad estructural ribosa abásica o una unidad estructural desoxirribosa abásica.

40 En diversas realizaciones de la estructura (X) z'' está presente y se selecciona de una unidad estructural ribosa abásica, una unidad estructural desoxirribosa; una unidad estructural ribosa abásica invertida, una unidad estructural desoxirribosa; C6-amino-Pi; un nucleótido espejo.

En incluso otro aspecto la presente descripción revela un compuesto que tiene la estructura (K) establecido a continuación:



- en donde cada uno de N y N' es un ribonucleótido que puede ser no modificado o modificado, o una unidad estructural no convencional;
- en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;
- 5 en donde Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente tiene de forma independiente 1-5 nucleótidos consecutivos unidos covalentemente en el extremo 3' de la cadena en la cual está presente;
- en donde z'' puede estar presente o ausente pero si está presente es una unidad estructural de protección unida covalentemente en el extremo 5' de (N')y;
- en donde x =18 a 27;
- 10 en donde y =18 a 27;
- en donde (N)x comprende una combinación de ribonucleótidos modificados o no modificados y unidades estructurales convencionales, cualquier ribonucleótido modificado que tiene un 2'-O-metilo sobre su azúcar;
- en donde (N')y comprende ribonucleótidos modificados o no modificados y opcionalmente una unidad estructural no convencional, cualquier ribonucleótido modificado que tiene un 2'OMe sobre su azúcar;
- 15 en donde la secuencia de (N)x es sustancialmente complementaria a la secuencia de (N')y; y en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido que tiene complementariedad sustancial a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en ARNm establecidos en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58; y en donde existen menos de 15 nucleótidos consecutivos complementarios al ARNm.
- 20 En algunas realizaciones x =y=19. En otras realizaciones x =y=23. En algunas realizaciones preferidas la al menos una unidad estructural no convencional preferida está presente en (N)x y es una unidad estructural ribosa abásica o una unidad estructural desoxirribosa abásica. En otras realizaciones la al menos una unidad estructural no convencional está presente en (N)x y es un análogo de nucleótido de pares de no bases. En diversas realizaciones (N')y comprende ribonucleótidos no modificados. En algunas realizaciones (N)x comprende al menos cinco unidades estructurales ribosa abásicas o unidades estructurales desoxirribosa abásicas o una combinación de las mismas. En ciertas realizaciones
- 25 (N)x y/o (N')y comprende ribonucleótidos modificados que no son pares de base con los correspondientes ribonucleótidos modificados o no modificados en (N')y y/o (N)x.
- En diversos aspectos la presente descripción revela un ARNip establecido en la estructura (L):
- (L) 5' (N)x-Z 3' (cadena antisentido)
- 3' Z'-(N')y 5' (cadena sentido)
- 30 en donde cada uno de N y N' es un nucleótido seleccionado a partir de un ribonucleótido no modificado, un ribonucleótido modificado, un desoxirribonucleótido no modificado y un desoxirribonucleótido modificado;
- en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;
- en donde Z y Z' están ausentes;
- 35 en donde x=y=19;
- en donde en (N')y el nucleótido en al menos una de las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19 comprende un nucleótido seleccionado a partir de un pseudo-nucleótido abásico, un nucleótido espejo, un desoxirribonucleótido y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace 2'-5' internucleotídico;
- 40 en donde (N)x comprende ribonucleótidos modificados alternantes y ribonucleótidos no modificados siendo cada ribonucleótido modificado, modificado de modo que tenga un 2'-O-metilo sobre su azúcar y el ribonucleótido situado en la posición media de (N)x siendo modificado o no modificado, preferiblemente no modificado; y en donde la secuencia de (N)x es sustancialmente complementaria a la secuencia de (N')y; y en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido que tiene complementariedad sustancial a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en ARNm establecidos en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58.

En algunas realizaciones de la estructura (L), en (N')y el nucleótido en una o ambas de las posiciones 17 y 18 comprende un nucleótido modificado seleccionado a partir de un pseudo-nucleótido abásico, un nucleótido espejo y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace 2'-5' internucleotídico. En algunas realizaciones el nucleótido espejo se selecciona de ADN-L y ARN-L. En diversas realizaciones el nucleótido espejo es ADN-L.

- 5 En diversas realizaciones (N')y comprende un nucleótido modificado en la posición 15, en donde el nucleótido modificado se selecciona de un nucleótido espejo y un desoxirribonucleótido.

En ciertas realizaciones (N')y además comprende un nucleótido modificado o pseudo nucleótido en la posición 2 en donde el pseudo nucleótido puede ser un análogo pseudo-nucleótido abásico y el nucleótido modificado es opcionalmente un nucleótido espejo.

- 10 En diversas realizaciones la cadena antisentido (N)x comprende ribonucleótidos modificados en 2'O-Me en las posiciones numeradas impares (5' a 3'; posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19). En algunas realizaciones (N)x además comprende ribonucleótidos modificados en 2'O-Me en una o ambas posiciones 2 y 18. En otras realizaciones (N)x comprende ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19.

- 15 Otras realizaciones de la estructuras (L), (I) y (J) se contemplan, en donde $x=y=21$ o en donde $x=y=23$; en estas realizaciones las modificaciones para (N')y discutidas anteriormente en lugar de estar en las posiciones 17 y 18 están en las posiciones 19 y 20 para oligonucleótido de 21-mer y 21 y 22 para oligonucleótido de 23-mer; igualmente las modificaciones en las posiciones 15, 16, 17, 18 o 19 están en las posiciones 17, 18, 19, 20 o 21 para el oligonucleótido de 21-mer y las posiciones 19, 20, 21, 22, o 23 para el oligonucleótido de 23-mer. Las modificaciones en 2'-OMe en la cadena antisentido se ajustan igualmente. En algunas realizaciones (N)x comprende ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar en las posiciones numeradas impares (5' a 3'; posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 18, 20 para el oligonucleótido de 21-mer [nucleótido en la posición 11 no modificado] y 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 para el oligonucleótido de 23-mer [nucleótido en la posición 12 no modificado]. En otras realizaciones (N)x comprende ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 [nucleótido en la posición 11 no modificado para el oligonucleótido de 21-mer y en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 19, 21, 23 para el oligonucleótido de 23-mer [nucleótido en la posición 12 no modificado].

- 20 En algunas realizaciones, (N')y además comprende un nucleótido de caperuza del extremo 5'. En diversas realizaciones la unidad estructural de caperuza del extremo se selecciona de un análogo pseudo-nucleótido abásico, un análogo pseudo-nucleótido abásico invertido, un nucleótido ADNL, y una C6-imina fosfato (enlazante C6 amino con fosfato en el extremo).

- 30 En otros aspectos la presente descripción revela un compuesto que tiene la estructura (M) establecido a continuación:

5' (N)x - Z 3' (cadena antisentido)

3' Z'-(N')y 5' (cadena sentido)

en donde cada uno de N y N' se selecciona de un pseudo-nucleótido y un nucleótido;

- 35 en donde cada nucleótido se selecciona de un ribonucleótido no modificado, un ribonucleótido modificado, un desoxirribonucleótido no modificado y un desoxirribonucleótido modificado;

en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

en donde Z y Z' están ausentes;

en donde $x = 18$ a 27 ;

- 40 en donde $y = 18$ a 27 ;

en donde la secuencia de (N)x es sustancialmente complementaria a la secuencia de (N')y; y en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido que tiene complementariedad sustancial a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en ARNm establecidos en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58;

- 45 en donde al menos uno de N se selecciona de un pseudo nucleótido abásico, un análogo de nucleótido sin apareamiento y un apareamiento erróneo de nucleótidos con el ARNm de un gen diana en una posición de (N)x de tal manera que (N)x comprende menos de 15 nucleótidos consecutivos complementarios al ARNm de un gen diana.

En otros aspectos la presente descripción revela un compuesto bicatenario que tiene la estructura (N) establecido a continuación:

(N) 5' (N)x - Z 3' (cadena antisentido)

3' Z'-(N')y 5' (cadena sentido)

5 en donde cada uno de N y N' es un nucleótido seleccionado a partir de un ribonucleótido no modificado, un ribonucleótido modificado, un desoxirribonucleótido no modificado y un desoxirribonucleótido modificado;

en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

en donde Z y Z' están ausentes;

10 en donde cada uno de x y y es un número entero entre 18 y 40;

en donde la secuencia de (N)x es sustancialmente complementaria a la secuencia de (N')y; y en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido que tiene complementariedad sustancial a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en ARNm establecidos en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58;

15 en donde (N)x, (N')y o (N)x y (N')y comprende nucleótidos modificados sin apareamiento de bases de tal manera que (N)x y (N')y forman menos de 15 pares de base en el compuesto bicatenario.

En otros aspectos la presente descripción revela un compuesto que tiene la estructura (O) establecido a continuación:

(O) 5' (N)x - Z 3' (cadena antisentido)

3' Z'-(N')y 5' (cadena sentido)

20 en donde cada uno de N es un nucleótido seleccionado a partir de un ribonucleótido no modificado, un ribonucleótido modificado, un desoxirribonucleótido no modificado y un desoxirribonucleótido modificado;

en donde cada uno de N' es un análogo de nucleótido seleccionado a partir de un nucleótido de azúcar de seis miembros, nucleótido de azúcar de siete miembros, unidad estructural morfolino, ácido nucleico peptídico y combinaciones de los mismos;

25 en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

en donde Z y Z' están ausentes;

en donde cada uno de x y y es un número entero entre 18 y 40;

30 en donde la secuencia de (N)x es sustancialmente complementaria a la secuencia de (N')y; y en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido que tiene complementariedad sustancial a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en ARNm establecidos en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58.

En otros aspectos la presente descripción revela un compuesto que tiene la estructura (P) establecido a continuación:

(P) 5' (N)x - Z 3' (cadena antisentido)

3' Z'-(N')y 5' (cadena sentido)

35 en donde cada uno de N y N' es un nucleótido seleccionado a partir de un ribonucleótido no modificado, un ribonucleótido modificado, un desoxirribonucleótido no modificado y un desoxirribonucleótido modificado;

en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

en donde Z y Z' están ausentes;

en donde cada uno de x y y es un número entero entre 18 y 40;

en donde uno de N o N' en una posición interna de (N)x o (N')y o uno o más de N o N' en una posición de extremo de (N)x o (N')y comprende una unidad estructural abásica o un nucleótido 2' modificado;

en donde la secuencia de (N)x es sustancialmente complementaria a la secuencia de (N')y; y en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido que tiene complementariedad sustancial a aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos consecutivos en ARNm establecidos en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-58.

5

En diversas realizaciones (N')y comprende un nucleótido modificado en la posición 15, en donde el nucleótido modificado se selecciona de un nucleótido espejo y un desoxirribonucleótido.

En ciertas realizaciones, (N')y además comprende un nucleótido modificado en la posición 2, en donde el nucleótido modificado se selecciona de un nucleótido espejo y un análogo pseudo-nucleótido abásico.

10

En diversas realizaciones la cadena antisentido (N)x comprende ribonucleótidos modificados en 2'O-Me en las posiciones numeradas impares (5' a 3'; posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19). En algunas realizaciones (N)x además comprende ribonucleótidos modificados en 2'O-Me en una o ambas posiciones 2 y 18. En otras realizaciones (N)x comprende ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19.

15

Los motivos estructurales (A)-(P) descritos anteriormente son útiles con cualquier par de oligonucleótidos (cadenas sentido y antisentido) con un gen de mamífero o no-mamífero. En algunas realizaciones el gen de mamífero es un gen humano preferiblemente seleccionado a partir de los genes proporcionados en las Tablas A1-A4, con el ARNm establecido en SEQ ID NOS:1-58. En ciertas realizaciones preferidas los oligonucleótidos sentido y antisentido del ARNip se seleccionan a partir de uno cualquiera de pares de ARNip establecidos en SEQ ID NOS:59-33,596. La Tabla A5 a continuación muestra ciertos pares de oligonucleótidos sentido y antisentido preferidos.

20

Tabla A5

GEN DIANA	SENTIDO (N')y 5'-3'	ANTISENTIDO (N)x 5'-3'
P53	GAGAAUAAUUUCACCCUJCA	UGAAGGGUGAAAUAUUCUC
CASP2	GCCAGAAUGUGGAACUCCU	AGGAGUCCACAUUCUGGC
RTP801	GUGCCAACCCUGAUGCAGCU	AGCAGCAUCAGGUUGGCAC
RTP801	UACUGUAGCAUGAAACAAA	UUUGUUUCAUGCUACAGUA
RTP801	CAGUACUGUAGCAUGAAAC	GUUUCAUGCUACAGUACUG
TP53BP2	CACCCAGAGAACAUUUAUU	AAUAAAUGUUCUCUGGGUG
CYBA	UGGGGACAGAAGUACAUGA	UCAUGUACUUCUGUCCCA
RAC1	GAGUCCUGCAUCAUUUGAA	UUCAAAUGAUGCAGGACUC
SPP1	GUGCCAUACCAGUUAACA	UGUUUAACUGGUAUGGCAC
SPP1	GCAAAAUGAAAGAGAACA	AUGUUCUCUUUCAUUUUGC
ASPP1	CGAACUCAGAGAAAUGUAA	UUACAUUUCUCUGAGUUCG
ASPP1	GGAGAAAACGUACUGAAA	UUUCAGUACGUUUUUCUCC
SOX9	CCUUCAUGAAGAUGACCGA	UCGGUCAUCUUCAUGAAGG

Para todas las estructuras (A)-(P) anteriores, en diversas realizaciones x = y y cada uno de x y y es 19, 20, 21, 22 o 23. En realizaciones preferidas, x=y=19. En realizaciones adicionales el compuesto comprende ribonucleótidos modificados en posiciones alternantes en donde cada N en los extremos 3' y 5' de (N)x se modifican en sus residuos de azúcar y el ribonucleótido intermedio no es modificado, por ejemplo, ribonucleótido en la posición 10 en una cadena de 19-mer, posición 11 en una cadena de 21 mer y posición 12 en una cadena de 23-mer.

25

En algunas realizaciones donde $x = y = 21$ o $x = y = 23$ la posición de las modificaciones en la 19 mer se ajustan para los 21 y 23 mers con la condición de que el nucleótido intermedio de la cadena antisentido es preferiblemente no modificado.

5 Para todas las estructuras (A)-(P) anteriores, en algunas realizaciones, ni (N)x ni (N')y son fosforilados en los extremos 3' y 5'. En otras realizaciones uno o ambos (N)x y (N')y son fosforilados en los extremos 3'. En incluso otra realización, uno o ambos (N)x y (N')y son fosforilados en los extremos 3' utilizando grupos fosfato no escindibles. En incluso otra realización, uno o ambos (N)x y (N')y son fosforilados en la posición extremo 2' terminal utilizando grupos fosfato escindibles o no escindibles. Estos compuestos particulares de ARNip también son romos en los extremos y son no-fosforilados en los extremos; sin embargo, experimentos comparativos han demostrado que los compuestos de ARNip fosforilado en uno o ambos de los extremos 3' tienen actividad similar *in vivo* en comparación con los compuestos no-fosforilados.

15 Para todas las estructuras (A)-(P) anteriores, en algunas realizaciones, el compuesto es de extremo romo, por ejemplo, en donde ambos Z y Z' están ausentes. En una realización alternativa, el compuesto comprende al menos una proyección en 3', en donde al menos uno de Z o Z' está presente. Z y Z' independientemente comprende uno o más nucleótidos unidos covalentemente modificados o no modificados, por ejemplo, dT o dA invertido; dT, LNA, nucleótido espejo y similares. En algunas realizaciones cada uno de Z y Z' son independientemente seleccionados a partir de dT y dTdT. ARNip en el cual Z y/o Z' está presente tiene actividad y estabilidad similar a la del ARNip en el cual Z y Z' están ausentes.

20 En ciertas realizaciones para todas las estructuras mencionadas anteriormente, el compuesto comprende uno o más ácidos nucleicos bloqueados (LNA) también definidos como ácidos nucleicos en puente o nucleótidos bicíclicos. Los ácidos nucleicos bloqueados preferidos son nucleósidos 2'-O, 4'-C-etileno (ENA) o nucleósidos 2'-O, 4'-C-metileno. Otros ejemplos de nucleótidos LNA y ENA se revelan en WO 98/39352, WO 00/47599 y WO 99/14226.

25 En ciertas realizaciones para todas las estructuras mencionadas anteriormente, el compuesto comprende uno o más monómeros alritol (nucleótidos), también definidos como 1,5 anhidro-2-desoxi-D-altrito-hexitol (véase, por ejemplo, Allart, et al., 1998. Nucleosides & Nucleotides 17:1523-1526; Herdewijn et al., 1999. Nucleosides & Nucleotides 18:1371-1376; Fisher et al., 2007, NAR 35(4):1064-1074).

30 La presente invención excluye explícitamente los compuestos en los cuales cada uno de N y/o N' es un desoxirribonucleótido (D-A, D-C, D-G, D-T). En ciertas realizaciones (N)x y (N')y puede comprender independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 desoxirribonucleótidos. En ciertas realizaciones la presente descripción revela un compuesto en donde cada uno de N es un ribonucleótido no modificado y el nucleótido del extremo 3' o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')y son desoxirribonucleótidos. En incluso otras realizaciones cada uno de N es un ribonucleótido no modificado y el nucleótido del extremo 5' o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N')y son desoxirribonucleótidos. En realizaciones adicionales el nucleótido del extremo 5' o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 nucleótidos consecutivos en el extremo 5' y 1, 2, 3, 4, 5, o 6 nucleótidos consecutivos en los extremos 3' de (N)x son desoxirribonucleótidos y cada uno de N' es un ribonucleótido no modificado. En incluso otras realizaciones (N)x comprende ribonucleótidos no modificados y 1 o 2, 3 o 4 desoxirribonucleótidos consecutivos independientemente en cada uno de los extremos 5' y 3' y 1 o 2, 3, 4, 5 o 6 desoxirribonucleótidos consecutivos en posiciones internas; y cada uno de N' es un ribonucleótido no modificado. En ciertas realizaciones el nucleótido del extremo 3' o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos consecutivos en el extremo 3' de (N')y y el nucleótido del extremo 5' o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos consecutivos en el extremo 5' de (N)x son desoxirribonucleótidos. La presente invención excluye los compuestos en los cuales cada uno de N y/o N' es un desoxirribonucleótido. En algunas realizaciones el nucleótido del extremo 5' de N o 2 o 3 consecutivo de N y 1, 2, o 3 de N' es un desoxirribonucleótido. Ciertos ejemplos de quimeras ARNip ADN/ARN activas se revelan en Publicación de la Patente de los Estados Unidos 2005/0004064, y Ui-Tei, 2008 (NAR 36(7):2136-2151).

45 A menos que se indique lo contrario, en realizaciones preferidas de las estructuras discutidas en este documento el enlace covalente entre cada N y N' consecutivo es un enlace fosfodiéster.

50 Una molécula nueva adicional revelada por la presente descripción es un oligonucleótido que comprende nucleótidos consecutivos en los cuales un primer segmento de tales nucleótidos codifica una primera molécula de ARN inhibidora, un segundo segmento de tales nucleótidos codifica una segunda molécula de ARN inhibidora, y un tercer segmento de tales nucleótidos codifican una tercera molécula de ARN inhibidora. Cada uno del primer, el segundo y el tercer segmento puede comprender una cadena de un ARN bicatenario y el primer, segundo y tercer segmentos se pueden unir juntos por un enlazante. Adicionalmente, el oligonucleótido puede comprender tres segmentos bicatenarios unidos juntos por uno o más enlazantes.

55 Por lo tanto, una molécula revelada por la presente descripción es un oligonucleótido que comprende nucleótidos consecutivos que codifican tres moléculas de ARN inhibidoras; dicho oligonucleótido puede poseer una estructura de

triple cadena, de tal manera que tres brazos de doble cadena se unen juntos por uno o más enlazantes, tales como cualquiera de los enlazantes presentados en este documento anteriormente. Esta molécula forma una estructura como "estrella", y también puede ser denominado en este documento como ARN en forma de estrella. Tales estructuras se revelan en la Publicación de la Patente PCT WO 2007/091269, transferida al cesionario de la presente invención.

5 Un enlace covalente se relaciona con un enlace internucleotídico que une un monómero de nucleótidos con un monómero nucleotídico adyacente. Un enlace covalente incluye, por ejemplo, un enlace fosfodiéster, un enlace fosforotioato, un enlace P-alcoxi, un enlace P-carboxi y similares. El enlace internucleosídico normal de ARN y ADN es un enlace 3' a 5' fosfodiéster. En ciertas realizaciones preferidas un enlace covalente es un enlace fosfodiéster. Un
10 enlace covalente abarca enlaces internucleosídicos que contienen no-fósforo, tales como los revelados en WO 2004/041924, *inter alia*. A menos que se indique lo contrario, en realizaciones preferidas de las estructuras discutidas en este documento el enlace covalente entre cada N y N' consecutivo es un enlace fosfodiéster.

15 Para todas las estructuras anteriores, en algunas realizaciones la secuencia de oligonucleótidos de (N)x es totalmente complementaria a la secuencia de oligonucleótidos de (N')y. En otras realizaciones (N)x y (N')y son sustancialmente complementarias. En ciertas realizaciones (N)x es totalmente complementaria a una secuencia diana. En otras realizaciones (N)x es sustancialmente complementaria a una secuencia diana.

En algunas realizaciones, ni (N)x ni (N')y son fosforilados en los extremos 3' y 5'. En otras realizaciones uno o ambos (N)x y (N')y son fosforilados en los extremos 3' (3' Pi). En incluso otra realización, uno o ambos (N)x y (N')y son fosforilados en los extremos 3' con grupos fosfato no escindibles. En incluso otra realización, uno o ambos (N)x y (N')y son fosforilados en la posición extremo 2' terminal utilizando grupos fosfato escindibles o no escindibles.
20 Adicionalmente, las moléculas de ácido nucleico inhibitoras de la presente invención pueden comprender una o más brechas y/o una o más muescas y/o uno o más apareamientos erróneos. Sin desear estar limitado por la teoría, brechas, muescas y apareamientos erróneos tienen la ventaja de desestabilizar parcialmente el ácido nucleico/ARNip, por lo que se puede procesar más fácilmente por la maquinaria celular endógena tal como DICER, DROSHA o RISC en sus componentes inhibidores.

25 En el contexto de la presente invención, una brecha en un ácido nucleico se refiere a la ausencia de uno o más nucleótidos internos en una cadena, mientras que una muesca en un ácido nucleico se refiere a la ausencia de un enlace internucleotídico entre dos nucleótidos adyacentes en una cadena. Cualquiera de las moléculas de la presente invención puede contener una o más brechas y/o una o más muescas.

30 Las estructuras reveladas en este documento, cuando se integran en secuencias correspondientes de ácido nucleico antisentido y sentido a cualquier gen diana, proveen el compuesto de ARNip útil en la reducción de la expresión de ese gen diana. El gen diana es un gen de mamífero o no mamífero. Los métodos de la invención comprenden administrar de forma no invasiva y por vía tópica al ojo del sujeto uno o más compuestos de ARNip que inhiben la expresión de un gen diana en el ojo del sujeto.

Síntesis de ARNip

35 Los compuestos de la presente invención se pueden sintetizar por cualquiera de los métodos que son bien conocidos en la técnica para la síntesis de oligonucleótidos ribonucleicos (o desoxirribonucleico). Tal síntesis, entre otras, se describe en Beaucage and Iyer, Tetrahedron 1992; 48:2223-2311; Beaucage and Iyer, Tetrahedron 1993; 49: 6123-6194 and Caruthers, et. al., Methods Enzymol. 1987; 154: 287-313; la síntesis de tioatos, entre otras, se describe en Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 1985; 54: 367-402, la síntesis de moléculas de ARN se describe en Sproat, in Humana Press 2005
40 edited by Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 y los respectivos procesos de acabado, entre otros, se describen en Pingoud et. al., in IRL Press 1989 editado por Oliver; Kap. 7: 183-208

Otros procedimientos de síntesis son conocidos en la técnica, por ejemplo, los procedimientos como se describe en Usman et al., J. Am. Chem. Soc., 1987, 109:7845; Scaringe et al., NAR, 1990, 18:5433; Wincott et al., NAR 1995, 23:2677-2684; y Wincott et al., Methods Mol. Bio., 1997, 74:59, y estos procedimientos pueden hacer uso de grupos de acoplamiento y protectores del ácido nucleico, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5', y fosforamiditas en el extremo 3'. Los nucleótidos modificados (por ejemplo, 2'-O-metilado) y nucleótidos no modificados se incorporan según lo deseado.
45

Los oligonucleótidos de la presente invención se pueden sintetizar por separado y unir entre sí post-sintéticamente, por ejemplo, mediante unión (Moore et al., Science 1992, 256:9923; Publicación de la Patente Internacional No. WO 93/23569; Shabarova et al., NAR 1991, 19:4247; Bellon et al., Nucleosides & Nucleotides, 1997, 16:951; Bellon et al., Bioconjugate Chem 1997, 8:204), o por hibridación después de la síntesis y/o desprotección.
50

Hay que señalar que se puede utilizar una máquina disponible comercialmente (disponible, *inter alia*, de Applied Biosystems); los oligonucleótidos se preparan de acuerdo con las secuencias reveladas en este documento. La

5 superposición de pares de fragmentos sintetizados químicamente se puede unir utilizando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,121,426). Las cadenas se sintetizan por separado y después se hibridan entre sí en el tubo. A continuación, los ARNip bicatenarios se separan de los oligonucleótidos de cadena sencilla que no fueron hibridados (por ejemplo, debido al exceso de uno de ellos) por HPLC. En relación con los fragmentos de ARNip o ARNip de la presente invención, dos o más de tales secuencias se pueden sintetizar y unir entre sí para uso en la presente invención.

10 Los compuestos de la invención también se pueden sintetizar a través de metodología de síntesis en tándem, como se describe por ejemplo, en la Publicación de la Patente de los Estados Unidos No. 2004/0019001 (McSwiggen), y en la Publicación de la Patente PCT No. WO 2007/091269 (transferida al cesionario de la presente invención) en donde ambas cadenas de ARNip se sintetizan como un único fragmento del oligonucleótido contiguo o cadena separada por un enlazante escindible que es escindible posteriormente para proveer fragmentos o cadenas del ARNip separados que hibridan y permiten la purificación del dúplex del ARNip. El enlazante pueden ser un enlazante polinucleótido o un enlazante no-nucleótido.

15 La presente invención provee además una composición farmacéutica que comprende dos o más moléculas de ARNip para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades y condiciones mencionadas en este documento, por lo que dichas dos moléculas se pueden mezclar físicamente juntos en la composición farmacéutica en cantidades que generan igual o por otro lado actividad beneficiosa, o puede ser unido covalente o no covalentemente, o unidos entre sí por un enlazante de ácido nucleico de una longitud que oscila desde 2-100, preferiblemente 2-50 o 2-30 nucleótidos.

20 Por lo tanto, las moléculas del ARNip se pueden unir covalente o no covalentemente o unir por un enlazante para formar un compuesto de ARNip en tándem. Tales compuestos de ARNip en tándem que comprenden dos secuencias de ARNip son por lo general de aproximadamente 38 a 150 nucleótidos de longitud, más preferiblemente 38 o 40-60 nucleótidos de longitud, y en consecuencia más largas si más de dos secuencias de ARNip se incluyen en la molécula de tándem. Un compuesto de tándem más largo compuesto de dos o más secuencias más largas que codifican ARNip producido mediante el procesamiento celular interno, por ejemplo, ARNhc largos, también se contempla, como es una molécula de tándem que codifica dos o más ARNhc. Tales moléculas de tándem también se consideran parte de la presente invención. Un compuesto de tándem que comprende dos o más secuencias de ARNip de la invención se contempla.

30 Adicionalmente, el ARNip revelado en este documento o cualquier molécula de ácido nucleico que comprende o que codifican tales ARNip pueden estar enlazados o unidos (de manera covalente o no covalente) a los anticuerpos (incluyendo moléculas aptámero) contra las moléculas internalizable de la superficie celular expresadas en las células diana, con el fin de lograr una mejor orientación para el tratamiento de las enfermedades reveladas en este documento. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Fas (preferiblemente un anticuerpo neutralizante) se puede combinar (de forma covalente o no covalente) con cualquiera de los compuestos de ARNip.

35 Los compuestos de la presente invención se pueden suministrar ya sea directamente o con vectores virales o no virales. Cuando se administra directamente a las secuencias generalmente se vuelven resistentes a la nucleasa. Alternativamente, las secuencias se pueden incorporar en casetes de expresión o construcciones de tal manera que la secuencia se expresa en la célula como se discute en este documento a continuación. En general, la construcción contiene la secuencia reguladora apropiada o el promotor para permitir que la secuencia que debe expresarse en la célula diana. Los vectores utilizados opcionalmente para la administración de los compuestos de la presente invención están disponibles comercialmente, y pueden ser modificados con el propósito de administrar los compuestos de la presente invención por métodos conocidos para un experto en el arte.

45 También se contempla que un oligonucleótido largo (por lo general 25-500 nucleótidos de longitud) que comprende una o más estructuras de tallo y bucle, donde las regiones madre comprenden las secuencias de los oligonucleótidos de la invención, se puede suministrar en un portador, preferiblemente un portador farmacéuticamente aceptable, y puede ser procesado intracelularmente por complejos celulares endógenos (por ejemplo, por DROSHA y DICER como se describió anteriormente) para producir uno o más oligonucleótidos bicatenarios más pequeños (ARNip) que son oligonucleótidos de la invención. Este oligonucleótido puede ser denominado una construcción de ARNhc de tándem. Se contempla que este oligonucleótido largo es un oligonucleótido monocatenario que comprende una o más estructuras del tallo y bucle, en donde cada región del tallo comprende una secuencia de ARNip sentido y antisentido correspondiente de los genes de la invención.

50 ARN de interferencia

55 Se han publicado recientemente un número de solicitudes PCT que se relacionan con el fenómeno ARNi. Estos incluyen: La Publicación PCT WO 00/44895; La publicación PCT WO 00/49035; La publicación PCT WO 00/63364; La publicación PCT WO 01/36641; La publicación PCT WO 01/36646; La publicación PCT WO 99/32619; La publicación PCT WO 00/44914; La publicación PCT WO 01/29058; y la publicación PCT WO 01/75164.

5 El ARN interferente (ARNi) se basa en la capacidad de las especies de ARNhc para entrar en un complejo de proteína citoplasmática, donde se dirige luego al ARN celular complementario y específicamente se degrada. La respuesta de interferencia de ARN cuenta con un complejo de endonucleasa que contiene un ARNip, denominado comúnmente como un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que media la escisión de ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNip. La escisión del ARN diana puede tener lugar en el medio de la región complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNip (Elbashir et al., *Genes Dev.*, 2001, 15(2):188-200). Con más detalle, ARNhc más largos son digeridos en fragmentos de ARNhc cortos (17-29 pb) (también denominados como ARN inhibidores cortos, "ARNip") por RNAsas tipo III (DICER, DROSHA, etc.; Bernstein et al., *Nature*, 2001, 409(6818):363-6; Lee et al., *Nature*, 2003, 425(6956):415-9). El complejo de proteínas RISC reconoce estos fragmentos y ARNm complementario. Todo el proceso se culminó por escisión de endonucleasa de ARNm diana (McManus & Sharp, *Nature Rev Genet*, 2002, 3(10):737-47; Paddison & Hannon, *Curr Opin Mol Ther.* 2003, 5(3):217-24). (Para información adicional sobre estos términos y mecanismos propuestos, véase, por ejemplo, Bernstein et al., *ARN* 2001, 7(11):1509-21; Nishikura, *Cell* 2001, 107(4):415-8 y la publicación PCT WO 01/36646).

15 Varios grupos han descrito el desarrollo de vectores basados en ADN capaces de generar ARNip dentro de las células. El método generalmente implica la transcripción de ARN de horquilla corta que se procesan eficientemente para formar ARNip dentro de las células (Paddison et al. *PNAS USA* 2002, 99:1443-1448; Paddison et al. *Genes & Dev* 2002, 16:948-958; Sui et al. *PNAS USA* 2002, 8:5515-5520; y Brummelkamp et al. *Science* 2002, 296:550-553). Estos informes describen métodos para generar ARNip capaces de dirigir específicamente numerosos genes expresados de forma endógena y exógena.

20 La invención se ha descrito de una manera ilustrativa, y se debe entender que la terminología usada está destinada a ser en la naturaleza de palabras de descripción más que de limitación.

Obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, se debe entender que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede practicarse de otra manera distinta a la descrita específicamente.

25 A través de esta solicitud, diversas publicaciones, incluyendo las Patentes de los Estados Unidos, están referenciadas por autor y año y las patentes por número. Las descripciones de estas publicaciones y patentes y solicitudes de patentes describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

La presente invención se ilustra en detalle a continuación con referencia a ejemplos, pero no debe interpretarse como limitada a los mismos.

30 La mención de cualquier documento en este documento no pretende ser una admisión de que tal documento es la técnica pertinente o material considerado a la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente solicitud. Cualquier declaración en cuanto a contenido o la fecha de cualquier documento se basa en la información disponible al solicitante en el momento de la presentación y no constituye una admisión en cuanto a la exactitud de esta declaración.

EJEMPLOS

35 Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica, utilizando la descripción precedente, puede utilizar la presente invención en toda su extensión. Por lo tanto, las siguientes realizaciones específicas preferidas se deben interpretar como meramente ilustrativas, y no limitativas de la invención reivindicada de ninguna manera.

40 Los protocolos estándar de biología molecular conocidos en la técnica que no se describe específicamente en este documento son generalmente seguidas esencialmente como en Sambrook et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New-York (1989, 1992), y en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988), y como en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) y como en Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley & Sons, New York (1988), y como en Watson et al., *Recombinant DNA*, Scientific American Books, New York y en Birren et al (eds) *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series*, Vols. 1-4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998) and methodology como se establece en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo como en Protocolos de PCR estándar: *A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, San Diego, CA (1990). PCR in situ en combinación con Citometría de Flujo (FACS) se puede utilizar para la detección de células que contienen secuencias específicas de ADN y ARNm (Testoni et al., *Blood* 1996, 87:3822). Métodos de la realización de RT-PCR son bien conocidos en la técnica.

Cultivo de células

Las células HeLa (American Type Culture Collection) se cultivaron como se describe en Czauderna, et al. (NAR, 2003. 31: 670-82). Los queratinocitos humanos se cultivaron a 37 °C en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene 10% de FCS. La línea celular de ratón, B16V (American Type Culture Collection), se cultivó a 37 °C en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene 10% de FCS. Las condiciones de cultivo fueron como se describe en (Methods Find Exp Clin Pharmacol. 1997, 19(4):231-9).

En cada caso, las células se sometieron a los experimentos como se describe en este documento a una densidad de aproximadamente 50,000 células por pozo y el ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con la presente invención se adicionó a una concentración de 20 nM, por lo que el ácido nucleico bicatenario se acompleja utilizando 1 µg/ml de un lípido patentado tal como se describe a continuación.

En las figuras histoquímicas/microscópicas, se adicionaron flechas para llamar la atención a las manchas de los tejidos.

Modelos de animales

Sistemas de modelo de glaucoma y de muerte de células ganglionares de la retina (RGC)

Modelo ONC en ratas

Varios modelos de animales son útiles para estudiar el efecto de terapéuticos de ARNip en el tratamiento de glaucoma. En el modelo de aplastamiento del nervio óptico en ratas el nervio óptico orbital (ON) de ratas anestesiadas se expone a través de un enfoque supraorbital, las meninges cortadas y todos los axones en el ON cortado transversalmente aplastado con fórceps durante 10 segundos, 2 mm de la lámina cribosa. La prueba de inhibidores activos de la invención (tales como ARNip) para tratar o prevenir el glaucoma se realiza, por ejemplo, en los modelos de animales descritos por Pease et al. (J. Glaucoma, 2006, 15(6):512-9. Manometric calibration and comparison of TonoLab and TonoPen tonometers in rats with experimental glaucoma and in normal mice).

El modelo de aplastamiento del nervio óptico (ONC) en ratas Wistar adultas también es un modelo aceptado para el estudio de la muerte de las células ganglionares de la retina (RGC). El inicio y la cinética de la muerte de RGC en este modelo son muy reproducibles; la apoptosis de RGC comienza el día 4-5 después de la ONC; se observó pérdida de RGC masiva (aproximadamente 50-60%) en los días 7-10 después del ONC; y 95% de la pérdida de RGC se produce por la semana 3-4 después del ONC. Este modelo permite la creación de la eficacia neuroprotectora de los fármacos de ensayo *in vivo*.

En algunos ejemplos no limitantes, los compuestos de ARNip dirigidos a los genes mostrados en las Tablas A1-A4 son probados en este modelo animal que muestran que estos compuestos de ARNip tratan y/o previenen el glaucoma y/o la muerte de RGC cuando se administra por vía tópica y no invasiva al ojo.

Modelo de IOP en ratas

La presión intraocular (IOP) es una medición de la presión del fluido dentro del ojo. Este líquido, llamado humor acuoso, se hace circular y luego se drena a través de vías de salida especializadas. Si el sistema de drenaje no funciona correctamente, como en las formas frecuentes de glaucoma, la presión dentro del ojo aumenta. En este estudio se utilizó un modelo de hipertensión ocular en ratas Brown Norway desarrolladas por el Dr. J. Morrison y colaboradores en el Casey Eye Institute (Portland, Oregon). El modelo Morrison implica la inyección de solución salina hipertónica en una vena episcleral, lo que lleva al bloqueo de las vías de salida del humor acuoso. Este procedimiento conduce al aumento gradual de la presión ocular y la muerte progresiva de las RGC. Es importante destacar que, atrofia de la retina interna, degeneración del nervio óptico, y remodelación de la cabeza del nervio óptico observada en este modelo son similares a las observadas en el glaucoma humano. Por lo tanto, el modelo de Morrison se considera el mejor modelo pre-clínico de roedor de glaucoma.

Modelo de axotomía *in vivo* en ratas

En este modelo la apoptosis de RGC es inducida por axotomía del nervio óptico (ON) en ratas adultas Sprague-Dawley. El inicio y la cinética de la muerte de RGC en este sistema de modelo son muy reproducibles y permiten el establecimiento de la eficacia neuroprotectora del compuesto de ARNip administrado de forma no invasiva *in vivo*. Utilizando este método, la evolución de la muerte de RGC sigue un curso predecible: la muerte celular comienza el día 5 y se procede a la rápida pérdida de más del 90% de estas neuronas por 2 semanas.

Formulaciones de vehículos y formulaciones de ejemplo de gotas para los ojos

La formulación acuosa de gotas para los ojos contienen opcionalmente diversos aditivos incorporados ordinariamente, tales como agentes de solución reguladora (por ejemplo, soluciones reguladoras de fosfato, soluciones reguladoras de borato, soluciones reguladoras de citrato, soluciones reguladoras de tartrato, soluciones reguladoras de acetato, aminoácidos, acetato de sodio, citrato de sodio y similares), isotónicos (por ejemplo, sacáridos tales como sorbitol, glucosa y manitol, alcoholes polihídricos tales como glicerina, glicerina concentrada, polietilenglicol y propilenglicol, sales tales como cloruro de sodio), conservantes o antisépticos (por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, p-oxibenzoato tales como p-oxibenzoato de metilo o p-oxibenzoato de etilo, alcohol bencílico, alcohol fenético, ácido sórbico o sus sales, timerosal, clorobutanol y similares), auxiliares de solubilización o agentes estabilizantes (por ejemplo, ciclodextrinas y sus derivados, polímeros solubles en agua tales como polivinil pirrolidona), surfactantes tales como polisorbato 80 (Tween 80)), modificadores del pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio y similares), agentes quelantes (por ejemplo, edetato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio condensado) y similares.

La formulación de gotas para los ojos en forma de una suspensión acuosa también puede contener agentes de suspensión (por ejemplo, polivinil pirrolidona, monoestearato de glicerina) y agentes dispersantes (por ejemplo, surfactantes tales como tiloxapol y polisorbato 80, polímeros iónicos, tales como alginato de sodio), además de los aditivos enumerados anteriormente, garantizando así que la formulación de gotas para los ojos es una suspensión acuosa adicional dispersa de manera satisfactoria y en micropartículas uniforme.

El ungüento oftálmico puede comprender una base de ungüento conocida, tal como lanolina, vaselina, plastibase, parafina líquida, polietilenglicol purificado y similares.

Formulación 1 de gotas para los ojos de ejemplo:

Formulación de compuestos de ARNip en PBS ("formulación de ARNip desnudo") se prepara por lo general disolviendo ARNip seco en PBS. La formulación comprende al menos un compuesto de ARNip por lo general presente en una cantidad que oscila desde aproximadamente 5 µg/µl a aproximadamente 60 µg/µl en volumen de la composición.

En una formulación de ejemplo no limitativo de un compuesto de ARNip en PBS se preparó de la siguiente manera: En condiciones estériles, 500 mg de ARNip seco se disolvieron en 25 ml de agua estéril doblemente destilada (DDW), para lograr una solución clara de 20 mg/ml. La solución se almacenó a -80°C hasta su uso. A continuación, la solución stock de 20 mg/ml en DDW se llevó a una concentración de trabajo de 100 µg/3 µl, en PBS, de la siguiente manera: 325 µl de la solución de 20 mg/ml de ARNip (6.5 mg) fueron precipitados por NaCl 0.15 M y EtOH, y se secaron bajo un laminar de cultivo de tejidos (condiciones estériles). 6.5 mg de ARNip seco se disolvieron en 130 µl de PBS para formar la formulación de gotas para los ojos 1.

Formulación 2 de gotas para los ojos de ejemplo:

En algunas realizaciones al menos un compuesto de ARNip se formula en tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) 1 M, pH 8.0 (disponible, por ejemplo, de Sigma (catálogo # T-1503)).

En un ejemplo no limitativo, 121.1 g de base TRIS (Sigma # T1503) se disolvieron en 700 ml de ddH₂O. El pH deseado 8 se logró con la adición de HCl concentrado. Se adicionó DDW para tener 1L de solución final. En condiciones estériles, 42.426 mg de polvo del compuesto de ARNip se disolvieron en 2.1 ml de agua estéril doblemente destilada, para lograr una solución stock clara de 20 mg/ml (1.5 mM). La solución stock se almacenó a -80 °C hasta su uso. En condiciones estériles, las cantidades correspondientes de Stock de ARNip se liofilizaron y resuspendieron en cantidad de TRIS 1 M pH 8

Formulación 3 de gotas para los ojos de ejemplo:

La concentración de los agentes potenciadores de la viscosidad para ser utilizados está por lo general dentro del intervalo de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 5.0 % (p/v), y más deseablemente, desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 3.0 % (p/v). Una composición oftálmica preferida comprende desde aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.075 % (p/v) de un ingrediente activo; desde aproximadamente 0.15 a aproximadamente 2.5 % (p/v) de estearato de polioxil 40; desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 3.0 % (p/v) de un agente espesante de celulosa seleccionado a partir de 25 hidroxipropil metilcelulosa o hidroxietilcelulosa; y desde aproximadamente 0.0001 % a aproximadamente 0.01 % (p/v) de un anti-oxidante seleccionado a partir de hidroxitolueno butilado o tiosulfato de sodio.

La combinación de los agentes surfactantes tales como estearato de polioxil 40 o polioxietileno cetil éter o éter de polioxietileno octilfenilo con ARNip se obtiene una preparación de gotas para los ojos que causa menos irritación a los ojos, proporcionando una mejor distribución en los ojos y que tiene una mayor estabilidad. La inclusión de un anti-

oxidante y un agente espesante de celulosa mejora aún más la distribución del agente terapéutico activo (i.e. ARNip) en los ojos y la estabilidad.

5 También se pueden adicionar otros excipientes, tal como por ejemplo, un agente isotónico, solución reguladora, conservante, y/o agente controlador del pH. Agua purificada estéril en cantidades apropiadas está presente para obtener la deseada preparación de gotas para los ojos.

El pH de la composición oftálmica está dentro del intervalo, que se utiliza normalmente para preparaciones oftálmicas, como se conoce en la técnica, pero es deseable dentro del intervalo de 5 a 8. La formulación comprende además al menos un compuesto de ARNip por lo general presente en una cantidad que oscila desde aproximadamente 6.6 µg/µl a aproximadamente 50 µg/µl en volumen de la composición.

10 Formulación 4 de gotas para los ojos de ejemplo:

En la administración tópica de fármacos para la lente, se considera que es importante la retención del fármaco en la superficie del ojo. Sin desear estar unido a la teoría, el aumento de la retención en la superficie ocular conduce a aumento de la absorción ocular de un fármaco a través de la córnea en el humor acuoso y, posteriormente, la lente.

15 En algunas realizaciones se prefiere una suspensión tópica. Los ejemplos no limitantes de suspensiones tópicas incluyen:

(1) hidroxipropil metilcelulosa (HPMC, 0.5% p/v), (2) goma xantana (0.5% p/v), (3) goma de gelano (0.5% p/v), (4) carbopol (0.25% p/v), y (5) carbopol (0.25% p/v) - hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) (0.25% p/v). Las medidas de viscosidad se realizan con un viscosímetro.

20 La formulación comprende además al menos un compuesto de ARNip por lo general presente en una cantidad que oscila desde aproximadamente 5 µg/µl a aproximadamente 60 µg/µl en volumen de la composición.

Formulación 5 de gotas para los ojos de ejemplo:

25 En las composiciones oftálmicas, un agente quelante se usa opcionalmente para aumentar la eficacia conservante. Los agentes quelantes adecuados son los conocidos en la técnica, y, aunque no se pretende que sean limitativos, sales edetato (EDTA) como edetato disódico, edetato de calcio disódico, edetato sódico, edetato trisódico, y edetato de dipotasio son ejemplos de agentes quelantes útiles. Se entiende que el EDTA se relaciona con una especie que tiene cuatro grupos funcionales de ácido carboxílico, y que estos grupos de ácido carboxílico pueden estar protonados o desprotonados (i.e., en la forma de sal) dependiendo del pH de la composición que se encuentra.

30 Las soluciones reguladoras se utilizan normalmente para ajustar el pH a un intervalo deseable para uso oftálmico. Generalmente, se desea un pH de alrededor de 5-8, sin embargo, puede ser necesario ajustarlo debido a consideraciones tales como la estabilidad o solubilidad del agente terapéuticamente activo u otros excipientes.

35 Otro excipiente utilizado comúnmente en composiciones oftálmicas es un potenciador de la viscosidad, o un agente espesante. Los agentes espesantes se utilizan por una variedad de razones, que van desde mejorar la forma de la formulación para la administración conveniente para mejorar el contacto con el ojo para mejorar la biodisponibilidad. El agente potenciador de la viscosidad comprende un polímero que contiene grupos hidrófilos tales como monosacáridos, polisacáridos, grupos de óxido de etileno, grupos hidroxilo, ácidos carboxílicos u otros grupos funcionales cargados. Aunque no se pretende limitar algunos ejemplos de agentes potenciadores de la viscosidad útiles son carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilmetilcelulosa, povidona, alcohol polivinílico, y polietilenglicol.

La formulación comprende además al menos un compuesto de ARNip por lo general presente en una cantidad que oscila desde aproximadamente 5 µg/µl a aproximadamente 60 µg/µl en volumen de la composición.

40 Formulación 6 de gotas para los ojos de ejemplo ("Formulación A"):

Formulación "A": Preparar 2 soluciones, A y B.

45 Preparación de la solución A: solución al 4% de metilcelulosa en agua. 0.4 g de metilcelulosa 25 (ScienceLab.com, Cat # SLM2050) disuelto en el volumen final de 10 ml de agua apirógena para inyección (WFI) en tubo estéril de 50 ml (Norbook, Cat # 7082-51). Poner un pequeño agitador estéril dentro y cerrar la tapa. Tener en baño de agua hirviendo mientras se agita durante al menos 5 minutos hasta que la metilcelulosa forma una solución opalescente.

Preparación de la Solución B: 2% de glicerol; 0.02% (v/v) de solución de EDTA. Adicionar 333.3 l de 60% de glicerol (Sigma, Cat # G6279) y 2 µl de EDTA 0.5 M, pH = 8 (Sigma, Cat # E9884) (final - 100µM) a 9.665 ml de WFI (Norbook, Cat # 7082-51). Volumen final - 10 mL.

- 5 Preparar 2X (con respecto a la concentración de trabajo) solución de ARNip en la Solución B. Observar: si el volumen de ARNip stock es sustancialmente alto, el volumen final de la solución B es mejor mantenerlo por debajo de 10 ml para permitir el ajuste del volumen más tarde en una solución de ARNip 2X.

Preparación de la solución de trabajo de ARNip:

Una solución fresca en la mano ~ hasta 40-50°C (todavía líquida) y mezclar el volumen deseado con un volumen igual de solución 2X de ARNip en la solución B.

- 10 La formulación final de ARNip contiene 2% de metilcelulosa, 1% de glicerol y 0.01% (v/v) (50µm) de EDTA en WFI. El pH final debe ser ~7.4 y osmolaridad - similar a la película lagrimal humana. La concentración de ARNip en la formulación final es 33.3 mg/ml.

Se debe preparar una vez a la semana y se divide en alícuotas en las porciones para el uso diario. Las alícuotas se mantienen a 4°C. Antes de la aplicación, la dosis se calienta durante 20-30 minutos a temperatura ambiente.

- 15 La concentración final de la metilcelulosa es de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 3% p/v aproximadamente 0.1% a aproximadamente 2% p/v, aproximadamente 0.1% - 1.5% p/v de metilcelulosa, preferiblemente aproximadamente 2% p/v. La concentración final de glicerol es aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5% v/v, aproximadamente 0.5% a aproximadamente 2%, preferiblemente aproximadamente 1% v/v. La concentración final de EDTA es aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.05%, aproximadamente 0.005% a aproximadamente 0.01%, preferiblemente aproximadamente 0.01% p/v.
- 20

Formulación 7 de gotas para los ojos de ejemplo:

- 25 En algunas realizaciones el ARNip se formula en una formulación de gotas para los ojos lubricante disponible comercialmente. Un ejemplo no limitante de formulación de gotas para los ojos lubricantes disponibles comercialmente es Systane® disponible de Alcon Inc. Tales formulaciones de gotas para los ojos lubricantes disponibles comercialmente comprenden por lo general polietilenglicol y/o propilenglicol, un agente antiséptico y/o antiviral, tal como ácido bórico, un agente gelificante tal como hidroxipropil guar, cloruro de potasio y/o cloruro de sodio y/o cloruro de magnesio y/o cloruro de calcio y/o cloruro de zinc, conservantes tales como Polyquad® y agua purificada. En condiciones estériles, 300 mg de polvo de ARNip se disuelven en 15 ml de agua estéril doblemente destilada, para lograr una solución clara de 20 mg/ml. La solución se almacenó a (-) 80°C hasta su uso. La solución stock de 20 mg/ml en agua doblemente destilada se lleva entonces a una concentración de trabajo de 100 µg/3 µl, en la formulación, de la siguiente manera:
- 30

Para obtener una cantidad final formulada de 1.7 mg de ARNip: 85 µl de 20 mg/ml de ARNip (1.7 mg), se precipita por NaCl 0.15 M y EtOH, se secó bajo el laminar de cultivo de tejidos (condiciones estériles).

Para lograr una solución de ARNip de 33.3 mg/ml, se disuelven 1.7 mg de ARNip seco en 51 µl de Systane®.

Compuestos de ARNip inducen modificación genética (KD) de los genes diana

- 35 Ejemplo 1: Ensayo *in vitro* de los compuestos de ARNip

Aproximadamente $1.5-2 \times 10^5$ células ensayadas (células HeLa y/o células 293T para ARNip dirigidos a genes humanos y NRK52 (células del túbulo proximal del riñón de rata normal) y/o células NMuMG (línea celular epitelial mamaria de ratón) genes humanos para ARNip dirigido al gen de rata/ratón) se sembraron por pozo en placas de 6 pozos (70-80% de confluencia).

- 40 Aproximadamente 24 horas más tarde, las células fueron transfectadas con compuestos de ARNip utilizando el reactivo Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen) a concentraciones finales de 5 nM o 20 nM. Las células se incubaron a 37°C en una incubadora de CO₂ durante 72 h.

- 45 Como control positivo para la transfección, se utilizaron compuestos de ARNip marcados con (PTEN)-Cy3 homólogo de tensina y fosfatasa. Se ensayaron varios compuestos de ARNip con extremo 3' o 5' modificados químicamente que tienen ribonucleótidos modificados y no modificados alternantes (modificados en la posición 2' del residuo de azúcar tanto en las cadenas antisentido como sentido, en donde la unidad estructural en la posición 2' es metoxi) y en donde los ribonucleótidos en los extremos 3' y 5' de la cadena antisentido se modifican en sus residuos de azúcar, y los ribonucleótidos en los extremos 3' y 5' de la cadena sentido son no modificados en sus residuos de azúcar. Otro

5 compuesto de ARNip comprendía una estructura de extremo romo que tiene un antisentido con un patrón alterno de unidades estructurales metoxi y una cadena sentido con tres ribonucleótidos unidos por dos puentes 2'5' en el extremo 3'; y se utilizó otro compuesto de ARNip que comprende cadenas antisentido y sentido que tienen tres ribonucleótidos unidos por puentes 2'5' en el extremo 3'. Algunos de los compuestos ensayados comprendían una estructura de extremo romo que tiene un antisentido con un patrón alterno de unidades estructurales metoxi y una cadena sentido con uno o dos L-nucleótidos en las posiciones penúltima 3' o el extremo 3'.

10 Los compuestos de ARNip GFP se utilizaron como control negativo para la actividad de ARNip. En 72h después de la transfección las células se recogieron y se extrajo el ARN de las células. La eficacia de transfección se probó por microscopía fluorescente. El porcentaje de inhibición de la expresión del gen utilizando estructuras específicas de ARNip preferidas se determinó mediante el análisis de qPCR de un gen diana en células que expresan el gen endógeno.

En general, el ARNip que tiene secuencias específicas que fueron seleccionadas para las pruebas *in vitro* eran específicas para humanos y una segunda especie, tal como genes de primate no humano, rata o conejo. Se obtienen resultados similares utilizando ARNip que tiene estas secuencias de ARN y modificado como se describe en este documento.

15 ARNip dirigidos a genes relacionados con la apoptosis y la neuroprotección se ensayaron mediante un procedimiento similar y se encontraron activos y capaz de inducir la modificación genética de sus correspondientes genes diana.

ARNip preparado para la administración no invasiva y administrado por medio de gotas para los ojos se administra al tejido diana de la retina *in vivo*

20 Ejemplo 2: Distribución de ARNip marcado con Cy3 en el tejido óptico de murino (ARNip formulada en PBS) como se controla por microscopía de fluorescencia y microscopía confocal. El presente estudio demostró la administración de ARNip *in vivo* a la glándula lagrimal y las estructuras oculares a través de una ruta ocular tópica.

Abreviaturas: E.D. = gotas para los ojos; ISH = hibridación in situ

25 El objetivo de este estudio (con fines ilustrativos) fue probar la administración de ARNip marcado con DDIT4-Cy3 (compuesto de ARNip dirigido al gen RTP801) a la glándula lagrimal por vía tópica ocular no invasiva. La ruta ocular tópica ha sido evaluada para la administración de ARNip en la glándula lagrimal, la cámara anterior del ojo, la retina y el nervio óptico.

Materiales y métodos

Tabla C1: Animales

Especie/cepa:	Ratones/ICR, machos
Edad:	6-10 semanas
Rango del peso corporal:	27-32 gr
Tamaño del grupo:	2
Número total de animales:	26

30 DDIT4-Cy3 ARNip (ARNip contra ratón RTP801) formulado como 20m-/ml de solución stock en PBS y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Procedimiento experimental

El estudio incluyó 6 grupos experimentales como se describe en la Tabla C2 a continuación: Los ratones se trataron con DDIT4-Cy3 ARNip solo, de la siguiente manera:

35 Grupo V (A y B): régimen de dosis: 50 µg/ratón/3 µl/ojo, ruta de administración: Gotas para los ojos (E.D.), ojo derecho;

Grupo Am-V-A, Am3-VIII, Am3-IX: régimen de dosis: 50 µg/ratón/3 µl/ojo, ruta de administración: Gotas para los ojos (E.D.), los dos ojos;

Grupo VI-A: régimen de dosis: 20 µg/ratón/3 µl/ojo, ruta de administración: Gotas para los ojos (E.D.), ojo derecho;

Grupo VII, Am-VII: control no tratado.

Tabla C2. Diseño del estudio

Grupo	Tipo ARNip	Dosis µg/ratón	volumen inyectado (µl)	Ruta	Momento (h)	Tamaño del grupo
V-A	DDIT4-Cy3	50.00 Ojo derecho	3.00	E.D.	1	2
Am-V-A	DDIT4-Cy3	50.00 por ojo/Ambos Ojos	3.00	E.D.	1	2
V-B	DDIT4-Cy3	50.00 Ojo derecho	3.00	E.D.	4	2
VI-A	DDIT4-Cy3	20.00 Ojo derecho	3.00	E.D.	1	2
VII	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno		5
Am-VII	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno		1
AM3-VIII	DDIT4-Cy3	50.00 por ojo/Ambos Ojos	3.00	E.D.	4	2
AM3-IX	DDIT4-Cy3	50.00 por ojo/Ambos Ojos	3.00	E.D.	24	2

- 5 Las dosis de ARNip se prepararon en condiciones estériles. Alícuotas de ARNip se descongelaron durante al menos 30 min a temperatura ambiente antes de la administración. Cantidad total por alícuota (por cada ratón) incluyó un 20% adicional del volumen calculado. La dosis de ARNip designada fue administrada en volumen por ojo de 3 µl (grupos experimentales V-VI).
- 10 Anestesia: Los ratones fueron anestesiados con mezcla de ketamina/xilazina de la siguiente manera: 0.85 ml de ketamina + 0.15 ml de Xilazina + 0.9 ml de solución salina, 0.1 ml de solución de mezcla/20 gr de peso corporal (PC).
- Administración de gotas para los ojos (E.D.): Un volumen de 3 µl de la muestra se dejó caer lentamente en el ojo tratado (superficie de la córnea), utilizando una punta de pipeta roma; los animales fueron colocados en un ambiente cálido para prevenir la hipotermia inducida por la anestesia, y se devolvieron a las jaulas después de recuperar la conciencia.
- 15 Eutanasia programada: Después del tratamiento, los ratones de todos los grupos fueron sacrificados de acuerdo con el diseño del estudio (Tabla C2, momento de terminación).
- La etapa de terminación se realizó por punción cardíaca y la recolección de sangre; el suero/plasma recolectado se almacenó (-20°C) para su posterior análisis de detección de ARNip en sangre.
- 20 Recolección de tejidos: ojo izquierdo y derecho, incluyendo nervio óptico, glándulas lagrimales (izquierda y derecha) se cortaron a partir de todos los animales, cerebro (partes frontal y media del cerebro, las secciones orientadas frontales) de los animales de los grupos de izquierda y, V-A uno del grupo VII, Am3-VIII, Am3-IX fueron extirpados, incrustados en el compuesto la temperatura óptima de corte (OCT) y seccionada con un criostato en cortes de 8 µm que se colocaron en portaobjetos de microscopio (Superfrost/Plus™). Las secciones fueron fijadas en 95% de EtOH durante 7 minutos y luego se contratiñeron con DAPI (1 µg/ml), se incubaron durante 1 minuto en EtOH absoluto, se incubaron durante 5 minutos en xileno, se secaron y montaron al aire.
- 25 Evaluación de Tejidos: La administración de ARNip se evaluó mediante microscopía de luz y la imagen digital. Un fragmento de tejido se consideró positivo (i.e., incorporación intracelular de Cy3 DDIT4 ARNip exitosa) sólo cuando el examen histológico (microscópico) mostró una señal de fluorescencia clara dentro de las células específicas o estructuras tales como acinar solo o en combinación con células ductales de la glándula lacrimal. Los antecedentes de tinción de DAPI ayudaron en la identificación de la estructura del tejido: en el caso de las estructuras de cámara anterior del ojo tales como córnea, ángulo, cuerpo ciliar o cámara posterior del ojo tales como retina (células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), células ganglionares de la retina (RGC)). La administración se consideró positiva si el examen histológico mostraría que todos los animales dentro de un grupo experimental mostraron la misma señal de fluorescencia dentro del tipo/tejido de célula investigado. (i.e., momentos o ruta de administración).
- 30

Resultados y Discusión

Todas las criosecciones se analizaron con microscopía de luz (campo claro, BF) y la microscopía confocal de fluorescencia. La señal fluorescente fue visualizada en los siguientes tejidos:

5 Retina por administración E.D. (células del epitelio pigmentario de la retina, células ganglionares de la retina). Las figuras 1A-1B: Imágenes representativas de DDIT4 ARNip marcado con Cy3 incorporado en la retina de ratones.

10 La figura 1A: microscopía fluorescente (panel superior, x40 aumentos) de la retina 1 hora después de la administración E.D. La flecha derecha identifica células ganglionares de la retina (RGC) teñidas con Cy3, la flecha izquierda identifica las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) teñidas con Cy3. La microscopía confocal (panel inferior, x60 aumentos) de la capa de células ganglionares de la retina. El conjunto inferior de 9 vistas muestra tejido marcado con Cy3 (izquierda), claro presentado (BF, centro) y una combinación de los dos (M, derecha). Las flechas apuntan a la RGC marcadas.

Las figuras en 1B: Microscopía confocal de la retina 4 horas después de la administración E.D. (x40 superior, inferior x60). La tinción con Cy3 de la RGC es prominente.

15 Administración con gotas para los ojos de ARNip a las glándulas lagrimales (células acinares, células ductales) Las figuras 2A-2D: Imágenes representativas de DDIT4 ARNip marcado con Cy3 incorporado en células ductales y acinares de la glándula lagrimal murino.

La figura 2A: Microscopía fluorescente de la glándula lagrimal 1 hora después de la administración E.D. (M = tinción de DAPI/Cy3 fusionada). La flecha central apunta a las células acinares, la flecha de la derecha indica las células epiteliales ductales, la flecha de la izquierda gris apunta hacia el conducto lagrimal (x60 aumentos)

20 La figura 2B: Microscopía confocal de la glándula lagrimal 1 hora después de la administración E.D (x40 superior y panel inferior x60). La flecha en la imagen M fusionada está señalando al conducto lagrimal.

La figura 2C: Microscopía confocal de la glándula lagrimal después de 1 hora de la administración E.D (x40). Las flechas apuntan a las células acinares

La figura 2D: Microscopía confocal de la glándula lagrimal 4 horas después de E.D. (x60).

25 Las figuras 3A-3C muestran la evolución de la acumulación de Cy3-ARNip en corioide de ratas después de la administración de gotas para los ojos, después de 1 y 4 horas después de la administración. Los coroides, la capa nuclear externa, RPE y la capa del segmento externo de las células fotorreceptoras muestran tinción con Cy3.

La figura 4 muestra la administración de Cy3-ARNip al cuerpo ciliar final de la red trabecular una hora después de la administración por gotas para los ojos.

30 Diferentes ARNip modificados químicamente (motivos estructurales) se ensayaron con ARNip marcado con Cy3 de ratón. Se observó la distribución tisular similar a la mostrada anteriormente para todas las estructuras ensayadas: La estructura B que tiene ribonucleótidos naturales alternantes y ribonucleótidos 2'O-Me modificado en el azúcar en ambas cadenas; La estructura I que tiene ribonucleótidos naturales alternantes y ribonucleótidos 2'O-Me modificado en el azúcar en la cadena antisentido y tres ribonucleótidos unidos por enlaces 2'5' internucleotídicos en el extremo 3' de la cadena sentido; y una estructura que tiene tres ribonucleótidos unidos por enlaces 2'5' internucleotídicos en el extremo 3' de cada una de las cadenas antisentido y sentido.

Ejemplo 3 (a título ilustrativo): Análisis de la ruta de administración tópica ocular de ARNip formulado en ratas (ARNip formulado en PBS o en metilcelulosa al 2% ("Formulación A"))

40 En el presente estudio la administración ocular del DDIT4-Cy3 ARNip formulado ya sea en PBS o en la Formulación A y aplicado por gotas para los ojos se estudió en ratas.

Tabla C3: Diseño del estudio

Grupo	ARNip	Dosis µg/ojo	Ruta de Adm. (Bilateral)	Volumen de Adm. (µl)	Formulación	Tiempo de terminación	Tamaño de grupo
I	DDIT4_1-Cy3	100.00	E.D.	3.00	Formulado	30 min.	1

Ia	DDIT4_1-Cy3	100.00	E.D.	3.00	PBS	30 min.	1
II	DDIT4_1-Cy3	100.00	E.D.	3.00	Formulado	1 hora	1
Ila	DDIT4_1-Cy3	100.00	E.D.	3.00	PBS	1 hora	1
III	DDIT4_1-Cy3	100.00	E.D.	3.00	Formulado	3 horas	1
IIIa	DDIT4_1-Cy3	100.00	E.D.	3.00	PBS	3 horas	1
IV	DDIT4_1-Cy3	100.00	E.D.	3.00	Formulado	6 horas	1
Iva	DDIT4_1-Cy3	100.00	E.D.	3.00	PBS	6 horas	1
V	DDIT4_1-Cy3	100.00	E.D.	3.00	Formulado	24 horas	1
Va	DDIT4_1-Cy3	100.00	E.D.	3.00	PBS	24 horas	1
VI	N/A	N/A	E.D.	3.00	vehículo	1 hora	1
VII	control intacto N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1

Diseño experimental:

- 1) Grupo I, II, III, IV, V: régimen de dosis: ARNip formulado en la Formulación A; 100 µg/rata/3µl/ojo, ruta de administración: Gotas para los ojos Bilateral (E.D.);
- 5 2) Grupo Ia, Ila, IIIa, Iva, Va: régimen de dosis: ARNip formulado en PBS; 100 µg/rata/3 µl/ojo, ruta de administración: Gotas para los ojos Bilateral (E.D.);
- 3) Grupo VI: grupo control tratado con el vehículo formulación de la Formulación A (sin ARNip); 100 µg/rata/3 µl/ojo, ruta de administración: Gotas para los ojos Bilateral (E.D.);
- 4) Grupo VII: Control intacto
- 10 Las dosis de ARNip se prepararon en condiciones estériles. Alícuotas de ARNip se descongelaron durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente antes de la administración. La cantidad total por alícuota (por cada ratón) incluyó un 20% adicional del volumen calculado. La dosis de ARNip designada fue administrada en el volumen de 3 µl por ojo.

Anestesia: Las ratas de los grupos I a VII se anestesiaron con Equithesine (4 ml/kg)

- 15 Etapa de terminación: En la terminación del estudio, los animales fueron profundamente anestesiados por Equithesine (4 ml/kg). A partir de entonces, las ratas se perfundieron por vía intracortical con formalina estandarizada neutra al 10% fresca, utilizando régimen estándar de bomba peristáltica.

- 20 Recolección del tejido: ojo derecho e izquierdo, incluyendo el nervio óptico de todos los animales fueron enucleados, perforado y después se fijaron en 10% de formalina estandarizada neutra durante 1 hora adicional en la temperatura ambiente con rotación lenta, crioprotectados paso a paso por gradiente de sacarosa a 4°C durante la noche, después de la crioprotección en el compuesto de temperatura de corte óptima (OCT) a 4°C, durante la noche con rotación, incrustado en el compuesto OCT y se seccionaron con un criostato en cortes de 12 µm que se colocaron en portaobjetos de microscopio (Superfrost/Plus). Las secciones se contratiñeron con DAPI (1 µg/ml) y se montaron.

La administración de ARNip se evaluó mediante microscopía de luz y la imagen digital.

- 25 Un fragmento del tejido se considera positivo (i.e., una transferencia de Cy3 DDIT4_1 ARNip exitosa en la administración en la cámara anterior del ojo, la retina y el nervio óptico se consideró positiva) si el examen histológico mostraría que todos los animales dentro de un grupo experimental mostraron la misma señal fluorescente dentro del tipo específico de tejido/célula.

5 Resultados: Todas las criosecciones se analizaron con microscopía de luz (campo claro, BF) y microscopía confocal de fluorescencia. La señal fluorescente se visualizó en la retina las células del epitelio pigmentario de la retina y las células ganglionares de la retina. En particular, los compuestos formulados en PBS alcanzaron el máximo de distribución en los tejidos oculares 3 horas después de la administración, y se desbloquearon de dichos tejidos en el momento de 6 horas. Sin embargo, los compuestos formulados en la Formulación A se distribuyeron al máximo en los tejidos oculares a las 24 horas después de la administración.

Ejemplo 4: Distribución ocular de ARNip (formulado en PBS) en el mono Cynomolgus (a título ilustrativo)

Tabla C4: Diseño experimental

Grupo	Número de animales	Compuesto	Volumen de dosis	Terminación después de la administración	Tratamiento en la terminación
					Ojos
1	101	Cy3-DDIT4_1	500ug/20ul/ojo	1 hora	4% de PFA
2	251	DDIT4_1	500ug/20ul/ojo	1 hora	Congelados rápidamente en nitrógeno líquido
3	351	Cy3-DDIT4_1	500ug/20ul/ojo	5 horas	4% de PFA
4	401	DDIT4_1	500ug/20ul/ojo	5 horas	Congelados rápidamente en nitrógeno líquido
ED= Gotas para los ojos, por vía tópica					

10 El objetivo de este estudio fue investigar la distribución tisular de ARNip formulado en PBS después de la administración ocular tópica sola a la superficie del ojo del mono Cynomolgus *Macaca fascicularis*. Todos los tejidos se congelaron rápidamente muestras por triplicado de ~ 1 a ~ 2 g o en su conjunto, según corresponda.

Purificación de ARN

15 Las muestras congeladas se muelen a un polvo fino en nitrógeno líquido. Una pequeña cantidad de tejido en polvo se utiliza para la extracción de ARN. El resto de los tejidos se almacenaron a - 80°C para su posterior uso. El PolyA ARN fue extraído de cada muestra con el Kit de purificación de ARNm MicroPoly (A) Purist (# 1919) y se procesa de acuerdo con el protocolo del fabricante para el aislamiento de poli(A)ARN a partir de tejidos o células. Los rendimientos finales y las características espectrales del ARN se resumen a continuación en la Tabla C5.

Tabla C5: polyA ARN a partir de mono

Tejido	260/280	260/230	Concentración µg/µl	Rendimiento µg
Ganglio linfático	1.58	0.92	0.104	1.55
Bazo	1.74	1.27	0.175	2.62

20 Preparaciones de polyA ARN un mg a partir del bazo y 0.7 mg a partir de los ganglios linfáticos se utilizaron para la síntesis de ADNc utilizando el cebador aleatorio. El gen Casp2 se amplificó con éxito de ambas preparaciones de ADNc.

Los resultados se resumen a continuación en la Tabla C6.

Tabla C6: Resultados

Tratamiento	Tejido analizado	Terminación	Av	SD	Tamaño del grupo
ED(REDD14)	Retina Neuronal	1h	0.2	[+/-0]	1 (2 ojos)
ED(REDD14)	Retina Neuronal	5h	0.05	[+/- 0.03]	1 (2 ojos)
ED(REDD14)	RPE	1h	0.62	[+/-0.05]	1 (2 ojos)
ED(REDD14)	RPE	5h	0.1	[+/- 0.07]	1 (2 ojos)
ED(REDD14)	nervio óptico	1h	8.9	[+/-2.6]	1 (2 ojos)
ED(REDD14):	nervio óptico	5h	3	[+/-1.9]	1 (2 ojos)

Conclusión: ARNip formulado en PBS después de la administración ocular tópica única a la superficie del ojo del mono *Cynomolgus Macaca fascicularis* llega a la retina neuronal y se puede medir por el método qPCR S&L.

5 Ejemplo 5: Administración de ARNip (formulado en TRIS) para dirigir tejido de la retina en ratones

Examen de administración tópica de moléculas de ARNip marcadas con diferentes fluoróforos.

La administración tópica a los ratones de 20 ug de diferentes ARNip marcados con fluorescencia formulados en tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) 1 M, pH 8, 1 hr después de la administración.

ARNip ensayados:

10 Cy3-QM5; Cy3-DDIT4; Cy3.5-DDIT4; DDIT4_1 Dy-649/C6; FITC-CNL_1; 3'Cy3-CNL_1; Cy3-Casp2_4 ADN-L; Cy3- AS-Casp2_4; TGASEII-FAM; HNOEL-FAM. (QM5 es un ARNip de rata/ratón que se dirige a p53; CNL es ARNip desordenado control)

Los ejemplos de compuestos de Casp2 ARNip modificados químicamente fueron los siguientes:

15 1. (ARNip comparativo). Sentido: GCCAGAAUGUGGAACUC2pC2pU, 17 y 18 son Antisentido en puente 2'-5': mAGmGAmGUmUCmCAmCAmUUmCUmGGmC-cy3

2. (ARNip comparativo). Sentido: GCCAGAAUGUGGAACUC;LdC;LdT 18 y 19 son ADN-L Antisentido: mAGmGAmGUmUCmCAmCAmUUmCUmGGmC-cy3

3. Sentido: GCCAGAAUGUGGAACUC;LdC;U18 es una unidad estructural ADN-L Antisentido: mAGmGAmGUmUCmCAmCAmUUmCUmGGmC-cy3

20 LdC, LdT se refiere a nucleótidos de ADN-L, mA, mC, Mg, Mu se refieren a ribonucleótidos 2'O-metoxi.

Formulado (compuesto formulado): ARNip en Tris 1 M pH 8.0 de los siguientes ARNip: QM5-Cy3#1, QM5- Cy3#10, DDIT4_1-Cy3, DDIT4_1Cy3.5, Redd14(DDIT4_1) Dy-649/C6, FITC-CNL_1RD/CNL_1FD, scambled3'Cy3CNL 1, Cy3-AS-CASP2_4-Struc-ADN-L-s(2 residuos at 3' de sentido)-plus-alt AS, Cy3AS- CASP2_4- Struc2-5-s(2 residuos en 3' de sentido)-más-alt AS, TGASEII-FAM, HNOEL-FAM.

25 Tabla C7: Formulaciones

ARNip	IDO	Final	Stock de ARNip	Preparación
QM5-Cy3#1	116937	40 µg	20mg/ml	2µl de stock se liofilizaron y resuspendieron en 7µl de Tris 1M pH8
QM5-Cy3#10	116938	40 µg	20mg/ml	2µl de stock se liofilizaron y

ES 2 563 984 T3

				resuspendieron en 7µl de Tris 1M pH8
DDIT4_1-Cy3	117821	40 µg	20mg/ml	2µl de stock se liofilizaron y resuspendieron en 7µl de Tris 1M pH8
DDIT4_1-Cy3.5	112206	40 µg	20mg/ml	2µl de stock se liofilizaron y resuspendieron en 7µl de Tris 1M pH8
Redd14(DDIT4_1) Dy-649/C6	114029	40 µg	20mg/ml	2µl de stock se liofilizaron y resuspendieron en 7µl de Tris 1M pH8
FITC-CNL_1RD/CNL_1 FD	110357	40 µg	20mg/ml	2µl de stock se liofilizaron y resuspendieron en 7µl de Tris 1M pH8
scrambled3'Cy3-CNL_1	110910	40 µg	20mg/ml	2µl de stock se liofilizaron y resuspendieron en 7µl de Tris 1M pH8
Cy3-AS-CASP2_4-Struc-L-ADN-s(2 residuos en 3' de sentido)-más-alt AS	122994	40 µg	20mg/ml	2µl de stock se liofilizaron y resuspendieron en 7µl de Tris 1M pH8
Cy3-AS-CASP2_4-Struc2-5-s(2 residuos at 3' de sentido)-más-alt AS	122979	40 µg	20mg/ml	2µl de stock se liofilizaron y resuspendieron en 7µl de Tris 1M pH8
TGASEII-FAM	75755	11.62 µg	0.75µg/µl	15.5 µl de stock se liofilizaron y resuspendieron en 2µl de Tris 1M pH8
HNOEL-FAM	75757	4.48 µg	1.4µg/µl	3.2 µl de stock se liofilizaron y resuspendieron en 0.784 µl de Tris 1M pH8
DDIT4_1-Cy3	117821	40 µg	20mg/ml	2µl de stock+0.7ul PBSx10+4.3 µl de DDW

Descripción del material de ensayo: En condiciones estériles, la cantidad correspondiente de Stock de ARNip se liofilizaron y se re-suspendieron en cantidad correspondiente de Tris 1M de pH 8 (véase la Tabla C7).

Cantidad suministrada: Un vial para cada ARNip probado (sintetizado por Biospring, AG)

- 5 Condiciones de almacenamiento: congelado hasta su uso. Antes de su uso, las muestras se descongelaron y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Control de artículo(s)

Control Positivo - DDIT4_1-Cy3 en PBS, Lote #: 117821

- 10 Descripción del material de ensayo: En condiciones estériles, 42.426 mg de polvo de DDIT4_1-Cy3 (BioSpring) se disolvieron en 2.1 ml de agua estéril doblemente destilada, para lograr una solución clara de 20 mg/ml (1.5 mM). La solución se almacenó a -80°C hasta su uso.

Vehículos - Tris 1 M pH 8.0 - Externalización de Sigma (catálogo # T-1503). Se disolvieron 121.1 g de base TRIS (Sigma # T1503) en 700 ml de ddH₂O. Se logró el pH 8 deseado con HCl concentrado. DDW se adicionó para tener una solución final de 1L.

- 15 Vehículos - PBSX10 - Externalización de Industrias Biológica (catálogo # 02-023-5A; (Para 10x PBS) # de lote: 619113)

Sistema de prueba

Animales:

Especie: Ratones; Cepa: RTP-801WT; CMF-608WT

Fuente: Harlan Laboratories, Jerusalén, Israel.

Edad: 8-12 semanas; Rango de peso corporal: 17-28 gr

5 Sexo: machos; Tamaño del grupo: 1; Número total de animales: 14

Cuidado de animales: Dieta: A los animales se les dio una dieta comercial para roedores a voluntad y el libre acceso al agua potable. Ambiente: (i) aclimatación de al menos 5 días. (ii) Todos los animales fueron confinados en unas instalaciones de acceso limitado a las condiciones de alojamiento controladas ambientalmente a lo largo de todo el período de estudio, y se mantuvieron de acuerdo con los procedimientos estándar de operación aprobados (SOP).

10 Diseño experimental

General: El estudio incluyó a 14 grupos experimentales que se describen en la Tabla C8:

Los grupos experimentales 1-12 administrados con gotas para los ojos de ARNip, grupo 13 el vehículo [control tratado con Tris 1 M pH 8, administrados con gotas para los ojos y el grupo 14 (control no tratado). Los ratones fueron tratados con un ARNip solo de la siguiente manera:

15 - Grupos 1-9 y 12: régimen de dosis: 20 µg/ojos/3 µl/ARNip, grupo 10: régimen de dosis 5.81 µg/ojos/3 µl/ARNip, grupo 11: régimen de dosis de 2.24 µg/ojos/3 µl/ruta de administración de ARNip: Gotas para los ojos (ED);

- Grupo 13: vehículo control (Tris 1M pH 8) 3 µl/ojo

- Grupo 14: control no tratado

Tabla C8. Diseño del estudio

Grupo	tipo de ARNip /bilateral	Dosis µg/ojo	Volumen (µl)	Ruta	Momento (hrs)	Tamaño de grupo
1	QM5-Cy3#1	20	3.00	E.D.	1	1
2	QM5-Cy3#10	20	3.00	E.D.	1	1
3	DDIT4_1-Cy3	20	3.00	E.D.	1	1
4	DDIT4_1-Cy3.5	20	3.00	E.D.	1	1
5	DDIT4_1 Dy-649/C6	20	3.00	E.D.	1	1
6	FITC-CNL_1RD/CNL_1FD	20	3.00	E.D.	1	1
7	scrambled3'cy3-CNL_1	20	3.00	E.D.	1	1
8	Cy3-AS-CASP2_4-Struc-L-ADN-s(2 residuos en 3' de sentido)-más-alt AS	20	3.00	E.D.	1	1
9	CY3-AS-CASP2_4-Struc2-5-s(2 residuos en 3' de sentido)-más-alt AS	20	3.00	E.D.	1	1
10	TGASEII-FAM	5.81	3.00	E.D.	1	1
11	HNOEL-FAM	2.24	3.00	E.D.	1	1
12	DDIT4_1-Cy3 en vehículo de PBS (control positivo)	20	3.00	E.D.	1	1

13	Vehículo (TRIS 1M pH8) (control negativo)	N/A	3.00	E.D.	1	1
14	No tratado (control negativo)	N/A	3.00	E.D.	1	1

5 Las dosis de ARNip para la administración se prepararon en condiciones estériles y se almacenaron a -20°C. Las alícuotas de ARNip se descongelaron durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente antes de la administración. La cantidad total por alícuota (para cada ojo) incluyó un 20% adicional del volumen calculado. La dosis de ARNip designada fue administrada en un volumen de 3.5 µl por ojo (grupos experimentales 1 a 9 y 12). La dosis de ARNip designada fue administrada en un volumen de 3.2 µl (grupos experimentales 10 y 11) por ojo.

10 Anestesia: Los ratones fueron anestesiados con mezcla de ketamina/xilazina de la siguiente manera (0.85 ml de ketamina + 0.15 ml de Xilazina + 0.9 ml de solución salina, solución de mezcla de 0.1 ml/20gr de PC).

10 Administración de gotas para los ojos: Una muestra de volumen de 3 µl se dejó caer lentamente en cada ojo (superficie corneal) mediante una punta de pipeta roma; los animales fueron colocados en un ambiente cálido para prevenir la hipotermia inducida por anestesia, y se devolvieron a su jaula después de que recuperan la conciencia.

10 Cronograma de eutanasia: Los ratones de todos los grupos se aniquilaron de acuerdo con el diseño del estudio (Tabla C8, Momento de terminación).

10 La etapa de terminación se llevó a cabo por dislocación cervical.

15 Recolección de tejidos: Los ojos izquierdo y derecho, incluyendo el nervio óptico, de todos los animales enucleados, la retina fue diseccionada transversal con la hoja de cuchilla, la lente/vítreo se retira suavemente. La copa para el ojo restante se fija con 4% de PFA (en PBS pH 7.4) durante 30 minutos, a continuación, se infiltraron con 30% de sacarosa durante 3 horas a 4°C. Minutos 3X5 lavadas con helado de PBS pH 7.4. Entonces se incrusta en el compuesto de temperatura óptima de corte (OCT) y se secciona longitudinal con un criostato en cortes de 4 µm que se colocaron en portaobjetos de microscopio (Superfrost/Plus). Las secciones se contratiñeron con DAPI (1 µg/ml) y se montaron.

20 Una gota completa de sangre de todos los animales, se unta en el portaobjetos con la hoja de la cubierta, y se cubre. Entonces fue pegada con esmalte de uñas

Evaluación

25 La administración de ARNip se evaluó mediante microscopía de luz y la imagen digital. Un fragmento de tejido se consideró positiva (i.e., se produjo una transferencia exitosa de ARNip/incorporación intracelular) sólo si el examen histológico (microscópico) mostró señal de fluorescencia clara dentro de las células específicas o estructuras de la cámara anterior o posterior, y la retina. La tinción de DAPI de referencia fue asistida en la identificación de la estructura del tejido. La administración se consideró positiva si el examen histológico fue consistente dentro del grupo (tipo de célula idéntica bilateral o tinción estructural), i.e., el examen histológico mostraría la misma señal fluorescente en todos los tipos de células/tejidos (cámara anterior del ojo, retina y nervio óptico) del mismo grupo experimental.

Resultados

35 Las figuras 5A-5B: Microscopía confocal (x60 aumentos) de la retina 1 hora después de la administración de gotas para los ojos de QM5 - ARNip dirigido al gen p53. ARNip en (células del epitelio pigmentario de la retina, células ganglionares de la retina) se muestra con fluorescencia Cy3.

35 Las figuras 6A-6B son imágenes representativas de DDIT4 ARNip marcado con Cy3 incorporado en la retina de ratones.

35 La figura 6B muestra acumulación de DDIT4_1 Cy3-ARNip después de 1 hora de la administración de gotas para los ojos. Coroides, capa nuclear externa, RPE y capa del segmento externo de las células fotorreceptoras muestran tinción Cy3.

40 La figura 7 muestra acumulación de DDIT4_1 Dy-649/C6 -ARNip después de 1 hora de la administración en gotas para los ojos en las células de RGC utilizando tinción con Dy-649/C6.

40 Las figuras 8A - 8C representan la administración de ARNip FITC CNL_1RD/CNL_1FD control y scarnbled3'cy3-CNL_1 a los tejidos de la retina por diferentes métodos de tinción. Las figuras 9A y 9B muestran la administración de las diferentes estructuras de Casp2 a los tejidos de la retina del ratón.

Las figuras 10A y 10B muestran administración de TGASEII-FAM y Hnoel-FAM.

La figura 11 muestra la administración de la retina de ARNip contra p53 en PBS como grupo de control positivo y

Las figuras 12A y 12B muestran que en animales intactos o cuando la administración ED sin ARNip no se obtiene ninguna señal fluorescente en la retina.

5 Conclusión: No se encontraron diferencias dependientes de la secuencia, ni fluoróforas ni diferencias dependientes de genes en la administración a la retina. El estudio demostró la administración eficiente de los compuestos de ARNip conjugados con Cy3 dirigidos a CASP2, RTP801, TIGASEII y genes diana p53, a las estructuras oculares: RGC, RPE, fotorreceptores, coroides.

10 Ejemplo 6: Cuantificación de la administración de Casp2 ARNip (formulado en PBS o en 2% de MC (Formulación "A")) para dirigir al tejido de la retina en ratas *in vivo*

El examen de diferentes formulaciones de gotas para los ojos para la administración de ARNip a la retina. El objetivo del estudio fue la determinación de la cantidad de CASP2_4_S510 ARNip en la retina de ratas en momentos de 1, 3, 6 y 24 horas después de la administración tópica única en diferentes formulaciones de gotas para los ojos (ED).

Artículo de prueba

15 Sustancia (compuesto no formulado): CASP2_4_S510 (ARNip contra CASP2)

Suministrada por Agilent (catálogo del fabricante # QPI-1007, # lote: Q02F08002N)

20 Descripción del material de ensayo: CASP2_4_S510: de caperuza 5' Abásica S invertida, ADN-L 18/AS-AL. Un dúplex de extremo romo de 19-mer modificado químicamente que tiene dos cadenas separadas, con una cadena de sentido (SEN) que comprende ribonucleótidos modificados (letras mayúsculas), un L-desoxirribonucleótido en la posición 18 (negrita, subrayada) y unidad estructural desoxiabásica invertida (iB) presente en el terminal 5' de la cadena SEN; y con una cadena antisentido (AS) que comprende ribonucleótidos no modificados (letras mayúsculas), y ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar (letras minúsculas) en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 como se muestra en la Fórmula I:

Fórmula I

25 SEN 5' iB-GCCAGAAUGUGGAACUCCU 3'

AS 3' cGgUcUuAcACcUuGaGgA 5'

Condiciones de almacenamiento: -80°C

ARNip formulado en PBS: CASP2_4_S510 33.3 mg/ml en PBS (solución para gotas para los ojos)

30 Descripción del material de ensayo: En condiciones estériles, 300 mg de CASP2_4_S510 ARNip seco, se disolvieron en 15 ml de agua estéril doblemente destilada, para lograr una solución clara de 20 mg/ml. La solución se almacenó a -80°C hasta su uso. Después, la solución stock de 20 mg/ml en DDW se llevó a una concentración de trabajo de 100 µg/3 µl, en PBS, de la siguiente manera:

35 6.5 mg de CASP2_4_S510 ARNip: 325 µl de stock de 20 mg/ml de CASP2_4 (6.5 mg), se precipitaron por 0.15 M NaCl y EtOH, y se secaron bajo laminar de cultivo de tejidos (condiciones estériles). La solución de ARNip 33.3mg/ml: 6.5 mg de ARNip seco se disolvieron en 195 µl de PBSx1. Cantidad preparada: 6.5 mg/195 µl en alícuotas en 4 tubos.

Condiciones de almacenamiento: recién preparado

ARNip formulado en la Formulación A: solución de 33.3 mg/ml de CASP2_4_S510 ARNip en 2% (p/v) de metilcelulosa y 1% (v/v) de glicerol esteril y 0.01% (p/v) de solución de EDTA en agua libre de pirógenos (solución de gotas para los ojos)

40 Descripción del material de ensayo: En condiciones estériles, 300 mg de CASP2_4_S510 ARNip seco se disolvieron en 15 ml de agua estéril doblemente destilada, para lograr una solución clara de 20 mg/ml. La solución se almacenó a -80°C hasta su uso. La solución de 20 mg/ml en DDW se llevó a una concentración de trabajo de 100 µg/3 µl, en la formulación, de la siguiente manera:

6.5 mg de CASP2_4_S510 ARNip: 325 µl de 20 mg/ml de CASP2_4 (6.5 mg), se precipitaron mediante NaCl 0.15M y EtOH, y se secaron en laminar de cultivo de tejidos (condiciones estériles).

Solución de ARNip 33.3mg/ml: 6.5 mg de ARNip seco se disolvieron en 195 µl de solución de formulación A

Cantidad preparada: 6.5 mg/195 µl en alícuotas en 4 tubos

5 Condiciones de almacenamiento: recién preparado

Control de artículo(s)

Formulación de metilcelulosa (sin ARNip) - 2% de metilcelulosa y 1% v/v de glicerol esteril y 0.01% p/v de solución de EDTA en agua libre de pirógenos, se preparó de la siguiente manera:

10 Solución A: 0.4 g de metilcelulosa 25 (ScienceLab.com, Cat # SLM2050) se disuelven en un volumen final de 10 ml de agua hervida caliente (80-90°C), (Norbroom), se enfrió hasta temperatura ambiente y se adicionó en una proporción de 1: 1 (concentración final 2%) a la solución B.

Solución B: 332 µl de 60% de glicerol (Sigma, Cat # G6279) y 2 µl de solución de EDTA pH 8 (preparada a partir de Sigma, Cat # E9884) en 9.66 ml de WFI (Norbroom).

15 500 µl de solución A se mezclan con 500 µl de solución B para obtener: 2% de metilcelulosa y 1% v/v de glicerol esteril y 0.01% p/v de solución de EDTA en agua libre de pirógenos (pH final fue de aproximadamente 7.4 y la osmolaridad similar a la de la película lagrimal humana).

PBS fue suministrado por las industrias biológicas (Catálogo del fabricante # 02-023-5A (Para 10x PBS); Lote # 619113)

Sistema de prueba

Animales utilizados: Especie: Ratas; Cepa: Adultos, Sprague-Dawley (SD)

20 Fuente: Harlan, Jerusalem Israel

Edad: 8-10 semanas; Rango de peso corporal: 180-250gr

Sexo: Macho; Tamaño del grupo: n = 6/3; Número total de animales: 54

Cuidado de animales: Dieta: A los animales se les proporcionó una dieta comercial para roedores a voluntad y libre acceso al agua potable.

25 Ambiente:

(i) Aclimatación de al menos 5 días.

30 (ii) Todos los animales fueron confinados en una instalación de acceso limitado a las condiciones de alojamiento controladas ambientalmente a lo largo de todo el período de estudio, y se albergaron de acuerdo con los procedimientos estándar de operación aprobados (SOP). A los animales se le proporcionó a voluntad una dieta comercial para roedores (Harlan Teklad 2018S Global 18% de proteínas de la dieta para roedores) y agua filtrada, clorada y acidificada.

Las ratas se mantuvieron en jaulas microisolator con la parte superior de filtro, 1-6 ratas/jaula. Las jaulas se mantuvieron en condiciones ambientales controladas de temperatura (20-24°C), humedad relativa (30-70%), un ciclo de 12 horas de luz/12 h de oscuridad, supervisados por el ordenador de control, durante todo el período del estudio.

Diseño experimental

35 Diseño del estudio: concentración de retina de CASP2_4 ARNip después de la aplicación ED de la formulación ocular se determinó mediante qPCR en grupos de estudio terminados en diferentes momentos después de la administración ARNip. Cada grupo de ARNip tratado experimental incluyó 6 ratas. ED se aplicó bilateralmente como se detalla en el diseño del estudio de la Tabla C9.

40 Momentos de terminación después de la administración de ARNip: configuración de terminación se realizó de acuerdo con el diseño del estudio de la Tabla C9. La dosificación y terminación de los grupos experimentales se realizaron en días separados.

Tabla C9: Diseño del estudio

Tamaño del Grupo	Número del Grupo	Artículo de prueba	Dosis de ED bilateral [100 µg/ ojo/3µl]	Terminación [h]	Método de análisis
1	6	CASP2_4_S510	siRNA formulado PBS	1	qPCR
2	6	CASP2_4_S510	formulado MC	1	qPCR
3	6	CASP2_4_S510	ARNip formulado PBS	3	qPCR
4	6	CASP2_4_S510	formulado MC	3	qPCR
5	6	CASP2_4_S510	ARNip formulado PBS	6	qPCR
6	6	CASP2_4_S510	formulado MC	6	qPCR
7	6	CASP2_4_S510	ARNip formulado PBS	24	qPCR
8	6	CASP2_4_S510	formulado MC	24	qPCR
9	3	N/A	Vehículo MC	1	qPCR
10	3	N/A	intacto	N/A	qPCR

Anestesia: En el curso del experimento, los animales fueron anestesiados con Equithesine (I.P. 4 ml/kg) para la aplicación ED y/o antes de las terminaciones.

- 5 Administración de gotas para los ojos: un volumen de muestra de 3 µl del artículo de ensayo o vehículo se aplicó a la superficie de la córnea bilateralmente a los animales anestesiados, por una punta de pipeta roma (puntas con filtro de 10 µl estériles (cortas)). Los animales fueron colocados en un ambiente cálido para prevenir la hipotermia inducida por anestesia, y se volvieron a su jaula después de recuperar la conciencia (Grupos experimentales 7 y 8). La terminación de los animales de todos los grupos de estudio fue de acuerdo al diseño del estudio. Los tejidos fueron recogidos de acuerdo con el diseño del estudio.

Cronograma de eutanasia: Todos los animales fueron anestesiados profundamente y se sacrificaron de acuerdo con el diseño del estudio (Tabla C9, terminación).

Configuración de perfusión: Las ratas fueron perfundidas transcárdialmente con PBS (20-50 ml/min después de 2-3 min).

- 15 Recolección de tejidos: Después de la perfusión, ambos ojos (izquierdo y derecha) fueron enucleados y almacenados en hielo. Los ojos fueron disecados utilizando un microscopio, y opcionalmente la patología en bruto se clasifican de acuerdo a la escala de calificaciones de la muestra. La córnea se disecó por un corte a lo largo del limbo, la lente se retira con suavidad, y la retina y el vítreo se separa cuidadosamente de la esclerótica. Se recogieron las retinas enteras y cuerpos vítreos (humor) (Retina incluyendo: "retina neural" + epitelio pigmentario de la retina + corioide) en dos tubos de ensayo separados apropiados y debidamente marcados. Las retinas disecadas se lavaron en un gran volumen de PBS (cada retina en un tubo separado con PBS fresco), el exceso de líquido se eliminó con Kimwipe® y las retinas fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido. Las muestras de retina y cuerpo vítreo fueron sometidas a extracción de ARN.

Evaluación

- 25 Extracción de ARN:

Retina: Se extrajo ARN de cada muestra de retina individualmente (izquierda y derecha) por extracción doble. El ARN fue transferido para la preparación de ADNc y análisis qPCR.

Vítreo: se obtuvo material para la detección de Casp2_4 ARNip de vítreo utilizando el siguiente protocolo:

5 Cada vítreo de rata fue alrededor de 10 μ l. 500 μ l de reactivo A EZ-ARN II (Biological Industries Cat no. 20-410-100) se adicionaron a cada vítreo. La muestra se homogeneizó, y se adicionaron 10 μ g de tRNA (1 μ l de 10 mg/ml de stock). La muestra se almacenó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente: EZ-ARN II B: 400 μ l y EZ-ARN II C: 90 μ l y se mezclaron bien. La muestra se almacenó durante 10 min a temperatura ambiente, a continuación, se centrifugó 12000 g, durante 15 min a 4°C.

La fase superior se transfirió a un tubo nuevo al cual se le adicionaron isopropanol: 500 μ l y Acrilamida Lineal: 5 μ l. La muestra se almacenó durante la noche a -20°C, se centrifugó a 12000 g durante 20 min a 4°C, se lavó dos veces con etanol al 75%. El pellet se disolvió en 15 μ l de H₂O.

10 Cuantificación de ARNip: La cantidad del ARNip en las retinas y humor vítreo (cuantificación del ARNip se realizó por vítreo) fue examinada mediante la cuantificación del ARNip qPCR. qPCR se realizó de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de Quark. La expresión de genes de referencia y CASP2_4 ARNip se probaron. Los resultados se resumen en la Tabla C10.

Tabla C10: Resultados

Terminación	Formulación	Ojo	Tamaño del grupo	ARNip fmol/ μ g de ARN de la retina
1 hrs	Metilcelulosa	Derecho	5	12.50
		Izquierda	6	10.19
	PBS	Derecho	6	8.08
		Izquierda	6	4.77
3 hrs	Metilcelulosa	Derecho	5	1.76
		Izquierda	5	2.47
	PBS	Derecho	6	6.48
		Izquierda	6	7.80
6 hrs	Metilcelulosa	Derecho	4	1.37
		Izquierda	6	3.80
	PBS	Derecho	6	3.61
		Izquierda	6	1.04
24 hrs	Metilcelulosa	Derecho	6	0.11
		Izquierda	6	0.21
	PBS	Derecho	6	0.03
		Izquierda	6	0.04

15 Conclusión: El estudio mostró la administración eficiente de ARNip en retina 1 y 3 horas después de la administración. El análisis de qPCR mostró que después de la aplicación de 100 μ g de ARNip en la Formulación A, en promedio 11 fmol/ μ g de ARN total se obtuvo en la retina después de 1 hora y 2 fmol/ μ g de ARNip después de 3 horas. Cuando se administra la misma concentración en PBS, una cantidad de 6 fmol/mg de ARNip se obtuvo después de 1 hora y 8 fmol/mg de ARN tot se obtuvo después de 3 horas.

20 Ejemplo 7: Cuantificación del compuesto de ARNip administrado de forma no invasiva (formulado en diversas formulaciones) en el tejido diana de la retina en ratas.

ES 2 563 984 T3

El examen de diferentes formulaciones de gotas para los ojos para administración no invasiva de ARNip a la retina *in vivo*.

5 El objetivo de este estudio fue la evaluación de la cantidad de CASP2_4_S510 ARNip en la retina de rata normal a las 3 horas después de la aplicación por vía tópica única de diferentes formulaciones de ARNip preparadas para la administración como gotas para los ojos (ED).

Artículo de prueba

Sustancia (compuesto no formulado) CASP2_4_S510 (ARNip contra CASP2) Suministrado por Agilent (del catálogo del fabricante # QPI-1007; Lote #: Q02F08002N).

10 La descripción del material de ensayo: CASP2_4_S510: de caperuza 5' Abásica S invertida, ADN-L 18/AS-AL. Un ARN bicatenario de 19-mer estabilizado con Abásico invertido como caperuza 5', ADN-L en la posición 18 de la cadena sentido y alternantes de 2'-OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 en la cadena antisentido.

Condiciones de almacenamiento: -80°C

ARNip formulado en PBS 33.3mg/ml de CASP2_4_S510 en PBS (solución de gotas para los ojos) -

15 Descripción del material de ensayo: En condiciones estériles, 300 mg de CASP2_4_S510 ARNip seco se disolvieron en 15 ml de agua estéril doblemente destilada, para lograr una solución clara de 20 mg/ml. La solución se almacenó a -80°C hasta su uso. A continuación, la solución stock de 20 mg/ml en agua doblemente destilada se llevó a una concentración de trabajo de 100 µg/3 µl, en PBS, de la siguiente manera:

1.7 mg CASP2_4_S510 ARNip: 85 µl de 20 mg/ml de CASP2_4 (1.7 mg), se precipitaron por NaCl 0.15 M y EtOH, y se secó bajo el laminar de cultivo de tejidos (condiciones estériles).

20 solución de ARNip 33.3 mg/ml: 1.7 mg de ARNip seco se disolvieron en PBS x1 para conseguir 51 µl de la cantidad preparada: 1 tubo de 1.7 mg en 51 µl de PBS Condiciones de almacenamiento: recién preparada

ARNip formulado en solución lubricante comercial Systane®: 33.3mg/ml de CASP2_4_S510 en Systane (solución de gotas para los ojos) - Grupo II. Comprado de Alcone Inc.; # Lotes: Lote 165228F.

25 Descripción del material de ensayo: En condiciones estériles, 300 mg de CASP2_4_S510 polvo (Aligent, lote # Q02F08002N) se disolvieron en 15 ml de agua estéril doblemente destilada, para lograr una solución clara de 20 mg/ml. La solución se almacenó a -80°C hasta su uso. A continuación, la solución stock de 20 mg/ml en agua doblemente destilada se llevó a una concentración de trabajo de 100 µg/3 µl, en la formulación, de la siguiente manera:

1.7 mg de CASP2_4_S510 ARNip: 85 µl de 20 mg/ml de CASP2_4_S510 (1.7 mg), se precipitó por NaCl 0.15 M y EtOH, y se secó bajo el laminar de cultivo de tejidos (condiciones estériles).

30 Solución de ARNip de 33.3 mg/ml: 1.7 mg de ARNip seco se disolvió en 51 µl de solución lubricante comercial (i.e. Systane®).

Cantidad preparada: 1 vial de 1.7 mg de ARNip en 51 µl de solución Systane®.

35 Soluciones del ARNip formulado en solución de glicerol + EDTA y en metilcelulosa (MC): 33.3 mg/ml de solución de CASP2_4_S510 ARNip en la formulación de Glicerol + EDTA, y en 0.5%, 2% o 3% (p/v) de metilcelulosa y 1% (v/v) de glicerol esteril y 0.01% (p/v) de solución de EDTA en agua libre de pirógenos Grupos III - VI

Descripción del material de ensayo: En condiciones estériles, 300 mg de polvo de CASP2_4_S510 (Aligent, lote # Q02F08002N) se disolvieron en 15 ml de agua estéril doblemente destilada, para lograr una solución clara de 20 mg/ml. La solución se almacenó a -80°C hasta su uso. A continuación, la solución stock de 20 mg/ml en agua doblemente destilada se llevó a una concentración de trabajo de 100 µg/3 µl, en la formulación, de la siguiente manera:

40 Siete viales de 1.7 mg de CASP2_4_S510 ARNip: 85 ml de 20 mg/ml de CASP2_4_S510 (1.7 mg), se precipitó por NaCl 0.15 M y EtOH, y se secaron a la laminar de cultivo de tejidos (condiciones estériles).

45 Grupo III: 0.5% de formulación de MC: mezcla 1: 7 de la solución A y la solución B [12.5 µl de la solución A se mezclaron con 50 µl de solución B y 37.5 µl de WFI para obtener: 0.5% de metilcelulosa y 1% v/v de glicerol esteril y 0.01% p/v de solución de EDTA en agua libre de pirógenos (pH final fue aproximadamente 7.4 y la osmolaridad similar a la película lagrimal humana)]

ES 2 563 984 T3

ARNip formulado en 0.5% de formulación de MC 33.3 mg/ml: 1.7 mg de ARNip seco se disolvieron en 0.5% de formulación de MC que se preparó como se describe para lograr 51 µl de solución formulada de ARNip en 0.5% de formulación de MC.

5 Grupo IV: 1% de formulación de MC: mezcla 1: 3 de la solución A y la solución B [25 µl de la solución A se mezclaron con 50 µl de solución B y 25 µl de WFI para obtener: 1% de metilcelulosa y 1% v/v de glicerol esteril y 0.01% p/v de solución de EDTA en agua libre de pirógenos (pH final fue aproximadamente 7.4 y la osmolaridad similar a la película lagrimal humana)]

10 Solución de ARNip formulado en 1% de formulación de MC 33.3 mg/ml: 1.7 mg de ARNip seco se disolvieron en 1% de formulación de MC que se preparó como se describe para lograr 51 µl de una solución formulada de ARNip en 1% de formulación de MC.

Grupo V: 2% de formulación de MC: mezcla 1: 1 de la solución A y la solución B [50 µl de la solución A se mezclaron con 50 µl de solución B para obtener: 2% de metilcelulosa y 1% v/v de glicerol esteril y 0.01 % p/v de solución de EDTA en agua libre de pirógenos (pH final fue de aproximadamente 7.4 y la osmolaridad similar a la película lagrimal humana)]

15 Solución de ARNip formulada en 2% de formulación de MC 33.3 mg/ml: 1.7 mg de ARNip seco se disolvieron en 2% de formulación de MC que se preparó como se describe para lograr 51 µl de una solución formulada de ARNip en 2% de formulación de MC.

Grupo VI: 3% de formulación de MC: mezcla 1: 1 de la solución A y la solución C [50 µl de la solución A se mezclaron con 50 µl de solución C para obtener: 3% de metilcelulosa y 1% v/v de glicerol esteril y 0.01% p/v de solución de EDTA en agua libre de pirógenos (pH final fue de aproximadamente 7.4 y la osmolaridad similar a la película lagrimal humana)]

20 Solución de ARNip formulada en 3% de formulación de MC 33.3 mg/ml: 1.7 mg de ARNip seco se disolvieron en 3% de formulación de MC que se preparó como se describe para lograr 51 µl de una solución formulada de ARNip en 4% de formulación de MC.

Grupo VII: formulación Glicerol + EDTA: 50 µl de WFI (Norbrook) se mezclaron con 50 µl de solución B para obtener: 1% v/v de glicerol esteril y 0.01% p/v de solución de EDTA en agua libre de pirógenos.

25 Solución de ARNip formulada en la formulación de Glicerol + EDTA 33.3 mg/ml: 1.7 mg de ARNip seco se disolvieron en formulación Glicerol + EDTA que se preparó como se describe para lograr 51 µl de una solución formulada de ARNip en la formulación de Glicerol + EDTA.

Cantidad preparada: 7 viales, de la siguiente manera:

1 vial de 1.7 mg de ARNip en 51 µl de formulación PBS

30 1 vial de 1.7 mg de ARNip en 51 µl de formulación Systane®

1 vial de 1.7 mg de ARNip en 51 µl 0.5% de formulación de MC

1 vial de 1.7 mg de ARNip en 51 µl 1% de formulación de MC

1 vial de 1.7 mg de ARNip en 51 µl 2% de formulación de MC

1 vial de 1.7 mg de ARNip en 51 µl 3% de formulación de MC

35 1 vial de 1.7 mg de ARNip en la formulación de 51 µl glicerol + EDTA

Condiciones de almacenamiento: recién preparado

Control de artículo(s)

1. PBS - Suministrado por Biological industries (Catálogo del fabricante # 02-023-5A (Para 10x PBS); Lote # 619113).

40 2. Systane® - solución de gotas para los ojos disponible comercialmente; Suministrado por Alcon; Lote #: Lote 165228F; Cantidad suministrada: 15 ml; Condiciones de almacenamiento: RT; Fecha de vencimiento: 02/2011.

- Formulación de solución A - solución de metilcelulosa en agua libre de pirógenos. Solución A) 0.4 g de metilcelulosa 25 (ScienceLab.com, Cat # SLM2050) disuelto en volumen final de 10 ml de agua hervida caliente (80-90°C), (Norbrook), se enfrió hasta la temperatura ambiente.
- 5 Formulación de solución B - Solución glicerol esteril y EDTA en agua libre de pirógenos. Solución B) 332 μ l de 60% de glicerol (Sigma, Cat # G6279) y 2 μ l de solución de EDTA pH 8 (preparado a partir de Sigma, Cat # E9884) en 9.666 ml de WFI (Norbrook).
- Formulación de solución C - solución concentrada de metilcelulosa en agua libre de pirógenos. Solución C) 0.6 g de metilcelulosa 25 (ScienceLab.com, Cat # SLM2050) disuelto en volumen final de 10 ml de agua hervida caliente (80-90°C), (Norbrook), se enfrió hasta la temperatura ambiente.
- 10 Pruebas de estabilidad de los compuestos de ARNip en las formulaciones de metilcelulosa anteriores:
- La estabilidad de Casp2_4 Q02F08002N ARNip se puso a prueba en las formulaciones de metilcelulosa de acuerdo con el siguiente protocolo:
- ARNip se diluyó en las diferentes formulaciones que contienen metilcelulosa, para una concentración final de ARNip 7 mM. El 0%, 0.5%, 1%, 2% y 3% de formulaciones de MC se incubaron a temperatura ambiente. Además, la formulación de MC al 3% también se incubó a 37 °C con y sin inhibidor de la nucleasa.
- 15 Una alícuota de 5 μ l de cada solución se transfirió a 15 μ l de 10x solución reguladora de carga-TBE. después de la incubación a los siguientes momentos: 0,10', 0.5, 1, 1.5, 3, 6h. Después, la solución se congeló en nitrógeno líquido, y se almacenó a -20°C.
- 20 4 μ l de cada muestra se cargó en un gel al 20% de poliacrilamida no desnaturalizante y la electroforesis se realizó a 80V durante 2.5 h.
- Para la visualización del ARNip, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (1.0 μ g/ μ l).
- Como control positivo para la migración en gel de un ARNip no degradado, 5 μ l de una solución de ARNip de prueba 7 μ M en PBS se transfirió a 15 μ l de 10x solución reguladora TBE de carga y se cargó en el gel. A continuación, la muestra se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -20°C.
- 25 Como una referencia al patrón de migración de un ARNip monocatenario (ss) degradado, se preparó ARNip monocatenario no relevante.
- Resultados: El compuesto Casp 2_4 ARNip se mantuvo estable en todas las formulaciones.
- El estudio *in vivo*:
- Sistema de Prueba:
- 30 Animales utilizados: Ratas; Cepa: adultas, Sprague -Dawley; Modificación: SD
- Fuente: Harlan, Jerusalem Israel
- Edad: 8-10 semanas; Rango de peso corporal: 220- 270 gr
- Sexo: Macho; Tamaño del grupo: n = 6; Número total de animales: 54
- 35 Cuidado de animales: Dieta: A los animales se les presentó una dieta comercial para roedores a voluntad y libre acceso al agua potable.
- Ambiente:
- (i) Aclimatación de al menos 5 días.
- (ii) Todos los animales fueron confinados en unas instalaciones de acceso limitado a las condiciones de alojamiento controladas ambientalmente a lo largo de todo el período de estudio, y se mantienen de acuerdo con los procedimientos estándar de operación aprobados (SOP). A los animales se le proporcionó a voluntad una dieta comercial para roedores (Harlan Teklad 2018S Global 18% Protein Rodent Diet) y agua filtrada, clorada y acidifica.
- 40

Las ratas se mantuvieron en jaulas microisolator con la parte superior del filtro, 1-6 ratas/jaula. Las jaulas se mantuvieron en condiciones ambientales controladas de temperatura (20-24°C), humedad relativa (30-70%), un ciclo de 12 horas de luz/12 h de oscuridad, supervisados por el ordenador de control, durante todo el período de estudio.

Diseño experimental

- 5 El montaje experimental incluyó 9 grupos experimentales (6 ratas por grupo). ED se aplicaron de forma bilateral. Se utilizaron diferentes formulaciones (Tabla C11 Estudio de Diseño). Momento de terminación (3 horas) después de la administración de ARNip: La configuración de terminación se realizó de acuerdo con el diseño del estudio Tabla C11. La concentración de la retina de CASP2_4 ARNip se determinó mediante qPCR.

Tabla C11: Diseño de estudio

Grupo	Ruta de administración	Formulación	Compuesto ARNip	Aplicación bilateral(dosis/volumen/ojo)	Momento de terminación (hrs)	Tamaño del grupo
I	ED	PBS	Casp2_4_S510	100 µg/3µl	3	6
II	ED	Systane	Casp2_4_S510	100 µg/3µl	3	6
III	ED	MC0.5%	Casp2_4_S510	100 µg/3µl	3	6
IV	ED	MC1%	Casp2_4_S510	100 µg/3µl	3	6
V	ED	MC2%	Casp2_4_S510	100 µg/3µl	3	6
VI	ED	MC3%	Casp2_4_S510	100 µg/3µl	3	6
VII	ED	Glicerol + EDTA *	Casp2_4_S510	100 µg/3µl	3	5
VIII	ED	PBS	-	-	3	6
IX	ED	-	-	-	-	6

* glicerol + Formulación de EDTA (formulación libre de MC) = 1% v/v de glicerol estéril y 0.01% p/v de solución de EDTA en agua libre de pirógenos

10

Anestesia: En el curso del experimento, todos los animales tratados ED se anestesiaron con equitesina (I.P. 4 ml/kg).

15

Administración de gotas para los ojos. Un volumen de muestra de 3 µl del artículo de ensayo o el vehículo se aplicaron a la superficie de la córnea bilateralmente a los animales anestesiados, por una punta de pipeta roma (puntas de filtro de 10 µl estéril (corto)). Los animales fueron colocados en un ambiente cálido para prevenir la hipotermia inducida por la anestesia. La terminación de los animales de todos los grupos de estudio fue de acuerdo al diseño del estudio (momento de 3 horas). Los tejidos fueron recogidos de acuerdo con el diseño del estudio.

20

Cronograma de eutanasia: Todos los animales fueron profundamente anestesiados y sacrificados de acuerdo con el diseño del estudio (Tabla C11, terminación).

Configuración de perfusión: Las ratas fueron perfundidos transcardialmente con PBS (20-50 rpm/min después de 2-3 min).

Recolección de tejidos: Después de la perfusión, ambos ojos (izquierdo y derecho) se lavaron con PBS, fueron enucleados y almacenados en hielo. Los ojos fueron disecados mediante un microscopio binocular, y opcionalmente patología bruta se clasifican de acuerdo a la escala de calificaciones de la muestra. La córnea se disecó por un corte a lo largo del limbo, la lente se retira con suavidad, y la retina y el vítreo se separan cuidadosamente de la esclerótica.

retinas enteras y cuerpos vítreos (humor) se recogieron en dos tubos de ensayo separados apropiados y debidamente marcados. Las retinas disecadas se lavaron en un gran volumen de PBS (cada retina en un tubo separado con PBS fresco), el exceso de líquido se eliminó con Kimwipes y retinas fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido. Las muestras de retina y vítreo fueron sometidos a extracción de ARN.

5 Evaluación:

Extracción de ARN: Retina: Se extrajo ARN de cada muestra de retina individualmente (izquierdo y derecho) por extracción doble. El ARN fue transferido para la preparación de ADNc y análisis de qPCR.

10 Vítreo: se obtuvo material para la detección de Casp2_4_S510 ARNip a partir de vítreo utilizando el siguiente protocolo: Cada vítreo de rata fue de alrededor de 10 µl. 500 µl de reactivo A EZ-ARN II (Biological Industries Cat no. 20-410-100) se adicionaron a cada vítreo. La muestra se homogeneizó, y se adicionaron 10 µg de tARN (1 µl de stock 10 mg/ml). La muestra se almacenó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente EZ-ARN II B: 400 µl y EZ-ARN II C: 90 µl se adicionaron y se mezclaron bien. La muestra así obtenida se almacenó durante 10 min a temperatura ambiente y después se centrifugó 12000 g, durante 15 min a 4°C.

15 La fase superior se transfirió a un tubo nuevo a la cual isopropanol: 500µl y Acrilamida Lineal: se adicionaron 5 µl. La muestra se almacenó durante la noche a -20°C, se centrifugó a 12000 g durante 20 min a 4°C, se lavó dos veces con etanol al 75%. El pellet se disolvió en 15 µl de DDW.

Cuantificación del ARNip: La cantidad de ARNip en las retinas y humor vítreo (se realizó la cuantificación del ARNip por vítreo) fue examinada por qPCR ARNip de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de Quark.

Resultados

20 El estudio mostró que se detectaron las siguientes cantidades de ARNip en la retina de rata tres horas después de la aplicación de ARNip administrada de forma no invasiva *in vivo* con las diferentes formulaciones:

Tabla C12: cantidad de CASP2 ARNip Normalizado (miARN) en fmole/1 µg de ARN

Grupo	Abreviatura	N	Media	Est
IX	I-N/A	6	0.005	0.005
VIII	P-PBS	6	0.056	0.124
VII	C-MC(0)	6	6.303	3.921
XA	C-MC(1/2)	4	17.831	16.628
XIA	C-MC(1)	6	5.677	4.235
V	C-MC(2)	6	6.963	8.042
VI	C-MC(3)	5	7.653	6.674
II	C-Systane	5	5.109	2.492
I	C-PBS	6	4.228	6.758

MC (0) -MC (3) - formulaciones que incluyen concentraciones crecientes de 0 a 3% de metilcelulosa.

25 Conclusión: Todos los grupos que fueron tratados por CASP2 ARNip muestran cantidades positivas del ARNip (> 4 fmole) en el tejido diana de la retina. No hay diferencia significativa (P-valor = 0.8425) se encontraron entre los grupos de formulación.

ARNip administrado de forma no invasiva induce modificación genética (KD) *in vivo* del gen diana asociado con la apoptosis en tejido ocular diana

Ejemplo 8 (a título ilustrativo): Determinación de la actividad de modificación genética in-vivo de ARNip contra p53 preparado para la administración no invasiva mediante gotas para los ojos en retina de rata (compuesto de ARNip formulado en MC al 2% (Formulación "A"))

Objetivo

- 5 El objetivo del estudio fue determinar la actividad de modificación genética del compuesto de ARNip administrado de forma no invasiva dirigido al ARNm de p53 en la retina neural de rata. El compuesto de ARNip se formuló para administrar de forma no invasiva mediante gotas para los ojos. Se evaluó la actividad de modificación genética mediante la determinación del nivel de proteína utilizando el método ELISA.

Artículo de prueba

- 10 a. Sustancia (compuesto de ARNip no formulado): QM5 (ARNip contra p53 de Ratón/Rata)
- b. Compuesto de ARNip formulado para administración no invasiva (gotas para los ojos) (grupos 2 y 5 de la Tabla C13): solución de 100 µg/3 µl de QM5 ARNip en 2% (p/v) de metilcelulosa y 1% (v/v) de glicerol estéril y 0.01 % (p/v) de solución de EDTA en agua libre de pirógenos.
- 15 c. Compuesto de ARNip formulado para inyección intravítrea (grupos 1 y 4 de la Tabla C13): 280 µg de QM5 ARNip en 140 µl de PBS
- d. Solución de vehículo formulado para administración no invasiva (gotas para los ojos) (grupos 3 y 6 en la Tabla C13): 2% de metilcelulosa y 1% v/v de glicerol estéril y 0.01% p/v de la solución de EDTA en agua libre de pirógenos.

Sistema de Prueba:

Ratas adultas macho, Sprague-Dawley (SD) Harlan, Jerusalén Israel, 6-8 semanas de edad, 160-180 gr cada una.

- 20 Diseño experimental

Diseño del estudio: axotomía unilateral (ojo izquierdo, OS) se llevó a cabo en cada uno de los animales de los grupos 1-6.

- 25 Los grupos 2, 3, 5 y 6: Compuesto de ensayo (100 µg del artículo de prueba en 3 µl de vehículo formulado - los grupos 2 y 5) o vehículo formulado solo (grupos 3 y 6) se aplicaron como gotas para los ojos cada día a partir del día 0 (inmediatamente después de axotomía). Los grupos experimentales se terminaron de acuerdo con la Tabla C13. Muestras de ojo izquierdo y derecho del grupo 7 sirvieron como los controles normales intactos.

Los grupos 1 y 4: Tres minutos después de la axotomía (el día 0), 20 mg del compuesto de ARNip en 10 µl de vehículo de PBS se aplicaron mediante microinyección en el vítreo. La microinyección en el vítreo se realizó perpendicular a la esclerótica, utilizando un micro-inyector de insulina (0.3 ml). Los animales se terminaron de acuerdo con la Tabla C13.

- 30 Tabla C13: Diseño del estudio:

Grupo	Tamaño del grupo	Axotomía (unilat. OS)	Inyección intravítrea (OS) (Dosis/volumen/ojo)	ED (OS) (Dosis/volumen/ojo)	Terminación (días)
1	6	Sí	QM5 20 µg/10 µl	N/A	1
2	6	Sí	N/A	QM5 100 µg/3 µl	1
3	4	Sí	N/A	vehículo Formulado	1
4	6	Sí	QM5 20 µg/10 µl	N/A	3
5	6	Sí	N/A	3x QM5 100 µg/3 µl	3
6	4	Sí	N/A	3x vehículo Formulado	3
7	4	N/A	N/A	N/A	N/A

(Véanse las Tablas C14-C17 a continuación y las figuras 11A y 11B)

señal de p53 de acuerdo con curva estándar Kidney W.C.E

Tabla C14: valores de señales de p53 de acuerdo con curva estándar Kidney W.C.E

Señal P53		retina	
Operación	Tratamiento	1 día	3 días
Axotomía	QM5 intravítrea	1.00	1.84
Axotomía	Gotas para los ojos QM5	0.75	1.41
Axotomía	Gotas para los ojos Vehículo	1.93	Ausente
Ninguno	No tratado	2.01	2.01

5

Tabla C15: % p53 relación de las señales a partir de los animales no tratados

% relación señal de no tratado		retina	
Axotomía	QM5 intravítrea	50%	92%
Axotomía	QM5 gotas para los ojos	37%	70%
Axotomía	vehículo gotas para los ojos	96%	0%
señal de p53 de acuerdo con GST-hp53			

Tabla C16: valores de la señal de p53 según la curva estándar GST-p53

Señal P53		retina	
Operación	Tratamiento	1 día	3 días
Axotomía	QM5 intravítrea	0.0159	0.0214
Axotomía	Gotas para los ojos QM5	0.0095	0.0149
Axotomía	Gotas para los ojos Vehículo	0.227	Ausente
Ninguno	No tratado	0.233	0.0233

10

Tabla C17: % p53 relación de las señales a partir de los animales no tratados

% relación señal de no tratado		retina	
Axotomía	QM5 intravítrea	8%	92%
Axotomía	QM5 gotas para los ojos	41%	64%
Axotomía	vehículo gotas para los ojos	97%	Ausente

Conclusión: Estos estudios mostraron que el compuesto de ARNip administrado de forma no invasiva dirigido al ARNm p53 en la retina neural de rata induce modificación genética de la proteína p53.

Los compuestos de ARNip indujeron neuroprotección ocular *in-vivo* en modelos de animales de lesión neuronal Ocular

5 Ejemplo 9 (con fines comparativos): Evaluación de la inducción ocular neuroprotector por el compuesto de ARNip dirigido a caspasa 2 en el modelo de ONC después de la inyección de IVT

Objetivos del estudio: Evaluar la eficacia neuroprotectora ocular de ARNip dirigidos a caspasa 2 en el modelo ONC después de la(s) inyección(es) intravítrea(s)

Métodos

Etiquetado retrógrado de la RGC.

10 El trazador de fluoroGold se transporta de forma retrógrada (del cerebro a los ojos) a lo largo de los axones de RGC resultantes en la marcación completa y específica de todas las RGC. Para el propósito de este estudio, las RGC se marcaron mediante la aplicación del trazador retrógrado FluoroGold (2%, fluorocromo, Englewood, CO) en el colículo superior. En resumen, una ventana se perforó en el cuero cabelludo por encima de las coordenadas 6 mm rostral al bregma y 1.2 mm lateral a la línea media en ambos hemisferios. Utilizando una jeringa Hamilton, 3 µl del FluoroGold se
15 inyectaron en el colículo superior 3.8 mm, 4 mm, y 4.2 mm por debajo de la superficie ósea a una velocidad de 1 µl/min a cada una de las tres profundidades. A continuación, la aguja se retiró lentamente y la piel se suturó. En ratas adultas, el tiempo requerido para obtener la marcación completa de todas las RGCs después de este procedimiento fue ~ 1 semana. Por esta razón, ONC se realizó una semana después de la marcación retrógrada de RGC.

20 Aplastamiento del nervio óptico. El nervio óptico orbital (ON) de adultos anestesiados ratas Wistar expuestos a través de un enfoque supraorbital, las meninges cortadas y todos los axones en el nervio óptico (ON) cortados transversalmente por aplastamiento con pinzas calibradas durante 10 segundos, 2 mm de la lámina cribosa.

25 Inyección intravítrea (IVT). Una o dos dosis de 20 µg (en 10 µl de PBS) de ARNip de ensayo o de control o 10 µl de vehículo PBS se microinyectaron en el cuerpo vítreo 2 mm anterior a la cabeza del nervio, perpendicular a la esclerótica, utilizando una micropipeta de vidrio. Administración IVT se muestra como un control y/o para la validación inicial de un gen diana.

30 Cuantificación de supervivencia de RGC. En la terminación, los animales experimentales fueron perfundidos transcárdialmente con 4% de paraformaldehído. Los ojos con el nervio óptico fueron enucleados, la córnea se disecó con la hoja y la lente/vítrea se retiraron con cuidado. Ambas retinas se diseccionaron, fijaron durante 30 minutos adicionales y se montaron plana del lado del vítreo sobre un portaobjetos de vidrio para el examen de la capa de células ganglionares. Las RGC fueron examinadas bajo el microscopio de fluorescencia con un filtro UV (365/420 nm). El número de RGC fluorescentes retrógrada se determinó por dos diferentes investigadores, independientes y "cegados" que las cuentan en 16 áreas distintas (cuatro áreas por cuadrante retiniano en tres excentricidades diferentes de una sexta parte, la mitad, y las cinco sextas partes del radio de la retina). La microglía que pueden haber incorporado FluoroGold después de la fagocitosis de las RGC que mueren se destacó por su morfología característica y excluido de
35 los análisis cuantitativos.

Parte 1

Artículo de prueba: CASP2_4 ARNip - un oligonucleótido bicatenario de 19-mer modificado químicamente por 2'O-metilación en ambas cadenas. Otros compuestos incluyen ARNip modificado químicamente con ADN-L en el extremo 3' de la cadena sentido o puentes 2'5' en el extremo 3'. Dirige el gen caspasa2 en múltiples especies.

40 Artículo de control: PBS

45 Diseño: células ganglionares de la retina (RGC) se marcaron selectivamente primero por aplicación del trazador retrógrado FluoroGold en el colículo superior. Una semana después, los animales fueron sometidos a lesión por aplastamiento del nervio óptico (ONC). Las cuantificaciones de las RGC supervivientes se llevaron a cabo a los 7 y 30 días después de la ONC contando las RGC marcadas con FluoroGold en retinas montadas planas. La Tabla C18 muestra los tratamientos de los grupos.

Tabla C18: Tratamientos del Grupo

Grupos	Ojo derecho (n=4)	Ojo izquierdo (n=4)	Terminación
1 y 2	20 µg siCasp2_4 en el día 0	20 µl PBS en el día 0	Día 7
3 y 4	20 µg siCasp2_4 en los días 0 y 10	20 µl PBS en los días 0 y 10	Día 30

5 Resultados: El número medio de supervivencia de RGC en ojos tratados con 20 µg de Casp2_4 ARNip y se sometieron a aplastamiento del nervio óptico fue de 2040 ± 35 células/mm² a los 7 días y 298 ± 25 células/mm² a los 30 días después de la lesión. Estos recuentos fueron significativamente mayores que la media de los recuentos de RGC en ojos tratados con PBS y se sometieron a aplastamiento del nervio, que fue 941 ± 27 células/mm² a los 7 días y 41 ± 7 células/mm² a los 30 días. En los ojos control no quirúrgicos, el número medio de RGC fue 2253 ± 104 células/mm², que es comparable con el número promedio de RGC reportado en la literatura. La Tabla C19 provee los resultados de este estudio.

10 Tabla C19: Números media de RGC supervivientes en los diferentes momentos después de la lesión

ONC después del tiempo	7 días		30 días	
Tratamiento	PBS	Casp2_4	PBS	Casp2_4
RGC supervivencia media (células/mm ²)	941.347	2039.672	41.040	298.051
SD	27.038	34.766	7.219	25.401
% de supervivencia de RGC a partir de RGC total	26.659	57.764	1.162	8.441
SD	0.766	0.985	0.204	0.719

Todos los datos se ofrecen como la media \pm desviación estándar. Los valores se compararon mediante un análisis de una vía de varianza (ANOVA) y se consideraron como significativamente diferentes a $P < 0.02$.

15 Conclusiones: El aumento de la supervivencia de las RGC no se debió a los efectos neuroprotectores de la anestesia (la ketamina es un antagonista del receptor de N-metil-D-aspartato, y xilazina es un agonista del receptor adrenérgico- α_2), ya que los animales anestesiados de forma idéntica en el grupo control tuvieron recuentos de RGC significativamente menores que los que tuvieron los animales en el grupo tratado con Casp2_4 ARNip, pero debido al efecto neuroprotector de activación de caspasa 2 pro-apoptótico de silenciamiento y favorecer la expresión después de una lesión del ONC, por el tratamiento con el compuesto de ARNip dirigidos al gen caspasa 2.

20 Parte 2

Artículo de prueba: CASP2_4L ARNip - un oligonucleótido bicatenario de 19-mer modificado químicamente por 2'O-metilación en la cadena antisentido y ADN-L en la cadena sentido. Dirige el gen caspasa 2 de múltiples especies.

Artículos de control:

- PBS

25 - ARNip dirigido a GFP - un oligonucleótido bicatenario de 21-mer estabilizado por 2'O-metilación en ambas cadenas.

- CNL - ARNip sin correspondencia a cualquier transcripción de mamífero conocido; un oligonucleótido bicatenario de 19-mer modificado químicamente por 2'O-metilación en ambas cadenas.

30 Diseño. Las células ganglionares de la retina (RGC) primero se marcaron selectivamente mediante la aplicación del trazador retrógrado FluoroGold para el colículo superior. Una semana después, los animales fueron sometidos a lesión por aplastamiento del nervio óptico (ONC). Las cuantificaciones de las RGC supervivientes se realizaron a los 7 días después de la ONC contando las RGC marcadas con FluoroGold en retinas montadas planas. Artículos de prueba o de control fueron inyectados en el momento de ONC. Experimentos similares se llevaron a cabo con el fin de probar la

actividad y la eficacia de ARNip administrado a través de gotas para los ojos (véase el siguiente ejemplo). La Tabla C20 muestra tratamientos de grupos.

Tabla C20: Tratamientos de grupos

Grupos	Ojo derecho (n=4)	Ojo izquierdo (n=4)	Terminación
1 y 2	20 µg siCasp2_4 en el día 0	20 µl PBS en el día 0	Día 7
3 y 4	20 µg siGFP en el día 0	20 µl siCNL_1 en el día 0	Día 7

- 5 Resultados: El número medio de supervivencia de RGC en los ojos tratados con 20 µg Casp2_4 ARNip y sometidos a aplastamiento del nervio óptico fue 2.085 ± 40 células/mm² a los 7 días después de la lesión. Estos recuentos fueron significativamente mayores que la media de los recuentos de RGC en ojos tratados con ya sea PBS o GFP ARNip o CNL_1 ARNip y se sometieron a aplastamiento del nervio, que fue 901 ± 50 células/mm², 922 ± 38 células/mm², 898 ± 42 células/mm² respectivamente, a los 7 días. En los ojos control no quirúrgicos, el número medio de RGCs fue 2196 ± 110 células/mm², que es comparable con el número promedio de RGCs reportado en la literatura. La Tabla C21 muestra los resultados. Todos los datos se ofrecen como media \pm desviación estándar. Los valores se compararon mediante un análisis de una vía de varianza (ANOVA) y se consideraron como significativamente diferentes a $P < 0.01$.

Tabla C21: Números media de supervivencia de RGC 7 días después de la lesión (n=4 retinas/grupo).

Tratamiento	PBS	siGFP	siCNL_1	siCasp2
RGC supervivencia media (células/mm ²)	901.3338	922.3666	898.4268	2084.815
SD	49.74134	38.04059	42.12429	40.03638
% de supervivencia de RGC a partir de RGC total	25.52577	26.12142	25.44345	59.04197
SD	1.408675	1.07731	1.19296	1.13383

- 15 Conclusiones: El aumento de la supervivencia de las RGC se debió al efecto neuroprotector de activación de caspasa 2 pro-apoptótico de silenciamiento y favorecer la expresión después de una lesión del ONC, por el tratamiento con el compuesto de ARNip dirigidos al gen caspasa 2. Las moléculas Casp2_4 ARNip que tienen diferentes modificaciones/motivos estructurales muestran efecto neuroprotector similar en el rango de supervivencia de las RGC.

- 20 Ejemplo 10: Evaluación de la eficacia neuroprotectora ocular del compuesto de ARNip dirigido a caspasa 2 en el modelo de IOP

El objetivo del presente estudio fue establecer el efecto neuroprotector de una inyección única de 20 µg del compuesto CASP2_4 o control negativo GFP ARNip en el modelo preclínico de IOP glaucoma en rata.

Esbozo del estudio

- 25 En los animales de todos los grupos de estudio, las RGC fueron marcadas de forma retrógrada utilizando el trazador fluorescente Dil (1,1'-dioctadecil-3,3,3', 3'-tetrametilindocarbocianina) aplicado a ambos colículo superior. Una semana más tarde, la IOP se incrementó de manera unilateral en los ojos izquierdos de los animales de los grupos 2 a 5. IOP se controló cada otro día en los ojos operado (izquierdo) y contralaterales (derecho) durante 2 semanas. Dos semanas después de la inyección de solución salina hipertónica, vehículo (PBS) o ARNip (20 µg en PBS, o bien ARNip dirigidos a Casp2 o un ARNip de control negativo dirigido al gen de animales no mamíferos, la proteína fluorescente verde), fue administrado por inyección intravítrea (IVT) a los ojos izquierdos (operados). Los ojos no operados contralaterales no recibieron la inyección IVT. Además, dos semanas después de la inyección de solución salina hipertónica, los animales del grupo 2 fueron sacrificados y las RGC marcadas con Dil se contaron en montajes planos de retinas izquierda bajo microscopía de fluorescencia, con el fin de evaluar la magnitud de la pérdida de RGC, en el tiempo de la inyección de ARNip. Para todos los grupos que recibieron la inyección IVT, la IOP se midió una vez durante la tercera semana del experimento para confirmar el aumento de su estado en los ojos operados. A las 3 semanas del aumento de la IOP, o a 35 1 semana después de las inyecciones del artículo de prueba y de control, los animales fueron sacrificados y las RGCs marcadas con Dil se contaron en montajes planos de las retinas izquierda bajo microscopía de fluorescencia. Las

5 retinas derechas sirvieron como controles internos de calidad de la marcación. Un grupo separado de ratas naive en el cual RGC se marcaron retrógradamente de en el inicio del experimento se utilizó como control intacto para proporcionar una referencia para densidades normales de RGC. 4 ratas de este grupo se sacrificaron a las 2 semanas de la hipertensión ocular (junto con el grupo 2) y los 9 ratas restantes - a las 3 semanas (junto con los grupos 3 a 5). El diseño experimental se muestra en la Tabla C22 a continuación.

Animales

Especie:	Ratas	
Cepa:	Ratas Brown Norway	
Modificación:	N/A	
Fuente:	Charles River(Canadá)	
Edad:	Adulto, criadores retirados, 10-12 meses	
Rango de peso corporal:	300-400g	
Sexo:	machos	
Cuidado del animal:	dieta:	
	Ambiente:	Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices de Consejo Canadiense de los Animales para el uso de animales de experimentación. (Http://www.ccac.ca/).
	Ambiente:	(i) Aclimatación de al menos 5 días.
		(ii) Todos los animales fueron confinados en unas instalaciones de acceso limitado con las condiciones de alojamiento de ambiente controlado a lo largo de todo el período de estudio, y se mantuvieron de acuerdo con los procedimientos operativos estándar (SOP) aprobados de la Universidad de Montreal.

Materiales y Equipos

Sustancia (compuesto no formulado) CASP2_4_S510 (CASP2_4; CASP2 SIARN; ARNip contra Caspasa2 ARNm)

10 Suministrado por Agilent

15 La descripción del material de ensayo: Un dúplex de extremos romos de 19-mero modificado químicamente que tiene dos cadenas separadas, con una cadena de sentido (SEN) que comprende ribonucleótidos modificados (letras mayúsculas), un L-desoxirribonucleótido en la posición 18 (negrita, subrayado) y unidad estructural desoxiabásica invertida (iB) presente en el extremo 5' de la cadena SEN; y con una cadena antisentido (AS) que comprende ribonucleótidos no modificados (letras mayúsculas), y ribonucleótidos 2'-OMe modificados en el azúcar (letras minúsculas) en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 como se muestra en Fórmula 1.

Cantidad suministrada: 300 mg

Condiciones de almacenamiento: -80°C

20 La sustancia de control (compuesto no formulado) GFP_5_S763 (ARNip contra GFP ARNm) Subcontratado (nombre del fabricante): Agilent

Fabricante de catálogo # N/A

Cantidad suministrada: 220.8150 mg

Condiciones de almacenamiento: -80 °C; Fecha de vencimiento: ND

Artículo de prueba/Control (formulado) CASP2_4/GFP_5 20µg /5 µl de PBS

Se diluyeron 0.5 mg en 125 µl para lograr una solución stock de 4 µg/µl. Estos se dividen en alícuotas posteriormente a 5 µl por tubo y se almacenó a -80°C.

5 Vehículo - PBS.

Solución salina regulada con fosfato Multicell, solución 1X, sin calcio, sin magnesio (CAT. No: 311-010-EL).

10 La microscopía de fluorescencia se realizó utilizando un microscopio Zeiss Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss Canadá, Kirkland, QC), las imágenes fueron capturadas con una cámara CCD (Retiga, Qimaging) y procesada con el software de análisis de imagen Northern Eclipse (Empix Imaging, Mississauga, ON). Las microfotografías fueron tomadas con 25X aumentos

Procedimiento experimental

La cirugía se puede realizar en ratas macho adultas Brown Norway, criadores retirados, entre 10-12 meses de edad (300-400g), bajo anestesia general por inyección intraperitoneal de 1 ml/kg de cóctel de rata estándar que consiste de ketamina (100 mg/ml), xilazina (20 mg/ml) y acepromazina (10 mg/mL).

15 Cirugía de hipertensión ocular: elevación unilateral y crónica de IOP se indujo utilizando el modelo de Morrison, que implica una inyección de solución salina hipertónica en una vena episcleral, lo que lleva a un bloqueo de las vías de salida del humor acuoso. Este procedimiento conduce a aumento gradual de la presión del ojo y la muerte progresiva de RGS. Todos los animales en este estudio recibieron una única inyección en la vena de solución salina. El ojo seleccionado para el procedimiento fue adaptado con un anillo de plástico aplicado al ecuador ocular para confinar la
20 inyección de solución salina al plexo limbal. Una micro aguja (30-50 µm de diámetro) se utilizó para inyectar 50 µl de solución de NaCl 1.85 M estéril a través de una vena episcleral. El anillo de plástico bloqueado temporalmente de otras venas episclerales forzando la solución salina en el canal de Schlemm para crear cicatrices aisladas. Los animales se mantuvieron en una habitación con luz fluorescente baja constante (40-100 lux) para estabilizar la variación de IOP circadiana (8).

25 La medición de la presión intraocular (IOP): IOP de los ojos glaucomatosos y normales (contralateral) se midió en animales despiertos utilizando un tonómetro calibrado (TonoPen XL, Medotronic Solan, Jacksonville, FL). La IOP se midió cada dos días para las primeras dos semanas después de la cirugía de hipertensión ocular; y al menos una vez entre 2 semanas y 3 semanas después de la cirugía de hipertensión ocular. Ojos se vuelven frágiles después de las inyecciones intraoculares en condiciones de IOP alta, por esta razón el número de mediciones de la IOP fue limitado ya
30 que esto implica poner presión adicional sobre la córnea para obtener una lectura confiable. La IOP media (mm de Hg ±S.E.M.) por ojo se consideró como la media de todas las lecturas de IOP desde el inicio de elevación de la presión. Las medidas máximas IOP en cada ojo individual, ojo contralateral glaucomatosa o normal se definió como la IOP pico y este valor se utilizó para estimar la IOP máxima media para cada grupo.

35 Cálculo de la presión intraocular (IOP): La IOP media (mm de Hg ± S.E.M.) por ojo se consideró como la media de todas las lecturas de IOP desde el inicio de elevación de la presión. Las medidas máximas de la IOP en cada ojo individual, ojo contralateral glaucomatoso o normal se definió como la IOP pico y este valor se utilizó para estimar la IOP máxima media para cada grupo. La IOP integral positiva se calculó como el área bajo la curva de IOP en el ojo glaucomatoso menos que la del otro ojo normal a partir de la cirugía de hipertensión ocular a la eutanasia. La IOP integral representa la exposición total de la IOP, acumulada a lo largo de todo el experimento.

40 Diseño del estudio:

Una semana antes de la inducción de glaucoma, RGC se marcaron retrógradamente con el trazador fluorescente Dil aplicado a ambos colículo superior.

Una semana más tarde, la elevación unilateral de la IOP fue inducida mediante la inyección de una solución de solución salina hipertónica en una vena episcleral. Este procedimiento se denomina cirugía de hipertensión ocular.

45 En un primer experimento, antes de los estudios de eficacia, se evaluó el estado de la pérdida de RGC en grupos "sin inyección" a las 2 y 3 semanas después de la cirugía de hipertensión ocular (4 ratas/grupo, total = 8 ratas).

Exactamente 2 semanas después de la cirugía de hipertensión ocular, se realizó una única inyección intravítrea de cada ARNip.

Los animales fueron sacrificados y las retinas preparadas para el análisis de la supervivencia de las RGC en exactamente 3 semanas después de la cirugía de hipertensión ocular.

La densidad de RGC supervivientes se cuantificó en 12 áreas de la retina estándar.

Tabla C22: Diseño del estudio

Grupo	n	IOP aumentada	Inyección IVT ($\mu\text{L}/\text{ojo}$) 2 semanas después de la inyección de IOP)	Volumen de dosis	Terminación (Semanas después de IOP)
1 (Intacto)	13 (4+9)	No	No	N/A	N/A
2	4	Sí	No	N/A	2
3	6	Sí	PBS Vehículo	5 μL	3
4	6	Sí	Control Negativo ARNip, 20 μg	5 μL	3
5	6	Sí	CASP2 SIRNA, 20 μg	5 μL	3
*NA - no-aplicable, Tamaño del grupo: n=5					

5

Cuantificación de RGC supervivientes soma: La cuantificación de los cuerpos de RGC se realizó por duplicado y de manera enmascarada. Para recuentos de densidad de RGC, las ratas fueron anestesiadas profundamente y luego perfundidas transcardialmente con 4% de paraformaldehído (PFA) en solución reguladora de fosfato 0.1 M y ambos ojos fueron enucleados inmediatamente. Las retinas se diseccionaron y se montaron plana en un portaobjetos de vidrio con el lado de la capa de células ganglionares arriba. Bajo microscopía de fluorescencia, las neuronas marcadas con Dil se contaron en 12 áreas de la retina estándar como se describe.

10

Resultados y discusión

Tabla C23: Porcentaje de RGC a partir de tabla de interferencia intacta

Tratamiento	N	Media	Est	CV	Valor P Dunnett
PBS	6	62.37	5.86	9.40	
CASP2_4	6	81.71	14.28	17.48	0.05
2wIOP	4	71.25	6.75	9.47	0.19
GFPsiRNA	6	65.75	4.97	7.57	0.68
intacto	13	100.00	2.84	2.84	0.00

15 Comparaciones con el grupo tratado con PBS

La preservación de RGC en los ojos tratados con CASP2_4 ARNip con aumento de la IOP fue significativamente mejor que en el grupo tratado con PBS (1.31 veces superior a partir del resultado de PBS; valor de $p = 0.05$). En el grupo tratado con GFP ARNip no se encontró diferencia significativa (p -valor = 0.68) con respecto al grupo tratado con PBS.

No hay diferencia significativa entre la IOP (2 semanas) con la IOP (3 semanas) tratados por PBS (valor $p = 0.19$).

20 Comparaciones con el grupo IOP (2 semanas)

El grupo intacto tiene significativamente mayor densidad de RGC, por mm^2 que el grupo IOP (2w) (p -valor = 0.00). No se encontraron diferencias significativas en la densidad por mm^2 de RGC entre el grupo IOP (2w) y otros grupos de la IOP que fueron sacrificados después de 3 semanas (rango de valor p 0.16 hasta 0.44).

Comparaciones con el grupo intacto

5 El grupo intacto tiene significativamente mayor densidad de RGC, por mm^2 que los grupos de la IOP que fueron tratados por PBS, GFP ARNip y IOP (2w) sin tratamiento (valor de $p < 0.01$). No se encontraron diferencias significativas en la densidad de RGC por mm^2 entre el grupo de la IOP tratada por CASP2_4 ARNip en comparación con el grupo intacto (p -valor = 0.06).

Estos datos demuestran que un ARNip dirigido a Caspasa2 provee protección de RGC del daño inducido por aumento de la presión intraocular y su administración a las 2 semanas de aumento de la IOP conduce al cese de la pérdida adicional de RGC.

Las mediciones de la IOP se llevaron a cabo como se describe anteriormente.

10 IOP: El enfoque de Dunnett se utilizó para la comparación de los resultados con un grupo tratado con PBS. Se calcularon y se analizaron los parámetros adicionales, tales como: AUC (área bajo la curva), la IOP media y Max (IOP) a lo largo de la duración de las mediciones.

La mayoría de los animales muestran un aumento significativo de la IOP en 1-2 semanas después de la cirugía de hipertensión ocular.

15 No se han encontrado diferencias significativas en los niveles de IOP entre los ojos operados en los grupos tratados (0.7746). Del mismo modo, no se encontraron diferencias en los niveles de IOP entre los ojos contralaterales en los grupos tratados y los ojos intactos.

Los resultados muestran que Casp2 ARNip induce la neuroprotección incluso cuando la IOP se mantiene elevada en todos los grupos de tratamiento.

20 Resultados: No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en los tres parámetros calculados de IOP

Ejemplo 11: Evaluación de la eficacia neuroprotectora ocular del compuesto de ARNip dirigido a caspasa 2 en el modelo de axotomía

25 El propósito de los presentes estudios de eficacia fue utilizar un modelo de apoptosis de RGC inducida por axotomía del nervio óptico (ON) en ratas adultas Sprague-Dawley. El inicio y la cinética de la muerte de RGC en este sistema modelo son muy reproducibles y permiten el establecimiento de la eficacia neuroprotectora de Casp2_4 ARNip *in vivo*. Utilizando este método, la evolución de la muerte de RGC sigue un curso predecible: la muerte celular comienza el día 5 y se procede a la rápida pérdida de más del 90% de estas neuronas en 2 semanas.

Métodos

30 Marcación retrógrada de RGC: Para el propósito de este estudio, se marcaron las RGC mediante la aplicación del trazador retrógrado FluoroGold (2%, fluorocromo, Englewood, CO) en el colículo superior. En resumen, ambos colículos superiores estaban expuestos y un pequeño trozo de espuma de gel empapada en FluoroGold se aplicó a su superficie. En ratas adultas, el tiempo requerido para obtener la marcación completa de todas las RGCs después de este procedimiento es ~ 1 semana. Por esta razón, la axotomía del nervio óptico y la inyección intraocular de moléculas de ARNip se realizaron una semana después de la marcación retrógrada de RGC.

35 Axotomía del nervio óptico: Toda la población de las RGC se axotomizaron por transección del cierre del nervio óptico en el ojo (0.5 a 1 mm). Examen de fondo de la retina se realiza rutinariamente después de cada axotomía para comprobar la integridad de la circulación de la retina después de la cirugía. Los animales que presenten signos de compromiso del flujo sanguíneo fueron excluidos del estudio.

40 Para la inyección intravítrea de 10 μg en 5 μl de PBS cada uno de los reactivos, ya sea Casp2_4 ARNip o GFP ARNip se microinyectaron en el cuerpo vítreo 2 mm anterior a la cabeza del nervio, perpendicular a la esclerótica, utilizando una micropipeta de vidrio en el momento de la cirugía, el día 0, y luego se repitió en el día 7.

45 La cuantificación de la supervivencia de RGC: Los animales experimentales y de control fueron perfundidos transcardialmente con paraformaldehído al 4% a los 14 días después de axotomía del nervio óptico. Las retinas izquierdas (tratadas) y las retinas derechas (controles no tratados) se diseccionaron, se fijaron durante 30 min adicionales y se montaron plana del lado del vítreo arriba en un portaobjetos de vidrio para el examen de la capa de células ganglionares. RGC rellenas con FluoroGold se contaron en 12 áreas estándar de la retina. La microglía que puede haber incorporado FluoroGold después de la fagocitosis de las RGC que mueren se distingue por su morfología característica y excluidas de los análisis cuantitativos.

Diseño experimental

Artículo de prueba: CASP2_4L ARNip: un oligonucleótido bicatenario de 19-mer modificado químicamente por 2'O-metilación de residuos de azúcar en la cadena antisentido y ADN-L en la cadena sentido. Dirige al gen caspasa 2 en múltiples especies.

5 Artículos de Control

PBS

ARNip dirigido a GFP - un oligonucleótido bicatenario de 21-mer modificado químicamente por 2'O-metilación en ambas cadenas.

10 CNL - ARNip sin correspondencia a cualquier transcripción de mamífero conocida; un oligonucleótido bicatenario de 19-mer modificado químicamente por 2'O-metilación en ambas cadenas. La Tabla C24 muestra tratamientos de grupos.

Tabla C24: Tratamientos de grupos

ARNip	Dosis de ARNip	Tiempo de Administración (después de la axotomía)	Tiempo de análisis (después de la axotomía)	No. de animales por grupo	Preparación de la muestra
SiGFP, axotomía (OS)	10 ug X2	Tiempo 0 1 semana	2 Semanas	8	montaje plano
SiCasp2_4, axotomía (OS)	10 ug X2	Tiempo 0 1 semana	2 Semanas	8	montaje plano

15 Resultados: El número medio de RGCs supervivientes en los ojos tratados con dos inyecciones intravítreas de 10 µg de Casp2_4 ARNip y sometidas a axotomía fue 533 ± 24 células/mm² en los 14 días después de la lesión. Estos recuentos fueron significativamente mayores que la media de los recuentos de RGC en ojos tratados con GFP ARNip en el régimen similar y sometidos a axotomía, que fue 130 ± 7 células/mm² en los 14 días. En los ojos control no quirúrgicos, el número medio de RGC fue 2138 ± 91 células/mm², que es comparable con el número promedio de RGC reportado en la literatura.

Tabla C25: Media de los números de RGC supervivientes 14 días después de la lesión (n=6 retinas/grupo)

Tratamiento	GFP	Casp2_4
supervivencia media de RGC (células/mm ²)	130	533
SE	7	24
% de supervivencia de RGC a partir de RGC total	6	25
SE	0.32	1.12

20 Los análisis de datos y las estadísticas se realizaron utilizando el software GraphPad Instat por análisis de una vía de la varianza (ANOVA). Todos los datos se ofrecen como la media ± SE, significativamente diferentes a P <0.02.

25 Conclusiones: El aumento de la supervivencia de las RGC debido al efecto neuroprotector de activación de caspasa 2 pro-apoptótico de silenciamiento y favorecer la expresión después de una axotomía mediante tratamiento con ARNip dirigido al gen caspasa 2.

Discusión: En el presente estudio, el Casp2_4 ARNip fue neuroprotector durante al menos 30 días en un modelo de aplastamiento del nervio óptico y durante 14 días en el modelo de axotomía de la pérdida de RGC. Los experimentos de aplastamiento del nervio óptico y axotomía proporcionan un modelo realista de neuropatías ópticas agudas.

Administración no invasiva de compuestos de ARNip induce neuroprotección ocular in vivo en modelos de animales de lesión neuronal ocular

Ejemplo 12: Evaluación de la eficacia neuroprotectora ocular del compuesto de ARNip administrado de forma no invasiva dirigido a caspasa 2 en el modelo de ONC

5 Artículo de prueba: CASP2_4 ARNip (compuesto de Fórmula I)

Artículos de control:

- Metilcelulosa

- CNL - ARNip sin correspondencia a cualquier transcripción de mamífero conocida; un oligonucleótido bicatenario de 19-mer estabilizada por 2'O-metilación en ambas cadenas.

10 Diseño: Las células ganglionares de la retina (RGC) primero se marcaron selectivamente aplicando el trazador retrógrado FluoroGold al colículo superior. Una semana después, los animales fueron sometidos a lesión por aplastamiento del nervio óptico (ONC). Las gotas para los ojos se aplicaron cada dos días durante una semana (3 veces general). 100 µg/3 µl CNL_1, o Casp2_4 ARNip o 3 µl de vehículo MC se aplicaron, la primera dosis se aplicó después de 10 minutos del ONC. Las cuantificaciones de las RGC supervivientes se realizaron a los 7 días después de la ONC
15 contando RGC marcadas con FluoroGold en retinas montadas planas.

Resultados: El número medio de RGC supervivientes en los ojos tratados con 20 µg de Casp2_4 ARNip y sometidos a aplastamiento del nervio óptico fue 445 ± 17 células/mm² a los 7 días después de la lesión. Estos recuentos fueron significativamente mayores que la media de los recuentos de RGC en ojos tratados con ya sea PBS o CNL_1 ARNip y se sometieron a aplastamiento del nervio, que fueron 337 ± 11 células/mm², 341.6 ± 13 células/mm², respectivamente, a los 7 días. La Tabla C26 muestra los resultados. Todos los datos se ofrecen como la media \pm desviación estándar. Los valores se compararon mediante un análisis de una vía de varianza (ANOVA) y se consideraron como significativamente diferentes a $P < 0.01$.
20

Tabla C26: Números media de RGC supervivientes 7 días después de la lesión.

	CNL_1	Casp2_4	vehículo MC
Promedio	341.625	445.4375	337.5
SD	13.03265	17.222331	11.3389342
células/mm ²	934.6785	1218.7073	923.392613
Sd	35.65705	47.119921	31.0230758
RGC/retina	26470.1	34513.789	26150.4788
SD	1009.808	1334.4362	878.573505
% total	26.4701	34.513789	26.1504788
SD	1.009808	1.3344362	0.87857351
Promedio	341.625	445.4375	337.5
SD	13.03265	17.222331	11.3389342

25 Conclusiones: El aumento de la supervivencia de las RGC se debió al efecto neuroprotector de caspasa 2 pro-apoptótico de silenciamiento después de una lesión ONC mediante el tratamiento con gotas para los ojos que contienen ARNip dirigido al gen caspasa 2 en una formulación de metilcelulosa.

Ejemplo 13: Evaluación de la eficacia neuroprotectora ocular del compuesto de ARNip administrado de forma no invasiva dirigido a caspasa 2 en el modelo de IOP

Configuración experimental:

5 Animales de experimentación: Todos los procedimientos de animales se llevan a cabo de acuerdo con las directrices del Consejo Canadiense del Cuidado de Animales para el uso de animales de experimentación (<http://www.ccac.ca/>). Las cirugías se realizaron en ratas macho adultas Brown Norway, criadores retirados, entre 10-12 meses de edad (de 300-400 g), bajo anestesia general por inyección intraperitoneal de 1 ml/kg de cóctel estándar rata que consiste de ketamina (100 mg/ml), xilazina (20 mg/ml) y acepromazina (10 mg/ml).

10 La marcación retrógrada de las RGC: Para los experimentos de supervivencia neuronal, las RGC se marcaron retrógradamente con un 3% de Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato; Molecular Probes, Junction City, OR), un marcador fluorescente carbocianina que persiste durante diversos meses sin decolorarse o fugas y no interfieren con la función de células marcadas. Para la marcación retrógrada, ambos colículos superiores, los principales objetivos de RGC en el cerebro, se establecen y un pequeño trozo de gelfoam espuma de gel (Pharmacia and Upjohn Inc., Mississauga, ON) empapado en Dil serán aplicados a su superficie. Siete días después de la aplicación Dil, el tiempo requerido para la marcación de toda la población RGC, animales se sometieron a cirugía de hipertensión ocular como se describe a continuación.

20 La cirugía de hipertensión ocular: la elevación unilateral y crónica de IOP son inducidos utilizando un método que consiste en la inyección de una solución salina hipertónica en una vena episcleral. Todos los animales que participan en este estudio sólo reciben una única inyección en la vena de solución salina. El ojo seleccionado para el procedimiento está adaptado con un anillo de plástico aplicado al ecuador ocular para confinar la inyección de solución salina al plexo limbal. Una microaguja (30-50 μ m de diámetro) se puede utilizar para inyectar 50 μ l de solución de NaCl 1.85 M estéril a través de una vena episcleral. El anillo de plástico bloquea temporalmente fuera de otras venas episclerales forzando la solución salina en el canal de Schlemm para crear cicatrices aisladas. Los animales se mantienen en una habitación con luz fluorescente bajo constante (40-100 lux) para estabilizar la variación de la IOP circadiana.

30 La medición de la presión intraocular (IOP): IOP de los ojos glaucomatosos y normales (contralateral) se mide en animales despiertos utilizando un tonómetro calibrado (TonoPen XL, Medtronic Solan, Jacksonville, FL). IOP se mide cada dos días durante las dos primeras semanas después de la cirugía de hipertensión ocular; y al menos una vez entre la semana 2 y semana 3 después de la cirugía de hipertensión ocular. Los ojos se vuelven frágiles después de las inyecciones intraoculares en condiciones de alta presión intraocular (véase más adelante), por lo que es aconsejable limitar el número de mediciones de la IOP en que se trata de poner presión adicional sobre la córnea para obtener una lectura confiable. La IOP media (mm de Hg \pm S.E.M.) por ojo es considerada como el promedio de todas las lecturas de IOP desde el inicio de la elevación de la presión. La IOP máxima medida en cada ojo individual, ojo contralateral glaucomatoso o normal se define como la IOP pico y este valor se utiliza para estimar la IOP máxima media para cada grupo. La IOP integral positivo se calcula como el área bajo la curva de IOP en el ojo glaucomatoso menos que la del otro ojo normal a partir de la cirugía de hipertensión ocular a la eutanasia. La IOP integral representa la exposición total de la IOP, acumulada a lo largo de todo el experimento.

40 Inyección intraocular de moléculas de ARNip: inyecciones intraoculares se llevan a cabo mediante la infusión de cada compuesto de ARNip a una concentración de 20 μ g en la cámara vítrea del ojo izquierdo (volumen total de inyección: 5 μ l). El ojo derecho sirve como control contralateral. Además, los ojos no operados de ratas naïve se utilizan como controles intactos. Inyecciones intravítreas se llevan a cabo utilizando una jeringa Hamilton de 10 μ adaptada con una aguja de vidrio calibre -32. La punta de la aguja se inserta en el hemisferio superior del ojo, a nivel de la parte plana, en un ángulo de 45 ° a través de la esclerótica en el cuerpo vítreo. Esta ruta de administración evita el desprendimiento de retina o lesiones a las estructuras del ojo, incluyendo la lente y el iris, que puede liberar factores que inducen la regeneración y supervivencia de RGC. La inyección se lleva a cabo durante un período de 2 min y la aguja se mantiene en su lugar por unos 2 min más, después de lo cual se retira con suavidad. Se utilizó pegamento quirúrgico (Indermill, Tyco Health Care, Mansfield, MA, USA) para sellar el sitio de la inyección.

Instilación tópica de gotas para los ojos de moléculas ARNip:

50 Diariamente durante 3 semanas después de la inducción de la IOP un volumen de muestra de 3 μ l de 100 μ g de ARNip se aplican a la superficie de la córnea bilateralmente a los animales anestesiados, por una punta de pipeta roma (puntas con filtro de 10 μ l estéril (corta)). Los animales se colocan en un ambiente cálido para prevenir la hipotermia inducida por la anestesia

Cuantificación de RGC supervivientes soma: La cuantificación de los cuerpos de RGC se realizó por duplicado y de manera enmascarada. Para recuentos de densidad de RGC, las ratas se anestesiaron profundamente y luego fueron

perfundidas transcárdialmente con 4% de paraformaldehído (PFA) en solución reguladora de fosfato 0.1 M y ambos ojos se enuclearon inmediatamente. Las retinas se diseccionan y se montan plana en un portaobjetos de vidrio con el lado de la capa de células ganglionares arriba. Bajo microscopía de fluorescencia, las neuronas marcadas con Dil se recuentan en 12 áreas de la retina estándar como se describe.

- 5 Se induce la IOP (presión intra ocular) y se siguió durante 2 semanas. Entonces, CASP2_4 o ARNip control se administran por cualquiera de las Gotas para los ojos para los ojos (ARNip en una formulación de metilcelulosa al 2%) o IVT (ARNip en PBS) como se detalla en el diseño del estudio en la Tabla C27.

Tabla C27: Diseño del estudio

Grupo	Tratamiento	Inyección intravítrea (5 uL)		Gotas para los ojos (3 uL/ojo)		Terminación
		Dosis	Frecuencia	Dosis	Frecuencia	
1	CASP2_4	20 ug	una vez a la semana a partir de 2 semanas después de la inducción de la IOP (total 3 veces durante 3, 4, 5 semanas)	NA *	NA	5 semanas después de la inducción de la IOP
2	siGFP	20 ug	una vez a la semana a partir de 2 semanas después de la inducción de la IOP (total 3 veces durante 3, 4, 5 semanas)	NA *	NA	5 semanas después de la inducción de la IOP
3	CASP2_4	20 ug	una vez después de 2 semanas de la inducción de la IOP en el comienzo de la semana 3	100 ug	Todos los días durante las semanas 4 y 5 después de la inducción de la IOP	5 semanas después de la inducción de la IOP
4	siGFP	20 ug	una vez después de 2 semanas de la inducción de la IOP en el comienzo de la semana 3	100 ug	Todos los días durante las semanas 4 y 5 después de la inducción de la IOP	5 semanas después de la inducción de la IOP
5	CASP2_4			100 ug	Todos los días durante la semana 3 después de la inducción de la IOP	3 semanas después de la inducción de la IOP
6	siGFP			100 ug	Todos los días durante la semana 3 después de la inducción de la IOP	3 semanas después de la inducción de la IOP

* NA - no aplicable, Tamaño del grupo: n = 5

- 10 Los resultados muestran que administrar de forma no invasiva el ARNip formulado en una formulación de metilcelulosa al 2% provee neuroprotección e incrementa la supervivencia neuronal.

Ejemplo 14: Modelo de aplastamiento del nervio óptico (ONC) en rata: Comparación de la administración de ARNip intravítrea a administración tópica de gotas para los ojos

- 15 Para transección del nervio óptico, el nervio óptico orbital (ON) de ratas anestesiadas se expone a través de un enfoque supraorbital, las meninges cortadas y todos los axones en el ON cortado transversalmente por aplastamiento con fórceps durante 10 segundos, 2 mm de la lámina cribosa.

- 20 Los compuestos de ARNip se administraron solos o en combinación en 5uL de volumen (20 ug/uL) en forma de gotas para los ojos. Inmediatamente después del aplastamiento del nervio óptico (ONC), 20 ug/10 ul de ARNip de prueba o 10 ul de PBS se administra por IVT a uno o ambos ojos de ratas Wistar adultas. Después de eso, se aplica ARNip al ojo por ED cada dos días y los niveles de ARNip tomados en las retinas enteras disecadas y congeladas en forma

instantánea a las 5 horas y 1 día, y más tarde a los 2 días, 4 días, 7 días, 14 días y 21 días después de la inyección se determina. Experimentos similares se llevan a cabo con el fin de la actividad de prueba y la eficacia de ARNip administrado a través de gotas para los ojos.

5 La Tabla C28 a continuación muestra un procedimiento experimental para determinar la eficacia de ARNip de prueba (siTEST1; siTEST2) solo o en combinación, en el modelo de ONC. Se contemplan Parámetros de dosificación adicionales, concentraciones, horarios de terminación, formulaciones y similares.

Tabla C28: Diseño de estudio

Grupo (n = 8)	ojo derecho (n = 8)	ojo izquierdo (n = 8)	Terminación
1 y 2	20 µg de siTEST1 en los días 0 y 7 (intravítrea)	20 µg de siGFP en días 0 y 7 (intravítrea)	Día 21
3 y 4	20 µg de siTEST1 en los días 10 y 20 (intravítrea)	20 µg de siGFP en días 10 y 20 (intravítrea)	Día 30
5 y 6	PBS (gotas para los ojos) cada dos días a partir del día 0, 3 veces/semana)	PBS en los días 0 y 7 (intravítrea)	Día 21
7 y 8	50µg de siTEST1 (gotas para los ojos) cada dos días a partir del día 0, 3 veces/semana)	50 µg de siGFP (gotas para los ojos) cada dos días a partir del día 0, 3 veces/semana)	Día 10
9 y 10	50µg de siTEST1 (gotas para los ojos) cada dos días a partir del día 0, 3 veces/semana)	50 µg de siGFP (gotas para los ojos) cada dos días a partir del día 0, 3 veces/semana)	Día 21
11 y 12	50µg de siTEST2 (gotas para los ojos) cada dos días a partir del día 0, 3 veces/semana)	50 µg de siGFP (gotas para los ojos) cada dos días a partir del día 0, 3 veces/semana)	Día 21
13 y 14	20 µg de siTEST1 + 20 µg de siTEST2 (gotas para los ojos) cada dos días a partir del día 0, 3 veces/semana)	40 µg siGFP en los días 0, 7 y 20 (gotas para los ojos) cada dos días a partir del día 0, 3 veces/semana)	Día 21
15 y 16	20 µg de siTEST1 + 20 µg de siTEST2 en los días 0 y 10 (intravítrea) n = 4	40 µg de siGFP en días 0 y 10 (intravítrea) n = 4	Día 21

10 Resultados: De acuerdo con los resultados que se obtienen en este estudio administración no invasiva del compuesto de ARNip diseñado para reducir la expresión de un gen diana provee neuroprotección e incrementa la supervivencia neuronal en la retina.

La Tabla B revela pares de oligonucleótidos sentido y ácidos nucleicos antisentido útiles en la síntesis de compuestos de ARNip no modificados o modificados químicamente. La tabla revela la posición de la cadena sentido a lo largo del ARNm para al menos una variante.

15

ES 2 563 984 T3

Tabla B CASP2 - caspasa 2, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis

No.	ARNip sentido	ARNip antisentido	Otros Sp	Humano-39995058 :148-1506
1	GAGUGAUGCCGGUAAAGAA	UUCUUUACCGGCAUCACUC	Cyn, Mnk	[1182-1200]
2	GGAAGGUGUCCAAAUUUAA	UUAAAUUUGGACACCUUCC	Mnk	[1965-1983]
3	GGGUCGACAUAGUAUGGAA	UCCAUAUAUGUCGACCC	Mnk	[4025-4043]
4	GGAGAGUGAUGCCGGUAAA	UUUACCGGCAUCACUCUCC	Cyn, Mnk	[1179-1197]
5	CAUCGAGGCUCUUGCUCAA	UUGAGCAAGAGCCUCGAUG	Mnk	[1305-1323]
6	GGAUCAUGUAAAUGCUCAA	UUGAGCAUUUACAUGAUCC	Mnk	[2505-2523]
7	AGGUGAACGCACUUAUCAA	UUGAUAAAGUGCGUUCACCU	Mnk	[1373-1391]
8	CCAGGAUUUGGUUGUUUAA	UUAAACAACCAAUCCUGG		[3229-3247]
9	CAAUCAACCUGCACUUCAU	AUGAAGUGCAGGUUGAUUG	Mnk	[2368-2386]
10	CACAGGAAAUGCAAGAGAA	UUCUCUUGCAUUUCCUGUG	Cyn, Rat, Ms, GP, Chn, Mnk	[890-908]
11	GCCCAAGCCUACAGAACAA	UUGUUCUGUAGGCUUGGGG C	Cyn, Mnk	[1061-1079]
12	UGACCAGACUGCACAGGAA	UCCUGUGCAGUCUGGUCA	Cyn, Rat, GP, Dog, Mnk	[879-897]
13	CAAGGAUCGGGAAGGUUAU	AUAACCUUCCCGAUCCUUG	Mnk	[1389-1407]
14	CAACUUCCUGUUCUUUAA	UUAAAGAACAGGGAAGUUG	Mnk	[2663-2681]
15	GGAUUUGGUUGUUUAAUA	UAUUUAAACAACCAAUCC		[3232-3250]
16	CCACCAAUCUGUCUAGAA	UUCUAGACAGAUUUGGUGG	Mnk	[2474-2492]
17	CCUACAGAACAACCAAAA	UUUUGGUUUGUUCUGUAGG	Mnk	[1068-1086]
18	CAGGAAACUCUAAAAAGA	UCUUUUUAGAGUUUCCUG	Cyn, Mnk	[256-274]
19	CAUCAUCAGGAAACUCUAA	UUAGAGUUUCCUGAUGAUG	Mnk	[250-268]
20	ACAGGAAAUGCAAGAGAAA	UUUCUCUUGCAUUUCCUGU	Cyn, Rat, Ms, GP, Chn, Mnk	[891-909]
21	AGGAAACUCUAAAAAGAA	UUCUUUUUAGAGUUUCCU	Cyn, Mnk	[257-275]
22	GAAGGUGUCCAAAUUUAAU	AUUAAAUUUGGACACCUUC		[1966-1984]
23	GCAUCCUCAUCAUCAGGAA	UCCUGAUGAUGAGGAUGC	Mnk	[243-261]
24	GAGUUUGGAAGGUGUCCAA	UUGGACACCUUCCAAACUC	Mnk	[1959-1977]
25	UGCCCAUGGAAGUCUCAA	UUUGAGACUCCAUGGGCA	Mnk	[2179-2197]

ES 2 563 984 T3

26	GGACAUCAUCACCUUGGAA	UCCAAGGUGAUGAUGUCC	Cyn, Dog, Mnk	[336-354]
27	CCUGACAAGUGAAGUUGUA	UACAACUUCACUUGUCAGG	Mnk	[1766-1784]
28	UGGUGUCCUUCUUCUCAA	UUGAGGAAGAAGGACACCA		[3491-3509]
29	CGUCCAUCUCUCUCCUUA	UAAGGGAGAGAGAUGGACG	Mnk	[2332-2350]
30	CUAUGGUGUGGAUGGGAAA	UUUCCCAUCCACACCAUAG	Mnk	[996-1014]
31	CAAUAUACACGGAUUAUUA	UAAUAAUCCGUGUAUAUUG	Mnk	[3812-3830]
32	CGUUGAGCUGUGACUACGA	UCGUAGUCACAGCUCAACG	Rb, Dog, Mnk	[539-557]
33	UCAUGUAAAUGCUCAAAGA	UCUUUGAGCAUUUACAUGA		[2508-2526]
34	AGUGAUGCCGGUAAAGAAA	UUUCUUUACCGGCAUCACU	Cyn, Mnk	[1183-1201]
35	ACUCCUGAAUUUUUAUCAA	UUUGAUAAAUAUCAGGAGU	Mnk	[685-703]
36	GCACUUCACUGGAGAGAAA	UUUCUCUCCAGUGAAGUGC	Cyn, Rat, Ms, Dog, Mnk	[771-789]
37	CUACAAUCCUACCUUUUGA	UCAAAGGUAGGAWGUAG	Mnk	[3776-3794]
38	GACCAGACUGCACAGGAAA	UUUCCUGUGCAGUCUGGUC	Cyn, Rat, GP, Chn, Dog, Mnk	[880-898]
39	AAGCAAACAUGACUAGAGA	UCUCUAGUCAUGUUUGCUU		[2011-2029]
40	CCCUCAUUUAAAUGUAAA	UUUACAUUUAAAUGAGGG	Mnk	[3297-3315]
41	CUAUGACGUCCAUGUUCUA	UAGAACAUGGACGUCAUAG	Mnk	[858-876]
42	AGGACAUCAUCACCUUGGA	UCCAAGGUGAUGAUGUCCU	Cyn, Dog, Mnk	[335-353]
43	UCAUCAUCAGGAAACUCUA	UAGAGUUUCCUGAUGAUGA	Mnk	[249-267]
44	GCAGAAUUUUGCACAGUUA	UAACUGUGCAAAAUCUGC	Mnk	[912-930]
45	GACUGCACAGGAAAUGCAA	UUGCAUUUCCUGUGCAGUC	Cyn, Rat, GP, Chn, Mnk	[885-903]
46	CCAUCUCUCUCCCUUACUA	UAGUAAGGGAGAGAGAUGG	Mnk	[2335-2353]
47	CUGCCUUUGGGUCGACAU	UAUGUCGACCCAAAGGCAG	Mnk	[4017-4035]
48	UGACAAGUGAAGUUGUAAA	UUUACAACUUCACUUGUCA	Mnk	[1768-1786]
49	CUGUCUGCCUUCAGGUGAA	UUCACCUGAAGGCAGACAG	Cyn, Mnk	[659-677]
50	GGAUGUGGAC CACAGUACU	AGUACUGUGGUCCACAUC	Cyn, Rb, Mnk	[813-831]
51	UAGUCAAGGUGCUCAAUAA	UUAUUGAGCACCUUGACUA	Mnk	[3959-3977]
52	CCUUUGGGUCGACAUAGUA	UACUAUGUCGACCCAAAGG	Mnk	[4020-4038]
53	GCAAGGAGAUGUCUGAAUA	UAUUCAGACAUCUCCUUGC	Mnk	[1433-1451]
54	CCAUGGAAGUCUCAAGAU	AUCUUUGAGACUCCAUGG	Mnk [2182-2200]

ES 2 563 984 T3

55	GAAGAAGCAAACAUGACUA	UAGUCAUGUUUGCUUCUUC		[2007-2025]
56	CCAGCUCCUUUUCUGUGAA	UUCACAGAAAAGGAGCUGG	Mnk	[1679-1697]
57	GAAGAGCCUGACAAGUGAA	UUCACUUGUCAGGCUCUUC	Mnk	[1760-1778]
58	UCCUCAACUUGCUGCCUAA	UUAGGCAGCAAGUUGAGGA	Cyn, Mnk	[407-425]
59	CAUAGUGGGCCUJCAUAAA	UUAAUGAAGGCCACUAUG		[3714-3732]
60	CAUCAGGAAACUCUAAAAA	UUUUUJAGAGUUUCCUGAUG	Cyn, GP, Mnk	[253-271]
61	CCGUGGAGAUGAGACUGAU	AUCAGUCUCAUCUCCACGG	Cyn, GP, Chn, Mnk	[1107-1125]
62	UCAUCAGGAAACUCUAAAA	UUUUJAGAGUUUCCUGAUGA	Mnk	[252-270]
63	AGUCAAGGUGCUCAAUAAA	UUUAUUGAGCACCUUGACU	Mnk	[3960-3978]
64	GGUGCAAGGAGAUGUCUGA	UCAGACAUCUCCUUGCACC	Mnk	[1430-1448]
65	UGAAGAGCCUGACAAGUGA	UCACUUGUCAGGCUCUUCA	Mnk	[1759-1777]
66	GCCUACAGAACAAACCAAA	UUUGUUUUGUUCUGUAGGC	Mnk	[1067-1085]
67	AAUCCUACCUUUUGAUAAA	UUUAUCAAAAGGUAGGAUU	Mnk	[3780-3798]
68	GCCUUUGGGUCGACAUAGU	ACUAUGUCGACCCAAAGGC	Mnk	[4019-4037]
69	CAGGAAUGUUUCAGCUGCA	UGCAGCUGAAACAUUCCUG	Mnk	[1738-1756]
70	GAAGCCCUUUGC CUGUAGA	UCUACAGGCAAAGGGCUUC	Mnk	[1695-1713]
71	GGGAGAGGGCAUAUAAAUU	AAUUUAUAUGCCCUCUCCC		[1802-1820]
72	CCAUCAUCUCUGCCUUUGA	UCAAAAGGCAGAGAUGAUGG	Mnk	[1645-1663]
73	UGGAAGGUGUCCAAAUUUA	UAAAUUUGGACACCUUCCA	Mnk	[1964-1982]
74	CUCCCUAGACAAUAAAAGAU	AUCUUUAUUGUCUAGGGAG	Cyn, Mnk	[636-654]
75	AAACGAGGUUCCUGGUACA	UGUACCAGGAACCUCGUUU	Cyn, Mnk	[1288-1306]
76	CAUCCUCAUCAUCAGGAAA	UUUCCUGAUGAUGAGGAUG	Mnk	[244-262]
77	CCAACUCCUGUUCUUUA	UAAAGAACAGGGAAGUUGG	Mnk	[2662-2680]
78	CUCUAGUCACCCUCUJCAA	UUGAAGAGGGUGACUAGAG	Cyn, Rat, Ms, Mnk	[830-848]
79	CAAGGUGCUCAAUAAAUAU	AUAUUUAUUGAGCACCUUG	Mnk	[3963-3981]
80	CUUGCUGCAGUGUCCAGAA	UUCUGGACACUGCAGCAAG	Mnk	[2035-2053]
81	CGACAGAUACUGUGGAACA	UGUCCACAGUAUCUGUCG	Cyn, Mnk	[617-635]
82	GAACCCUUCUGCUUUCUAU	AUAGAAAGCAGAAGGGUUC	Mnk	[3275-3293]
83	GACCAUCUCCUAUCUUUUA	UAAAAGAUAGGAGAUGGUC	Mnk	[1902-1920]
84	UGUGGACCACAGUACUCUA	UAGAGUACUGUGGUCCACA	Cyn, Rb, Mnk	[816-834]
85	AACACUCCCUAGACAAUAA	UUAUUGUCUAGGGAGUGUU	Cyn, Mnk	[632-650]

ES 2 563 984 T3

86	GAAACUGCUCCAGCUCCAA	UUGGAGCUGGAGCAGUUUC		[1011-1029]
87	AGUGAUUGCWUUAUUACA	UGUAAUAAAAGCAAUCACU	Mnk	[1864-1882]
88	CCUCCAGUCUGUUCUCACA	UGUGAGAACAGACUGGAGG		[3039-3057]
89	UGUUCUUUUUGACAAUAUA	UAUAUUUGUCAAAGGAACA	Mnk	[3800-3818]
90	AAGCACUGAGGGAGACCAA	UUGGUCUCCUCAGUGCUU	Cyn, Mnk	[458-476]
91	CAGCUGUUGUUGAGCGAAU	AUUCGCUCAACAACAGCUG		[295-313]
92	CAAAUUUAAUGUAGACAUU	AAUGUCUACAUUAAAUUUG		[1975-1993]
93	UGUCCAAUUUAAUGUAGA	UCUACAUUAAAUUUGACA		[1971-1989]
94	GCUUCAGCAUGUACUCCCA	UGGGAGUACAUGCUGAAGC	Cyn, Mnk	[519-537]
95	CAAAAUGUUCUUCAUCCA	UGGAUGAAGAACAUUUUUG	Rat, Ms, Mnk	[1082-1100]
96	GAAGUAUUUGAGAGAGAGA	UCUCUCUCUCAAAUACUUC	Mnk	[4041-4059]
97	GAAGCCUUGCACUCCUGAA	UUCAGGAGUGCAAGGCUUC	Cyn, Mnk	[675-693]
98	AAUGGUGAUUUUCUUGC UAA	UUAGCAAGAAUCACCAUU	Mnk	[3370-3388]
99	GCAUUUUUAGCUCCUUGAA	UUCAAGGAGCUAAAAUUGC	Mnk	[3872-3890]
100	GGCUCUGAAGAAGCAAACA	UGUUUGCUUCUUCAGAGCC		[2001-2019]
101	UCCUGAAUUUUAUCAACA	UGUUUGAUAAAAUUCAGGA	Mnk	[687-705]
102	CCGACAUGCUGGUUAAGGU	ACCUUAACCAGCAUGUCGG	Rb, Mnk	[1358-1376]
103	UGGAGAGAAAGAACUGGAA	UUCAGUUCUUCUCUCCA	Cyn, Mnk	[780-798]
104	CUAGGCCUGUAGUAGUCA	UUGACUACUACAGGCCUAG	Mnk	[3947-3965]
105	GAGUAACUCCUUCACAU	AUGUGAAGGAAGUUAUCUC	Mnk	[3905-3923]
106	CUCCCUUCUUUACCUUCAU	AUGAAGGUAAAGAAGGGAG		[2436-2454]
107	CUACAGAACAAACCAAAAA	UUUUUGGUUUUGUUCUGUAG	Rat, Mnk	[1069-1087]
108	CAGGAUUUGGUUGUUUAAA	UUUAAACAACCAAUCCUG		[3230-3248]
109	CUCUGAGCUUUGUUACUGA	UCAGUAACAAAGCUCAGAG	Dog, Mnk	[2217-2235]
110	UAUCCUGCUUAUCUGAAA	UUUCAGAUAAAGCAGGGAUA	Mnk	[2639-2657]
111	GGGCCUUCAUUAAAUGUUU	AAACAUUUAUGAAGGCC		[3720-3738]
112	GCUUUACAGGAUCAUGUAA	UUACAUGAUCCUGUAAAGC		[2497-2515]
113	CUAGAGUGAGAGUUUGGAA	UUCCAAACUCUCACUCUAG	Mnk	[1950-1968]
114	GGCUGUAAAUGAGGGCAGA	UCUGCCCUCAUUUACAGCC	Mnk	[3651-3669]
115	CGACUUGAGUCUCCUUUU	AAAAGGGAGACUCAAGUCG	Mnk	[555-573]
116	CCUUGAACCUCAUUAUUG	CAUUUAUUGAGGUUCAAGG	Mnk	[3355-3373]

ES 2 563 984 T3

117	AACCAAAAUGUUCUUCAU	AUGAAGAACAUUUUUGGUU	Rat, Mnk	[1079-1097]
118	CCAGUCUGUUCUCACAUAA	UUAUGUGAGAACAGACUGG		[3042-3060]
119	CUGACAAGUGAAGUUGUAA	UUACAACUUCACUUGUCAG	Mnk	[1767-1785]
120	CAUGCAUCCUCAUCAUCAG	CUGAUGAUGAGGAUGCAUG	Mnk	[240-258]
121	GAGGAUAUGUUGCUCACCA	UGGUGAGCAACAUAUCCUC	Cyn, Mnk	[490-508]
122	GGUUGACCAACAAGAUGGA	UCCAUCUUGUUGGUCAACC	Mnk	[1131-1149]
123	CCUGCACUUCAUAUCUAGA	UCUAGAUUAUGAAGUGCAGG	Mnk	[2375-2393]
124	CACUCCUGAAUUUUAUCAA	UUGAUAAAUUCAGGAGUG	Mnk	[684-702]
125	GAAACUGCAGAAUUUUGCA	UGCAAAAUUCUGCAGUUUC	Mnk	[906-924]
126	GGCUCUUGCUCUAGUGUUU	AAACACUUGAGCAAGAGCC	Mnk	[1311-1329]
127	UCUGAAGAAGCAAACAUGA	UCAUGUUUGCUUCUUCAGA		[2004-2022]
128	GCUCCUUGAAGACAUAUCA	UGAUUUGUCUUCAAGGAGC	Mnk	[3881-3899]
129	GUUUAAACUCUCCUUUGA	UCAAAGGAGAGUUUAAUAC	Mnk	[2562-2580]
130	GAGCGAAUUGUUAGAACAU	AUGUUCUAACAAUUCGCUC		[306-324]
131	CCAAUAAAUGCUCAUUUU	AAUUGAGCAUUUUAUUUGG	Mnk	[4104-4122]
132	GUGAUGCCGGUAAAGAAAA	UUUUCUUUACCGGCAUCAC	Cyn, Mnk	[1184-1202]
133	CUUCAUAUCUAGAUUUCUA	UAGAAAUCUAGAUUAUGAAG	Mnk	[2381-2399]
134	CCUUGCAUUUGUACCUUUAU	AUAAGGUACAAAUGCAAGG	Mnk	[2153-2171]
135	AAACCUUUAUCCCUGCUUA	UAAGCAGGGAAUAAAGGUUU	Mnk	[2632-2650]
136	GUAAAUGCUCAAAGAUGUA	UACAUCUUUGAGCAUUUAC		[2512-2530]
137	ACAUGCUGGUUAAGGUGAA	UUCACCUUAACCAGCAUGU	Cyn, Rb, Mnk	[1361-1379]
138	CCGCCUUUUUGUCCUAGA	UCUAGGACAAAAGGGCGG		[1936-1954]
139	CUUUUCCUCCUGAGAAA	UUUCUCAGGAAGGAAAAAG	Mnk	[2313-2331]
140	UCAUUAAAUGUUUGUUGAA	UUCAACAAACAUUUAAUGA		[3726-3744]
141	GACAUAGUAUGGAAGUAUU	AAUACUCCAUAUCUAUGUC	Mnk	[4030-4048]
142	GGGCUAUGACGUCCAUGUU	AACAUGGACGUCAUAGCCC	Cyn, Mnk	[855-873]
143	GAUAAAUGUUCUUUUUGA	UCAAAAGGAACAUUUUAUC	Mnk	[3793-3811]
144	CCAGUGGAAGGACACUCUU	AAGAGUGUCCUCCACUGG	Mnk	[2090-2108]
145	GUGUGAUAGAGCCUUUGAU	AUCAAAAGGCUCUAUCACAC	Mnk	[1557-1575]
146	AUCAGGAAACUCUAAAAAA	UUUUUUAGAGUUUCCUGAU	Cyn, Mnk	[254-272]
147	AGCUGUGACUACGACUUGA	UCAAGUCGUAGUCACAGCU	Rb, Mnk	[544-562]

ES 2 563 984 T3

148	CAGAAUCCACCGGUGCAA	UUGCACCGGUGGAAUUCUG		[1418-1436]
149	CAAUGUGCACUUCACUGGA	UCCAGUGAAGUGCACAUUG	Cyn, Ms, Dog, Mnk	[765-783]
150	CAUGUAAAUGCUCAAAGAU	AUCUUUGAGCAUUUACAUG		[2509-2527]
151	CCCUUGAACCUCAUJAAAU	AUUUAAUGAGGUUCAAGGG	Mnk	[3354-3372]
152	UGGUGUUGAGCAAUGUGCA	UGCACAUUGCUC AACACCA	Cyn, Mnk	[755-773]
153	CAAUCCUACCUUUUGAUAA	UUAUCAAAGGUAGGAUUG	Mnk	[3779-3797]
154	UGGAAAUGAGGGAGCUCAU	AUGAGCUCCCUCAUUUCCA	Ms, Rb, Mnk	[350-368]
155	UGCUIIACAGGAUCAUGUA	UACAUGAUCCUGUAAAGCA		[2496-2514]
156	GUUGUUGAGCGAAUUGUUA	UAACAAUUCGCUCAACAAC		[300-318]
157	GCAUUUGUACCUUUAUUGAU	AUCAUAAGGUACAAAUGC	Mnk	[2157-2175]
158	AAUCAACCUGCACUUCAUA	UAUGAAGUGCAGGUUGAUU	Mnk	[2369-2387]
159	AGGAUUUGGUUGUUUAAAU	AUUUAAACAACCAAUCCU		[3231-3249]
160	AAGAGAAACUGCAGAAUUU	AAAUUCUGCAGUUUCUCUU	Mnk	[902-920]
161	AACCUUAGCUACAAUCCUA	UAGGAUUGUAGCUAAGGUU	Mnk	[3768-3786]
162	UGUUUCAGCUGCAGUUGAA	UUCAACUGCAGCUGAAACA	Mnk	[1744-1762]
163	CAUUUAUUGCAGUUUAUUAU	AUAUAAACUGCAAUAAAUG	Mnk	[3592-3610]
164	GAUUGCUUUUAUUAUUAUA	UAAUGUAAUAAAAGCAAUC	Mnk	[1867-1885]
165	CACCAAUCUGUCUAGAAU	AUUCUAGACAGAUUUGGUG	Mnk	[2475-2493]
166	ACUUAUCAAGGAUCGGGAA	UCCCCGAUCCUUGAUAAAGU	Cyn, Mnk	[1383-1401]
167	CCACAGGAGGUGUGAUAGA	UCUAUCACACCUCUGUGG	Mnk	[1548-1566]
168	UGCUCAAAGAUGUAAUGUA	UACAUUACAUCUUUGAGCA		[2517-2535]
169	CUUUGAUCUUCAGGAUGCA	UGCAUCCUGAAGAUCAAAG	Mnk	[1569-1587]
170	GCUACUUUUACUUGUUCAU	AUGAACAAGUAAAAGUAGC	Mnk	[3615-3633]
171	UGUCUAGAAUCCUGCUUUA	UAAAGCAGGAUUCUAGACA	Mnk	[2484-2502]
172	UCACCUUGGUUUAUGAGAA	UUCUCAUAAACCAAGGUGA	Mnk	[3320-3338]
173	AACCUUUUACCCUGCUUAU	AUAAGCAGGGAUAAAGGUU	Mnk, Mnk	[2633-2651]
174	GGAGAGAAAGAACUGGAAU	AUCCAGUUCUUUCUCUCC	Mnk	[781-799]
175	GAGGUUCCUGGUACAUCGA	UCGAUGUACCAGGAACCUC	Mnk	[1292-1310]
176	GUCGACAGAUACUGUGGAA	UCCACAGUAUCUGUCGAC	Cyn, Mnk	[615-633]
177	GCAGUUUAUAUAUAUGCUA	UAGCAUAUAUAUAAACUGC		[3600-3618]
178	CACUUAUCAAGGAUCGGGA	UCCCGAUCCUUGAUAAAGUG	Cyn, Mnk	[1382-1400]

ES 2 563 984 T3

179	AGCCUACAGAACAAACCAA	UUGGUUUGUUCUGUAGGCU	Mnk	[1066-1084]
180	ACACUCCCUAGACAAUAAA	UUUAUUGUCUAGGGAGUGU	Cyn, Mnk	[633-651]
181	ACAUUGCCUUGCAUUGUA	UACAAAUGCAAGGCAAUGU		[2147-2165]
182	CUUGCACUCCUGAAUUUUA	UAAAAUUCAGGAGUGCAAG	Cyn, Mnk	[680-698]
183	ACAUCAUCACCUUGGAAAU	AUUUCCAAGGUGAUGAUGU	Cyn, Dog, Mnk	[338-356]
184	CACGCGCUCAGACAUGAUA	UAUCAUGUCUGAGCGCGUG	Cyn, Mnk	[1224-1242]
185	CUGGAGAAGGACAUCAUCA	UGAUGAUGUCCUUCUCCAG	Cyn, Rb, Dog, Mnk	[328-346]
186	CCUUAUUGAUCUUUGCCCA	UGGGCAAAGAUCAAUAAGG	Mnk	[2166-2184]
187	GGAACACUCCCUAGACAAU	AUUGUCUAGGGAGUGUUC	Cyn, Mnk	[630-648]
188	CCUGAGCAGUCUACUUCU	AGAAGUAGACUGCUCAGGG	Mnk	[3537-3555]
189	CAUGC GGAACACCAAACGA	UCGUUUGGUGUUCGCAUG	Mnk	[1275-1293]
190	UAGUAGUCAAGGUGCUCAA	UUGAGCACCUUGACUACUA	Mnk	[3956-3974]
191	CCUGCUUUCUCUUCAGUA	UACUGAAAGAGAAAGCAGG		[2546-2564]
192	CAGUUGAAGAGCCUGACAA	UUGUCAGGCUCUUAACUG	Mnk	[1755-1773]
193	UGGAAAGAACCACGCAGGA	UCCUGCGUGGUUCUUUCCA	Mnk	[1146-1164]
194	UGUUGUUGAGCGAAUUGUU	AACAAUUCGCUCAACAACA		[299-317]
195	GUGCAAGGAGAUGUCUGAA	UUCAGACAUCUCCUUGCAC	Mnk	[1431-1449]
196	UUUACAGGAUCAUGUAAA	AUUUACAUGAUCCUGUAAA		[2499-2517]
197	CAGGAUGCACGGUUUCUGU	ACAGAAACCGUGCAUCCUG	Mnk	[1579-1597]
198	CAUaucucuccuucuuua	UAAAGAAGGGAGAGUAUG		[2429-2447]
199	CCCAUGGUCCCUAGCAAAA	UUUUGCUAGGGACCAUGGG	Mnk	[3926-3944]
200	UCAAGGUGCUCAAUAAAUA	UAUUUAUUGAGCACCUUGA	Mnk	[3962-3980]
201	AGAAGGACAUCAUCACCUU	AAGGUGAUGAUGUCCUUCU	Cyn, Dog, Mnk	[332-350]
202	CCCAUGGAAGUCUCAAGA	UCUUUGAGACUCCAUGGG	Mnk	[2181-2199]
203	ACUGGAAUUUCGCUCUGGA	UCCAGAGCGAAAUCCAGU	Cyn, Mnk	[792-810]
204	UCUGAGCUUUGUUACUGAA	UUCAGUAACAAAGCUCAGA	Dog, Mnk	[2218-2236]
205	GCAUUUAUUGCAGUUUAUA	UAUAAACUGCAAUAAAUGC	Mnk	[3591-3609]
206	GUUUGGAAGGUGUCCAAAU	AUUUGGACACCUUCCAAAC	Mnk	[1961-1979]
207	AAGAAAAGUUGCCGAAGAU	AUCUUCGGCAACUUUUCUU	Mnk	[1196-1214]
208	CAUUAGUUAAGAUGUCUGA	UCAGACAUCUUAACUAAUG	Mnk	[1881-1899]
209	GCAGAAACCUUGUUUGUUU	AAACAAACAAGGUUCUGC	Mnk	[3665-3683]

ES 2 563 984 T3

210	AACUCUCCUUUGAUUUAU	AUAAUAUCAAGGAGAGUU	Mnk	[2568-2586]
211	AAAUGUUCUUUUUGACAAU	AUUGUCAAAAGGAACAUUU	Mnk	[3797-3815]
212	GCAAAAUGCUAGGCCUGUA	UACAGGCCUAGCAUUUUGC	Mnk	[3939-3957]
213	GCACAGGAAAUGCAAGAGA	UCUCUUGCAUUUCCUGUGC	Rat, Ms, GP, Chn, Mnk	[889-907]
214	GCACAUAGUGGGCCUUCAU	AUGAAGGCCACUAUGUGC	AUGAAGGCCACUA UGUGC	[3711-3729]
215	AGCUUAUCUCCUGCUUCA	UGAAGCAGGGAGAUAGCU	Mnk	[2412-2430]
216	UAUUGUUUUAACCUAGAA	UUCUAGGUUGAAAACAAUA		[2615-2633]
217	GUGGAACACUCCUAGACA	UGUCUAGGGAGUGUCCAC	Cyn, Dog, Mnk	[628-646]
218	CUCCUGCUUCAUAUCUCU	AGAGAUUGAAGCAGGGAG	Mnk	[2419-2437]
219	CAUUUAAAUGUAAACUCU	AGAGUUUACAUUUUAAAUG	Mnk	[3301-3319]
220	CGACAUAGUAUGGAAGUAU	AUACUCCAUAUAUGUCG	Mnk	[4029-4047]
221	AAUGUUUGUUGAAUAAAAG	CUUUUAUUAACAAACAUU	Mnk	[3732-3750]
222	CCAAUUUUAUGUAGACAU	AUGUCUACAUUAAAUUUGG		[1974-1992]
223	UGAGUAACUCCUUCACA	UGUGAAGGAAGUUAUCUCA	Mnk	[3904-3922]
224	GAGCCUUUGAUCUUCAGGA	UCCUGAAGAUCAAAGGCUC	Mnk	[1565-1583]
225	CCUUUAUCCUGCUUAUCU	AGAUAAAGCAGGGAUAAAAG	Mnk	[2635-2653]
226	CGAAUUGUUAGAACAUCUU	AAGAUGUUCUAACAAUUCG		[309-327]
227	CUUUCUCUUCAGUAUUAA	UUAAUACUGAAAGAGAAAG		[2550-2568]
228	GAGAGAGAGAACCUUCCA	UGGAAAGGUUCUCUCUCUC	Mnk	[4050-4068]
229	CUGAGCUUUGUUCUGAAA	UUUCAGUAACAAAGCUCAG	Mnk	[2219-2237]
230	AUGUUUGUUGAAUAAAAGA	UCUUUUUAUCAACAAACAU	Mnk	[3733-3751]
231	AGUUAAGAUGUCUGAGAGA	UCUCUCAGACAUCUUAACU	Mnk	[1885-1903]
232	CUUCCUCAAGUCUUGACAA	UUGUCAAGACUUGAGGAAG		[3501-3519]
233	5CUCCUAUCUUUUUUAUUAU	AUGGAAAUAAAAGAUAGGAG	Mnk	[1908-1926]
234	GGUGUGAUAGAGCCUUUGA	UCAAAAGGCUCUAUCACACC	Mnk	[1556-1574]
235	GGCAGAAACCUUGUUUGU	ACAAACAAGGUUUCUGCCC	Mnk	[3663-3681]
236	GAGAUGUCUGAAUACUGCA	UGCAGUAUUCAGACAUCUC	Mnk	[1438-1456]
237	CCCACUUUCAUCAAUCAA	UUGAAUUGAAUGAAAGUGGG	Mnk	[2356-2374]
238	CCACUUUCAUCAAUCAA	GUUGAUUGAAUGAAAGUGG	Mnk	[2357-2375]
239	CAUCUCUCUCCCUUACUUAU	AUAGUAAGGGAGAGAGAUG	Mnk	[2336-2354]

ES 2 563 984 T3

240	UGAGCGAAUUGUUAGAACA	UGUUCUAACAAUUCGCUCA		[305-323]
241	UUAGCUCCUUGAAGACAUUA	UAUGUCUUCAAGGAGCUAA	Mnk	[3878-3896]
242	ACAGUUACCUGCACACCGA	UCGGUGUGCAGGUAACUGU	Mnk	[924-942]
243	ACAGGAUCAUGUAAAUGCU	AGCAUUUACAUGAUCCUGU		[2502-2520]
244	CGUUCUUUCAGUACUGCA	UGCAGUACUGAAGGGAACG	Mnk	[2064-2082]
245	AAAUGCUAGGCCUGUAGUA	UACUACAGGCCUAGCAUUU	Mnk	[3942-3960]
246	GUGUGGAUGGGAAACUGCU	AGCAGUUUCCCAUCCACAC	Mnk	[1001-1019]
247	CUGUCUUUUUCCUCCUGA	UCAGGAAGGAAAAAGACAG	Mnk	[2309-2327]
248	CCUAGACAAUAAAGAUGGU	ACCAUCUUUAUUGUCUAGG	Cyn, Mnk	[639-657]
249	UGGAAGUAAUUUGAGAGAGA	UCUCUCUCAAAUACUCCA	Mnk	[4039-4057]
250	CAGCCUUGGUUGGACCUAU	AUAGGUCCAACCAAGGCUG		[1716-1734]
251	GAACGCACUUAUCAAGGAU	AUCCUUGAUAAUGUGCGUUC	Mnk	[1377-1395]
252	GCGAAUUGUUAGAACAUCU	AGAUGUUCUAACAAUUCGC		[308-326]
253	AAGCCUACAGAACAAACCA	UGGUUUUGUUCUGUAGGCUU	Mnk	[1065-1083]
254	CGCCUUUUUUGUCCUAGAG	CUCUAGGACAAAAAGGGCG		[1937-1955]
255	GAGCCUGACAAGUGAAGUU	AACUUCACUUGUCAGGCUC	Mnk	[1763-1781]
256	GCCUGACAAGUGAAGUUGU	ACAACUUCACUUGUCAGGC	Mnk	[1765-1783]
257	GCUGUAAAUGAGGGCAGAA	UUCUGCCCUCAUUUACAGC	Mnk	[3652-3670]
258	UGUUGAGCGAAUUGUUAGA	UCUAACAAUUCGCUCAACA		[302-320]
259	AGCUGUUGUUGAGCGAAUU	AAUUCGCUCAACAACAGCU		[296-314]
260	CUGUGCGUCCUUCAGUA	UACUGAAGGGAACGCACAG	Mnk	[2059-2077]
261	UAGCACUGGUGUUGAGCAA	UUGCUC AACACCAGUGCUA	Mnk	[749-767]
262	CGUCCAUGUUCU AUGUGAC	GUCACAUAGAACAUGGACG	Mnk	[864-882]
263	AGACCAUCUCCU AUCUUUU	AAAAGAUAGGAGAUGGUCU	Mnk	[1901-1919]
264	GCUUUUAUUACA UAGUUA	UAACUAAUGUAAUAAAAGC	Mnk	[1871-1889]
265	AGCCUUUGAU CUUCAGGAU	AUCCUGAAGAUCAAAGGCU	Mnk	[1566-1584]
266	GGUCCUAGCAAAAUGCUA	UAGCAUUUUGCUAGGACC	Mnk	[3931-3949]
267	CAUUAAAUGGUGAUUUCUU	AAGAAAUCACCAUUUAAUG	Mnk	[3365-3383]
268	CAACCUUAGCUACAAUCCU	AGGAUUGUAGCUAAGGUUG	Mnk	[3767-3785]
269	GCAGUUGAAGAGCCUGACA	UGUCAGGCUCUUC AACUGC	Mnk	[1754-1772]
270	CAGAAACCUUGUUGUUUU	AAAACAAACAAGGUUUCUG	Mnk	[3666-3684]

ES 2 563 984 T3

271	CAUCUUCUGGAGAAGGACA	UGUCCUUCUCCAGAAGAUG	Mnk	[322-340]
272	CUUUGAGUGUGGGACUCCA	UGGAGUCCCACACUCAAAG	Mnk	[1658-1676]
273	UGCAUUUUAUUGCAGUUUUAU	AUAAACUGCAAUAAAUGCA	Mnk	[3590-3608]
274	GAACCUCAUUAAAUGGUGA	UCACCAUUUAAUGAGGUUC	Mnk	[3359-3377]
275	CGUUGGUUGUUUCUCUGAG	CUCAGAGAAACAACCAACG		[2205-2223]
276	UGACAAUUAACACGGAUUA	UAAUCCGUGUAUAUUGUCA	Mnk	[3809-3827]
277	GCCUUGCAUUUGUACCUUA	UAAGGUACAAAUGCAAGGC	Mnk	[2152-2170]
278	UCUUCACCUUGGUUUAUGA	UCAUAAACCAAGGUGAAGA	Mnk	[3317-3335]
279	UCAGGAAACUCUAAAAAAG	CUUUUUUAGAGUUUCCUGA	Cyn, Mnk	[255-273]
280	UCUCCUAUCUUUUAUUUCA	UGAAAUAAAAGAUAGGAGA	Mnk	[1907-1925]
281	GAUCGGGAAGGUUAUGCU	AGCAUAACCUUCCCGAUCC	Mnk	[1392-1410]
282	AGUCUGUUCUCACAUACA	UGUUAUGUGAGAACAGACU		[3044-3062]
283	AAGUAUUUGAGAGAGAGAA	UUCUCUCUCUCAAAUACU	Mnk	[4042-4060]
284	AAAUGAGGGAGCUCAUCCA	UGGAUGAGCUCCUCAUUU	Ms, Rb, Mnk	[353-371]
285	GUUCCUGCUUUCUCUUUCA	UGAAAGAGAAAGCAGGAAC		[2543-2561]
286	UGAAUAAAAGAGGGAAGAA	UUCUJCCCUCUUUUAUUCA	Mnk	[3741-3759]
287	GAGCAAUGUGCACUUCACU	AGUGAAGUGCACAUUGCUC	Cyn, Ms, Dog, Mnk	[762-780]
288	CUUUGGGUCGACAUAGUAU	AUACUAUGUCGACCCAAAG	Mnk	[4021-4039]
289	GAGAAACGUCCAUCUCUCU	AGAGAGAUGGACGUUUCUC	Mnk	[2326-2344]
290	UAUCUAGAUUUCUAGAAAA	UUUUCUAGAAAUCUAGAU	Mnk	[2386-2404]
291	UGAGCUUUGUACUGAAAU	AUUUCAGUAACAAAGCUCA	Mnk	[2220-2238]
292	AUCAUGUAAAUGCUCAAA	UUUGAGCAUUUACAUGAUC	Mnk	[2506-2524]
293	GCUCAAGAUGUAAUGUAG	CUACAUUACAUCUUUGAGC		[2518-2536]
294	CCAUCUCCUAUCUUUUAUU	AAUAAAAGAUAGGAGAUGG	Mnk	[1904-1922]
295	GGCCUGUAGUAGUCAAGGU	ACCUUGACUACUACAGGCC	Mnk	[3950-3968]
296	GACCACAGGAGGUGUGAUA	UAUCACACCUCCUGUGGUC	Mnk	[1546-1564]
297	AGGUUUUCAGCUCUUUGA	UCAAGAGCUGAAAAACCU	Mnk	[1031-1049]
298	GGUUAAGGUGAACGCACUU	AAGUGCGUUCACCUUAACC	Mnk	[1368-1386]
299	CUACCAGGCUGUAAAUGAG	CUCAUUUACAGCCUGGUAG	Mnk	[3645-3663]
300	GUUJCCCUAGACUCUGUAA	UUACAGAGUCUAGGGAAAC	Mnk	[2282-2300]
301	AGGAGAGUGAUGCCGGUAA	UUACCGGCAUCACUCUCCU	Cyn, Mnk	[1178-1196]

ES 2 563 984 T3

302	UCCCAUGGUCCCUAGCAAA	UUUGCUAGGGACCAUGGGA	Mnk	[3925-3943]
303	CUGUAAAUGAGGGCAGAAA	UUUCUGCCCUCAUUUACAG	Mnk	[3653-3671]
304	GAGAGAAAGAACUGGAAUU	AAUUCAGUUCUUUCUCUC	Cyn, Mnk	[782-800]
305	CCAUGGUCCCUAGCAAAAU	AUUUUGCUAGGGACCAUGG	Mnk	[3927-3945]
306	GUGGUGUCCUUCUCCUCA	UGAGGAAGAAGGACACCAC		[3490-3508]
307	GCUCCAAGAGGUUUUCAG	CUGAAAAACCUUCUUGGAGC		[1023-1041]
308	CAUGUUCUAUGUGACCAGA	UCUGGUCACAUAGAACAUG	Mnk	[868-886]
309	UUGUUUGGGUGGUUUGUGA	UCACAAACCACCCAAACAA		[3982-4000]
310	GAAAAGUUGCCGAAGAUGA	UCAUCUUCGGCAACUUUUC	Mnk	[1198-1216]
311	AUAGUAUGGAAGUAUUUGA	UCAAUACUUCCAUACUUAU	Mnk	[4033-4051]
312	CACCGUUGAGCUGUGACUA	UAGUCACAGCUCAACGGUG	Rat, Ms, Rb, GP, Dog, Mnk	[536-554]
313	CUUUAGUGAUUGCUUUUAU	AUAAAAGCAAUCACUAAAG	Mnk	[1860-1878]
314	CUUUACAGGAUCAUGUAAA	UUUACAUGAUCCUGUAAAAG		[2498-2516]
315	AAACCUUGUUUGUUUUUAU	AAUAAAACAAACAAGGUUU	Mnk	[3669-3687]
316	GAAGCAAACAUGACUAGAG	CUCUAGUCAUGUUUGCUUC		[2010-2028]
317	UUGCACUCCUGAAUUUUUAU	AUAAAAUUCAGGAGUGCAA	Cyn, Mnk	[681-699]
318	GCCUGUCGACAGAUACUGU	ACAGUAUCUGUCGACAGGC	Cyn, Mnk	[611-629]
319	GCAUGCAUCCUCAUCAUCA	UGAUGAUGAGGAUGCAUGC	Mnk	[239-257]
320	CCUACCAGGCUGUAAAUGA	UCAUUUACAGCCUGGUAGG	Mnk	[3644-3662]
321	ACUGCCCAAGCCUACAGAA	UUCUGUAGGCUUGGGCAGU	Mnk	[1058-1076]
322	UGUGAAGCACUGAGGGAGA	UCUCCUCAGUGCUUCACA	Mnk	[454-472]
323	AGUUUGGAAGGUGUCCAAA	UUUGGACACCUUCCAAACU	Mnk	[1960-1978]
324	ACUGAGGGAGACCAAGCAA	UUGCUUGGUCUCCUCAGU	Cyn, Mnk	[462-480]
325	GACAUCAUCACCUUGGAAA	UUUCCAAGGUGAUGAUGUC	Cyn, Dog, Mnk	[337-355]
326	GGUCGACAUAGUAUGGAAG	CUUCCAUACUAUGUCGACC	Mnk	[4026-4044]
327	AACUCUUCACCUUGGUUUA	UAAACCAAGGUGAAGAGUU	Mnk	[3314-3332]
328	CUGAGAGACCAUCUCCUAU	AUAGGAGAUGGUCUCUCAG	Mnk	[1896-1914]
329	CAAUAAAGAUGGUCCUGUC	GACAGGACCAUCUUUAUUG	Mnk	[645-663]
330	UUUGGAAGGUGUCCAAAUU	AAUUUGGACACCUUCCAAA	Mnk	[1962-1980]
331	AGCCUUGGUUGGACCUAUU	AAUAGGUCCAACCAAGGCU		[1717-1735]

ES 2 563 984 T3

332	GAAUGUUUCAGCUGCAGUU	AACUGCAGCUGAAACAUUC	Mnk	[1741-1759]
333	GCUCUGAAGAAGCAAACAU	AUGUUUGCUUCUUCAGAGC		[2002-2020]
334	CUGUGACUACGACUUGAGU	ACUCAAGUCGUAGUCACAG	Rb, Mnk	[546-564]
335	CUUGCAUUUGUACCUUAUU	AAUAAGGUACAAAUGCAAG	Mnk	[2154-2172]
336	UUAUCUCCCUGCUUCAUUAU	AUAUGAAGCAGGGAGAUAA	Mnk	[2415-2433]
337	GAUCUUUGCCCAUGGAAGU	ACUCCAUGGGCAAAGAUC	Mnk	[2173-2191]
338	CCUUUUUGUCCUAGAGUGA	UCACUCUAGGACAAAAAGG	Mnk	[1940-1958]
339	GUGGGAAUCUCCCAGACUU	AAGUCUGGGAGAUUCCAC	Mnk	[1615-1633]
340	CUCCUUGAAGACAUAUCAU	AUGAUAUGUCUUCAAGGAG	Mnk	[3882-3900]
341	CAUGUACUCCCACCGUUGA	UCAACGGUGGGAGUACAUG	Cyn, Mnk	[526-544]
342	AUUAAACUCUCCUUUGAUA	UAUCAAAAGGAGAGUUUAAU	Mnk	[2564-2582]
343	CAAGUGAAGUUGUAAACAC	GUGUUUACAACUUCACUUG	Mnk	[1771-1789]
344	GCUUUCUCUUUCAGUAUUA	UAAUACUGAAAGAGAAAGC		[2549-2567]
345	CCUAGAAACCUUUAUCCCU	AGGGAUAAAGGUUUCUAGG	Mnk	[2627-2645]
346	GCCCAUGGAAGUCUCAAG	CUUUGAGACUCCAUGGGC	Mnk	[2180-2198]
347	GCACUUUAGUGAUJGCUUU	AAAGCAAUCACUAAAGUGC	Mnk	[1857-1875]
348	CAUUAAAUGUUUGUUGAAU	AUUCAACAACAUUUAAUG		[3727-3745]
349	UGCCCAAGCCUACAGAACA	UGUUCUGUAGGCUJGGGCA	Mnk	[1060-1078]
350	AGGUGUGAUAGAGCCUUU	JAAAGGCUCUAUCACACCUC	Mnk	[1554-1572]
351	CAAGCUUUUGGGCUAUGAC	GUCAUAGCCCAAAGCUUG	Cyn, Mnk	[846-864]
352	CCUUCUGAGAAACGUCCA	UGGACGUUUCUCAGGAAGG	Mnk	[2319-2337]
353	CCUGAAUUUUAUCAAAACAC	GUGUUUGAUAAAAUUCAGG	Mnk	[688-706]
354	GAGACCAUCUCCUAUCUUU	AAAGAUAGGAGAUGGUCUC	Mnk	[1900-1918]
355	CUGCACAGGAAAUGCAAGA	UCUUGCAUUUCCUGUGCAG	Cyn, Rat, GP, Chn, Mnk	[887-905]
356	GUCCCUGAGCAGUCUACUU	AAGUAGACUGCUCAGGGAC	Mnk	[3535-3553]
357	GGAAGUAUUUGAGAGAGAG	CUCUCUCUCAAUACUCC	Mnk	[4040-4058]
358	CACGGAUUUAUUUUGUAC	GUACAAAUAAUAAUCCGUG	Mnk	[3819-3837]
359	UCAAGGAUCGGGAAGGUUA	UAACCUUCCGAUCCUUGA	Mnk	[1388-1406]
360	GGUGAUUUUCUUGCUAAGCU	AGCUUAGCAAGAAAUCACC	Mnk	[3373-3391]
361	GAGAGACCAUCUCCUAUCU	AGAUAGGAGAUGGUCUCUC	Mnk	[1898-1916]

ES 2 563 984 T3

362	AAAUGGUGAUUUCUJGCUA	UAGCAAGAAUCACCAUUU	Mnk	[3369-3387]
363	CUCAGGUGGUGUCCUUCUU	AAGAAGGACACCACCUGAG		[3485-3503]
364	AGAAAAGCUUCCUAGCUUA	UAAGCUAGGAAGCUUUUCU	Mnk	[2399-2417]
365	CCAACAAGAUGGAAAGAAC	GUUCUUUCCAUCUUGUUGG	Mnk	[1137-1155]
366	GGUGUCCAAAUUUAAUGUA	UACAUUAAAUUUGGACACC		[1969-1987]
367	CAAGGAGAUGUCUGAAUAC	GUAUUCAGACAUCUCCUUG	Mnk	[1434-1452]
368	GGCAUUUUUAGCUCCUUGA	UCAAGGAGCUAAAAUGCC	Mnk	[3871-3889]
369	UGACGUCCAUGUUCUAUGU	ACAUAGAACAUGGACGUCA	Mnk	[861-879]
370	GUGAUUGCUUUUAUUACA	AUGUAAUAAAAGCAAUCAC	Mnk	[1865-1883]
371	CAAGAGAAACUGCAGAAUU	AAUUCUGCAGUUUCUCUUG	Mnk	[901-919]
372	CCAACAUUGCCUUGCAUUU	AAAUGCAAGGCAAUGUUGG		[2144-2162]
373	UCGACAUAGUAUGGAAGUA	UACUCCAUAUAUGUCGA	Mnk	[4028-4046]
374	GCUGGUUAAGGUGAACGCA	UGCGUUCACCUUAACCAGC	Mnk	[1365-1383]
375	UAGUGGGCCUUCAUUAAAU	AUUUAAUGAAGGCCACUA		[3716-3734]
376	AAAGAAAAGUUGCCGAAGA	UCUUCGGCAACUUUUCUUU	Mnk	[1195-1213]
377	CUAGAAUCCUGCUUUACAG	CUGUAAAGCAGGAUUCUAG		[2487-2505]
378	AGAGUGAUGCCGGUAAAGA	UCUUUACCGGAUCACUCU	Cyn, Mnk	[1181-1199]
379	AGAAGCAAACAUGACUAGA	UCUAGUCAUGUUUGCUUCU		[2009-2027]
380	UGCUACUUUUACUUGUUCA	UGAACAAAGUAAAAGUAGCA	Mnk	[3614-3632]
381	UACAUGUUUAUUGUUUCAA	UUGAAAACAAUAACAUGUA		[2608-2626]
382	ACAUAGUAUGGAAGUAUUU	AAAUACUCCAUAUAUGU	Mnk	[4031-4049]
383	AGUUGAAGAGCCUGACAAG	CUUGUCAGGCUCUUAACU	Mnk	[1756-1774]
384	AUGGGAACUGCUCCAGCU	AGCUGGAGCAGUUCCCAU	Mnk	[1007-1025]
385	UGGAACACUCCUAGACAA	UUGUCUAGGGAGUGUCCA	Cyn, Dog, Mnk	[629-647]
386	AGAAUGUGGAACUCCUCAA	UUGAGGAGUCCACAUUCU	Rat, Ms, GP, Chn, Mnk	[395-413]
387	UCUUUUUCCUCCUGAGAA	UUCUCAGGAAGGAAAAAGA	Mnk	[2312-2330]
388	CCUUGAAGACAUAUCAUGU	ACAUGAUUAUGUCUUAAGG	Mnk	[3884-3902]
389	AAACAUGACUAGAGACGCA	UGCGUCUCUAGUCAUGUUU	Mnk	[2015-2033]
390	CCUCUCAGCUUCUAAUUUU	AAAAUAGAAGCUGAGAGG	Mnk	[3408-3426]
391	GACAAUAUACACGGAUUUAU	AUAAUCCGUGUAUAUUGUC	Mnk	[3810-3828]
392	AUAUCUAGAUUUCUAGAAA	UUUCUAGAAAUCUAGAUUAU	Mnk	[2385-2403]

ES 2 563 984 T3

393	CCUAGAGUGAGAGUUUGGA	UCCAAACUCUCACUCUAGG	Mnk	[1949-1967]
394	UUCUGAGCGGGCUUGUGAU	AUCACAAGCCCCGCUCAGAA	Mnk	[1329-1347]
395	GACGCAGGAUAUUGGGAGU	ACUCCCAAUAUCCUGCGUC	Cyn, Mnk	[215-233]
396	GGUGCUCAAUAAAUAUUUG	CAAAUAUUUAUUGAGCACC	Mnk	[3966-3984]
397	CUGUGGAACACUCCCUAGA	UCUAGGGAGUGUCCACAG	Cyn, Dog, Mnk	[626-644]
398	AGAGAAACUGCAGAAUUUU	AAAAUUCUGCAGUUUCUCU	Mnk	[903-921]
399	UGUUGAAUAAAAGAGGGAA	UUCCCUUUUUUAUUCAACA	Mnk	[3738-3756]
400	GAGAGAGAACCUUCCACU	AGUGGAAAGGUUCUCUCUC	Mnk	[4052-4070]
401	UGAACGCACUUAUCAAGGA	UCCUUGAUAAGUGCGUUA	Mnk	[1376-1394]
402	ACGCGCUCAGACAUGAUAU	AUAUCAUGUCUGAGCGCGU	Cyn, Mnk	[1225-1243]
403	CUUCACUGGAGAGAAAGAA	UUCUUUCUCUCCAGUGAAG	Cyn, Mnk	[774-792]
404	CCUUGUUUGUUUAUUCAC	GUGAAUAAAACAAACAAGG	Mnk	[3672-3690]
405	AGAACAAACCAAAAUGUU	AACAUUUUUGGUUUUGUUCU	Rat, Mnk	[1073-1091]
406	CGUGGAGAUGAGACUGAUC	GAUCAGUCUCAUCUCCACG	Cyn, GP, Chn, Mnk	[1108-1126]
407	CACUGGUGUUGAGCAAUGU	ACAUUGCUCACACCAGUG	Cyn, Mnk	[752-770]
408	UGUAAAUGCUCAAAAGAUGU	ACAUCUUUGAGCAUUUACA		[2511-2529]
409	CAUCAUCUCUGCCUUUGAG	CUCAAAAGGCAGAGAUGAUG	Mnk	[1696-1664]
410	CUACCUUUUGAUAAAAGU	ACAUUUUAUCAAAAAGGUAG	Mnk	[3784-3802]
411	AAGGUGAACGCACUUAUCA	UGAUAAAGUGCGUUCACCUU	Mnk	[1372-1390]
412	GAACACUCCCUAGACAAUA	UAUUGUCUAGGGAGUGUUC	Cyn, Mnk	[631-649]
413	ACCAGACUGCACAGGAAAU	AUUUCCUGUGCAGUCUGGU	Cyn, Rat, GP, Chn, Dog, Mnk	[881-899]
414	ACAAGUGAAGUUGUAAACA	UGUUUACAACUUCACUUGU	Mnk	[1770-1788]
415	CAUUCUUUCUCCUCCAGU	ACUGGAGGAAGAAAGAAUG	Mnk	[3028-3046]
416	CAGACAUGAU AUGCGGCUA	UAGCCGCAUAUCAUGUCUG	Cyn, Mnk	[1232-1250]
417	CAACCUGCACUUCAUAUCU	AGAUUGAAGUGCAGGUUG	Mnk	[2372-2390]
418	CUUUGUCCUGCUUUCUCU	AGAGAAAGCAGGAACAAAG		[2539-2557]
419	CUUCUUUACCUUCAUUUCA	UGAAAUGAAGGUAAAAGAAG		[2440-2458]
420	AACCCUUCUGCUUUCUAUU	AAUAGAAAGCAGAAGGGUU	Mnk	[3276-3294]
421	ACUUCACUGGAGAGAAAGA	UCUUUCUCUCCAGUGAAGU	Cyn, Rat, Ms, Dog, Mnk	[773-791]
422	GUCUCCUCUCAGCUUCUAA	UUAGAAGCUGAGAGGAGAC	Mnk	[3404-3422]

ES 2 563 984 T3

423	GGAAAGAACCACGCAGGAU	AUCCUGCGUGGUUCUUUCC	Mnk	[1147-1165]
424	ACUCCCUAGACAAUAAAGA	UCUUUAUUGUCUAGGGAGU	Cyn, Mnk	[635-653]
425	GUAAAGAAAAGUUGCCGAA	UUCGGCAACUUUUCUUUAC	Mnk	[1193-1211]
426	CUAUCUUUUUUUUAUUCU	UGAAUGAAAUAAGAUAG	Mnk	[1911-1929]
427	AACCUGCACUUCUAUUCUA	UAGAUUAUGAAGUGCAGGUU	Mnk	[2373-2391]
428	AGCGGGCUUGUGAUUUGCA	UGCAUAUCACAAGCCCGCU	Mnk	[1334-1352]
429	UGCAAGAGAAACUGCAGAA	UUCUGCAGUUUCUCUUGCA	Mnk	[899-917]
430	CUGGAGAGAAAGAACUGGA	UCCAGUUCUUUCUCUCCAG	Mnk	[779-797]
431	AAUAUACACGGAUUUAUUU	AUAAUAUCCGUGUAUAUU	Mnk	[3813-3831]
432	UCUGAGAGACCAUCUCCUA	UAGGAGAUGGUCUCUCAGA	Mnk	[1895-1913]
433	UCUAUGGUGUGGAUGGGAA	UUCCCAUCCACACCAUAGA	Mnk	[995-1013]
434	CAGAAUGUGGAACUCCUCA	UGAGGAGUUCACAUUCUG	Rat, Ms, GP, Chn, Mnk	[394-412]
435	ACAGAAUUCACCGGUGCA	UGCACCGGUGGAAUUCUGU		[1417-1435]
436	CUUACUUAUCCACUUUCA	UGAAAGUGGGAAUAGUAAG	Mnk	[2347-2365]
437	GCAAGAGAAACUGCAGAAU	AUUCUGCAGUUUCUCUUGC	Mnk	[900-918]
438	GAAUCUCCCAGACUUGUUU	AAACAAGUCUGGGAGAUUC	Mnk	[1619-1637]
439	UGGAGAAGGACAUCAUCAC	GUGAUGAUGUCCUUCUCCA	Rb, Dog, Mnk	[329-347]
440	GAGAACCUUCCACUCCCA	UGGGAGUGGAAAGGUUCUC	Mnk	[4056-4074]
441	ACUJCCCUGUUCUUUAAGA	UCUUAAAGAACAGGGAAAGU	Mnk	[2665-2683]
442	GUGUUUCCCUAGACUCUGU	ACAGAGUCUAGGGAAACAC	Mnk	[2280-2298]
443	AGGAAUUGCAAGAGAAACU	AGUUUCUCUUGCAUUUCCU	Rat, Ms, GP, Chn, Mnk	[893-911]
444	UUCAGUUCAGCUUUUGUA	UACAAAAGCUGGAACUGAA	Mnk	[1834-1852]
445	CGCGCUCAGACAUGAUUUG	CAUAUCAUGUCUGAGCGCG	Cyn, Mnk	[1226-1244]
446	AUGUCUGAAUACUGCAGCA	UGCUGCAGUAUUCAGACAU	Mnk	[1441-1459]
447	UGGUUAAGGUGAACGCACU	AGUGCGUUCACCUUAACCA	Mnk	[1367-1385]
448	UGCAUUUGUACCUUAUUGA	UCAAUAAAGGUACAAAUGCA	Mnk	[2156-2174]
449	CCAAGCCUACAGAACAAA	UUUGUUCUGUAGGCUUGGG	Mnk	[1062-1080]
450	CUUUCUUCUCCAGUCUGU	ACAGACUGGAGGAAAGAAAG	Mnk	[3032-3050]
451	AAGAUGUCUGAGAGACCAU	AUGGUCUCUCAGACAUCUU	Mnk	[1889-1907]
452	GCCUUGCACUCCUGAAUUU	AAAUUCAGGAGUGCAAGGC	Cyn, Mnk	[678-696]
453	CUUUAUCCUUCUUAUCUG	CAGAUAAAGCAGGGAUAAAG	Mnk	[2636-2654]

ES 2 563 984 T3

454	UGUUUUUUUUUCAACCUA	UAGGUUGAAAACAAUAACA		[2612-2630]
455	AAAAGAGGGAAGAAGGCAA	UUGCCUUCUUCCCUCUUUU	Mnk	[3746-3764]
456	GAACCUUUCACUCCCACU	AGUGGGAGUGGAAAGGUUC	Mnk	[4058-4076]
457	GUCCAAAUUUAAUGUAGAC	GUCUACAUUAAAUUUGGAC		[1972-1990]
458	AGUUCAGCUUUUGUAGAU	AUCUACAAAAGCUGGAACU	Mnk	[1837-1855]
459	GGAGAUGUCUGAAUACUGC	GCAGUAUUCAGACAUCUCC	Mnk	[1437-1455]
460	ACAGCUGUUGUUGAGCGAA	UUCGCUCAACAACAGCUGU		[294-312]
461	CAUCUCCUAUCUUUUUUUU	AAAUAAAAGAUAGGAGAUG	Mnk	[1905-1923]
462	CCCUGCUUAUCUGAAACUU	AAGUUUCAGUAAGCAGGG	Mnk	[2642-2660]
463	GGUGAACGCACUUAUCAAG	CUUGAUUAGUGCGUUCACC	Mnk	[1374-1392]
464	AACUGCUCCAGCUCCAAGA	UCUUGGAGCUGGAGCAGUU		[1013-1031]
465	UGAGCAAUGUGCACUUCAC	GUGAAGUGCACAUUGCUCU	Cyn, Ms, GP,Dog,Mnk	[761-779]
466	CAUCAUGUACCAAGUGCUU	AAGCACUUGGUACAUGAUG	Mnk	[3691-3709]
467	UGAAGAAGCAAACAUGACU	AGUCAUGUUUGCUUCUUCA		[2006-2024]
468	UACAGAACAACCAAAAAU	AUUUUUGGUUUUGUUCUGUA	Rat, Mnk	[1070-1088]
469	GUACAUCGAGGCUCUUGCU	AGCAAGAGCCUCGAUGUAC	Mnk	[1302-1320]
470	GAGCUUUGUUCUGAAAUG	CAUUUCAGUAACAAAGCUC	Mnk	[2221-2239]
471	ACCCUUCUGCUUUCUUAUA	UAAUAGAAAGCAGAAGGGU	Mnk	[3277-3295]
472	UUUAGUGAUUGCUUUUAUU	AAUAAAAGCAAUCACUAAA	Mnk	[1861-1879]
473	AACAGCUGUUGUUGAGCGA	UCGCUCAACAACAGCUGUU		[293-311]
474	GUUUCUCUGAGCUUUGUUA	UAACAAAGCUCAGAGAAAC	Mnk	[2213-2231]
475	CUCUAAAAAAGAACCGAGU	ACUCGGUUCUUUUUUAGAG	Cyn, Pig, Mnk	[263-281]
476	GAGAGUGAUGCCGGUAAAG	CUUUACCGGCAUCACUCUC	Cyn, Mnk	[1180-1198]
477	AGAGGUUUUUCAGCUCUUU	AAAGAGCUGAAAACCUCU	Mnk	[1029-1047]
478	AGGAUAUGUUGCUCACCAC	GUGGUGAGCAACAUAUCCU	Cyn, Mnk	[491-509]
479	CCUUUUCUGUGAAGCCCUU	AAGGGCUUCACAGAAAAGG	Mnk	[1685-1703]
480	UGAUGCCGGUAAAGAAAAG	CUUUUCUUUACCGGCAUCA	Cyn, Mnk	[1185-1203]
481	CCUUCUUCUCAAGUCUUG	CAAGACUUGAGGAAGAAGG		[3497-3515]
482	CUGAGAAACGUCCAUCUCU	AGAGUUGGACGUUUCUCAG	Mnk	[2324-2342]
483	GAUUUGGUUGUUUAAAUAU	AUAUUUAAACAACCAAUC		[3233-3251]
484	UAUJAAACUCUCCUUUGAU	AUCAAGGAGAGUUUAAUA	Mnk	[2563-2581]

ES 2 563 984 T3

485	UUCUGGAGAAGGACAUCAU	AUGAUGUCCUUCUCCAGAA	Cyn, Mnk	[326-344]
486	AGACUGCACAGGAAAUGCA	UGCAUUUCCUGUGCAGUCU	Cyn, Rat, GP, Chn, Mnk	[889-902]
487	GCUCAAUAAAUAUUUGUUU	AAACAAAUAUUUAUUGAGC		[3969-3987]
488	AAACCAAAAAUGUUCUUCA	UGAAGAACAUUUUUGGUUU	Rat, Mnk	[1078-1096]
489	CUCUGAAGAAGCAAACAUG	CAUGUUUGCUUCUUCAGAG		[2003-2021]
490	CUGUAGUAGUCAAGGUGCU	AGCACCUUGACUACUACAG	Mnk	[3953-3971]
491	UGCUIUUUAUUACAUIUAGUU	AACUAAUGUAAUAAAAGCA	Mnk	[1870-1888]
492	GUGCGUUCUUUCAGUACU	AGUACUGAAGGGAACGCAC	Mnk	[2061-2079]
493	CAGUUCAGCUUUUGUAGA	UCUACAAAAGCUGGAACUG	Mnk	[1836-1854]
494	GACAAGUGAAGUUGUAAAC	GUUUACAACUUCACUUGUC	Mnk	[1769-1787]
495	UUGCCCAUGGAAGUCUCAA	UUGAGACUUCUCCAUUGGCAA	Mnk	[2178-2196]
496	UAGCUACAAUCCUACCUUU	AAAGGUAGGAUUGUAGCUA	Mnk	[3773-3791]
497	CCAUGUUCUAUGUGACCAG	CUGGUCACAUAGAACAUGG	Mnk	[867-885]
498	GUAGUCAAGGUGCUCAAUA	UAUUGAGCACCUUGACUAC	Mnk	[3958-3976]
499	CCACCUUGGAGGAUAUGUUG	CAACAUAUCCUCCAGGUGG	Cyn, Mnk	[983-501]
500	UCUGAGCGGGCUUGUGAUA	UAUCACAAGCCCGCUCAGA	Cyn, Mnk	[1330-1348]
501	GCCAGAAUGUGGAACUCCU	AGGAGUCCACAUUCUGGC		

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de ARN bicatenario que tiene la estructura:
 5' iB - GCCAGAAUGUGGAACUCCU 3' (cadena sentido; SEQ ID NO: 9015)
 3' CGGUCUUACACCUUGAGGA 5' (cadena antisentido; SEQ ID NO: 9516)
- 5 en donde cada A, C, U, y G es un ribonucleótido y cada ribonucleótido consecutivo se une al siguiente ribonucleótido mediante un enlace fosfodiéster;
 en donde la cadena sentido comprende, contar desde el extremo 5', un ribonucleótido modificado en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 19, una L-desoxicitidina en la posición 18, y una unidad estructural desoxiabásica invertida (iB) de caperuza 5'; y
- 10 en donde la cadena antisentido comprende, contar desde el extremo 5', un ribonucleótido de azúcar modificado en 2'-O-Me en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 y un ribonucleótido no modificado en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 16 y 18; o una sal de este farmacéuticamente aceptable.
2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicha unidad estructural desoxiabásica invertida (iB) de caperuza 5' es una unidad estructural desoxirribosa abásica invertida.
- 15 3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicha unidad estructural desoxiabásica invertida (iB) de caperuza 5' es una 3',5' desoxirribosa 5'-fosfato abásica invertida.
4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en terapia.
5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en terapia para tratar un paciente que padece una enfermedad ocular, un trastorno ocular, una lesión ocular, una pérdida del campo visual; o para proporcionar neuroprotección ocular.
- 20 6. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad ocular, trastorno ocular, o lesión ocular está relacionado con anomalías/cambios patológicos en los tejidos del sistema visual; y/o en donde la enfermedad, trastorno o lesión ocular comprende la neurodegeneración; y/o en donde la enfermedad, trastorno o lesión ocular se asocia con la pérdida de células ganglionares de la retina o con daño de las células ganglionares de la retina.
- 25 7. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la pérdida de células ganglionares de la retina o el daño de las células ganglionares de la retina está mediada por la presión intraocular (IOP) elevada.
8. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la pérdida de campo visual se asocia con la muerte de las células ganglionares de la retina.
9. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad ocular, trastorno ocular, o lesión ocular se selecciona del grupo que consiste en neuropatía ocular, presión intraocular (IOP) elevada, glaucoma, ojo seco, síndrome de Sjögren, retinopatía diabética (DR), edema macular diabético (DME), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), neuritis óptica, oclusión de la vena central de la retina, oclusión de una rama de la vena retiniana, neuropatía óptica isquémica, lesión del nervio óptico, retinopatía del prematuro (ROP), retinitis pigmentosa (RP), degeneración ganglionar de la retina, degeneración macular, neuropatía óptica hereditaria, neuropatía óptica hereditaria de Leber, neuropatía óptica metabólica, neuropatía debido a un agente tóxico y neuropatía causada por una reacción adversa al fármaco o una deficiencia de vitamina.
- 30 10. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la neuropatía óptica isquémica comprende neuropatía óptica isquémica anterior y/o neuropatía óptica isquémica posterior.
- 40 11. Una composición que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o una sal de esta farmacéuticamente aceptable, y un excipiente o portador o mezcla farmacéuticamente aceptable de la misma.
12. Una composición que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en una cantidad eficaz para reducir la expresión de un gen CASP2 en una célula ocular seleccionada de un grupo que consiste en una célula acinar de la glándula lagrimal, una célula ductal de la glándula lagrimal, una célula ganglionar de la retina (RGC), una célula del epitelio pigmentario de la retina (RPE), una célula de la coroides, una célula de la córnea, una célula del proceso ciliar y una célula de la red trabecular, o una combinación de las mismas.
- 45

13. La composición de la reivindicación 11, en donde el compuesto está presente a una concentración final de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 60 µg/ml en volumen de la composición.

5 14. La composición de la reivindicación 11, en donde la composición se formula como una crema, una espuma, una pasta, un ungüento, una emulsión, una solución líquida, unas gotas para los ojos, un gel, spray, una suspensión, una microemulsión, microesferas, microcápsulas, nanoesferas, nanopartículas, vesículas lipídicas, liposomas, vesículas poliméricas, un parche, o una lente de contacto.

15. La composición de la reivindicación 14, en donde la composición se formula como unas gotas para los ojos.

16. La composición de la reivindicación 14, en donde la composición se formula como una solución líquida para inyección intravítrea.

10

Figura 1A

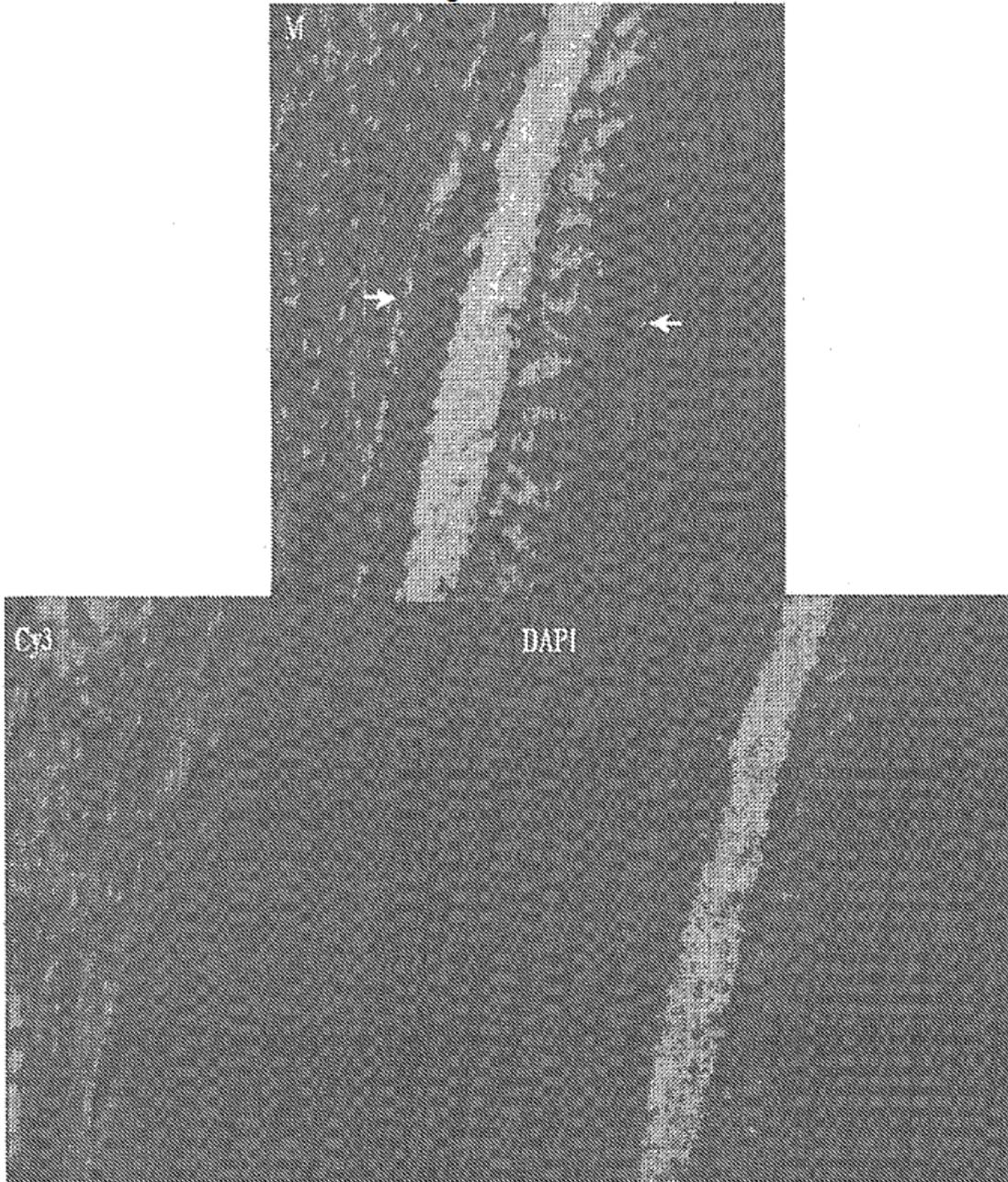


Figura 1B

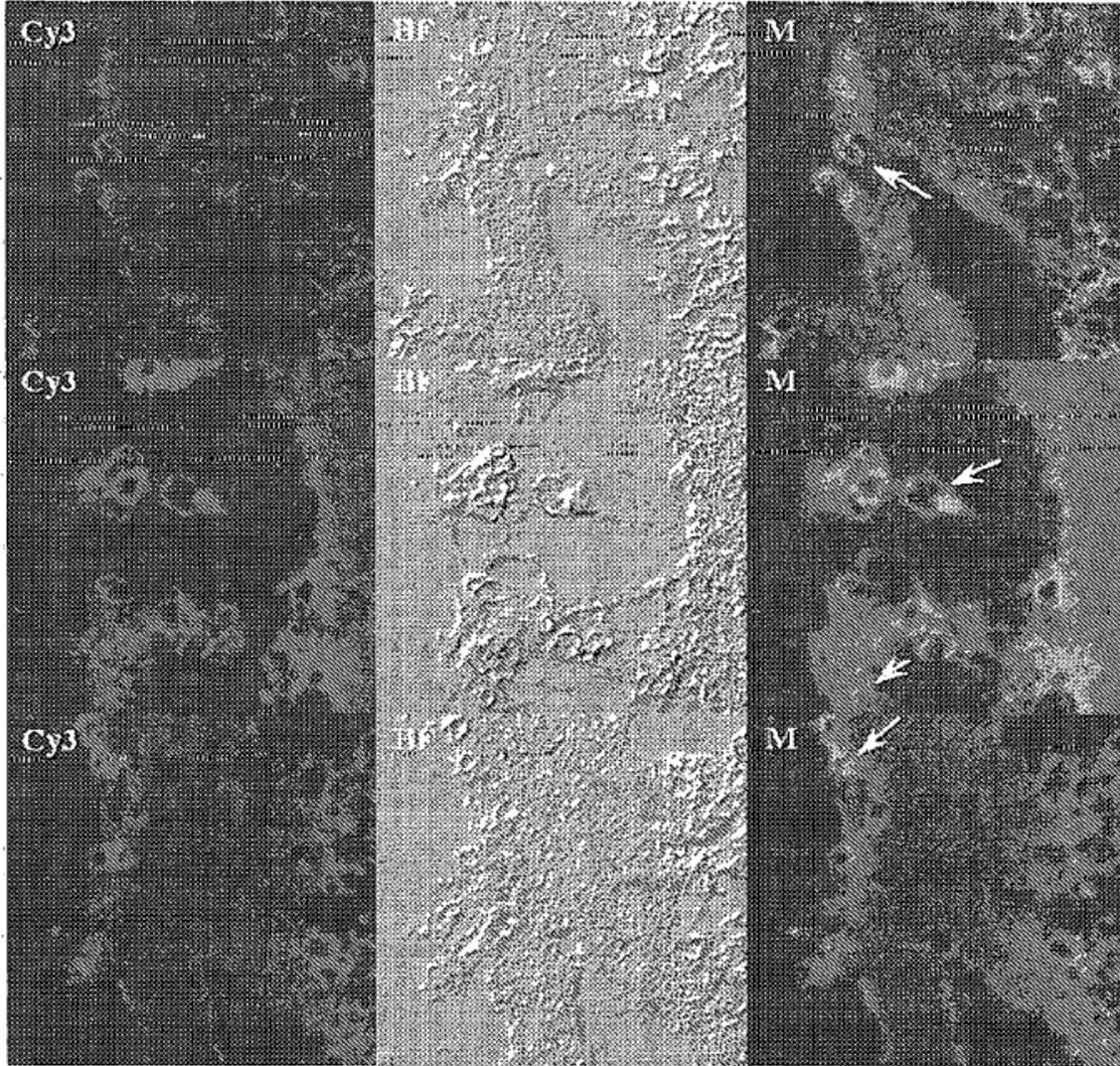


Figura 1C

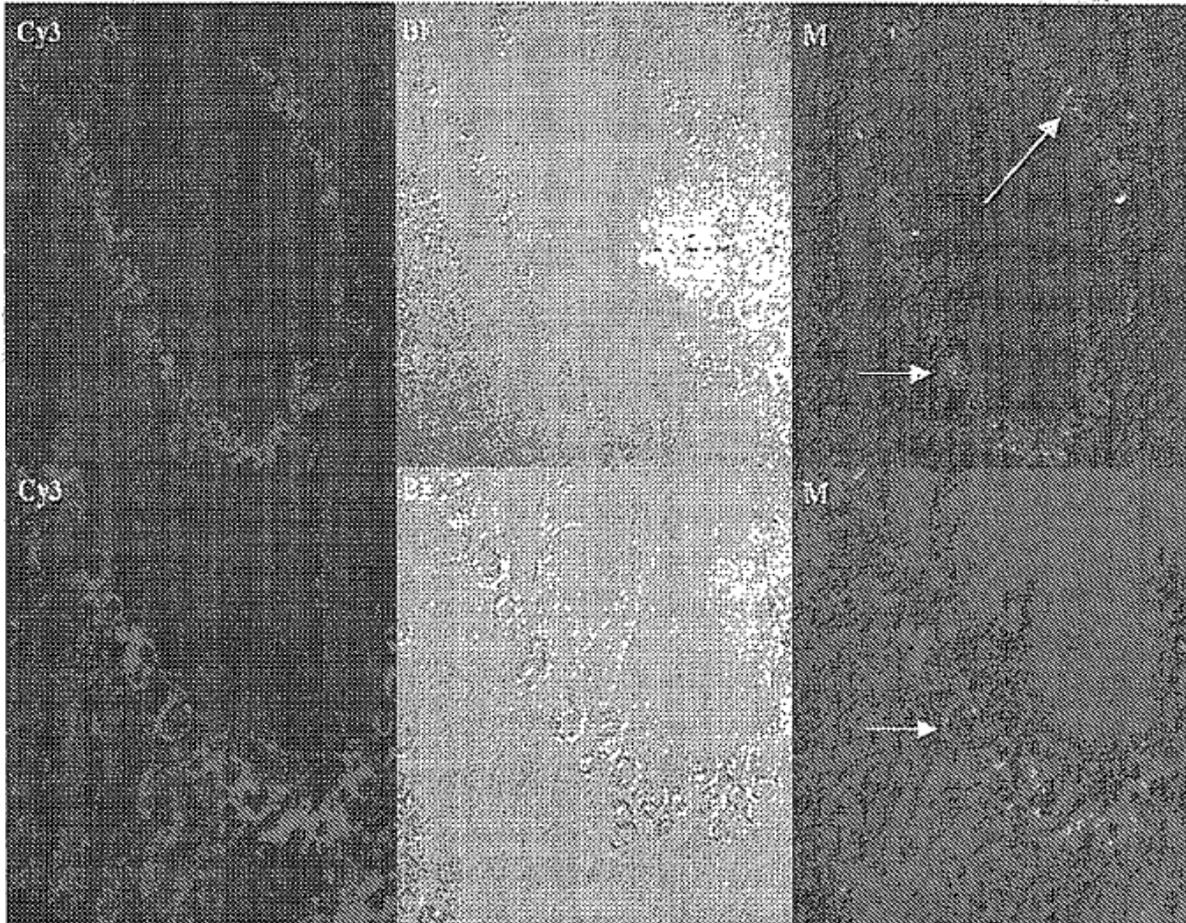


Figura 2A

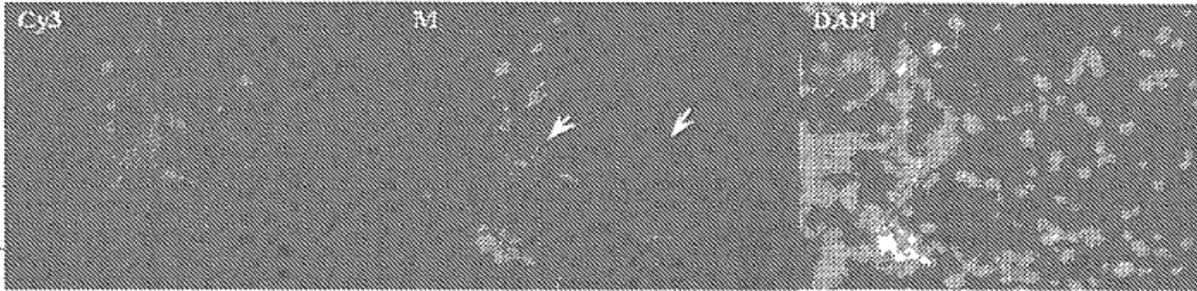


Figura 2B

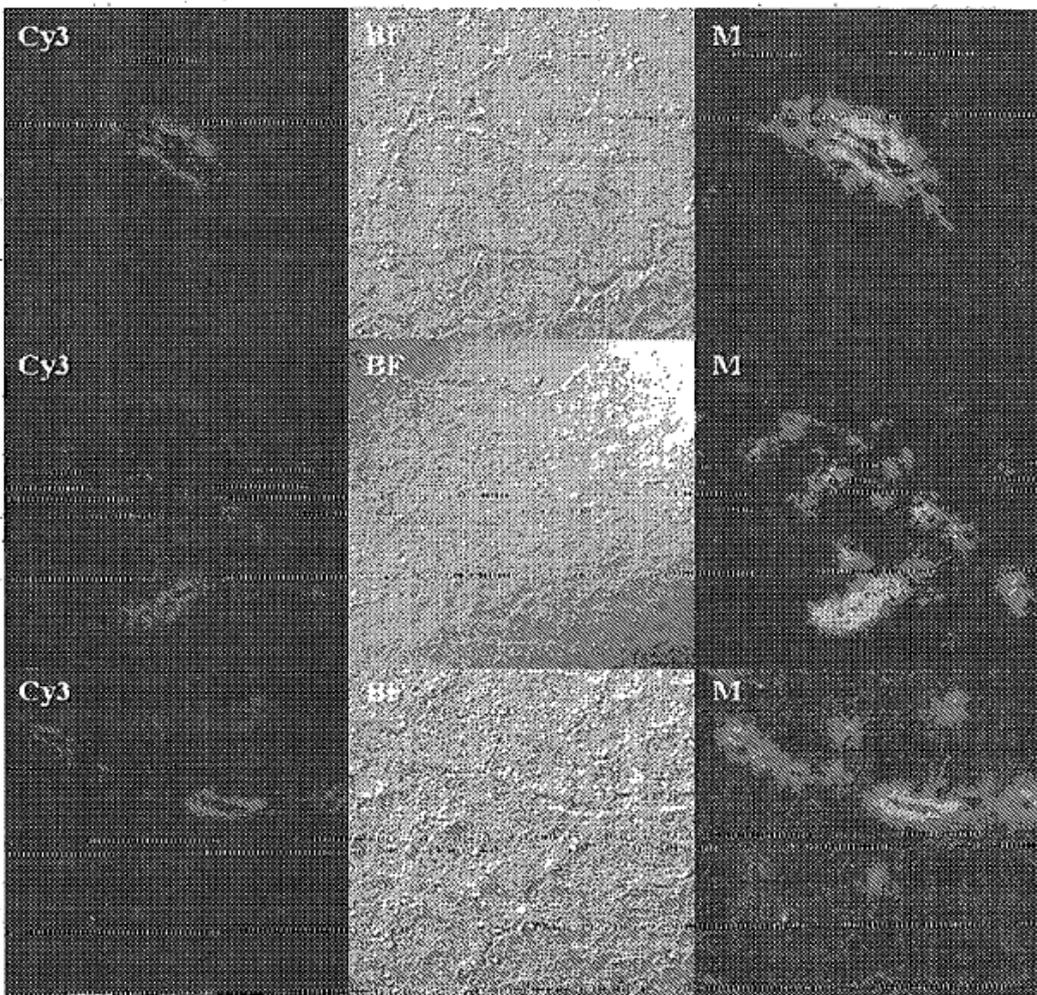


Figura 2C

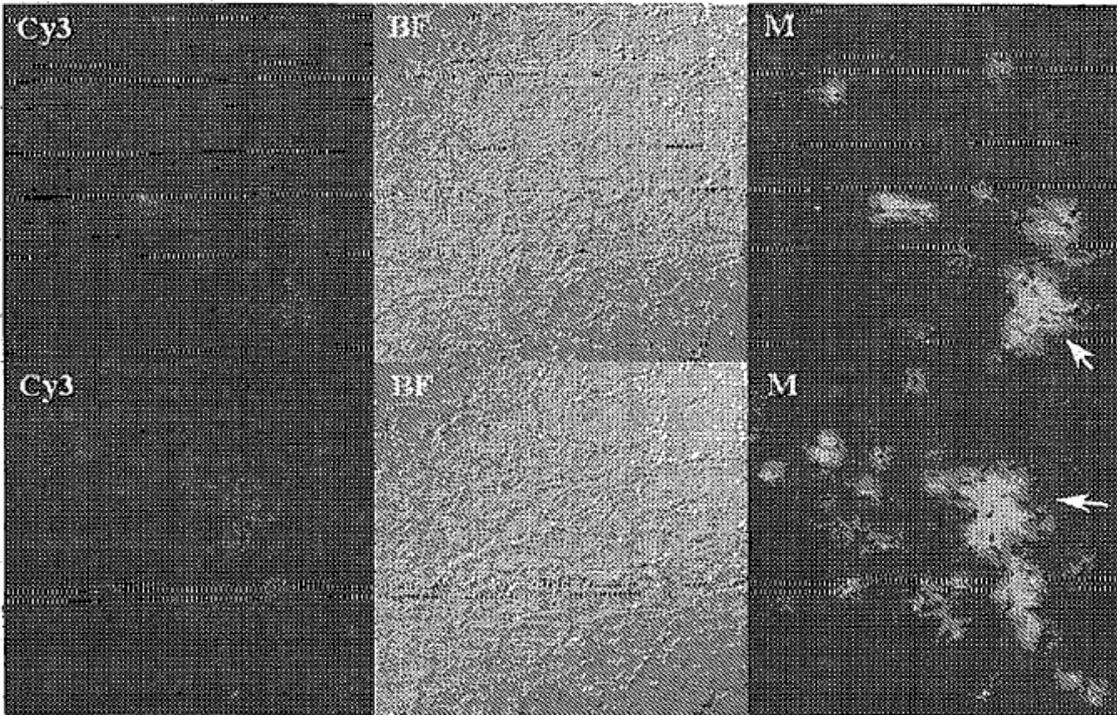


Figura 2D

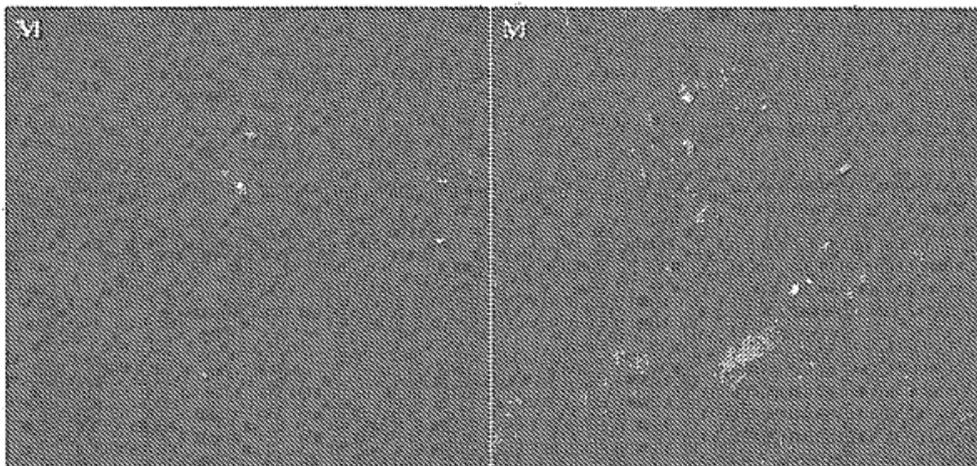


Figura 3A - 3C

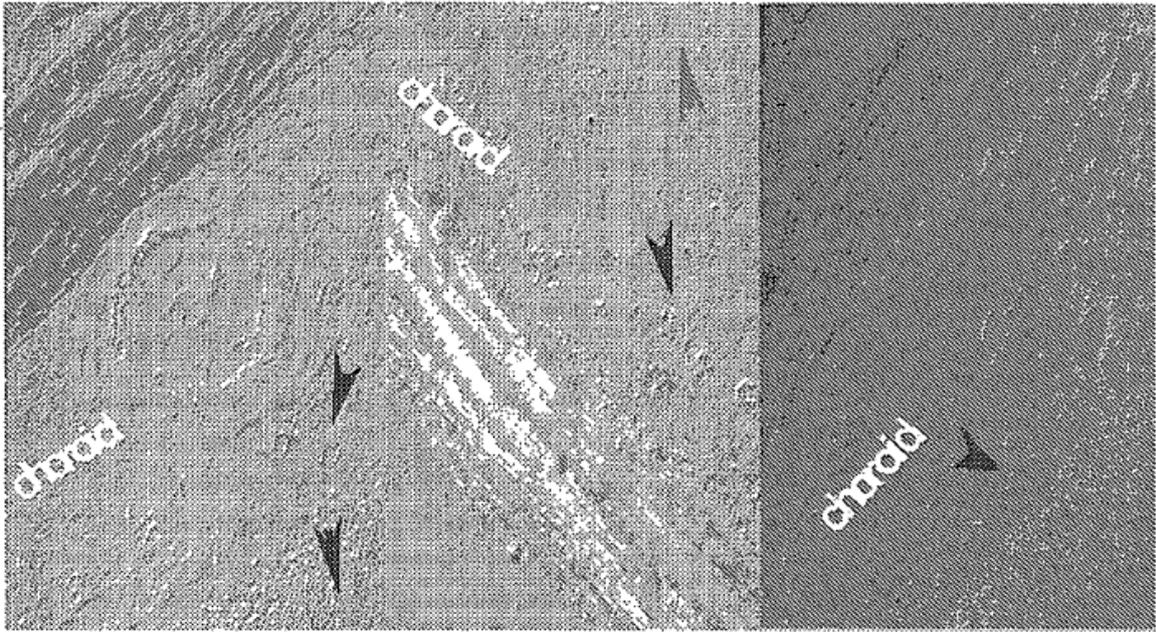


Figura 4

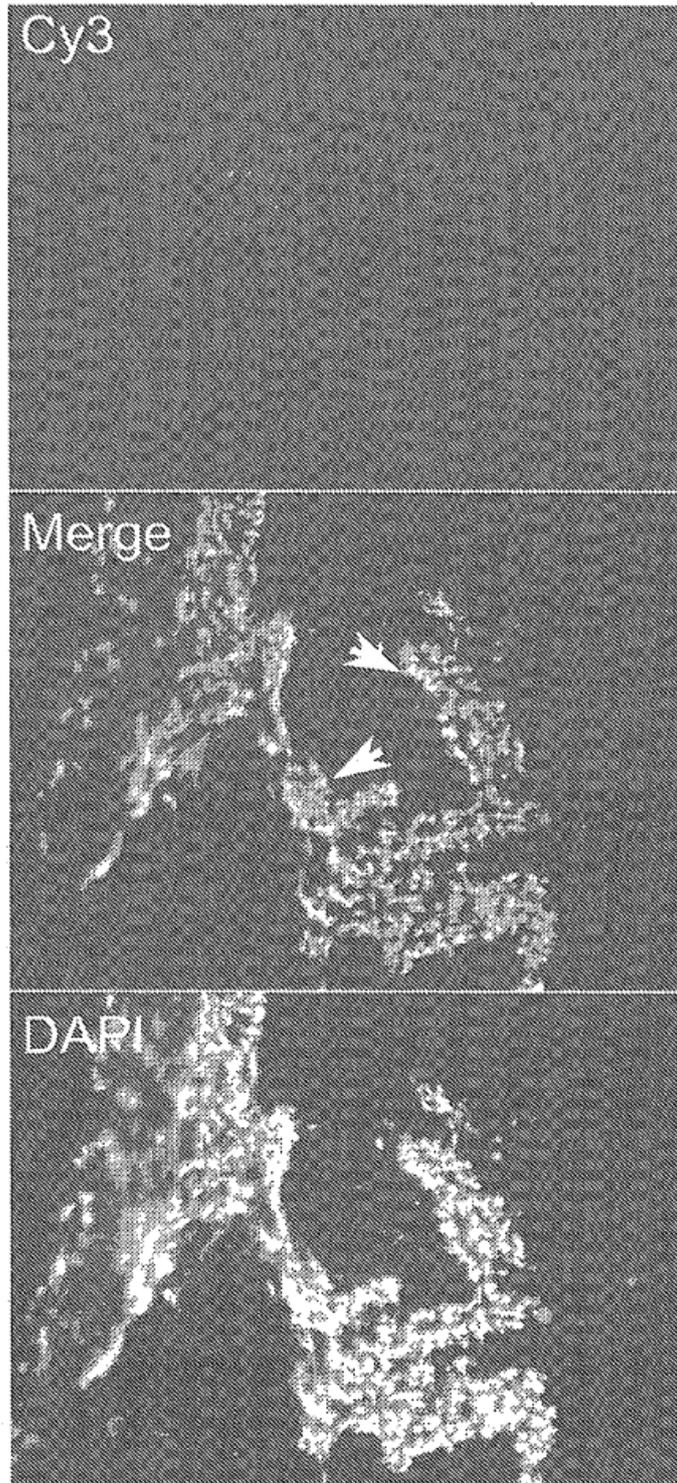


Figura 5A

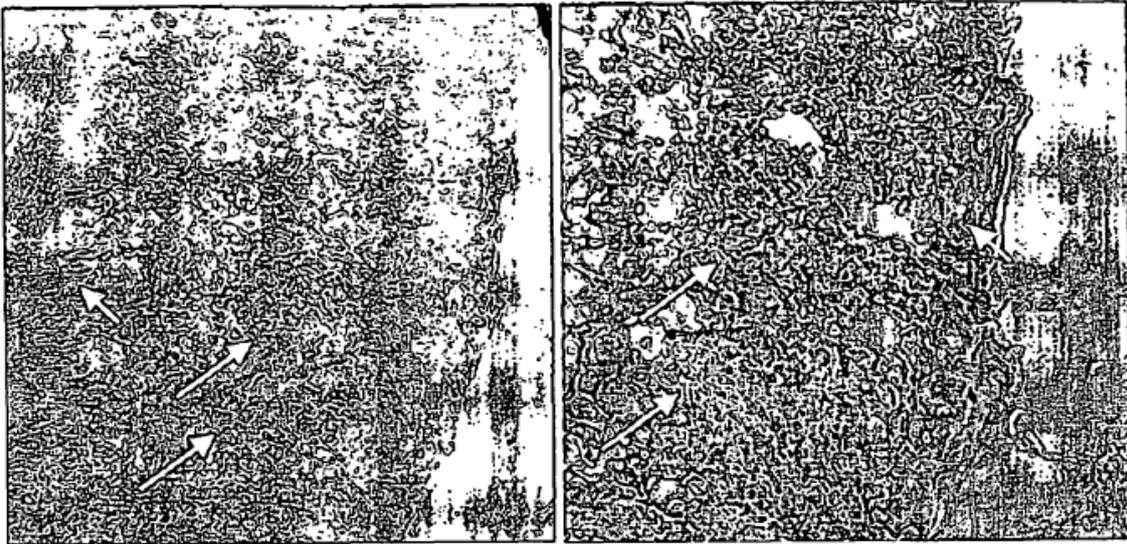


Figura 5B

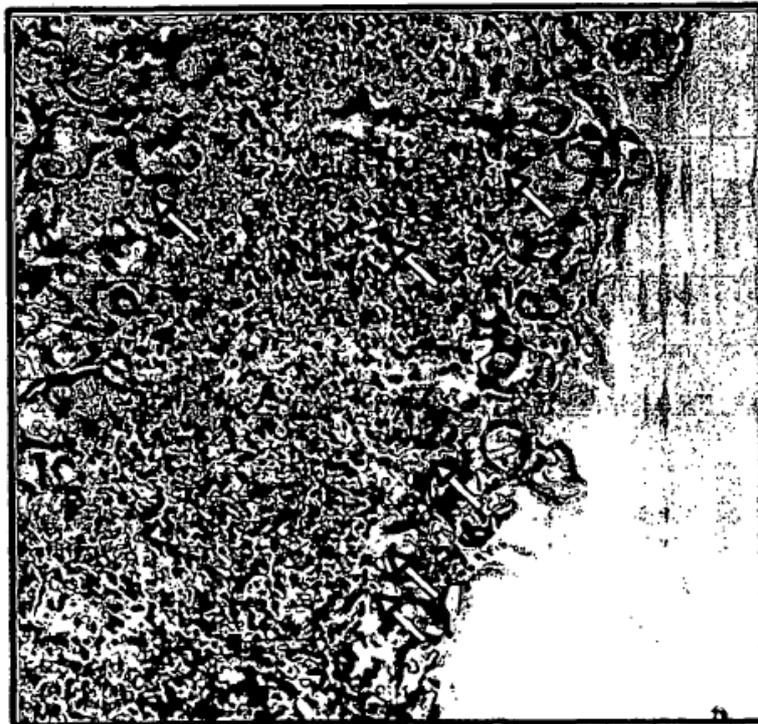


Figura 6A

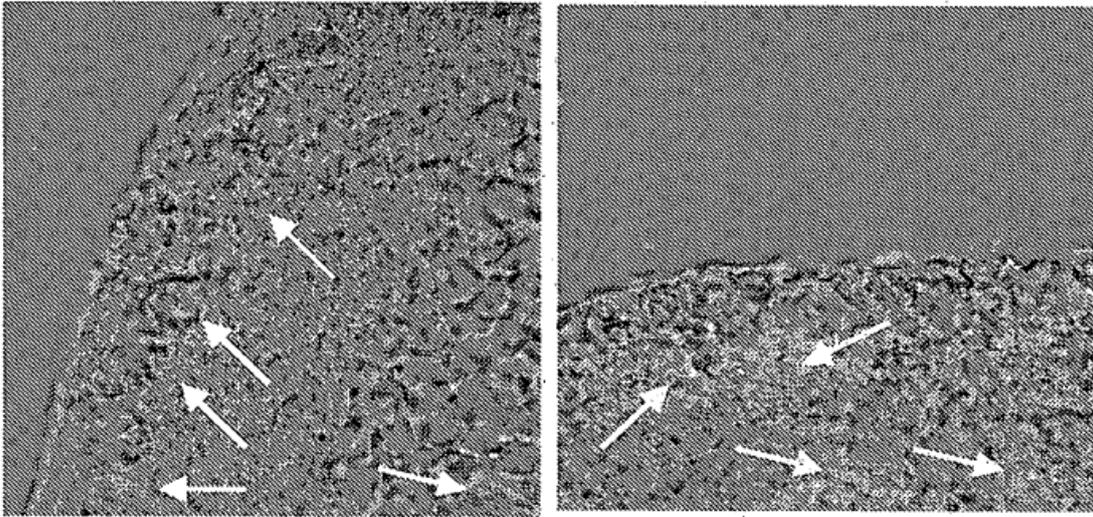


Figura 6B

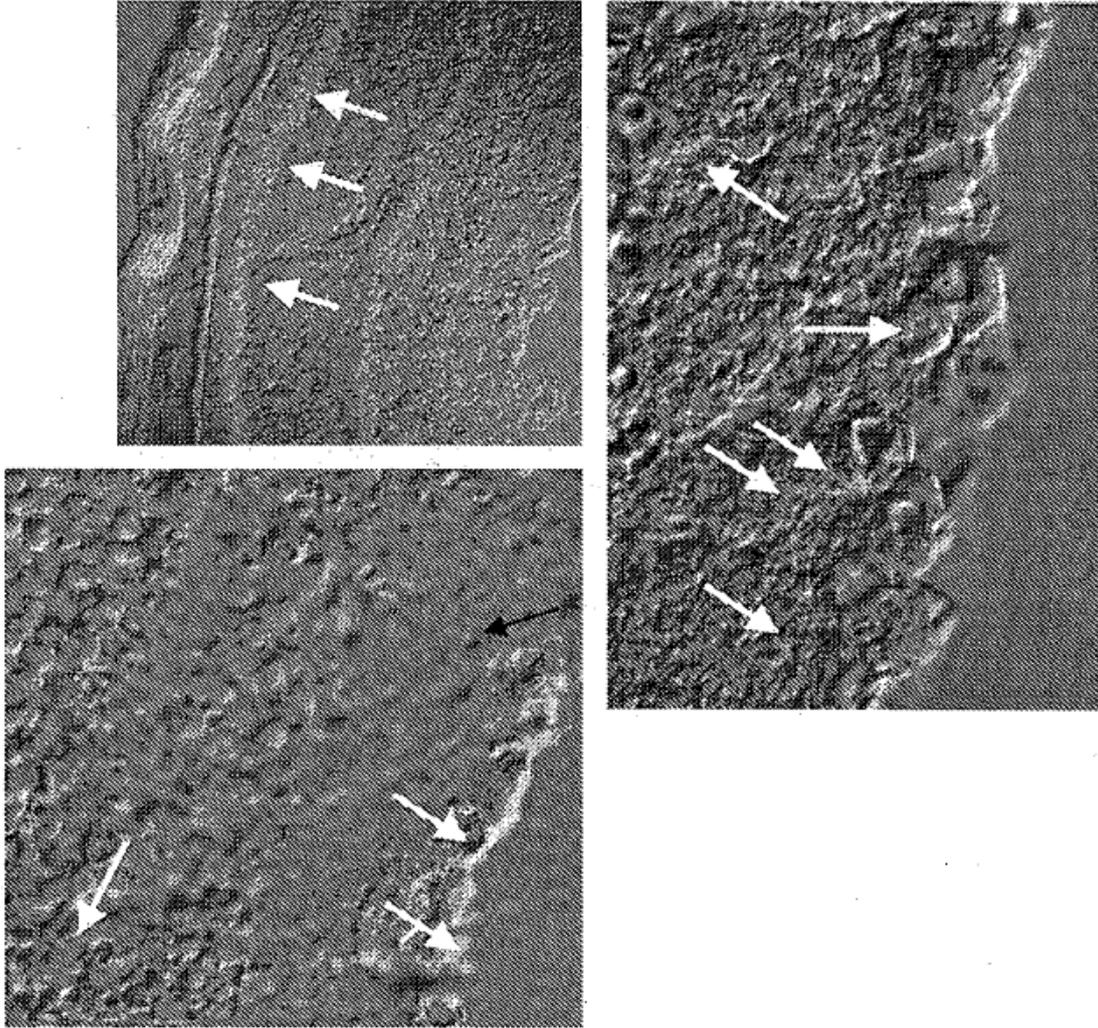


Figura 7

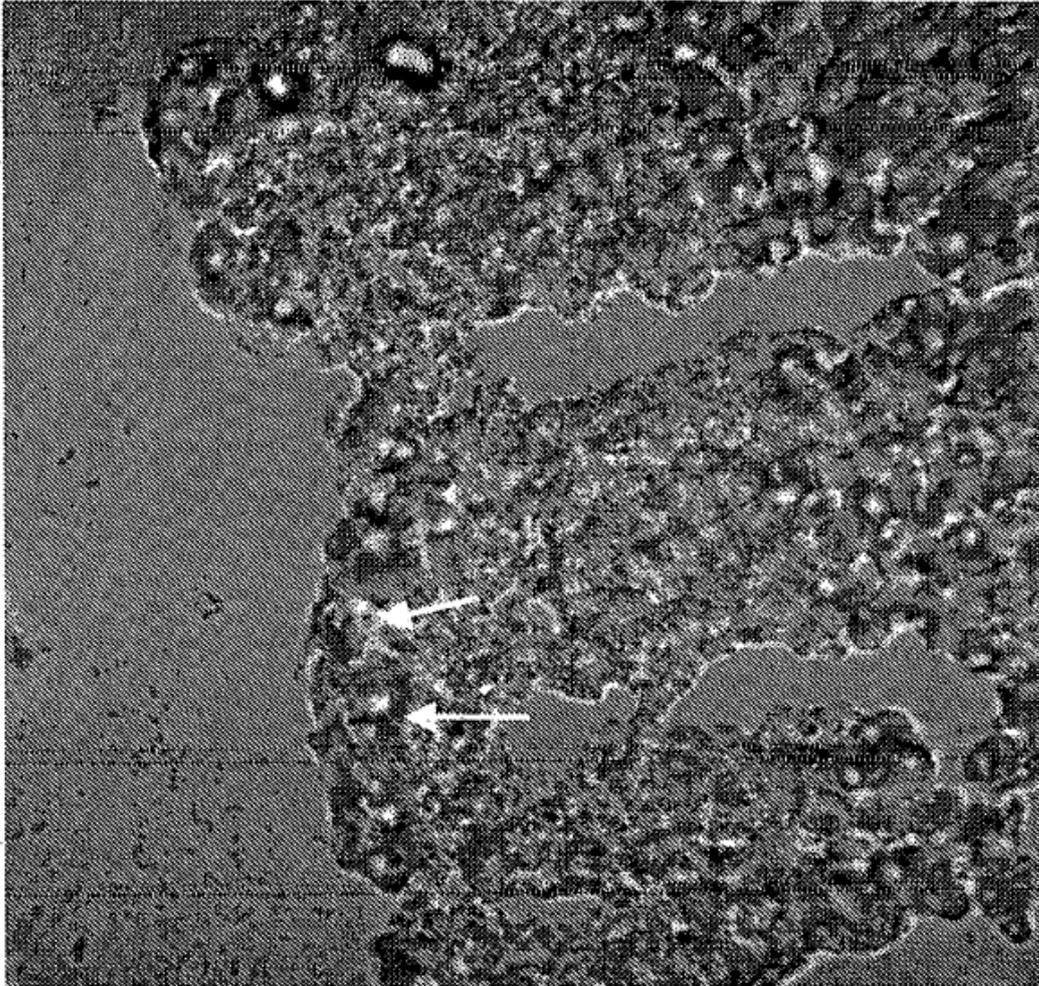


Figura 8A

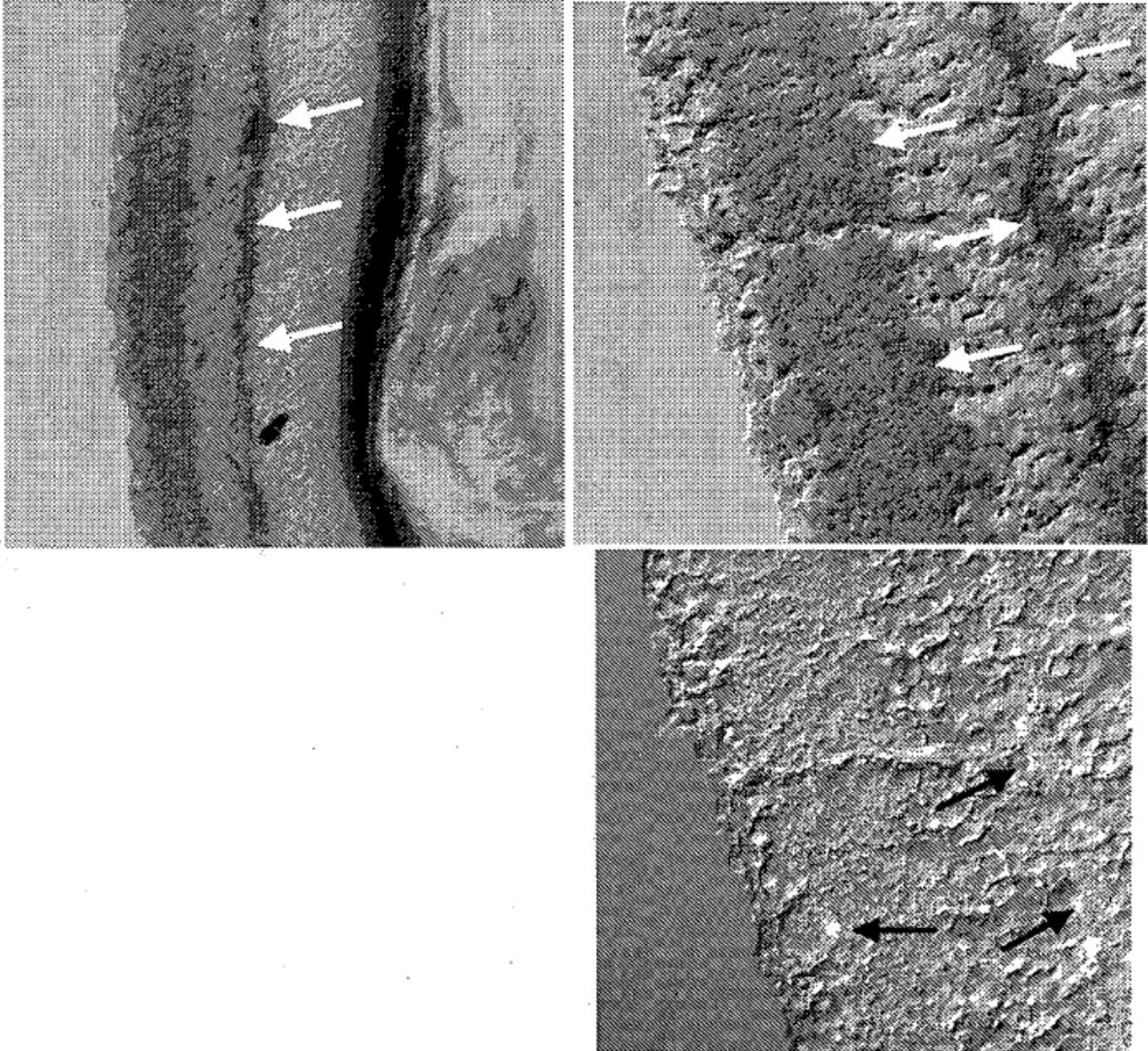


Figura 8B

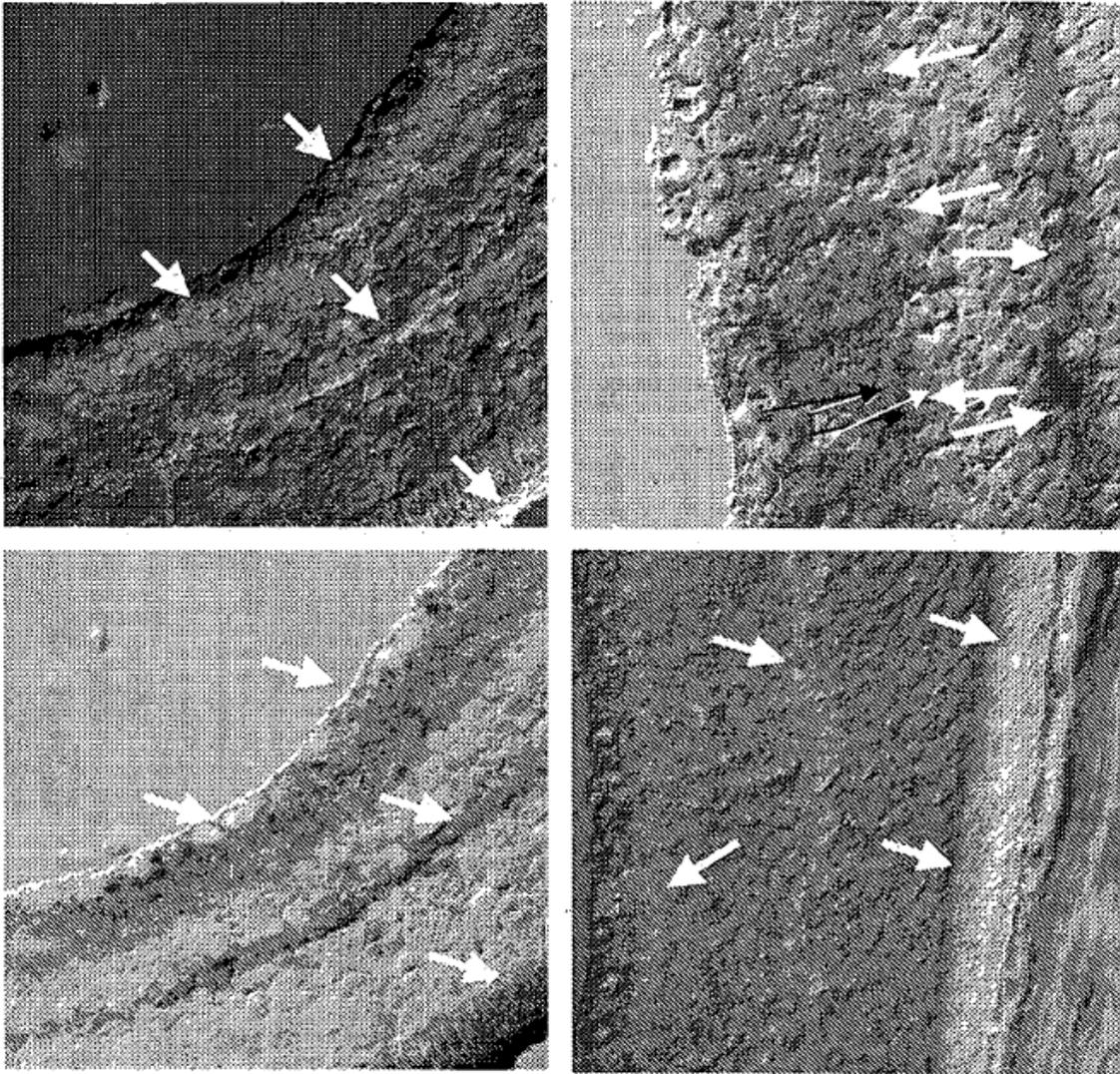


Figura 8C

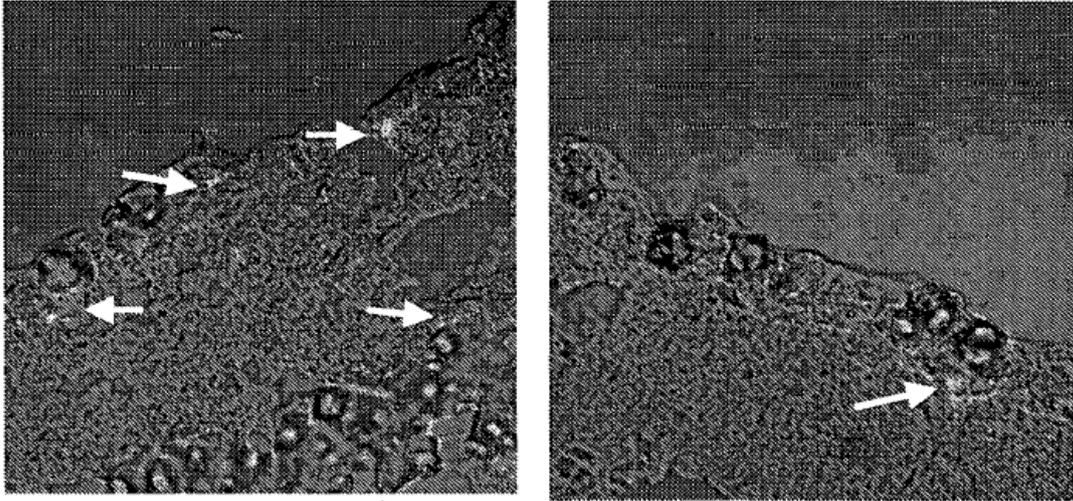


Figura 9A

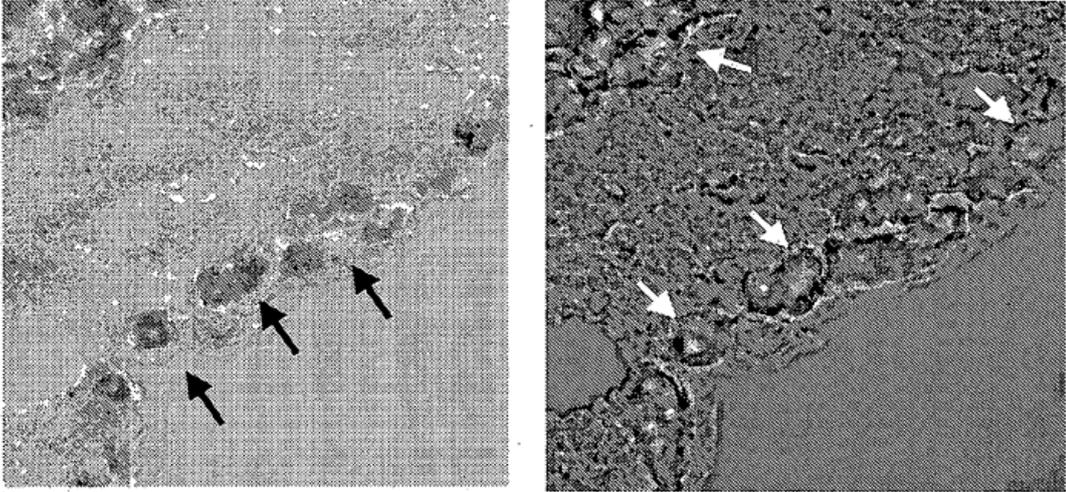


Figura 9B

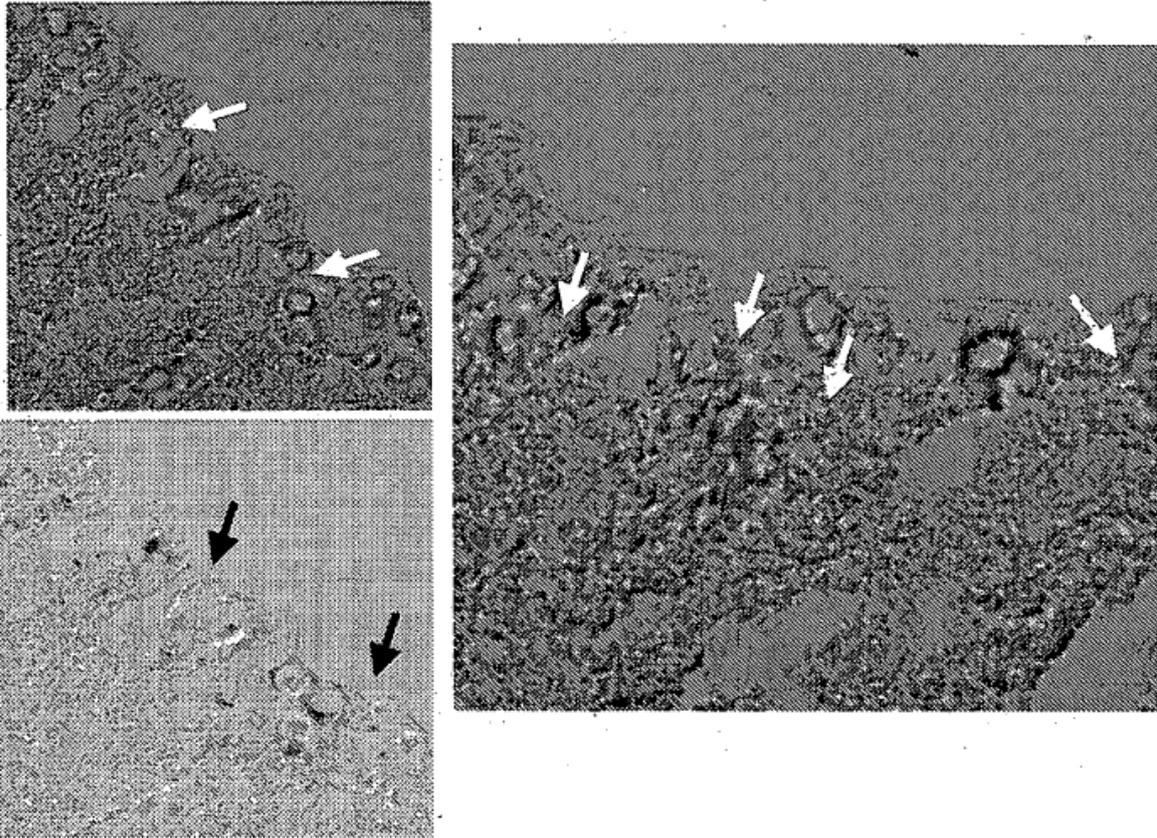


Figura 10A

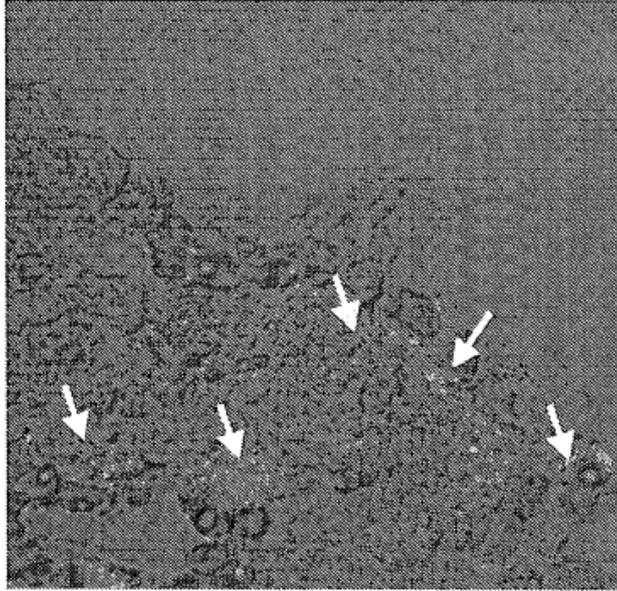


Figura 10B

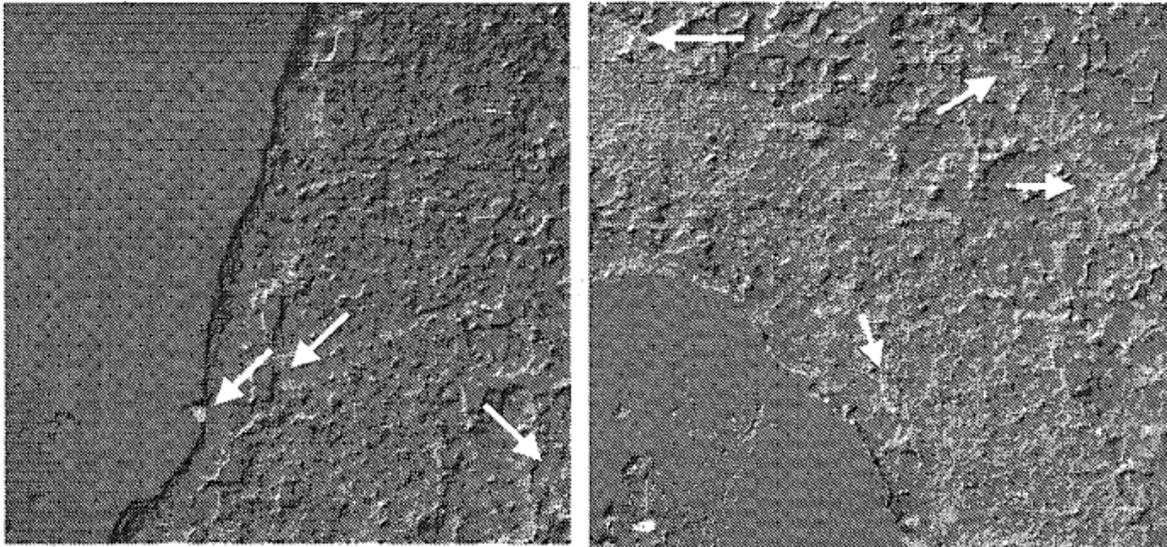


Figura 11

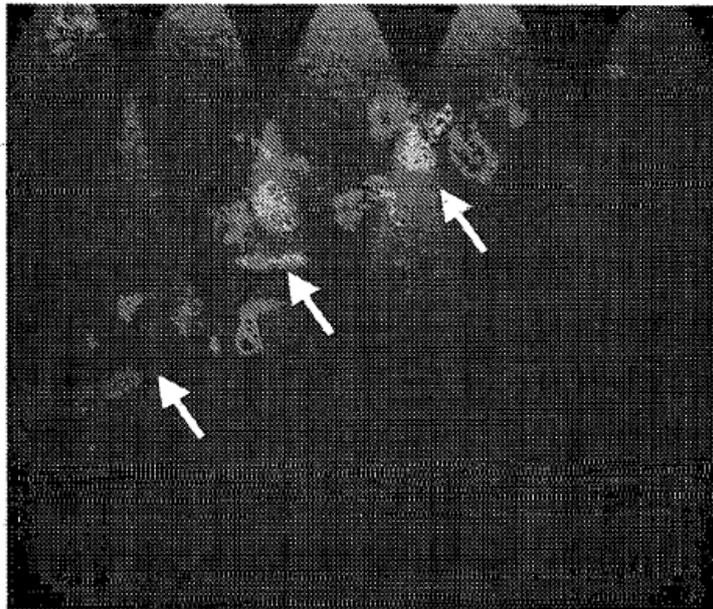
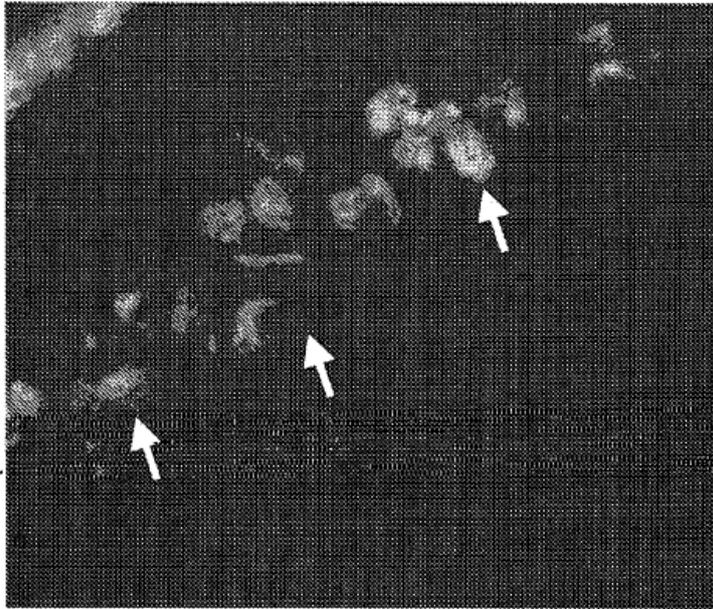


Figura 12A

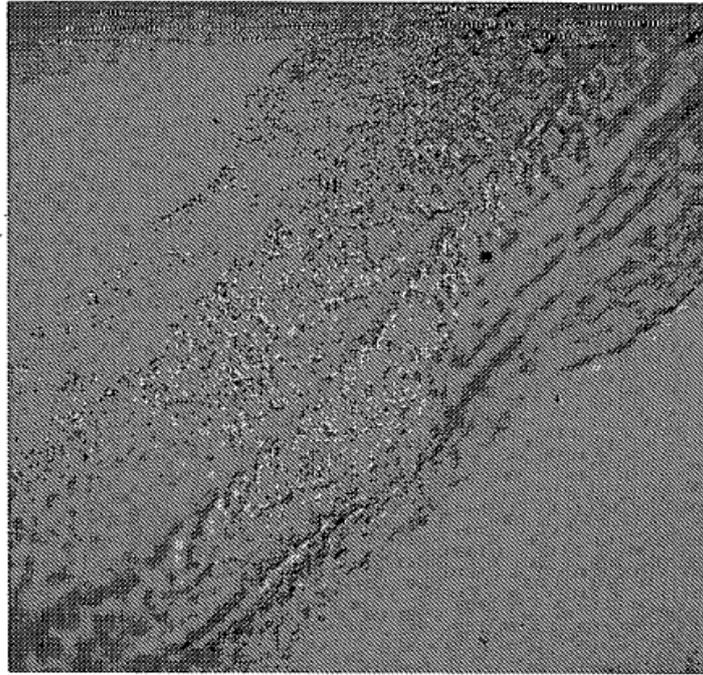


Figura 12B

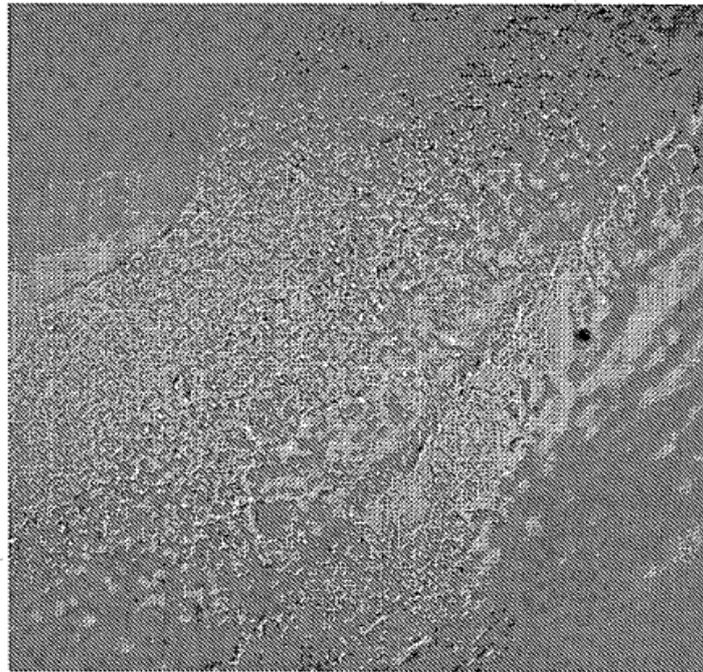


Figura 13A

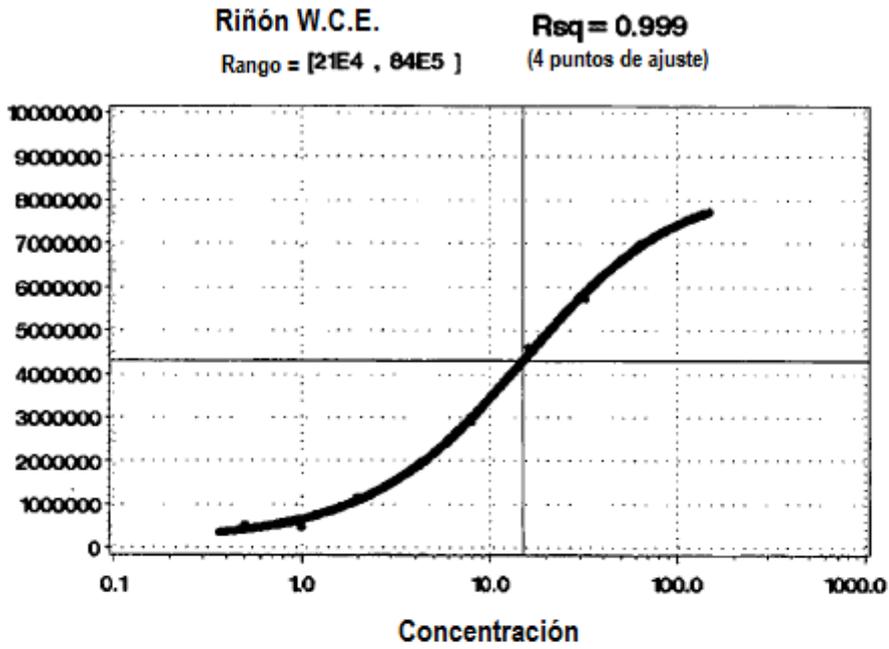


Figura 13B

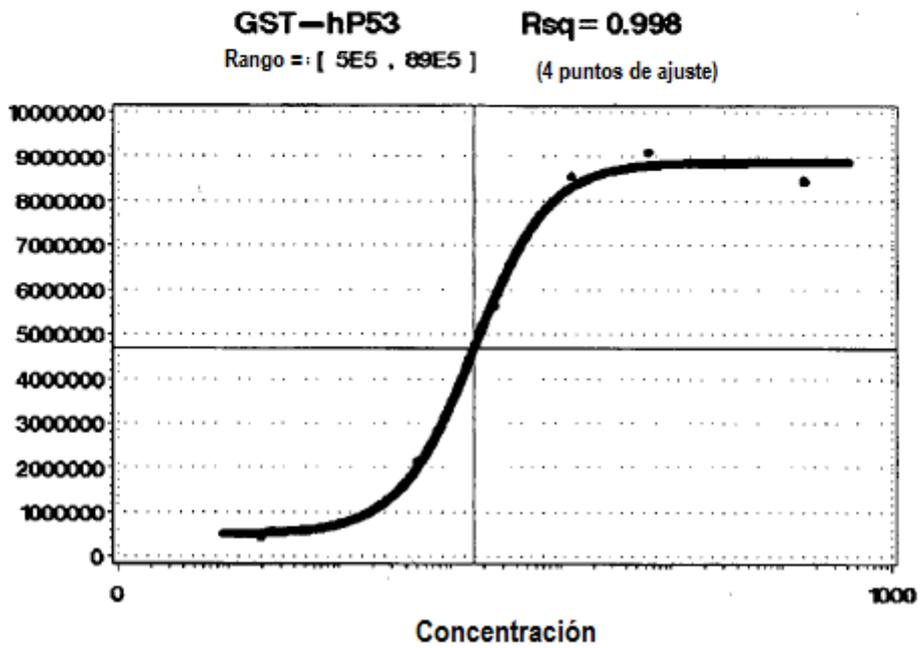


Figura 13C

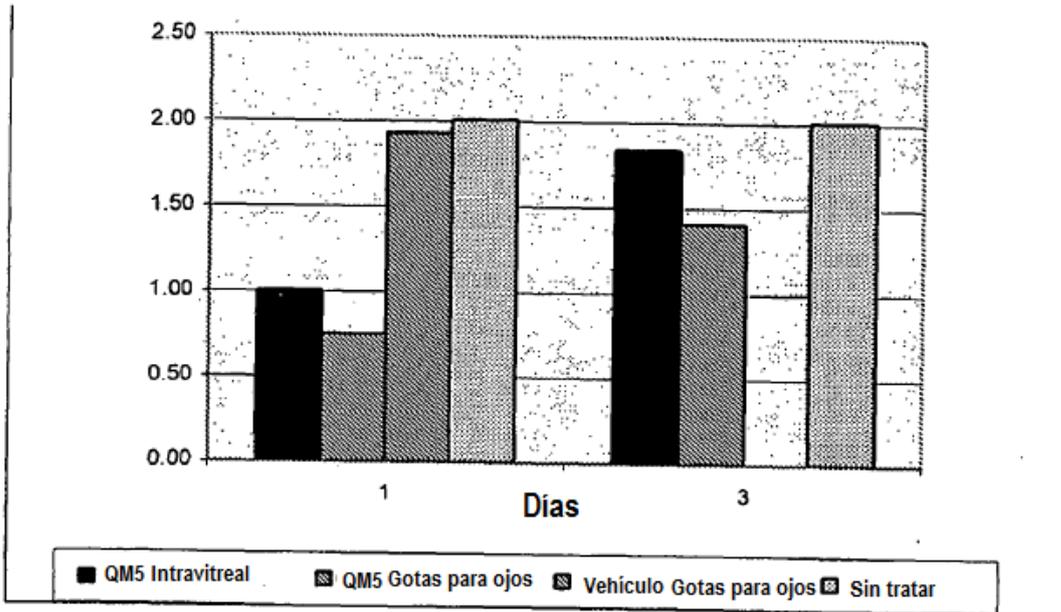


Figura 13D

