

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 346**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/712 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2013 PCT/EP2013/068245**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14037377**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2013 E 13759707 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2893019**

54 Título: **ARNip y su uso en métodos y composiciones para el tratamiento y/o la prevención de afecciones oculares**

30 Prioridad:

05.09.2012 GB 201215857

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

08.10.2018

73 Titular/es:

**SYLENTIS S.A.U. (100.0%)
Plaza del Descubridor Diego de Ordás nº 3 Plta. 5
28003 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**JIMENEZ ANTON, ANA ISABEL;
GONZALEZ FAJARDO, VICTORIA y
RUZ PALOMAR, VERONICA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 685 346 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

ARNip y su uso en métodos y composiciones para el tratamiento y/o la prevención de afecciones oculares

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la disposición de productos de ARNip y su uso en métodos y composiciones para el tratamiento y/o prevención de afecciones oculares relacionadas con altos niveles de expresión y/o actividad del receptor de potencial transitorio vaniloide (TRPV1, del inglés "transient receptor potential vanilloid") que utiliza ARN de interferencia. Entre otros, se deben mitigar las afecciones oculares asociadas al dolor ocular como la incomodidad y la sensibilidad alterada de la córnea después de una cirugía refractiva, el uso de lentes de contacto, el síndrome del ojo seco y el síndrome de Sjogren.

15 **Antecedentes de la invención**

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo regulador de origen natural de la mayoría de las células eucariotas que utilizan moléculas de ARN de doble cadena pequeño (ARNdc) para dirigir el silenciamiento de genes dependientes de homología. Su descubrimiento por Fire y Mello en el gusano *C. elegans* {Fire, 1998} fue galardonado con el Premio Nobel en 2006. Poco después de su primera descripción, también se demostró que el ARNi se produce en células de mamífero, no a través de ARNdc largos sino mediante ARN de interferencia pequeños de doble cadena (ARNip) de 21 nucleótidos de longitud {Elbashir, 2001}.

Se cree que el proceso del ARN de interferencia es un mecanismo de defensa celular conservado a lo largo de la evolución utilizado para prevenir la expresión de genes extraños y, comúnmente, se comparte por diversos filos y flora, donde se denomina silenciamiento de genes postrascriptional. Desde el descubrimiento del mecanismo del ARNi ha habido una explosión de investigación para descubrir nuevos compuestos que puedan alterar selectivamente la expresión de genes como una nueva forma para tratar enfermedades humanas mediante el direccionamiento de dianas que de otro modo serían "no aptas para fármacos" con enfoques farmacéuticos tradicionales que implican moléculas o proteínas pequeñas.

De acuerdo con el conocimiento actual, el mecanismo del ARNi se inicia cuando los ARN de doble cadena largos se procesan mediante una proteína de tipo RNasa III conocida como Dicer. Normalmente, la proteína Dicer contiene un dominio de helicasa de ARN N-terminal, un dominio de unión a ARN denominado Piwi/Argonaute/Zwille (PAZ), dos dominios de RNasa III y un dominio de unión a ARN de doble cadena (dsRBD, del inglés "double-stranded RNA binding domain") {Collins, 2005} y su actividad conduce al procesamiento de los ARN de doble cadena largos en ARNip de doble cadena de 21-24 nucleótidos con 2 bases salientes en 3' y un grupo fosfato en 5' y un hidroxilo en 3'. Luego, se incorporan los ARNip dobles resultantes en el complejo efector conocido como complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, del inglés "RNA-induced silencing complex"), donde la cadena antisentido o guía del ARNip guía al RISC para reconocer y escindir secuencias de ARNm diana {Elbashir, 2001} sobre la liberación dependiente de adenosín trifosfato (ATP) de la molécula de ARNip de doble cadena a través de una actividad de helicasa de ARN {Nykanen, 2001}. La actividad catalítica del RISC, que conduce a la degradación del ARNm, está mediada por la endonucleasa Argonauta 2 (AGO2) {Liu, 2004; Song, 2004}. La AGO2 pertenece a la familia de proteínas Argonautas altamente conservadas. Las proteínas Argonautas son proteínas altamente básicas de ~100 KDa que contienen dos dominios comunes, a saber, los dominios PIWI y PAZ {Cerutti, 2000}. El dominio PIWI es crucial para la interacción con Dicer y contiene la actividad nucleasa responsable para la escisión de los ARNm {Song, 2004}. La AGO2 utiliza una cadena del ARNip doble como guía para encontrar ARN mensajeros que contienen secuencias complementarias y escinde la cadena principal de fosfodiéster entre las bases 10 y 11 en relación con el extremo 5' de la cadena guía {Elbashir, 2001}. Un importante paso durante la activación del RISC es la escisión de la cadena sentido o pasajera mediante la AGO2, que elimina esta cadena del complejo {Rand, 2005}. Estudios de cristalografía que analizan la interacción entre la cadena guía del ARNip y el dominio PIWI revelan que son solo los nucleótidos 2 a 8 los que constituyen una "secuencia semilla" que dirige el reconocimiento del ARNm diana por el RISC, y que una discordancia de un único nucleótido en esta secuencia puede afectar drásticamente la capacidad de silenciamiento de la molécula {Ma, 2005; Doench 2004; Lewis, 2003}. Una vez que se ha escindido el ARNm y debido a la presencia de extremos de ARN desprotegidos en los fragmentos, el ARNm se escinde y degrada de nuevo mediante nucleasas intracelulares y ya no se traducirá en proteínas {Orban, 2005} mientras el RISC se recicla para rondas subsiguientes {Hutvagner, 2002}. Esto constituye un proceso catalítico que conduce a la reducción selectiva de moléculas de ARNm específicas y las proteínas correspondientes. Es posible explotar este mecanismo nativo para el silenciamiento de genes con el fin de regular cualquier gen(es) de elección mediante la liberación directa de efectores de ARNip en las células o tejidos, donde activarán el RISC y producirán un silenciamiento potente y específico del ARNm diana.

Se han publicado muchos estudios que describen las características ideales que un ARNip debería tener para lograr la máxima eficacia, con respecto a la longitud, estructura, composición química y secuencia. Los parámetros iniciales para el diseño de ARNip fueron expuestos por Tuschl y colaboradores en el documento WO02/44321, aunque desde entonces se ha publicado muchos estudios, algoritmos y/o mejoras posteriores. Asimismo, se ha puesto un esfuerzo considerable en mejorar la estabilidad del ARNip, ya que se percibe como uno de los principales obstáculos para la

terapia basada en ARNip, dada la naturaleza ubicua de las RNasas en fluidos biológicos. Una de las principales estrategias seguidas para mejorar la estabilidad ha sido la utilización de nucleótidos modificados tales como nucleótidos 2'-O-metil, nucleótidos 2'-amino, nucleótidos que contienen puentes 2'-O o 4'-C metileno. Asimismo, se ha descrito la modificación de la cadena principal de ribonucleótidos que conecta nucleótidos adyacentes, principalmente mediante la introducción de nucleótidos modificados con fosforotioato. Parece que la estabilidad mejorada es, a menudo, inversamente proporcional a la eficacia (Parish, 2000) y solo un cierto número, posiciones y/o combinaciones de nucleótidos modificados pueden dar como resultado un compuesto de silenciamiento estable. Como este es un obstáculo importante dentro de los tratamientos basados en ARNip, se han publicado diferentes estudios que describen ciertos patrones de modificación que muestran buenos resultados, ejemplos de los mismos incluyen los documentos EP1527176, WO2008/050329, WO2008/104978 o WO2009/044392, aunque se pueden encontrar muchos más en la bibliografía.

El receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1), también llamado receptor vaniloide 1 (VR-1), es un canal catiónico dependiente de ligando sensible a capsaicina, que se descubrió por primera vez en 1997 (Caterina, 1997). El TRPV1 se expresa principalmente en neuronas sensoriales y sirve como un detector molecular para calor, capsaicina, protones y endovaniloides (Caterina, 2001; Montell, 2002; Baumann, 2000). Aunque los inventores de la presente solicitud también han encontrado la expresión del TRPV1 en tejidos de la glándula lagrimal y el cuerpo ciliar.

Cuando el TRPV1 se activa mediante agonistas tales como capsaicina y otros factores tales como el calor, acidosis, productos de lipoxigenasa o anandamina, el calcio entra en la célula y se inician señales de dolor. La activación del canal induce la liberación de neuropéptidos desde los terminales nerviosos sensoriales centrales y periféricos, que da como resultado la sensación de dolor, inflamación neurogénica y, a veces, la contracción del músculo liso y tos. Como cuestión de hecho, la evidencia reciente sugiere un papel del TRPV1 en el dolor, tos, asma e incontinencia urinaria (Jia, 2005). De hecho, el TRPV1 es un objetivo conocido para los tratamientos mediante analgesia en respuesta a estímulos de dolor. Además, también se han descrito tratamientos diseñados para reducir los niveles de expresión del TRPV1 utilizando diferentes tecnologías en el documento WO2004/042046, o (Schubert, 2005), con un enfoque en el tratamiento del dolor.

Los nociceptores polimodales son el tipo de nociceptores más abundante que se encuentra en la córnea. Existe evidencia farmacológica de que estas fibras receptoras expresan el receptor TRPV1 porque responden a capsaicina, calor y ácido. Además, altas dosis de capsaicina inactivan la respuesta de los nociceptores polimodales corneales al calor y al ácido, mientras que la capacidad de respuesta mecánica permanece inalterada. Esto sugiere que se inactivaron selectivamente los receptores TRPV1 presentes en las terminaciones nerviosas polimodales corneales.

Por lo tanto, es probable que una parte importante de la respuesta nociceptiva aguda a la lesión de la córnea y las sensaciones de dolor sostenido que acompañan a procesos inflamatorios e irritativos en este tejido estén mediados por la activación del TRPV1.

Además, el documento WO2007/045930 describe la utilización de ARNip específicos del TRPV1 para el tratamiento de patologías oculares relacionadas con dolor acular y el síndrome del ojo seco. Sin embargo, la presente invención proporciona productos mejorados para reducir la expresión del TRPV1 y el malestar ocular consiguiente. La ventaja del tratamiento de estas afecciones con productos de ARNip frente a inhibidores químicos tradicionales es que los tratamientos basados en ARNip tendrán un efecto de mayor duración. Este resultado se debe al hecho de que una vez que la molécula efectora ya no está presente, la célula tendrá que sintetizar nuevos receptores desde cero; mientras que los tratamientos tradicionales dejarían intactos los niveles de receptores en la membrana celular.

El documento WO2011/148193 describe ARNip que inhiben la expresión del gen del TRPV1, que se dirige a una secuencia común para las variantes de transcripción del TRPV1, 5'-AAGCGCATCTTCTACTTCA-3'.

Debido al estilo de vida actual, el número de personas afectadas por patologías oculares relacionadas con la sensibilidad ocular alterada es bastante alto y, se espera que aumente con el envejecimiento de la población. La cirugía refractiva y la utilización de lentes de contacto a menudo derivan en una sensibilidad corneal alterada y una sensación de ojo seco en el paciente. Esto, además, se agrava por las largas horas de trabajo mirando las pantallas de los ordenadores y la utilización de sistemas de aire acondicionado que, generalmente, secan más la atmósfera. Asimismo, la cantidad y la calidad de las lágrimas disminuyen con la edad. Los síntomas que acompañan al síndrome del ojo seco incluyen picazón, ardor e irritación de los tejidos oculares. Una forma más grave del ojo seco tiene lugar en pacientes con el síndrome de Sjogren. La presencia de una o diferentes combinaciones de estas sensaciones se denomina dolor ocular dentro del significado del presente texto. En la actualidad, se estima que el síndrome del ojo seco afecta a más 10 millones de estadounidenses.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama que muestra el perfil de expresión temporal del TRPV1, utilizando Qrt-PCR, después de la transfección de células HeLa con diferentes ARNip que se dirigen al TRPV1: un compuesto de acuerdo con la presente invención (SEQ ID NO: 2), un compuesto previamente descrito que se dirige a una región diferente

(SEQ ID NO: 7) y otros cuatro ARNip (SEQ ID NO: 17 a 20) diseñados para dirigirse al TRPV1 y una secuencia aleatoria utilizada como control negativo. Se muestran dos representaciones alternativas de los mismos resultados para asegurar la claridad, A y B.

5 La Figura 2 es un diagrama que muestra el perfil de expresión temporal del TRPV1, utilizando Qrt-PCR, después de la transfección de células HeLa con diferentes ARNip de la presente invención: SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8 a SEQ ID NO: 16, y una secuencia aleatoria utilizada como control negativo.

10 La figura 3 muestra una línea de tiempo con la apertura palpebral medida en mm de los ojos de conejos tratados con un compuesto de la presente invención (SEQ ID NO: 2) en comparación con capsazepina, un analgésico específico aceptado para el dolor dependiente del TRPV1, después de la estimulación con capsaicina.

15 La figura 4 es un gráfico que muestra la relación (%) con respecto a los valores previos a la prueba, de la apertura palpebral después de la inducción del dolor con capsaicina, resultante del tratamiento con un compuesto de la presente invención (SEQ ID NO: 2) y capsazepina.

La figura 5 es un gráfico que muestra la cantidad de producto intacto (%) restante después de exponerse al plasma al 10 % durante 24 horas.

20 La figura 6 es un gráfico que muestra la concentración de la SEQ ID NO: 2 en tejidos oculares basándose en la cadena antisentido intacta 5-fosforilada, lo que significa la cantidad de la cadena antisentido no metabolizada intacta de la SEQ ID NO: 2 (compuesto original) que está presente en el compartimento citoplasmático y se activa mediante 5'-fosforilación. Barra izquierda: 5 min; barra derecha: 30 min.

25 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un ARNip dirigido a la SEQ ID NO: 1 para su uso en el tratamiento del ojo seco y/o del dolor ocular en el que el ARNip se administra en una dosificación de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,9 mg por día. Otros aspectos de la invención se explican en las reivindicaciones dependientes. También se proporciona un kit médico para el tratamiento del ojo seco y/o del dolor ocular, de acuerdo con la reivindicación independiente 8.

30 En el presente documento se describe la disposición de un régimen de dosificación para una molécula de ARNip en el que dicha molécula se dirige específicamente a la SEQ ID NO: 1 y reduce la expresión del gen del TRPV1 cuando se introduce en una célula.

Un gen se "dirige a" mediante un ARNip de acuerdo con la presente invención cuando, por ejemplo, la molécula de ARNip disminuye o inhibe selectivamente la expresión del gen. La frase "disminuye o inhibe selectivamente" como se usa en el presente documento abarca los ARNip que afectan a la expresión de un gen, en este caso TRPV1. Como alternativa, un ARNip se dirige a un gen cuando el ARNip se hibrida en condiciones rigurosas con la transcripción del gen, es decir, su ARNm. Capaz de hibridar "en condiciones rigurosas" significa reasociación a la región de ARNm diana, en condiciones estándar, por ejemplo, alta temperatura y/o bajo contenido de sal que tienden a desfavorecer la hibridación. Un protocolo adecuado (que incluye SSC 0,1x, 68 °C durante 2 horas) se describe en Maniatis, T., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, en las páginas 387-389.

40 Las secuencias de ácidos nucleicos citadas en el presente documento se escriben en dirección 5' a 3' a menos que se indique lo contrario. La expresión "ácido nucleico" se refiere a ADN o ARN o a formas modificadas de los mismos que comprenden las bases purina o pirimidina presentes en el ADN (adenina "A", citosina "C", guanina "G", timina "T") o en el ARN (adenina "A", citosina "C", guanina "G", uracilo "U"). Los ARN de interferencia proporcionados en el presente documento pueden comprender bases "T", por ejemplo en extremos 3', a pesar de que las bases "T" no son de origen natural en el ARN. En algunos casos, estas bases pueden aparecer como "dT" para diferenciar los desoxirribonucleótidos presentes en una cadena de ribonucleótidos.

55 La secuencia diana como se definió anteriormente se describe como una secuencia de ADN diana como se utilizó para la definición de las variantes de transcripción en bases de datos utilizadas para fines de diseño de ARNip, mientras que los compuestos específicos a utilizarse serán secuencias de ARN definidas como tales.

60 Se han identificado diferentes variantes de transcripción que corresponden al TRPV1. Los números de referencia de GenBank que corresponden a cuatro TRPV1 de transcripción producidos mediante la unión alternativa son: NM_080704 (NM_080704.3, GI:117306161), NM_018727 (NM_018727.5, GI:117306160), NM_080706 (NM_080706.3, GI:117306163) y NM_080705 (NM_080705.3, GI:117306162). Además, ENSEMBL (MBL-EBI/Wellcome Trust Sanger Institute) tiene además 5 TRPV1 de transcripción publicados: ENST00000174621, ENST00000310522, ENST00000344161, ENST00000399752, ENST00000399756, ENST00000399759, ENST00000425167.

En el presente documento se describen regímenes de dosificación para los ARNip que inhiben la expresión del gen del TRPV1, siendo estos ARNip especialmente eficaces en comparación con aquellos ya desvelados en el estado de la técnica. Especialmente eficaces significa que logran grados mayores de inhibición y/o un efecto más prolongado en el tiempo.

5 Estos ARNip se diseñan contra una secuencia diana común para todas las variantes de transcripción del TRPV1 descritas en el párrafo anterior y, además, median la degradación mediada por el RISC de todos los ARNm posibles presentes en la célula que codifica la proteína del TRPV1. Dichas regiones diana preferidas se identifican en la SEQ ID NO: 1 (5-AAGCGCATCTTCTACTTCA-3'). Se describen en el documento WO2011/148193.

10 Por consiguiente, un ARNip de acuerdo con los aspectos de la presente invención comprende una molécula de ARN de doble cadena, cuya cadena antisentido comprenderá o consistirá en una secuencia de ARN sustancialmente complementaria a la SEQ ID NO: 1 y, su cadena sentido comprenderá una secuencia de ARN complementaria a la cadena antisentido, en la que ambas cadenas se hibridan mediante el emparejamiento de bases estándar entre
15 nucleótidos. Dentro del significado de la presente invención "sustancialmente complementaria" a una secuencia de ARNm diana, también puede comprenderse como "sustancialmente idéntica" a dicha secuencia diana. "Identidad" como se conoce por el experto en la técnica, es el grado de relación de secuencia entre secuencias de nucleótidos como se determina mediante la coincidencia del orden y la identidad de nucleótidos entre secuencias. En una realización, la cadena antisentido de un ARNip que tiene el 80 % y entre el 80 % hasta el 100 % de
20 complementariedad, por ejemplo, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de complementariedad, a la secuencia de ARNm diana se considera sustancialmente complementaria y puede utilizarse en la presente invención. El porcentaje de complementariedad describe el porcentaje de nucleótidos contiguos en una primera molécula de ácidos nucleicos que puede formar pares en el sentido de Watson-Crick con un conjunto de nucleótidos contiguos en una segunda
25 molécula de ácidos nucleicos.

Como se conoce por el estado de la técnica, se han propuesto muchas estructuras diferentes para lograr ARN de interferencia. Generalmente, estas moléculas de doble cadena tienen aproximadamente 19 a aproximadamente 25
30 nucleótidos de longitud e incluyen estructuras con extremos romos así como aquellas con salientes. Se han descrito que los salientes son ventajosos y pueden presentarse en los extremos 5' o en los extremos 3' de las dos cadenas ya que reducen el reconocimiento mediante RNAsas e imitan el sustrato natural de las Dicer. Algunos autores recomiendan incluir salientes en ambos extremos 3' de las moléculas, mientras otros consideran suficiente un saliente. Otros han descrito la utilización de estructuras de extremos romos con patrones de modificación específicos (documentos EP 1527176, WO 2008/104978 u muchos otros).

35 Los salientes pueden comprender entre 1 y 5 nucleótidos, normalmente, los salientes se forman por dinucleótidos. Las moléculas clásicas utilizadas en el campo, comprenden una molécula de doble cadena de 19 nucleótidos que comprende además salientes en 3' de dinucleótidos que comprenden preferentemente desoxinucleótidos como se enseñó en estudios iniciales por Tuschl (documento WO02/44321). Se dice que estos salientes mejoran además la
40 resistencia a la degradación de nucleasas (RNAsas). Después, Kim et al. 2005 describen que los productos de 21-mer (que contienen salientes de dinucleótidos) son necesarios para la carga en el RISC. Además, Bramsen et al. 2009 describen la introducción de posibles modificaciones desestabilizadoras en los salientes para aumentar adicionalmente la eficacia del silenciamiento.

45 Como tal, una realización preferida de los diversos aspectos de la presente invención se refiere a moléculas de ARNip que se dirigen a la SEQ ID NO: 1 que comprenden al menos un saliente. Otra realización alternativa de los diversos aspectos de la presente invención proporciona moléculas con extremos romos.

50 La presente invención desvela un ARNip que comprende o consiste en una estructura de doble cadena de 19 nucleótidos que se dirige a la SEQ ID NO: 1. Sorprendentemente, dichos ARN de doble cadena de 19 nucleótidos han demostrado ser más resistentes a la degradación que productos con 21 nucleótidos y salientes en 3' descritos previamente como puede verse en la figura 5.

55 La presente invención desvela un ARNip con extremos romos de doble cadena de 19 nucleótidos dirigido contra la SEQ ID NO: 1. En una realización particular adicional este compuesto se identifica como la SEQ ID NO: 2 (5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'). En una realización preferida adicional, la cadena antisentido de este ARNip es al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %, complementaria a la SEQ ID NO: 1.

60 Además, como se describe en la sección denominada antecedentes de la técnica, un importante problema con moléculas de ARNip es su inestabilidad en los fluidos biológicos debido a la naturaleza ubicua de las RNAsas. Por consiguiente, se ha descrito la utilización de muchas modificaciones químicas diferentes a los nucleótidos con el fin de mejorar la estabilidad del compuesto.

65 Otro problema inherente de las moléculas de ARNip es su inmunogenicidad, por lo cual se han encontrado ARNip para inducir activación inespecífica del sistema inmune innato, que incluye la regulación positiva de ciertas citoquinas, por ejemplo, interferón de tipo I y/o tipo II así como la producción de IL-12, IL-6 y/o TNF-alfa. Se cree que

el origen de estos efectos es la activación de los receptores de tipo Toll tales como TLR7, TLR8 y/o TLR3 mediante los ARNip.

5 Ambos efectos, reconocimiento mediante RNAsas e inmunogenicidad, también se han descrito por ser dependientes de secuencia.

10 Algunas de las modificaciones químicas que mejoran la estabilidad del compuesto mediante la disminución de la susceptibilidad a las RNAsas también pueden ser capaces de reducir la inducción del reconocimiento inmune de la respuesta posterior. Sin embargo, la inserción de nucleótidos modificados químicamente en un ARNip también puede dar como resultado una disminución de la eficacia del silenciamiento como se describe en la sección anterior y, por lo tanto, debe abordarse con precaución.

15 Por consiguiente, el ARNip puede comprender, además, al menos un nucleótido con un modificación química. Las modificaciones químicas preferidas que mejoran la estabilidad y reducen los efectos inmunogénicos incluyen nucleótidos 2'-O-metilo, nucleótidos 2'-fluoro, nucleótidos 2'-amino, nucleótidos 2'-desoxi, nucleótidos que contienen puentes 2'-O o 4'-C metileno. También, la modificación de la cadena principal de ribonucleótidos que conecta nucleótidos adyacentes mediante la introducción de nucleótidos modificados por fosforotioato. Una modificación química preferida adicional dentro del significado de la presente invención se refiere a la sustitución de ribonucleótidos de uracilo por desoxitimidina (desoxirribonucleótidos). En otra realización preferida de la presente invención, el al menos un nucleótido modificado químicamente está en la cadena sentido, en la cadena antisentido o en ambas cadenas del ARNip.

20 Por consiguiente, el ARNip se puede seleccionar de las SEQ ID. NO. 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. Las moléculas de ARNip como se describen anteriormente pueden liberarse al interior de la célula en su estructura nativa utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando se estudia el silenciamiento de genes *in vitro*, estos compuestos se administran utilizando reactivos de transfección estándar. Para lograr efectos *in vivo*, pueden también administrarse estos compuestos desnudos o utilizando agentes potenciadores de la liberación tales como, por ejemplo, liposomas, conjugación con una fracción específica, etc. aunque se conocen muchas alternativas diferentes en la técnica, y se utilizan de forma diferente dependiendo del sitio diana deseado dentro del cuerpo.

30 Como alternativa, las moléculas de ARNip de los diversos aspectos de la invención se pueden expresar dentro de las células de promotores eucariotas. Se pueden liberar vectores recombinantes capaces de expresar las moléculas de ARNip y persistir en las células diana. Como alternativa, se pueden utilizar vectores que proporcionan la expresión transitoria de moléculas de ácidos nucleicos. Dichos vectores se pueden administrar repetidamente según sea necesario. Una vez expresada, la molécula de ARNip interactúa con ARNm diana y genera una respuesta de interferencia de ARN. Las moléculas de ARNip producidas de esta manera se denominan, a menudo, ARNhc (ARN de horquilla corta), y sus cadenas sentido y antisentido se unen mediante un pequeño bucle de nucleótidos. La liberación de vectores que expresan moléculas de ARNip puede ser sistémica, tal como mediante la administración intravenosa o intramuscular, mediante la administración a células diana explantadas de un sujeto seguida de la reintroducción en el sujeto o mediante cualquier otro medio que permitiría la introducción en la célula diana deseada.

45 En el presente documento también se desvela la utilización de ARNip que se dirige a la SEQ ID NO. 1 en la preparación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento de una afección ocular caracterizada por la expresión y/o actividad aumentada del TRPV1 en la que el ARNip se administra de acuerdo con el régimen de dosificación desvelado en el presente documento. El método comprende la inhibición de la expresión del TRPV1 en un paciente. El término inhibición se utiliza para indicar una disminución o regulación negativa de la expresión o actividad. Preferentemente, la afección ocular es dolor ocular. En una realización, la afección ocular se selecciona del grupo que comprende incomodidad ocular y la sensibilidad alterada de la córnea después de una cirugía refractiva, uso de lentes de contacto, síndrome del ojo seco, síndrome de Sjogren y otras patologías oculares.

50 Se espera que el tratamiento terapéutico con ARNip dirigido contra el ARNm del TRPV1 sea beneficioso sobre las gotas oculares tópicas de moléculas pequeñas mediante el aumento del tiempo que se observa ese efecto, permitiendo así una dosificación menos frecuente y un mayor cumplimiento por parte del paciente. Esto es especialmente importante en casos como el síndrome del ojo seco y la sensibilidad corneal alterada ya que a menudo son afecciones crónicas.

60 Teniendo en cuenta la preparación de dicho medicamento, puede formularse el ARNip descrito en el presente documento. Preferentemente, las composiciones y formulaciones de dichos ARNip pueden administrarse tópicamente al órgano de interés. En una realización aún más preferida, pueden formularse para administración tópica en el ojo, preferentemente en la superficie corneal del ojo. La aplicación a la superficie corneal puede ser, por ejemplo, en forma de gotas para los ojos, un gel, loción, crema o insertos oculares. Otras formas de administración al ojo pueden incluir inyección en el ojo.

65 En el presente documento se describe adicionalmente un ARNip que se dirige específicamente a la SEQ ID NO: 1 como se describe en los párrafos anteriores, para su uso como un medicamento para el tratamiento de una afección ocular caracterizada por la expresión y/o actividad aumentada del TRPV1 en el que el ARNip se administra de

acuerdo con el régimen de dosificación desvelado en el presente documento. Tal como se ha descrito anteriormente, puede ser un ARNip que comprende o consiste en una estructura de doble cadena de 19 nucleótidos que se dirige a la SEQ ID NO: 1. Este ARNip puede tener extremos romos. Preferentemente, el ARNip es la SEQ ID NO: 2. Otro ARNip para su uso puede seleccionarse de las SEQ ID. NO. 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16.

Dentro del contexto de la presente invención, para "dirigirse específicamente a" una secuencia, el ARNip de la invención preferentemente comprende al menos la misma secuencia semilla. Por lo tanto, cualquier secuencia que se dirige específicamente a la SEQ ID NO: 1 es, preferentemente, idéntica en las posiciones 2-8 de la cadena antisentido.

No obstante lo anterior, los ARNip descritos en el presente documento pueden utilizarse para silenciar la expresión del TRPV1 en tejidos distintos del ojo. Por consiguiente, dichos ARNip deberían formularse en consecuencia.

Por ejemplo, una molécula de ARNip puede comprender un vehículo de liberación, que incluye liposomas, para la administración a un sujeto. Los vehículos y diluyentes y sus sales se pueden presentar en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Las moléculas de ácidos nucleicos se pueden administrar a las células mediante una diversidad de métodos conocidos para los expertos en la técnica, incluyendo, pero no restringidos a, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis o mediante la incorporación en otros vehículos, tales como polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y microesferas de PLGA, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas o mediante vectores proteicos. En otra realización, las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento también se pueden formular o formar complejos con polietilimina y sus derivados, tales como derivados de polietilimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o polietilimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL). Las composiciones preferidas son soluciones acuosas, específicamente soluciones acuosas salinas tales como solución salina tamponada con fosfato (PBS) con un intervalo de pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,4, preferentemente con un pH de $7,2 \pm 0,5$.

Una molécula de ARNip descrita en el presente documento puede formar complejos con agentes disruptivos de membrana y/o un lípido catiónico o molécula lipídica auxiliar.

Los sistemas de liberación que pueden utilizarse incluyen, por ejemplo, geles acuosos y no acuosos, cremas, emulsiones múltiples, microemulsiones, liposomas, ungüentos, soluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, bases y polvos de hidrocarburos y pueden contener excipientes tales como solubilizantes, potenciadores de permeación (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes y aminoácidos grasos) y polímeros hidrófilos (por ejemplo, policarbófilo y polivinilpirrolidona). En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un liposoma o un potenciador transdérmico.

Una formulación farmacéutica descrita en el presente documento es en una forma adecuada de administración, por ejemplo, administración sistémica o local, en una célula o sujeto, incluyendo, por ejemplo, un ser humano. Las formas adecuadas, en parte, dependen del uso o la ruta de entrada, por ejemplo, oral, transdérmica o por inyección. Se conocen otros factores en la técnica e incluyen consideraciones tales como toxicidad y formas que evitan que la composición o formulación ejerza su efecto.

También se desvelan en el presente documento composiciones preparadas para almacenamiento o administración que incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz de los compuestos deseados en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, agentes colorantes y aromatizantes. Estos incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Además, se pueden utilizar antioxidantes y agentes de suspensión.

Una dosis farmacéuticamente eficaz es la dosis requerida para evitar, inhibir la aparición o tratar (aliviar un síntoma hasta cierto punto, preferentemente todos los síntomas) un estado de enfermedad. La dosis farmacéuticamente eficaz, generalmente, depende del tipo de enfermedad, la composición utilizada, la vía de administración, el tipo de mamífero a tratar, las características físicas del mamífero específico en consideración, la medicación concurrente y otros factores que los expertos en la medicina reconocerán.

En particular, se conoce que además de la dosificación, el programa de administración es un determinante importante de la regulación negativa eficaz mediante moléculas de ARNip.

Los inventores han desarrollado un programa de dosificación eficaz para la administración de un ARNip para el tratamiento de una afección ocular caracterizada por la expresión y/o actividad aumentada del TRPV1, en particular del ojo seco y/o dolo ocular, que evita efectos secundarios y se puede administrar de forma segura. Por lo tanto, la administración de una molécula de ARNip en la que dicha molécula se dirige específicamente a la SEQ ID NO: 1 y reduce la expresión del gen del TRPV1 cuando se introduce en una célula de acuerdo con los regímenes de dosificación descritos en el presente documento conduce a una mejora clínica.

Como se usa en el presente documento un "programa de dosificación eficaz" se refiere a la cantidad de ARNip suficiente para tratar o controlar un trastorno ocular asociado a la sobreexpresión del TRPV1. Para el tratamiento del ojo seco y/o del dolor ocular en seres humanos, se prefiere reducir los niveles de enfermedad ocular medidos mediante diferentes parámetros conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, utilizando el cuestionario OSDI (índice de superficie ocular) (para ojo seco) y/o VAS (escala analógica visual) para dolor ocular. Cualquier reducción en estos niveles en comparación con los niveles previos al tratamiento es ventajosa, ya sea que los compuestos se liberen solos o en combinación con otro agente terapéutico adecuado, (por ejemplo, la divulgación contempla una disminución en OSDI y/o VAS mayor que aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 % o aproximadamente 60 % de IOP previo al tratamiento).

Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad de un ARNip suficiente para retrasar o minimizar el comienzo de un trastorno ocular asociado al ojo seco y/o al dolor ocular. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o control de un trastorno ocular asociado al ojo seco y/o al dolor ocular. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un ARNip de la invención significa que la cantidad del agente terapéutico solo o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o control de un trastorno ocular asociado al ojo seco y/o al dolor ocular. Utilizado en conexión con una cantidad de un ARNip, la expresión puede abarcar una cantidad que mejore la terapia global, reduzca o evite efectos no deseados o mejore la eficacia terapéutica de o sinergice con otro agente terapéutico.

Un beneficio terapéutico en el tratamiento o control de un trastorno ocular tal como el ojo seco y/o el dolor ocular es la disminución sostenida del dolor y/o de las sensaciones no deseadas. Dado que el ARNip disminuirá los niveles de los receptores TRPV1 dentro de la célula, una vez que el tratamiento se detenga, la célula debe volver a sintetizar nuevos receptores antes de que se perciban las sensaciones de dolor. Como tales, las terapias basadas en tratamientos de ARNip tendrán un efecto más sostenido. Esto se considera una mejora significativa de la eficacia terapéutica.

Un beneficio adicional de la utilización del ARNip es la probabilidad mínima de efectos secundarios o problemas de toxicidad aguda derivados de su presencia en la circulación sistémica, a menudo asociados a diferentes tratamientos basados en gotas oculares. Esto se debe al hecho de que cuando el compuesto ingresa en el torrente sanguíneo, será rápidamente degradado por las RNasas presentes en la sangre.

Por otro lado, el hecho de que la formulación descrita en el presente documento se pueda ofrecer en viales de dosis única, significa la incorporación de conservantes antimicrobianos, presentes en la mayoría de las formulaciones en el mercado hoy en día, y que producen una cierta intolerancia en algunos pacientes, haciendo necesario detener el tratamiento. Ambos problemas son especialmente importantes cuando se tiene en cuenta que las afecciones como el ojo seco y/o el dolor ocular son, a menudo, crónicas y, por lo tanto, también lo es el tratamiento.

Una de las rutas de administración preferidas es tópica, mediante instilación directamente en el ojo, preferentemente utilizando gotas oculares. Tal como se ha descrito anteriormente, se espera que el tratamiento terapéutico con ARNip dirigido contra el ARNm del TRPV1 sea beneficioso sobre las gotas oculares tópicas de moléculas pequeñas mediante el aumento del tiempo que se observa ese efecto, permitiendo así una dosificación menos frecuente y un mayor cumplimiento por parte del paciente. Cuando el ARNip se administra directamente en el ojo, generalmente, se puede administrar una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg por día y por ojo. En una realización, la cantidad administrada por día y por ojo es aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg. En otra realización, se administra aproximadamente 0,04 mg a 80 mg, aproximadamente 0,04 mg a aproximadamente 20 mg, aproximadamente 0,08 mg a aproximadamente 10 mg, aproximadamente 0,08 mg a aproximadamente 1,2 mg, aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,9 mg o aproximadamente 0,08 mg a aproximadamente 0,9 mg por ojo por día de ARNip.

En una realización, la dosis es de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 1,5 mg. En una realización, la dosis es aproximadamente 0,3 a 0,9 mg, preferentemente aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 0,9 mg. Alternativamente, una dosis preferida es aproximadamente 0,6 mg o aproximadamente 0,9 mg por ojo por día.

Una de las rutas de administración preferidas como se mencionó anteriormente es a través de la utilización de gotas oculares. En una realización, estas gotas oculares tienen un volumen de entre 25 y 50 microlitros que contienen la dosis dada del compuesto, preferentemente entre 26 y 40 microlitros. Preferentemente, pueden utilizarse cuentagotas comerciales en la presentación final de la medicina, y el volumen resultante estaría entre aproximadamente 30 y aproximadamente 33 microlitros por gota. En una realización adicionalmente preferida, las gotas oculares se suministran en un volumen de aproximadamente 40 µl. En una realización adicional, la composición de la invención presenta un ARNip tal como el de SEQ ID NO: 2 en una solución aceptable tal como solución salina tamponada con fosfato a una concentración de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 22,5 mg/ml o, alternativamente, de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 22,5 mg/ml. Las composiciones de la invención pueden comprender las concentraciones anteriores de ARNip en PBS y, opcionalmente, excipientes farmacéuticamente aceptables tales como, por ejemplo, cloruro de benzalconio.

- El tratamiento en las dosis anteriores puede administrarse para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días. Preferentemente, la administración es para 10-15 días, más preferentemente para 10 días. La administración puede ir seguida de un periodo de descanso, por ejemplo, un periodo de descanso de 7 días antes de la continuación del tratamiento. Como alternativa, dado que el ojo seco y/o el dolor ocular son, a menudo, afecciones crónicas, las dosificaciones pueden administrarse diariamente durante un largo periodo que da como resultado una administración crónica. Por consiguiente, la administración puede continuarse durante más de 4 semanas a diario o, alternativamente, la administración puede continuarse durante más de 4 semanas pero no a diario. El programa preciso se puede determinar de acuerdo con la gravedad de la afección crónica.
- 5 Sin embargo, tal y como se ha explicado anteriormente, también se pueden utilizar rutas de administración que no sean directamente al ojo. La dosificación precisa y el programa de administración a emplearse en la formulación también dependerá de la ruta de administración, pero se pueden emplear las dosificaciones anteriores y, generalmente, se puede administrar una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg por día y por ojo. Una persona experta entenderá que la dosificación precisa y el programa de administración que se va a emplear también dependen de la gravedad del trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. También se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto particular depende de una serie de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, la ruta de administración y la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia.
- 10 Las formulaciones o ARNip descritos en la presente memoria se pueden administrar en formulaciones de dosificación unitaria que contienen vehículos, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. Las formulaciones pueden estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires.
- 15 Las composiciones destinadas a uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas, y dichas composiciones pueden contener uno o más de dichos agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes a fin de proporcionar preparaciones sabrosas y farmacéuticamente elegantes. Los comprimidos contienen el principio activo en una premezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos.
- 20 Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes; tales como carbonato de calcio, carbonato sódico, lactosa, fosfato cálcico o fosfato sódico; agentes de granulación y desintegración, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido algínico; agentes de unión, por ejemplo, almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden estar recubiertos mediante técnicas conocidas. En algunos casos dichos recubrimientos se pueden preparar mediante técnicas conocidas para retrasar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de esta forma una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material con tiempo de retardo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.
- 25 Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar en forma de cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda, en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.
- 30 Las suspensiones acuosas contienen los principios activos en una mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfáido de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietileno. Las suspensiones acuosas pueden contener también uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.
- 35 Se pueden formular suspensiones oleosas suspendiendo los principios activos en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de araquis, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes y agentes aromatizantes para proporcionar preparaciones orales sabrosas. Estas composiciones se pueden preservar mediante la adición de un antioxidante, tal como ácido ascórbico.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo en premezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes adecuados o los agentes de suspensión se ejemplifican mediante los ya mencionados anteriormente. También se pueden presentar excipientes
5 adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas también pueden encontrarse en la forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o mezclas de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo, goma acacia o goma de tragacanto, fosfátidos de
10 origen natural, por ejemplo, soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo, monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietilenado. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

15 Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol, glucosa o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante y agentes saborizantes y colorantes. Las composiciones farmacéuticas o ARNip descritos en el presente documento pueden estar en la forma de una suspensión oleaginosa o acuosa inyectable estéril.

20 Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente.

Una preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los
25 vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, la solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, aceites fijos estériles, se emplean convencionalmente como un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico, encuentran uso en la preparación de inyectables.

30 En realizaciones preferidas, las composiciones descritas en el presente documento se formulan en una solución, preferentemente, una solución salina tamponada tal como PBS o un gel para administración tópica a los ojos, tal como, por ejemplo, en forma de gotas oculares. En dichas realizaciones, las formulaciones pueden ser emulsiones catiónicas y/o contener biopolímeros, que incluyen, pero sin limitación, poli(lactida-co-glicólido), carbopol, ácido hialurónico y ácido poliacrílico.
35

Las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento también se pueden administrar en la forma de supositorios, por ejemplo, para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas convencionales pero
40 líquido a la temperatura del recto y por lo tanto, se derretirán en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales incluyen manteca de cacao y polietilenglicoles.

Las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento se pueden administrar parenteralmente en un medio estéril. El fármaco, dependiendo del vehículo y de la concentración utilizada, se puede suspender o
45 disolver en el vehículo. Ventajosamente, pueden disolverse en el vehículo adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes tamponantes.

Como tal, en el presente documento se desvela adicionalmente una composición farmacéutica en la que dicha composición comprende al menos un ARNip que se dirige a la SEQ ID NO: 1 en un programa de dosificación específico, como se ha descrito en los párrafos anteriores.
50

Las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento también se pueden administrar a un sujeto en combinación con otros compuestos terapéuticos para aumentar el efecto terapéutico global. La utilización de múltiples compuestos para tratar una indicación puede aumentar los efectos beneficiosos mientras reducen la
55 presencia de efectos secundarios.

Los compuestos de ARNip descritos en el presente documento también se pueden proporcionar en kits que comprenden un dispensador con un orificio para la dispensación de dosis específicas del compuesto de ARNip en una gota de volumen predeterminado. En una realización preferida, los compuestos de ARNip son ARNip dirigidos
60 contra la SEQ ID NO: 1. En una realización adicional, los dispensadores dentro del kit proporcionan una composición que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2. En otra realización, el kit puede comprender una colección de dispensador de uso único, por ejemplo, para uso durante un mes, en este caso específico, la caja contendría 30 dispensadores de uso único. La gota puede variar de aproximadamente 50 µl a aproximadamente 100 µl en volumen. El dispensador puede ser un dispensador de uso único y comprender entre aproximadamente 1 mg a
65 aproximadamente 2 mg de los compuestos de ARNip y, opcionalmente, también comprende uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, uno o más excipientes. La composición contenida en el

dispensador puede comprender una concentración de entre aproximadamente 7,5 mg/ml a aproximadamente 22,5 mg/ml del compuesto de ARNip. Como alternativa, el dispensador se puede diseñar para utilizarse para un mes o más y los volúmenes contenidos aumentarán de forma correspondiente para proporcionar el número equivalente de dosis. Los kits también pueden comprender instrucciones que especifican que se debe aplicar a cada ojo una

- 5 dosificación del compuesto de ARNip de entre aproximadamente 0,3 mg a aproximadamente 0,9 mg en 1 gota. Las instrucciones pueden especificar además que las gotas se aplican a cada ojo una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día y que la aplicación a cada ojo debe realizarse diariamente, en días alternos, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cada dos semanas o una vez al mes.
- 10 La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Análisis *in vitro*

- 15 A fin de encontrar una secuencia diana particularmente eficaz para que los ARNip silencien el TRPV1 (que obtienen inhibición importante de la expresión génica), se probaron seis ARNip diferentes. Estos ARNip se describen como SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 17 a 20.

- 20 La SEQ ID NO: 2 es un ARNip que se dirige a la SEQ ID NO: 1 que tiene la siguiente secuencia:

Sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUJCA-3'
Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

- 25 La SEQ ID NO: 7 (5'-UCGCCACGACAUGCUCUUGdTdT-3') corresponde a una molécula de ARNip clásica (21 nucleótidos de longitud que contiene salientes en 3' hechos de desoxitimidina) previamente descrita en el documento WO 2007/045930 para dirigirse eficazmente al TRPV1 y reducir la respuesta ocular al estímulo de capsaicina. Las SEQ ID NO: 17 a 19 corresponden a ARNip diseñados contra el TRPV1 de acuerdo con diferentes algoritmos disponibles en la técnica tales como los descritos por Reynolds et al. 2004 o Ui-Tei et al. 2004 y otros. La SEQ ID
- 30 NO: 20 es un ARNip disponible comercialmente suministrado por Ambion y diseñado contra el TRPV1.

SEQ ID NO: 17

- 35 Sentido: 5'-CGCAUCUUCUACUJCAACU-3'
Antisentido: 5'-AGUUGAAGUAGAAGAUGCG-3'

SEQ ID NO: 18

- 40 Sentido: 5'-GCGCAUCUUCUACUJCAAC-3'
Antisentido: 5'-GUUGAAGUAGAAGAUGCGC-3'

SEQ ID NO: 19

- 45 Sentido: 5'-AAAGCCAUGCUCUACCUJGC-3'
Antisentido: 5'-GCAGGUUGAGCAUGGCUUU-3'

SEQ ID NO: 20

- 50 Sentido: 5'-UGAUCGCAGGAGUAUCUUdTdT-3'
Antisentido: 5'-AAAGAUACUCCUGCGAUCAdTdT-3'

Como un modelo para probar la efectividad del ARNip descrito anteriormente, se utilizaron cultivos de células HeLa (adenocarcinoma de cuello uterino humano). Se transfectaron células HeLa con 100 nM de diferentes compuestos y Lipofectamina 2000 como un agente transfectante. Todas las transfecciones se realizaron siguiendo las condiciones

55 estándar del fabricante. En la misma transfección, se utilizó un ARNip aleatorio diferente como control. Se recolectaron los sedimentos celulares a las 24, 48 y 72 horas para evaluar las posibles variaciones en los niveles de proteína y se procesaron mediante PCR en tiempo real. A fin de cuantificar los resultados obtenidos mediante Qrt-PCR en tiempo real, se utilizó el método de umbral comparativo.

- 60 Como muestran los resultados (figura 1), un ARNip dirigido contra la secuencia diana de SEQ ID NO: 1, es mucho más eficaz en términos de silenciamiento de genes del TRPV1 que los productos de ARNip descritos previamente dirigidos contra una región diferente del mismo gen. Además, este efecto se mantiene en el tiempo, ya que a las 72 horas después de la transfección todavía hay regulación negativa significativa de los niveles de ARNm. Esta duración del efecto es impredecible y es específica de la secuencia.

- 65 Con el objetivo de proporcionar productos mejorados adicionales, se introdujeron diferentes modificaciones químicas

en el producto anterior, de acuerdo con la siguiente descripción:

SEQ ID NO: 3,

5 Sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'
Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

SEQ ID NO: 4,

10 Sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'
Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

SEQ ID NO: 8,

15 Sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'
Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

SEQ ID NO: 9,

20 Sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'
Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

SEQ ID NO: 10,

25 Sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'
Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

SEQ ID NO: 11,

30 Sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'
Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

Donde el subrayado representa bases que comprenden un grupo 2'-ometilo.

35 SEQ ID NO: 5,

Sentido: 5'-AAGCGCAdTCdTdTCdTACdTdTCA-3'
Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

40 SEQ ID NO: 6,

Sentido: 5'-AAGCGCAdTCdTdTCdTACdTdTCA-3'
Antisentido: 5'-dTGAAGdTAGAAGAdTGCGCdTdT-3'

45 SEQ ID NO: 12,

Sentido: 5'-AAGCGCAdTCUdTCdTACdTdTCA-3'
Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

50 SEQ ID NO: 13,

Sentido: 5'-AAGCGCAdTCUdTCdTACUdTCA-3'
Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

55 SEQ ID NO: 14,

Sentido: 5'-AAGCGCAdTCUUCdTACUdTCA-3'
Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

60 SEQ ID NO: 15,

Sentido: 5'-AAGCGCAdTCUUCUACUdTCA-3'
Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

65 SEQ ID NO: 16,

Sentido: 5'-AAGCGCAdTCUUCUACUdTCA-3'
 Antisentido: 5'-UGAAGdTAGAAGAdTGCGCUU-3'

Donde algunos o todos los nucleótidos de uracilo han sido sustituidos por nucleótidos de desoxitimidina.

5 Estos compuestos se probaron en ensayos de inmunogenicidad junto con la SEQ ID NO: 2 (el mismo compuesto sin ningún nucleótido modificado). Los resultados mostraron que todos estos compuestos reducen significativamente la inducción de una respuesta inmune en células mononucleares de sangre periférica. Además, la mayoría de los compuestos indujeron una respuesta que estaba en sus niveles más altos, tan bajo como el producido por los ARNip que han avanzado a través de ensayos clínicos en seres humanos (bevasiranib y Sirna-027) que se incluyeron en los ensayos como control.

15 Como diversos grados de modificación pueden alterar la capacidad de silenciamiento de genes de los ARNip, estos compuestos se probaron adicionalmente para determinar su capacidad de interferencia de ARN mediante transfección en células HeLa, y los niveles del ARNm del TRPV1 resultantes se midieron de acuerdo con el método descrito en párrafos anteriores.

20 Tal como puede observarse en la figura 2, todos los compuestos conservan la capacidad para disminuir eficazmente los niveles de ARNm del TRPV1 en diversos grados.

Un efecto beneficioso inesperado adicional derivado de los compuestos descritos anteriormente es su resistencia mejorada a la degradación por RNasas como se puede ver en la Figura 5.

25 Para estos experimentos, se suspendieron los compuestos en plasma humano al 10 % en PBS a una concentración final de 2 µM y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. A continuación, se analizaron las muestras utilizando HPLC-UV y se determinó la cantidad de producto intacto remanente. Tal como puede observarse en la figura 5, el compuesto de doble cadena de 19 nucleótidos de SEQ ID NO: 2 (son ninguna modificación química) es casi 3 veces más resistente a la degradación que la SEQ ID NO: 21: 5'-CAAGAUCGCACAGGAGAGCdTdT-3' descrita previamente (también descrita en el documento WO 2007045930) que comprende salientes en 3'. Este efecto se mejora además, para el compuesto de la SEQ ID NO: 3, que incluye algunos nucleótidos modificados químicamente como los descritos en párrafos anteriores.

Análisis *in vivo*

35 Los modelos animales de ojo seco y dolor ocular a menudo hacen uso de conejos, en este caso conejos blancos de Nueva Zelanda. Para este fin, una ventaja adicional de los ARNip de la presente invención es que la secuencia diana, SEQ ID NO: 1, es una región altamente conservada del gen del TRPV1, a lo largo de diferentes secuencias de animales. De hecho, esta secuencia es idéntica entre seres humanos y conejos, lo que hace que este modelo animal sea especialmente adecuado para el estudio de dichas enfermedades.

40 El experimento descrito a continuación se realizó utilizando un modelo estándar de dolor ocular conocido por un experto en el campo (González et al., 1993). Brevemente, se indujo el dolor utilizando la instilación de 30 µl de una solución de capsaicina al 1 % (un agonista conocidos del TRPV1) en el ojo utilizando una micropipeta apropiada. Debido a consideraciones éticas, los animales a tratar con capsaicina habían recibido previamente una dosis de capsazepina 5 mM, un antagonista de capsaicina conocido, o 40 µl de una solución que contenía el compuesto a probar. Por lo tanto, el efecto analgésico se mide en comparación con la capsazepina como tratamiento de referencia.

50 Se instilaron los elementos de prueba y de referencia una vez al día desde el día 1 hasta el día 3 y dos veces al día el día 4 (velocidad de 60 minutos) en los ojos derechos. En el día 4, 15 minutos después de la última instilación, se indujo dolor corneal en el ojo derecho de los animales mediante una única instilación de capsaicina al 1%. El ojo contralateral se instiló con PBS durante todo el estudio y sirvió como control.

55 Para medir la respuesta al dolor, se midió la apertura palpebral. Se considera que el ojo se cierra en respuesta al dolor y, a medida que disminuyen las sensaciones de dolor, la abertura palpebral volverá a los niveles normales. La apertura palpebral se midió antes del tratamiento (inicial), justo antes de la inducción del dolor y, a continuación, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, minutos después de la inducción del dolor.

60 Como se puede verse en las figuras 3 y 4, se probó un compuesto, específicamente, el compuesto de SEQ ID NO: 2 y se observó que induce un efecto analgésico más elevado que la capsazepina (recuperación ocular medida mediante el grado de apertura palpebral). Por lo tanto, este compuesto ha demostrado ser un tratamiento terapéutico eficaz para la incomodidad ocular.

65 Además, se realizó otro experimento *in vivo* en el que los compuestos (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5) se administraron a ojos de conejo, junto con la SEQ ID NO: 21, descrita previamente en el documento WO 2007045930.

En este caso, los conejos (6 animales por grupo de tratamiento) recibieron una administración diaria del compuesto durante 3 días consecutivos. Al tercer día, dos horas después de la última instilación, se sacrificaron los animales. Se recogieron tejidos oculares de estos conejos y se analizó la presencia de ARNm específico del TRPV1 utilizando RT-PCR. La siguiente tabla (Tabla 1) muestra los niveles de silenciamiento del gen del TRPV1 logrados en un tejido dado expresado como una relación del % de inhibición logrado con el compuesto de referencia SEQ ID NO: 21.

Tabla. 1

| | SEQ ID NO: 2 | SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 5 |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| Glándula lagrimal | 3,06 | 3,15 | 1,92 |
| Cuerpo ciliar | 6,54 | 2,48 | 3,57 |

Como resulta claro a partir de estos resultados, los compuestos son mucho más eficaces cuando se silencia la expresión del gen del TRPV1 en tejidos oculares que los compuestos descritos previamente.

La mayor eficacia junto con el efecto más duradero de los compuestos, debería proporcionar regímenes de dosis ventajosos, ya que permitir un mayor tiempo entre dosis mejoraría significativamente la calidad de vida de los pacientes.

Se realizó otro experimento para evaluar la distribución tisular y la exposición al plasma en conejos blancos de Nueva Zelanda después de la administración ocular de la SEQ ID NO: 2 en PBS. Los materiales y métodos empleados se especifican en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2. Materiales y métodos para evaluar la distribución tisular y la exposición al plasma en conejos blancos de Nueva Zelanda después de la administración ocular de la SEQ ID NO: 2 en PBS

| | |
|---------------------|--|
| Animales de prueba | Especie: Conejo blanco de Nueva Zelanda N.º de animales/sexo/ruta de administración: 6 animales/3 machos/3 hembras/gota ocular |
| Sustancia de prueba | Fármaco: SEQ ID NO: 2 |
| Tratamiento | Dosis: 0,9 mg/ ojo/adm Administración: ocular (gota ocular) Frecuencia: una vez Duración: 30 minutos |
| Formulación | Descripción: La SEQ ID NO: 2 se formula en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril a una concentración de 22,5 mg/ml |
| Muestreo | Punto temporal: 5 y 30 minutos después de la dosis (recolección de tejido y plasma). Condiciones de almacenamiento: -80 °C |
| Ensayo bioanalítico | Método: Cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC, del inglés "Anion-Exchange High Performance Liquid Chromatography") con detección de fluorescencia desarrollada para la SEQ ID NO: 2 Límite de detección: 0,25 ng/g en tejido y 0,15 ng/ml en plasma |

Todos los cálculos se realizaron utilizando el peso molecular de la sal de sodio de la SEQ ID NO: 2. El cálculo de las concentraciones de SEQ ID NO: 2 se realizó de tres formas diferentes:

- Basándose en el área máxima de la cadena antisentido no metabolizada intacta de la SEQ ID NO: 2 (compuesto original). Este valor es un marcador para la cantidad del compuesto original que no se modifica en el tejido.
- Basándose en el área máxima de la cadena antisentido 5'-fosforilada intacta de la SEQ ID NO: 2. Este valor es un marcador para la cantidad del compuesto original que está presente en el compartimento citoplasmático y se activa mediante 5'-fosforilación.
- Basándose en el área máxima total. Este valor resume todas las SEQ ID NO: 2 intactas y metabolizadas que están presentes en la muestra.

Se recogieron muestras de hígado, corteza y médula renal, pulmón, cuerpo ciliar, retina, iris, glándula lagrimal, córnea, humor acuoso y vítreo, ganglio, plasma y orina 5 y 30 minutos después de la dosis. Después de una administración ocular de la SEQ ID NO: 2 a conejos (n = 6) los resultados indicaron:

- La exposición sistémica de la SEQ ID NO: 2 se detectó en muestras de plasma y de tejido sistémico a los 5 y 30

minutos después de la dosificación en el ojo a concentraciones por debajo de 1 ng/g (véase Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones medias para el compuesto original de la SEQ ID NO: 2 después de la administración ocular a conejos.

| | Punto temporal | N | Hígado | Médula renal | Corteza renal | Pulmón | Plasma |
|---------------------|----------------|---|--------|--------------|---------------|--------|---------|
| | [min] | | [ng/g] | [ng/g] | [ng/g] | [ng/g] | [ng/ml] |
| Concentración media | 5 | 6 | 0,42 | 0,16 | 0,34 | 0,04 | 0,34 |
| Desviación estándar | | | 0,48 | 0,25 | 0,56 | 0,13 | 0,32 |
| Concentración media | 30 | 6 | 0,60 | 0,77 | 0,00 | 0,40 | 0,09 |
| Desviación estándar | | | 0,63 | 1,96 | 0,00 | 0,13 | 0,05 |

- 5 • La SEQ ID NO: 2 podría detectarse en todos los tejidos y fluidos oculares 5 minutos después de la dosificación y en concentraciones muy reducidas 30 minutos después de la dosis (véase Tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones medias para el compuesto original de la SEQ ID NO: 2 después de la administración ocular a conejos.

| | Punto temporal | N | Cuerpo ciliar | Retina | Iris | Glándula lagrimal | Córnea |
|---------------------|----------------|---|---------------|--------|--------|-------------------|--------|
| | [min] | | [ng/g] | [ng/g] | [ng/g] | [ng/g] | [ng/g] |
| Concentración media | 5 | 6 | 431,6 | 840,8 | 317,0 | 1473,8 | 3684,2 |
| Desviación estándar | | | 318,3 | 667,0 | 193,2 | 2178,8 | 984,8 |
| Concentración media | 30 | 6 | 4,3 | 3,7 | 2,1 | 132,4 | 59,3 |
| Desviación estándar | | | 4,8 | 3,7 | 2,3 | 394,6 | 71,0 |

- 10 • En la retina, iris, cuerpo ciliar y glándula lagrimal se detectó la cadena(s) antisentido 5'-fosforilada a los 5 y 30 minutos después de la dosis lo que indica la liberación citoplasmática del ARNip en esos tejidos (ARNip activado en el compartimento de células diana) (véase Figura 6).
- 15 Estos datos reflejan que después de la administración ocular de la SEQ ID NO: 2, los animales presentan la SEQ ID NO: 2 activada distribuida en todos los tejidos oculares que pueden detectarse 5 minutos después de la dosificación.

Análisis en seres humanos

- 20 Inicialmente, se evaluó la tolerancia ocular del compuesto de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 en 30 adultos humanos sanos.

Se organizó el estudio en dos periodos. Durante el primer período, se realizó una evaluación de seguridad inicial utilizando una dosis única del producto en investigación, seguido de un segundo período con una administración de dosis múltiples.

Periodo 1, dosis única: controlado sin intervención, y asignación al azar del ojo que recibe la administración. Cada voluntario era su propio control, dado que el elemento de la prueba se administró a un solo ojo, mientras que el otro ojo no recibió ninguna intervención, sin embargo, se realizaron las pruebas de evaluación de seguridad. El oftalmólogo que realizó la evaluación de seguridad estaba ciego a la administración del medicamento. Se determinó la absorción del producto en el torrente sanguíneo.

Periodo 2, dosis múltiple: abierto, paralelo y controlado. El ojo tratado fue aleatorizado. El evaluador era ciego en cuanto al sitio de administración del producto en investigación. El ojo antes de la administración del fármaco y el otro ojo se consideraron ambos como controles. Durante esta etapa se evaluaron la seguridad local y sistémica, además de la absorción y, cuando fue apropiado, la farmacocinética del producto en investigación.

La segunda etapa comenzó una vez que se evaluaron la seguridad y la farmacocinética de la primera etapa. Los resultados para la primera etapa establecieron la necesidad de continuar con la evaluación farmacocinética durante la segunda etapa.

Se distribuyeron 30 adultos en diferentes grupos de tratamiento y recibieron una única gota de 26,6 µl que contenía una dosis de 600 µg del compuesto en un ojo (período 1), o una dosis diaria durante una semana de 600 o 900 µg del compuesto por ojo (período 2), administrado en un volumen de 26,6 µl o 40 µl, respectivamente. El período 1 tuvo 6 voluntarios y el período 2 tuvo 24 voluntarios, divididos en dos cohortes con un nivel de dosis diferente

aplicado a cada mitad del grupo. El período 1 comprende una sola dosis y el período 2 comprende 7 dosis en total (una administración por día).

- 5 La evaluación de tolerancia local se basó en la frecuencia de alteraciones (efectos adversos locales) detectadas en la superficie del ojo durante las exploraciones realizadas 24 horas después de la administración de la última dosis en el período 2 y 72 horas después de la instilación de la dosis única en el período 1. La buena tolerancia se definió como la ausencia de toxicidad de grado 3 o superior, en la escala CTCAEv3 (Criterios de terminología común para eventos adversos).
- 10 Se utilizó una prueba de Chi cuadrado para determinar la relación entre los efectos adversos locales y la medicación, considerando si habían aparecido o no síntomas o signos locales en cada ojo (independientemente de la cantidad de síntomas), en relación con el tratamiento. El análisis consideró la presencia de un efecto adverso en cada ojo, si al menos uno había ocurrido (véase Tabla 5).

15 **Tabla 5.** Análisis de los efectos adversos locales en los ojos, en relación con la administración de la medicación.

| | | Efecto adverso | | Total |
|------------|----------------------|----------------|---------|---------|
| | | no | Sí | |
| Tratado no | Recuento | 26 | 4 | 30 |
| | Frecuencia esperada | 24,5 | 5,5 | 30,0 |
| | % del efecto adverso | 53,1 % | 36,4 % | 50,0 % |
| | Residual | 1,5 | -1,5 | |
| Sí | Recuento | 23 | 7 | 30 |
| | Frecuencia esperada | 24,5 | 5,5 | 30,0 |
| | % del efecto adverso | 46,9 % | 63,6 % | 50,0 % |
| | Residual | -1,5 | 1,5 | |
| Total | Recuento | 49 | 11 | 60 |
| | Frecuencia esperada | 49,0 | 11,0 | 60,0 |
| | % del efecto adverso | 100,0 % | 100,0 % | 100,0 % |

Con respecto al desarrollo de alteraciones locales (efectos adversos locales), no se observaron diferencias entre el ojo tratado y el ojo no tratado, obteniéndose un Chi cuadrado de Pearson de 1,002 ($p = 0,317$).

- 20 No se observaron alteraciones de la superficie ocular relacionadas con el fármaco en ningún período del ensayo; por lo tanto, la tolerancia local fue excelente cuando se administró en dosis únicas o múltiples durante hasta siete días como gotas oculares.

- 25 Un objetivo adicional de este ensayo fue evaluar la tolerancia sistémica al compuesto, mediante el seguimiento de las repercusiones en los parámetros analíticos, en el examen físico, los signos vitales y el electrocardiograma posterior al tratamiento.

- 30 Se realizaron análisis de sangre y orina durante el proceso de selección, antes de la administración de la medicación y en el examen final, en los días posteriores a la administración final de la SEQ ID NO: 2. Se realizó un estudio de la variación en los parámetros analíticos entre el período de selección y el examen final, utilizando la prueba t de Student para datos relacionados. La siguiente tabla muestra la media, la desviación estándar y la significación estadística de la diferencia entre dichos parámetros (véase Tabla 6).

Tabla 6: Variación en los parámetros analíticos entre el examen de selección y el examen final.

| PRUEBAS DE LABORATORIO | SELECCIÓN media ± DE | EXAMEN FINAL. Media ± DE | Significación estadística |
|-----------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|
| Hematología | | | |
| Eritrocitos ($10^{12}/l$) | 4,75 ± 0,46 | 4,79 ± 0,59 | e.n.s. |
| Hemoglobina (g/dl) | 13,7 ± 1,4 | 13,8 ± 1,6 | e.n.s. |
| Hematocrito (%) | 43,0 ± 4,2 | 43,0 ± 5,2 | e.n.s. |
| VCM (fl) | 90,6 ± 4,0 | 89,8 ± 4,2 | 0,001* |
| HCM (pg) | 28,9 ± 1,6 | 28,9 ± 1,7 | e.n.s.* |
| CHCM (g/dl) | 31,9 ± 1,4 | 32,2 ± 1,1 | e.n.s.* |

| | | | |
|---|---------------|---------------|---------|
| Plaquetas (10⁹/l) | 238,9 ± 48,1 | 240,5 ± 44,3 | e.n.s. |
| Leucocitos (10⁹/l) | 6,3 ± 1,1 | 5,8 ± 1,3 | 0,038 |
| Neutrófilos (%) | 59,6 ± 8,0 | 56,1 ± 7,4 | e.n.s. |
| Linfocitos (%) | 30,0 ± 6,5 | 32,8 ± 6,2 | 0,010 |
| Monocitos (%) | 7,5 ± 1,7 | 7,8 ± 1,6 | e.n.s. |
| Eosinófilos (%) | 2,3 ± 1,2 | 2,5 ± 1,2 | e.n.s. |
| Basófilos (%) | 0,6 ± 0,5 | 0,7 ± 0,4 | e.n.s. |
| Química de la sangre | | | |
| Glucosa (mg/dl) | 87,4 ± 6,4 | 85,2 ± 7,5 | e.n.s. |
| Bilirrubina total (mg/dl) | 0,7 ± 0,2 | 0,7 ± 0,2 | e.n.s. |
| AST-GOT(U/l) | 12,9 ± 3,5 | 12,5 ± 3,2 | e.n.s. |
| ALT-GPT(U/l) | 11,1 ± 5,0 | 11,9 ± 6,6 | e.n.s.* |
| Fosfatasa alcalina(U/l) | 39,8 ± 10,2 | 39,0 ± 9,2 | e.n.s. |
| GGT (U/l) | 10,8 ± 4,9 | 9,7 ± 4,3 | 0,001* |
| Creatinina (mg/dl) | 0,9 ± 0,2 | 0,9 ± 0,2 | e.n.s. |
| Análisis de orina | | | |
| Densidad | 1,021 ± 0,008 | 1,023 ± 0,008 | e.n.s.* |
| pH | 6,3 ± 0,7 | 6,3 ± 0,6 | e.n.s.* |
| <i>e.n.s.: Estadísticamente no significativo. * Prueba de Wilcoxon.</i> | | | |

Se observaron diferencias en algunos parámetros entre el examen de selección y el examen final, sin embargo, todos los valores se consideraron normales, sin significación clínica.

5 Tal como se ha indicado anteriormente, durante el estudio, se tomaron los signos vitales (presión arterial y frecuencia cardíaca) durante la selección, y en diferentes momentos durante la fase de tratamiento y en el examen final (véanse las Tablas 7 y 8).

10 Los valores medios para el alcance de los tiempos de medición y el análisis estadístico con ANOVA de medidas repetidas en los seis voluntarios que participan en el periodo 1, se muestran a continuación (véase Tabla 7).

Tabla 7: Signos vitales durante el periodo 1 del ensayo. n = 6.

| PAS (mm Hg) | Media ± DE | p (compuesto a selección) |
|------------------------|-------------------|----------------------------------|
| PAS en la selección | 116,8 ± 10,3 | - |
| PAS inicial en el D1 | 105,7 ± 6,8 | 0,008 |
| PAS a 1h | 107,7 ± 10,5 | 0,003 |
| PAS a las 4h | 108,8 ± 11,6 | e.n.s. |
| PAS en el examen final | 112,0 ± 10,6 | e.n.s. |
| PAD (mm Hg) | | |
| PAD en la selección | 61,5 ± 8,7 | - |
| PAD inicial en el D1 | 57,3 ± 10,5 | e.n.s. |
| PAD a 1h | 55,8 ± 9,6 | 0,011 |
| PAD a las 4h | 57,3 ± 11,6 | e.n.s. |
| PAD en el examen final | 59,2 ± 7,2 | e.n.s. |
| FC (l.p.m.) | | |
| FC en la selección | 69,7 ± 6,0 | - |
| FC inicial en el D1 | 58,0 ± 5,4 | 0,013 |
| FC a 1h | 58,7 ± 6,0 | 0,003 |

| | | |
|---|------------|--------|
| FC a las 4h | 55,5 ± 4,1 | 0,006 |
| FC en el examen final | 59,7 ± 2,6 | 0,003 |
| FR (r.p.m.) | | |
| FR en la selección | 16,0 ± 2,8 | - |
| FR inicial en el D1 | 14,3 ± 1,5 | e.n.s. |
| FR en el examen final | 14,0 ± 2,6 | e.n.s. |
| T (°C) | | |
| T en la selección | 36,2 ± 0,3 | - |
| T inicial en el D1 | 36,1 ± 0,5 | e.n.s. |
| T en el examen final | 36,1 ± 0,3 | e.n.s. |
| e.n.s.: estadísticamente no significativo | | |

5 Los signos vitales en el período 2 se tomaron en el examen realizado el día 1 y en el realizado el día 7, antes y una hora después de la administración de la primera y la última dosis del medicamento en investigación. Los signos vitales también se tomaron durante el examen de selección y en el examen final. Tomando los valores de selección como iniciales, se evaluó la evolución de los signos vitales para los 24 voluntarios durante el transcurso del estudio, durante el período 2, utilizando un ANOVA de medidas repetidas (véase Tabla 8).

Tabla 8: Signos vitales durante el segundo periodo del ensayo. n = 24.

| PAS (mm Hg) | Media ± DE | p (compuesto de selección) |
|------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| PAS en la selección | 123,2 ± 9,5 | - |
| PAS inicial en el D1 | 118,0 ± 9,0 | 0,014 |
| PAS a 1h del D1 | 118,6 ± 7,5 | 0,040 |
| PAS inicial en el D7 | 119,0 ± 8,8 | 0,042 |
| PAS a 1h del D7 | 118,1 ± 7,2 | 0,017 |
| PAS en el examen final | 119,0 ± 7,5 | 0,016 |
| PAD (mm Hg) | | |
| PAD en la selección | 65,5 ± 7,2 | - |
| PAD inicial en el D1 | 60,6 ± 6,6 | < 0,001 |
| PAD a 1h del D1 | 60,6 ± 6,1 | < 0,001 |
| PAD inicial en el D7 | 64,4 ± 6,7 | e.n.s. |
| PAD a 1h del D7 | 66,5 ± 8,0 | e.n.s. |
| PAD en el examen final | 60,5 ± 5,7 | 0,003 |
| FC (l.p.m.) | | |
| FC en la selección | 69,4 ± 7,9 | - |
| FC inicial en el D1 | 64,9 ± 8,8 | 0,019 |
| FC a 1h del D1 | 63,2 ± 8,2 | 0,002 |
| FC inicial en el D7 | 66,1 ± 8,6 | 0,041 |
| FC a 1h del D7 | 60,8 ± 7,1 | < 0,001 |
| FC en el examen final | 66,0 ± 8,3 | e.n.s. |
| FR (r.p.m.) | | |
| FR en la selección | 16,0 ± 2,9 | - |
| FR inicial en el D1 | 14,8 ± 3,3 | e.n.s. |
| FR inicial en el D7 | 16,5 ± 3,6 | e.n.s. |
| FR en el examen final | 15,1 ± 3,0 | e.n.s. |

| T (°C) | | |
|---|------------|--------|
| T en la selección | 36,1 ± 0,4 | - |
| T inicial en el D1 | 35,9 ± 0,4 | e.n.s. |
| T inicial en el D7 | 35,9 ± 0,8 | e.n.s. |
| T en el examen final | 35,9 ± 0,5 | e.n.s. |
| e.n.s.: estadísticamente no significativo | | |

- 5 Se realizó un electrocardiograma en el examen de selección y un electrocardiograma adicional en el examen final. Se hace una comparación entre los exámenes de selección y final, utilizando la prueba t de Student para muestras relacionadas. La siguiente tabla resume la desviación media y estándar de cada parámetro y el resultado del análisis (véase Tabla 9).

Tabla 9: Electrocardiograma: Una comparación entre los exámenes de selección y final

| EXAMEN DE SELECCIÓN-FINAL. | | | |
|---|------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| n=30 | Selección (media ± DE) | Examen final (Media ± DE) | Significación estadística (p) |
| FC (l.p.m.) | 66,9 ± 9,0 | 61,1 ± 7,8 | < 0,001 |
| FR (seg) | 148,2 ± 18,0 | 149,8 ± 15,7 | e.n.s.* |
| QRS (seg) | 87,7 ± 13,3 | 88,6 ± 13,8 | e.n.s. |
| QT (seg) | 369,9 ± 19,0 | 380,2 ± 25,5 | 0,003 |
| QTc (seg) | 388,5 ± 21,9 | 381,2 ± 18,1 | 0,014 |
| e.n.s.: estadísticamente no significativo. * Prueba de Wilcoxon | | | |

- 10 Se observaron cambios estadísticamente significativos en algunas de las mediciones de presión arterial en la Tabla 7 y 8 y en algunas de las mediciones de la frecuencia cardíaca en la Tabla 9, aunque todos los valores estuvieron dentro de los límites normales y, por lo tanto, estas diferencias no son clínicamente significativas.

- 15 La tolerancia sistémica fue buena, sin alteraciones en los análisis de sangre y orina, electrocardiograma o en el examen realizado durante la evaluación final.

- 20 El análisis de sangre se realizó para determinar las concentraciones de SEQ ID NO: 2 en muestras de plasma obtenidas después de la administración del fármaco. Durante el primer período, el muestreo se realizó durante las 4 horas siguientes a la administración, extrayéndose la sangre a los 5, 15, 30 minutos y 4 horas después de la administración del producto. Durante el segundo período, se tomaron muestras de sangre 5 minutos después de la administración el día 1 y nuevamente el día 7, tanto antes de la administración del compuesto como también 5 minutos después de la administración del producto.

- 25 No se pudo determinar un perfil farmacocinético para ninguno de los períodos, ya que el compuesto no se detectó en ninguna de las muestras de sangre recolectadas con el método bioanalítico validado (LLOQ: 10 ng/ml). La ausencia de cantidades detectables del compuesto en sangre está en línea con la degradación rápida esperada del ARN al entrar en el torrente sanguíneo debido a la presencia de RNasas.

- 30 Todos estos hechos respaldan la conclusión de que la SEQ ID NO: 2 muestra una buena tolerancia en una solución oftálmica en seres humanos sanos.

Dado los resultados positivos obtenidos en modelos animales y la ausencia de toxicidad en seres humanos sanos, los compuestos se prueban a continuación en pacientes que sufren de dolor ocular y ojo seco.

- 35 *Sujetos*

- 40 Se reclutan sesenta pacientes adultos que fueron diagnosticados con dolor ocular leve a moderado y síndrome de ojo seco. De estos, la mitad de ellos son mayores de 65 años. Los niveles de enfermedad ocular se establecen utilizando el cuestionario OSDI© (índice de enfermedad de la superficie ocular) desarrollado por Allergan Inc. y la evaluación VAS (escala analógica visual).

Los criterios de inclusión fueron una puntuación de 13-30 en OSDI© para ojo seco y una puntuación de 2 a 7 en

VAS para dolor. Se realiza un examen físico completo y un examen ocular antes de la admisión en el estudio para asegurar la idoneidad de los sujetos para la participación en el estudio.

Diseño del estudio

- 5 Se diseñó un estudio clínico paralelo, controlado con placebo, de doble enmascaramiento para evaluar el efecto analgésico y la tolerabilidad del compuesto de SEQ ID NO: 2 administrado diariamente como gotas oculares durante 10 días de tratamiento.
- 10 Los objetivos secundarios son la evaluación de la tolerabilidad local después de cada dosis, tolerabilidad sistémica (efecto en los parámetros de laboratorio, examen físico y signos vitales) y cambios (si corresponde) en la agudeza visual, presión intraocular, prueba de Schirmer y tiempo de ruptura lagrimal, posiblemente relacionado con el producto en investigación.
- 15 En todos los casos, se instila el fármaco o placebo en ambos ojos. Ambos ojos son controlados de forma ciega.

Período de referencia

- 20 Hasta 15 días antes de la primera administración del producto en investigación, se inscribe a los sujetos para que sean elegibles para participar en el período de tratamiento del ensayo clínico.

Periodo de tratamiento

- 25 En el día 1, los sujetos se aleatorizaron para formar compuesto o placebo en una proporción de 2:1 administrada por vía tópica al ojo, como gotas oculares. Los sujetos reciben un volumen final de 40 µl del compuesto o vehículo (placebo) por ojo. La dosis administrada es de 900 µg del compuesto por ojo.

- 30 Los sujetos regresan cada día (incluidos días festivos y fines de semana) al sitio para la administración y evaluación de productos en investigación. Los sujetos reciben 1 dosis del compuesto una vez al día en ambos ojos durante 10 días.

En el día 10, los pacientes reciben nuevamente un examen completo equivalente al realizado al inicio del estudio.

Visita de seguimiento

- 35 La evaluación final se realiza en la visita de seguimiento que tiene lugar 14 a 20 días después de la primera administración (de 4 a 10 días después de la última administración) para determinar la evolución de los pacientes después de la finalización del período de tratamiento.
- 40 Para determinar el efecto de la SEQ ID NO: 2 en el nivel de ojo seco y dolor ocular de los pacientes, cada puntuación individual en OSDI® y VAS se toma un día antes del inicio del tratamiento y se compara con el del día 10. El resultado se mide específicamente en los cambios en la puntuación media que resultan del cuestionario OSDI® y los cambios en la intensidad media de la evaluación VAS.
- 45 También, los resultados de exploraciones oculares realizadas antes de iniciar el tratamiento y después de 10 días se comparan para confirmar la tolerabilidad.

Resultados

- 50 El cuestionario OSDI® se evalúa en una escala de 0 a 100, con las puntuaciones más altas que representan una mayor discapacidad. El índice demuestra sensibilidad y especificidad para distinguir entre sujetos normales y pacientes con enfermedad del ojo seco. El OSDI® consiste en doce preguntas y está diseñado para proporcionar una indicación rápida de los síntomas que son consistentes con la enfermedad del ojo seco. El OSDI® es un instrumento válido y fiable para medir la gravedad de la enfermedad del ojo seco (normal, leve a moderado y grave) y ha sido aceptado por la Administración de Alimentos y Medicamentos para su uso en ensayos clínicos. La validez y fiabilidad de OSDI® han sido evaluadas y se ha encontrado que proporciona fiabilidad, validez, sensibilidad y especificidad entre buena y excelente para los ojos secos. Una puntuación general estimada de OSDI® definió la superficie ocular como normal (0-12 puntos) o como una enfermedad leve (13-22 puntos), moderada (23-32 puntos) o grave (33-100 puntos).

60

Tabla 10: OSDI© para ojo seco. n = 23. V0 corresponde al OSDI© el día antes de comenzar el tratamiento, y VD10 corresponde al OSDI© el día 10. El resultado y % muestra los cambios en la puntuación media en el nivel de ojo seco de los pacientes.

| N.º | V0 | VD10 | RESULTADO | % |
|-----|-------|-------|----------------------------|--------|
| 1 | 20,45 | 6,82 | De leve a normal | -66,65 |
| 2 | 27,08 | 20,83 | De moderado a leve | -23,08 |
| 3 | 38,64 | 50 | De menos grave a más grave | 29,40 |
| 4 | 40,91 | 11,36 | De grave a normal | -72,23 |
| 5 | 37,5 | 33,33 | De más grave a menos grave | -11,12 |
| 6 | 52,08 | 10,42 | De grave a normal | -79,99 |
| 7 | 34,09 | 9,09 | De grave a normal | -73,34 |
| 8 | 60 | 17,5 | De grave a leve | -70,83 |
| 9 | 43,18 | 25 | De grave a moderado | -42,10 |
| 10 | 50 | 56,81 | De menos grave a más grave | 13,62 |
| 11 | 32,5 | 10,4 | De moderado a normal | -68,00 |
| 12 | 39,58 | 29,16 | De grave a moderado | -26,33 |
| 13 | 43,75 | 36,36 | De más grave a menos grave | -16,89 |
| 14 | 43,75 | 59,09 | De menos grave a más grave | 35,06 |
| 15 | 43,18 | 52,7 | De menos grave a más grave | 22,05 |
| 16 | 45,45 | 43,18 | De más grave a menos grave | -4,99 |
| 17 | 25 | 15,9 | De moderado a leve | -36,40 |
| 18 | 63,63 | 45,45 | De más grave a menos grave | -28,57 |
| 19 | 43,75 | 45,83 | De menos grave a más grave | 4,75 |
| 20 | 52,7 | 47,72 | De más grave a menos grave | -9,45 |
| 21 | 50 | 55 | De menos grave a más grave | 10,00 |
| 22 | 29,16 | 10,4 | De moderado a normal | -64,33 |
| 23 | 54,16 | 45,45 | De más grave a menos grave | -16,08 |

5 El cuestionario del dolor VAS es una medida unidimensional de la intensidad del dolor, que se ha utilizado ampliamente en diversas poblaciones adultas. El VAS mide el dolor que se extiende a lo largo de un continuo de valores y no se puede medir fácilmente, como el dolor ocular. Para la intensidad del dolor en el VAS, la escala generalmente se basa en "sin dolor" (puntuación de 0) y "peor dolor imaginable" (puntuación de 10).

10 **Tabla 11:** VAS para dolor ocular. n = 23. V0 corresponde al VAS el día antes de comenzar el tratamiento, y VD10 corresponde al VAS el día 10. El % muestra los cambios en la puntuación media en el nivel de dolor ocular de los pacientes en el ojo derecho y el izquierdo.

| N.º | OJO | V0 | VD10 | % |
|-----|---------------|----|------|--------|
| 1 | Ojo derecho | 24 | 2 | -91,67 |
| | Ojo izquierdo | 30 | 2 | -93,33 |
| 2 | Ojo derecho | 38 | 13 | -65,79 |
| | Ojo izquierdo | 50 | 10 | -80,00 |
| | Ojo derecho | 40 | 33 | -17,50 |
| | Ojo izquierdo | 30 | 20 | -33,33 |
| 4 | Ojo derecho | 20 | 4 | -80,00 |
| | Ojo izquierdo | 20 | 5 | -75,00 |
| R | Ojo derecho | 60 | 60 | 0,00 |

ES 2 685 346 T3

| | | | | |
|----|---------------|-----|------|--------|
| | Ojo izquierdo | 70 | 70 | 0,00 |
| 6 | Ojo derecho | 50 | 40 | -20,00 |
| | Ojo izquierdo | 70 | 40 | -42,86 |
| 7 | Ojo derecho | 53 | 37,5 | -29,25 |
| | Ojo izquierdo | 67 | 46,5 | -30,60 |
| 8 | Ojo derecho | 70 | 42 | -40,00 |
| | Ojo izquierdo | 70 | 46 | -34,29 |
| 9 | Ojo derecho | 7 | 5,5 | -21,43 |
| | Ojo izquierdo | 5 | 4,5 | -10,00 |
| 10 | Ojo derecho | 3,5 | 0,5 | -85,71 |
| | Ojo izquierdo | 3,5 | 1,1 | -68,57 |
| 11 | Ojo derecho | 5 | 2 | -60,00 |
| | Ojo izquierdo | 4 | 1,1 | -72,50 |
| 12 | Ojo derecho | 5 | 6,4 | 28,00 |
| | Ojo izquierdo | 4 | 3,3 | -17,50 |
| 13 | Ojo derecho | 7 | 6 | -14,29 |
| | Ojo izquierdo | 7 | 6,5 | -7,14 |
| 14 | Ojo derecho | 4 | 6,8 | 70,00 |
| | Ojo izquierdo | 5 | 6,8 | 36,00 |
| 15 | Ojo derecho | 7 | 8 | 14,29 |
| | Ojo izquierdo | 7 | 7 | 0,00 |
| 16 | Ojo derecho | 7 | 6 | -14,29 |
| | Ojo izquierdo | 4 | 7 | 75,00 |
| 17 | Ojo derecho | 3,7 | 2,5 | -32,43 |
| | Ojo izquierdo | 6 | 2 | -66,67 |
| 18 | Ojo derecho | 7 | 4 | -42,86 |
| | Ojo izquierdo | 6 | 5 | -16,67 |
| 19 | Ojo derecho | 4,9 | 5,7 | 16,33 |
| | Ojo izquierdo | 5,5 | 5,5 | 0,00 |
| 20 | Ojo derecho | 3 | 7 | 133,33 |
| | Ojo izquierdo | 7 | 3 | -57,14 |
| 21 | Ojo derecho | 2 | 4,4 | 120,00 |
| | Ojo izquierdo | 7 | 6,7 | -4,29 |
| 22 | Ojo derecho | 2 | 2,4 | 20,00 |
| | Ojo izquierdo | 2 | 1,3 | -35,00 |
| 23 | Ojo derecho | 6 | 3 | -50,00 |
| | Ojo izquierdo | 7 | 5 | -28,57 |

Conclusiones

- 5 Teniendo en cuenta la relación compuesto: placebo de 2:1 del ensayo clínico, y que esta relación se mantiene independientemente del número de pacientes analizados, se puede concluir que el efecto de la SEQ ID NO: 2 aplicada diariamente al paciente, es capaz de reducir la gravedad de la enfermedad del ojo seco y reducir el dolor ocular cuando se administra tópicamente en el ojo.

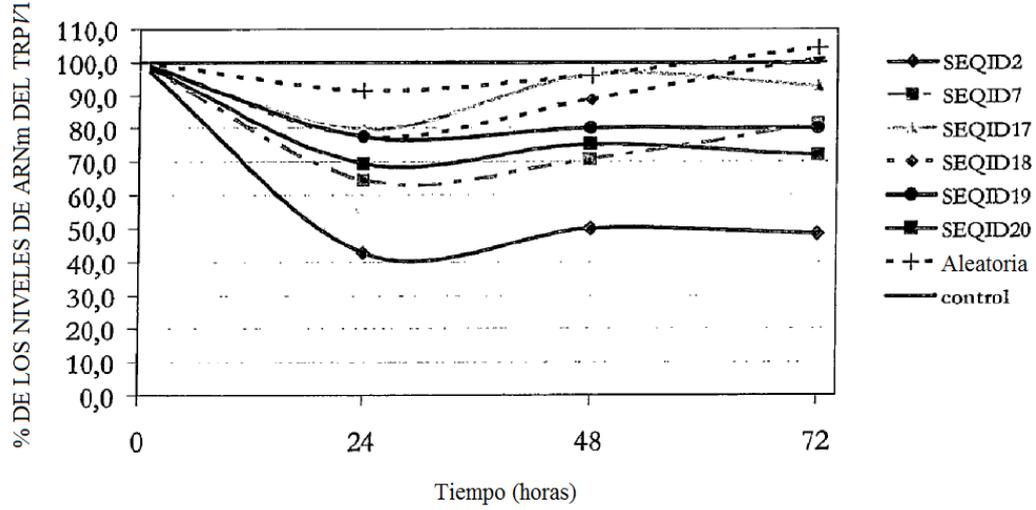
REFERENCIAS

- Baumann TK & Martenson ME. (2000). "Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin-gated channels." *J Neurosci* 20:RC80.
- 5 Caterina et al. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* 389(6653):816-24.
- Caterina et al. (2001). "The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway." *Annu Rev Neurosci.* 24:487-517.
- 10 Cerutti, L., N. Mian, et al. (2000). "Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain." *Trends Biochem Sci* 25(10): 481-2.
- Collins, R. E. y X. Cheng (2005). "Structural domains in RNAi." *FEBS Lett* 579(26): 5841-9.
- Doench, J.G. Sharp, P.A. "specificity of microRNA target selection in translational repression" *Genes Dev.* 18, 504-511; 2004
- 15 Elbashir, S. M., W. Lendeckel, et al. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." *Genes Dev* 15(2): 188-200.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391 (6669): 806-11.
- Gonzalez, G. G., Garcia, P. et al. (1993). "Reduction of capsaicin-induced ocular pain and neurogenic inflammation by calcium antagonists." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(12):3329-3335.
- 20 Hutvagner, G. y P. D. Zamore (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." *Science* 297(5589): 2056-60.
- Jia et al. (2005). "TRPV1 receptor: a target for the treatment of pain, cough, airway disease and urinary incontinence." *Drug News Perspect* 18(3): 165-71.
- Lewis, B.P., Shih I. Et al. "prediction of mammalian micro RNA targets" *Cell* 115:787-798; 2003
- 25 Liu, J., M. A. Carmell, et al. (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." *Science* 305(5689): 1437-41.
- Ma, J. B., Y. R. Yuan, et al. (2005). "Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein." *Nature* 434(7033): 666-70.
- 30 Montell et al. (2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells." *Genes Dev* 16(8):948-58.
- Nykanen, A., B. Haley, et al. (2001). "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." *Cell* 107(3): 309-21.
- Orban, T. I. y E. Izaurralde (2005). "Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome." *Rna* 11(4): 459-69.
- 35 Parrish, S., J. Fleenor, et al. (2000). "Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference." *Mol Cell* 6(5): 1077-87.
- Rand, T. A., S. Petersen, et al. (2005). "Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation." *Cell* 123(4): 621-9.
- 40 Reynolds, A., Leake, D., et al. (2004). "Rational siRNA design for RNA interference " *Nat Biotechnol* 22(31):326-30.
- Schubert, S. et al. (2005). "Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions." *J Mol Biol* 348:883-893.
- Song, J. J., S. K. Smith, et al. (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." *Science* 305(5689): 1434-7.
- 45 Ui-Tei, K., Naito, Y., et al. (2004). "Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference." *Nucleic Acids Res* 32(3): 936-48.

REIVINDICACIONES

1. Un ARNip dirigido a la SEQ ID NO: 1 para su uso en el tratamiento del ojo seco y/o del dolor ocular, en donde el ARNip se administra en una dosificación de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,9 mg por día.
5
2. ARNip para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ARNip se administra en una dosificación de aproximadamente 0,6 mg o aproximadamente 0,9 mg por ojo por día.
3. ARNip para su uso de acuerdo con una reivindicación anterior, en donde dicho ARNip se administra durante 5-15 días.
10
4. ARNip para su uso de acuerdo con una reivindicación anterior, en donde dicho ARNip se administra durante 10 días.
5. ARNip para su uso de acuerdo con una reivindicación anterior, en donde dicho ARNip se administra de forma crónica.
15
6. ARNip para su uso de acuerdo con una reivindicación anterior, en donde dicho ARNip es el compuesto definido como SEQ ID NO: 2.
20
7. ARNip para su uso de acuerdo con una reivindicación anterior, en donde dicho ARNip se administra tópicamente al ojo.
8. Un kit médico para el tratamiento del ojo seco y/o del dolor ocular, que comprende un suministro de un ARNip dirigido a la SEQ ID NO: 1, un dispensador con un orificio para dispensar una dosificación de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,9 mg del ARNip en una gota de volumen predeterminado, e instrucciones impresas para administrar un ARNip dirigido a la SEQ ID NO: 1 de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 en una dosificación de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,9 mg para administración diaria.
25

A



B

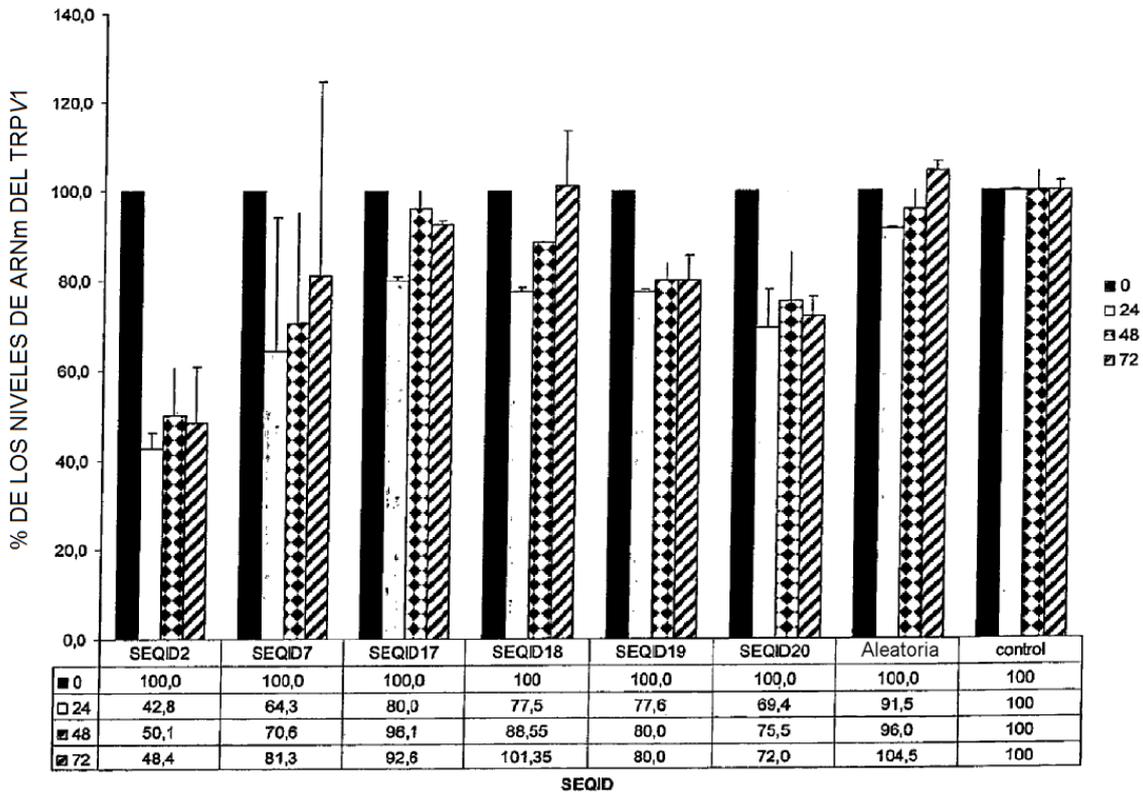


FIGURA 1

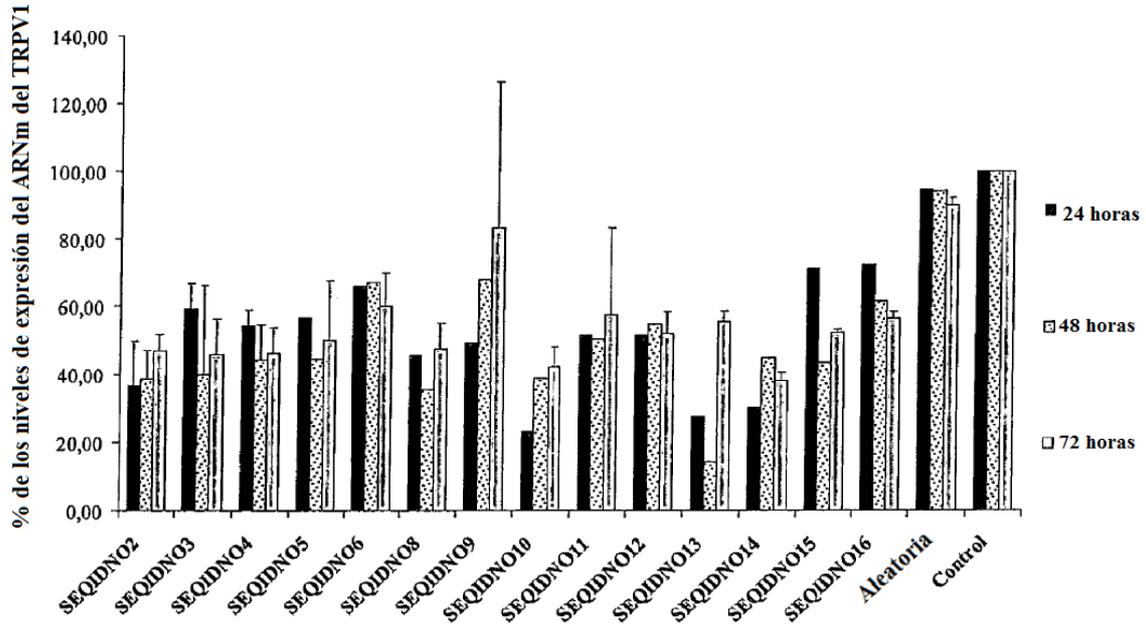


FIGURA 2

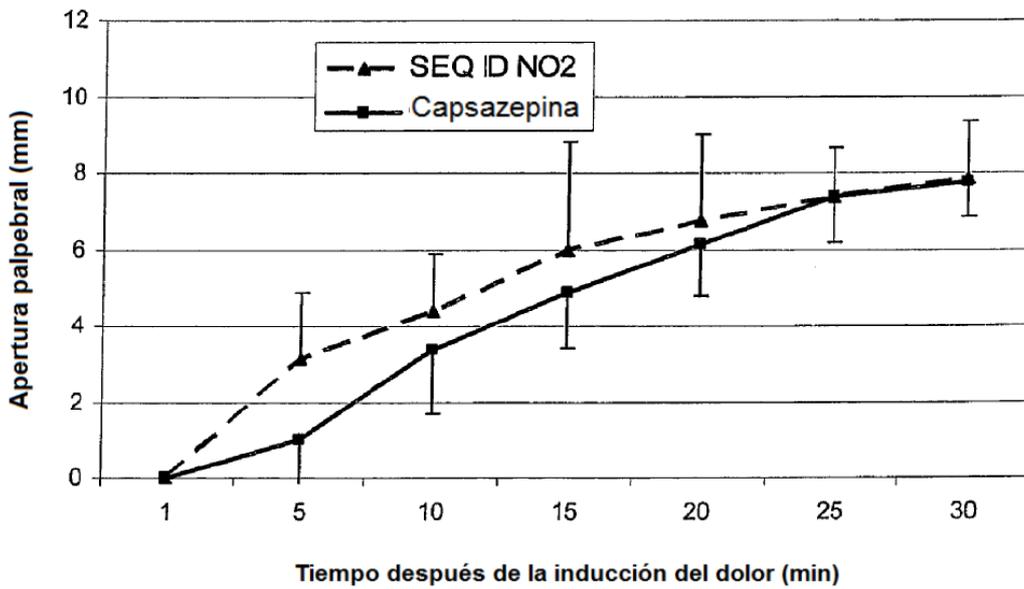


FIGURA 3

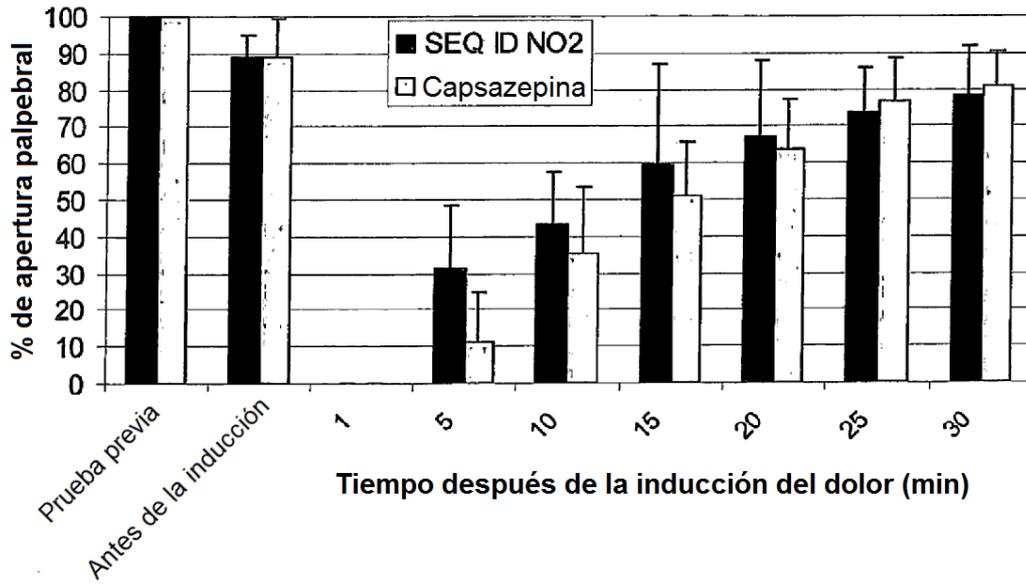


FIGURA 4

Plasma humano al 10 %

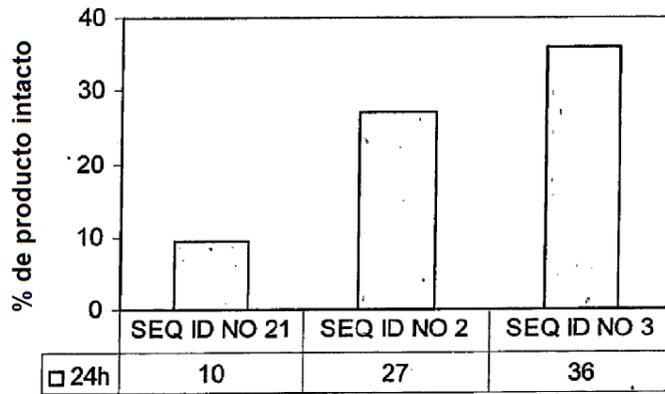


FIGURA 5

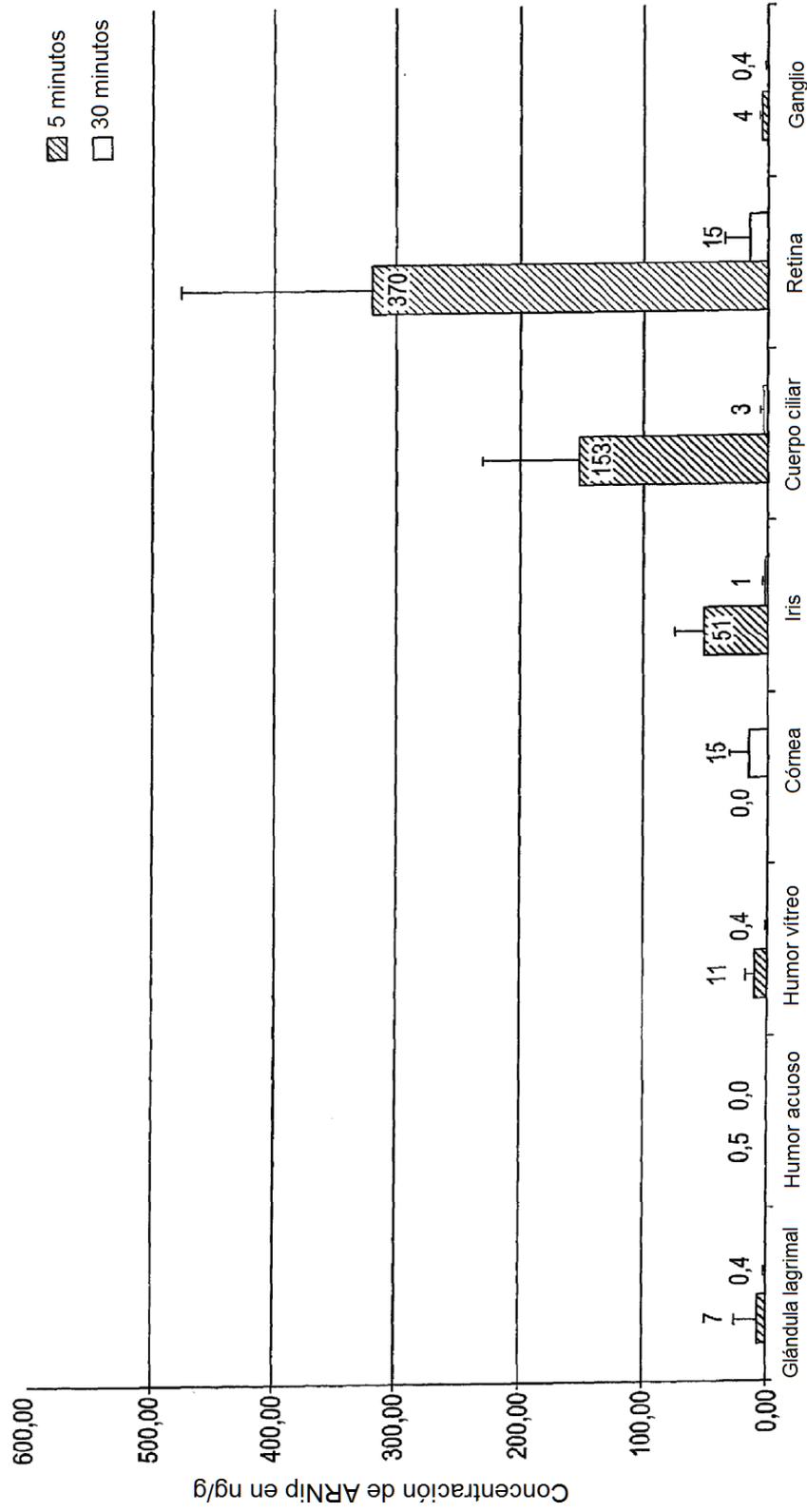


FIGURA 6