

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 196**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2005 E 11153604 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2319925**

54 Título: **Usos terapéuticos de los inhibidores de RTP801**

30 Prioridad:

17.08.2004 US 601983 P

25.08.2004 US 604668 P

14.09.2004 US 609786 P

22.12.2004 US 638659 P

22.03.2005 US 664236 P

08.06.2005 US 688943 P

16.08.2004 EP 04019405

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2018

73 Titular/es:

QUARK PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

6501 Dumbarton Circle

Fremont, California 94555, US y

SILENCE THERAPEUTICS GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

FEINSTEIN, ELENA;

KAUFMANN, JÖRG y

GIESE, KLAUS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 691 196 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

Usos terapéuticos de los inhibidores de RTP801

5 Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente europea núm. EP 04019405.2, presentada el 16 de agosto de 2004; las solicitudes provisionales de Estados Unidos núms. 60/601,983, presentada el 17 de agosto de 2004; 60/604,668, presentada el 25 de agosto de 2004; 60/609,786, presentada el 14 de septiembre de 2004; 60/638,659, presentada el 22 de diciembre de 2004; 60/664,236, presentada el 22 de marzo de 2005 y 60/688,943, presentada el 8 de junio de 2005.

Campo de la invención

10 La presente invención se relaciona con nuevas moléculas de ARNip que inhiben el gen RTP801 y con el uso de tales moléculas para tratar enfermedades oculares.

Antecedentes de la invención

Degeneración macular

15 La causa más común de la disminución de la visión mejor corregida en los individuos mayores de 65 años en los Estados Unidos es el trastorno de la retina conocido como degeneración macular relacionada con la edad (AMD). Cuando la AMD progresa, la enfermedad se caracteriza por pérdida de la visión central, aguda. El área del ojo afectado por la AMD es la mácula - un área pequeña en el centro de la retina, compuesta fundamentalmente de células fotorreceptoras. La llamada AMD "seca", representa aproximadamente 85% - 90% de los pacientes con AMD, involucra alteraciones en la distribución de pigmentos en los ojos, pérdida de los fotorreceptores y disminuye la función de la retina debido a la atrofia general de las células. La llamada AMD "húmeda" involucra la proliferación de vasos coroides anormales lo que conduce a coágulos o cicatrices en el espacio sub-retinal. Así, la aparición de la AMD húmeda ocurre debido a la formación de una red neovascular coroidea anormal (neovascularización coroidea, CNV) debajo de la retina neural. Los vasos sanguíneos formados nuevamente son excesivamente débiles. Esto conduce a la acumulación de fluido subretinal y sangre conduciendo a la pérdida de la agudeza visual. Eventualmente, hay pérdida total de la retina funcional en la región involucrada, ya que se forma una gran cicatriz disciforme que involucra la coroides y la retina. Mientras que los pacientes con AMD seca pueden mantener una visión de calidad decreciente, la AMD húmeda frecuentemente resulta en la ceguera. (Hamdi & Age-related Macular degeneration - a new viewpoint, *Frontiers in Bioscience*, e305-314, mayo 2003). La CNV ocurre no solamente en la AMD húmeda sino también en otras patologías oculares tales como el síndrome de histoplasmosis ocular, estrías angioides, rupturas en la membrana de Bruch, degeneración miope, tumores oculares y algunas enfermedades degenerativas de la retina.

20 Varios estudios conducidos han determinado los factores de riesgo severo para la AMD, tales como fumar, el envejecimiento, la historia familiar (Milton, *Am J Ophthalmol* 88, 269 (1979); Mitchell y otros, *Ophthalmology* 102, 1450-1460 (1995); Smith y otros, *Ophthalmology* 108, 697-704 (2001)) el sexo (7 veces de probabilidad más alta en mujeres: Klein y otros, *Ophthalmology* 99, 933-943 (1992) y la raza (los blancos son más susceptibles). Los factores de riesgo adicionales pueden incluir las características del ojo tales como hipermetropía (hyperopia) y ojos de color claro, así como la enfermedad cardiovascular y la hipertensión. También se ha documentado evidencia de la implicación genética en el inicio del progreso de la enfermedad (véase Hamdi & Kenney anteriormente).

35 Dos compañías, Acuity Pharmaceuticals y ARNip Therapeutics, presentaron recientemente un IND para moléculas de ARNip inhibitoras de VEGF y VEGF-R1 (Flt-1), respectivamente, para el tratamiento de la AMD. Esas moléculas se llaman inhibidor Cand5 e inhibidor 027 respectivamente.

Trastornos microvasculares

40 Los trastornos microvasculares se componen de un amplio grupo de afecciones que afectan principalmente los capilares microscópicos y linfáticos y están, por lo tanto, fuera del alcance de la intervención quirúrgica directa. La enfermedad microvascular puede agruparse ampliamente en la vasoespástica, la vasculitis y oclusiva linfática. Además, muchas de las afecciones vasculares conocidas tienen un elemento microvascular en ellas.

45 ■ **Enfermedad vasoespástica**- Las enfermedades vasoespásticas son un grupo de afecciones relativamente comunes donde, por razones desconocidas, los reflejos vasoconstrictivos periféricos son hipersensibles. Esto resulta en una vasoconstricción inapropiada e isquemia del tejido, aún al punto de la pérdida del tejido. Los síntomas vasoespásticos se relacionan generalmente con la temperatura o el uso de maquinaria vibradora pero puede ser secundario a otras afecciones.

50 ■ **Enfermedad vasculítica** - Las enfermedades vasculíticas son aquellas que involucran un primario proceso inflamatorio en la microcirculación. La vasculitis es generalmente un componente de un trastorno autoinmune o del

tejido conectivo y generalmente no es susceptible de tratamiento quirúrgico pero requiere tratamiento inmunosupresivo si los síntomas son severos.

- 5 ■ *Enfermedad oclusiva linfática* - El hinchamiento crónico de los miembros inferior o superior (linfedema) es el resultado de la oclusión linfática periférica. Esto es una afección relativamente rara que tiene un gran número de causas, algunas heredadas, algunas adquiridas. El pilar principal del tratamiento son las prendas de compresión correctamente ajustadas y el uso de dispositivos de compresión intermitentes.

Patologías microvasculares asociadas con la diabetes

10 La diabetes es la causa principal de la ceguera, la causa número uno de amputaciones e impotencia, y una de las enfermedades crónicas de la niñez que más frecuentemente ocurre. La diabetes es además la causa principal de la enfermedad renal en etapa final en los Estados Unidos, con una tasa de prevalencia de 31 % comparado con otras enfermedades renales. La diabetes es además la indicación más frecuente para trasplante de riñón, llegando al 22% de todas las operaciones de trasplante.

15 En general, las complicaciones diabéticas pueden clasificarse ampliamente como enfermedad microvascular o macrovascular. Las complicaciones microvasculares incluyen neuropatía (daño de los nervios), nefropatía (enfermedad del riñón) y trastornos de la visión (por ejemplo, retinopatía, glaucoma, cataratas y trastornos de la córnea). En la retina, los glomérulos, y los vasos sanguíneos que nutren los nervios, rasgos patofisiológicos similares caracterizan la enfermedad microvascular específica de la diabetes.

20 Las patologías microvasculares asociadas con la diabetes se definen como una enfermedad de los vasos sanguíneos más pequeños (capilares) que puede ocurrir, por ejemplo, en personas que han tenido diabetes por mucho tiempo. Las paredes de los vasos se hacen anormalmente gruesas pero débiles. Ellas, por lo tanto, sangran, pierden proteína y reducen el flujo de sangre a través del cuerpo.

25 Los datos del modelo clínico y animal indican que la hiperglicemia crónica es el factor de iniciación central de todos los tipos de enfermedad microvascular diabética. La duración y magnitud de la hiperglicemia están fuertemente correlacionados con la extensión y velocidad de progreso de la enfermedad microvascular diabética. Aunque todas las células diabéticas se exponen a niveles elevados de glucosa en plasma, el daño hiperglicémico se limita a aquellos tipos de células (por ejemplo, células endoteliales) que desarrollan hiperglicemia intracelular. Las células endoteliales desarrollan hiperglicemia intracelular debido, a diferencia de otras muchas células, a que ellas no pueden regular descendientemente el transporte de glucosa cuando se exponen a hiperglicemia extracelular. Que la hiperglicemia intracelular es necesaria y suficiente para el desarrollo de la patología diabética se demuestra además por el hecho de que la sobreexpresión del transportador de glucosa GLUT1 en las células mesangiales cultivadas en un medio de glucosa normal imita el fenotipo diabético, induciendo a que aumente la expresión génica de fibronectina, colágeno tipo IV, y colágeno tipo I como la hiperglicemia diabética.

35 Función de la célula endotelial anormal: Temprano en el curso de la diabetes mellitus, antes que los cambios estructurales sean evidentes, la hiperglicemia causa anomalías en el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular en la retina, glomérulo, y vasos sanguíneos del nervio periférico. Se piensa que el aumento del flujo sanguíneo y la presión intracapilar refleja la producción disminuida de óxido nítrico (NO) inducida por la hiperglicemia en lado eferente de los lechos capilares, y posiblemente una sensibilidad aumentada de la angiotensina II. Como consecuencia del aumento de la presión intracapilar y la disfunción de la célula endotelial, los capilares de la retina exhiben una fuga aumentada de fluoresceína y los capilares glomerulares tienen una tasa de excreción de albúmina (AER) elevada. Cambios comparables ocurren en los vasos sanguíneos del nervio periférico. Temprano en el curso de la diabetes, la permeabilidad incrementada es reversible; cuando el tiempo pasa, sin embargo, se hace irreversible.

Acumulación aumentada de proteínas en la pared del vaso

45 El rasgo patofisiológico común de la enfermedad microvascular diabética es el estrechamiento progresivo y la eventual oclusión de la luz vascular, lo que resulta en una perfusión y función inadecuada del tejido afectado. La hipertensión microvascular temprana inducida por hiperglicemia y el aumento de la permeabilidad vascular contribuyen a la oclusión irreversible de los microvasos por tres procesos:

- 50 ■ El primero es una fuga anormal de ácido periódico-Schiff (PAS)-positiva, proteínas plasmáticas que contienen carbohidrato, que se depositan en la pared capilar y que pueden estimular las células perivasculares tales como los pericitos y células mesangiales para elaborar los factores de crecimiento y la matriz extracelular.

■ El segundo es la extravasación de los factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), que estimula directamente la sobreproducción de componentes de la matriz extracelular, y puede inducir apoptosis en ciertos tipos de células relevantes a complicaciones.

■ El tercero es la estimulación inducida por la hipertensión de la expresión génica patológica por células endoteliales y células de soporte, que incluyen transportadores de glucosa GLUT-1, factores de crecimiento, receptores del factor de crecimiento, componentes de la matriz extracelular, y moléculas de adhesión que pueden activar los leucocitos circulantes. La observación que la reducción unilateral en la gravedad de la enfermedad microvascular diabética ocurre en el lado con estenosis arterial oftálmica o renal es consistente con este concepto.

Pérdida de células microvasculares y oclusión del vaso

El estrechamiento progresivo y la oclusión de la luz microvascular diabética se acompañan además de la pérdida de células microvasculares. En la retina, la diabetes mellitus induce la muerte celular programada de las células de Müller y las células ganglionares, pericitos, y células endoteliales. En el glomérulo, el declive de la función renal se asocia con la oclusión capilar generalizada y la pérdida de podocito, pero los mecanismos que subyacen a la pérdida de células glomerulares no se conocen todavía. En los vasos sanguíneos que nutren los nervios ocurre la degeneración del pericito y la célula endotelial, y estos cambios microvasculares parecen anteceder el desarrollo de la neuropatía periférica diabética. La distribución multifocal de la degeneración axonal en diabetes soporta una función causal para la oclusión microvascular, pero las disminuciones en las neurotrofinas inducidas por la hiperglicemia pueden contribuir previniendo la reparación axonal normal y la regeneración.

Otra característica común de la enfermedad microvascular diabética se conoce como *memoria hiperglicémica*, o la persistencia o progresión de alteraciones microvasculares inducidas por la hiperglicemia durante períodos posteriores de la homeostasis glucosil normal. El ejemplo más notable de este fenómeno es el desarrollo de retinopatía severa en ojos histológicamente normales de perros diabéticos que ocurrió completamente durante un período de 2,5 años de glucosa sanguínea normalizada que siguió 2,5 años de hiperglicemia. El aumento inducido por la hiperglicemia en la transcripción del gen de la matriz seleccionado persiste además por semanas después del restablecimiento de la normoglicemia in vivo, y una prolongación menos pronunciada, pero cualitativamente similar, de aumento inducido por hiperglicemia en la transcripción del gen de la matriz seleccionado ocurre en células endoteliales cultivadas.

Para más información, ver "Shared pathophysiologic features of microvascular complications of diabetes" (Larsen: Williams Textbook of Endocrinology, 10ma ed., Copyright © 2003 Elsevier).

Las complicaciones microvasculares ocurren no solamente en diabetes declarada sino también debido a la tolerancia deficiente a la glucosa (IGT). Las complicaciones microvasculares de IGT: neuropatía, retinopatía, y microproteinuria renal.

Retinopatía diabética

En el estado diabético, la hiperglucemia conduce a una disminución del flujo sanguíneo retiniano, la hiperpermeabilidad retiniana, retrasos en la conducción del nervio foto-receptor, y la muerte celular de la neurona retiniana. En la diabetes de corta duración, la muerte celular neuronal se identificó dentro de la capa nuclear interna de la retina. Específicamente, la apoptosis se localizó en las células gliales tales como las células de Mueller y los astrocitos y se demostró que se produce en un 1 mes de la diabetes en el modelo de diabetes en rata inducida por STZ. La causa de estos eventos es multi-factorial lo que incluye la activación de la vía de diacilglicerol/PKC, el estrés oxidativo y la glucosilación no enzimática. La combinación de estos eventos deja la retina hipóxica y en última instancia, conduce al desarrollo de la retinopatía diabética. Una posible conexión entre la isquemia de la retina y los cambios tempranos en la retina diabética es la producción de factores de crecimiento como el VEGF inducidos por la hipoxia. El regulador maestro de la respuesta hipóxica se identificó como el factor-1 inducible por hipoxia (HIF-1), el cual controla los genes que regulan la proliferación celular y la angiogénesis. Estudios anteriores demostraron que la inhibición de la ubiquitinación de HIF-1 conduce a la unión con elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) y la producción del ARNm de VEGF.

La retinopatía diabética se define como la disfunción progresiva de la vasculatura de la retina causada por la hiperglucemia crónica. Las principales características de la retinopatía diabética incluyen los microaneurismas, las hemorragias retinianas, los exudados de lípidos retinianos, las manchas algodinosas, la no perfusión capilar, el edema macular y la neovascularización. Las características asociadas incluyen la hemorragia vítrea, el desprendimiento de la retina, el glaucoma neovascular, las cataratas prematuras y la parálisis de los nervios craneales.

Hay 16 millones de personas en los Estados Unidos con diabetes Tipo 1 y diabetes Tipo 2. En 15 años, el 80% de los pacientes de Tipo 1 desarrollan retinopatía diabética mientras que el 84% de los pacientes diabéticos de Tipo 2 desarrollan retinopatía en 19 años. Estas cifras constituyen un mercado significativo para los agentes terapéuticos dirigidos a las enfermedades oculares de la neovascularización. El desarrollo de la retinopatía diabética es dependiente del tiempo. A pesar del control óptimo del azúcar en la sangre, se puede esperar que los pacientes con enfermedad de larga duración eventualmente desarrollen alguna forma de retinopatía. La National Society to Prevent Blindness, estimó que de 4 a 6 millones de diabéticos en los Estados Unidos tienen retinopatía diabética. La incidencia anual estimada de nuevos casos de *retinopatía diabética proliferativa* y *de edema macular diabético* son

65.000 y 75.000, respectivamente, con una prevalencia de 700.000 y 500.000, respectivamente. La retinopatía diabética causa entre 12.000 y 24.000 nuevos casos de ceguera en los Estados Unidos cada año. La retinopatía se trata por métodos quirúrgicos, eficaces en la reducción de la pérdida grave de la visión, pero las porciones de la retina tratadas con láser se destruyen irreversiblemente. No existen tratamientos farmacológicos disponibles.

5 Una enfermedad microvascular que afecta principalmente a los capilares, la diabetes mellitus afecta el ojo por la destrucción de la vasculatura en la conjuntiva, la retina y el sistema nervioso central. Los pacientes pueden presentarse con antecedentes de conjuntiva bulbar inyectada por mucho tiempo junto con quejas sistemáticas de pérdida de peso a pesar de un apetito mayor de lo normal (polifasia), sed anormal (polidipsia) y orina anormalmente frecuente (poliuria).

10 La agudeza visual fluctuante secundaria al azúcar en sangre inestable es un signo ocular común. La inflamación en los lentes del cristalino resulta en grandes cambios repentinos en la refracción, así como en la formación prematura de cataratas. Los cambios en la agudeza visual dependerán de la gravedad y etapa de la enfermedad.

15 En la retina, el debilitamiento de las arteriolas y capilares puede resultar en la apariencia característica de hemorragias intrarretiniana en forma de puntos y manchas, exudados, anomalías microvasculares intrarretinianas (IRMA), microaneurismas, edema e infartos algodanosos. La retinopatía diabética proliferativa es el resultado de un compromiso vascular severo y es visible como la neovascularización del disco (NVD), la neovascularización en otra parte (NVE) y la neovascularización del iris (NVI, o la rubeosis del iris). Las complicaciones neurológicas incluyen parálisis de los nervios craneales tercero, cuarto y sexto, así como la papilitis diabética y la parálisis del nervio facial.

20 La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades influenciadas genéticamente que comparten la intolerancia a la glucosa. Se caracteriza como un trastorno de la regulación metabólica como resultado de la deficiencia o el mal funcionamiento de la insulina o de la deficiencia o el mal funcionamiento de los receptores celulares de la insulina.

25 La bioquímica que implica la formación del sorbitol juega un papel en la destrucción de los pericitos, los cuales son células que soportan el endotelio vascular. A medida que los pericitos de apoyo perecen, el endotelio capilar se pone en peligro, lo que resulta en la fuga vascular de sangre, proteínas y lípidos. Esto, en combinación con la sangre espesada, cargada de glucosa, produce insuficiencia vascular, no perfusión capilar, hipoxia retiniana, estructura alterada y disminución de la función. La formación y liberación de factores vasoproliferativos que desempeñan un papel en la génesis de la neovascularización de la retina son poco conocidos.

30 La mayoría de las secuelas de la diabetes que no amenazan la visión se resuelven espontáneamente en el transcurso de semanas o meses después de un control médico. En los casos en los que hay grandes cambios en la refracción, los pacientes pueden requerir una receta de lentes temporales hasta que la refracción se estabilice. Cuando la retinopatía amenaza la mácula o cuando nuevos vasos sanguíneos proliferan, el paciente se puede remitir para una fotocoagulación con láser. El estudio de la retinopatía diabética (DRS) demostró concluyentemente que la fotocoagulación panretiniana tuvo éxito en la reducción del riesgo de pérdida severa de la visión en pacientes de alto riesgo. Se definen las características de alto riesgo como: (1) la neovascularización del disco óptico (NVD) de un cuarto a un tercio del diámetro de un disco en tamaño y (2) la neovascularización en otra parte (NVE) con cualquier hemorragia vítrea.

Edema macular diabético (DME)

40 El DME es una complicación de la retinopatía diabética, una enfermedad que afecta a los vasos sanguíneos de la retina. La retinopatía diabética produce múltiples anomalías en la retina, lo que incluye engrosamiento de la retina y edema, hemorragias, flujo de sangre obstaculizado, fuga excesiva de líquido de los vasos sanguíneos y, en las últimas etapas, el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos. Este crecimiento de los vasos sanguíneos puede causar grandes hemorragias y daño severo de la retina. Cuando la fuga de los vasos sanguíneos de la retinopatía diabética causa hinchazón de la mácula, se conoce como DME. El síntoma principal del DME es una pérdida de la visión central. Los factores de riesgo asociados con el DME incluyen niveles de glucosa en sangre mal controlados, presión arterial alta, función renal anormal que causa la retención de líquidos, niveles altos de colesterol y otros factores sistémicos generales.

50 Según la Organización Mundial de la Salud, la retinopatía diabética es la principal causa de ceguera en adultos en edad laboral y la principal causa de pérdida de visión en los diabéticos. La American Diabetes Association informa que hay aproximadamente 18 millones de diabéticos en los Estados Unidos y aproximadamente 1,3 millones de casos nuevos diagnosticados de diabetes en los Estados Unidos cada año. La Prevent Blindness America y el National Eye Institute estiman que en los Estados Unidos hay más de 5,3 millones de personas mayores de 18 años con retinopatía diabética, lo que incluye aproximadamente 500.000 con DME. El CDC estima que hay aproximadamente 75.000 nuevos casos de DME en los Estados Unidos cada año.

Neuropatías adicionales

Además de la diabetes, las causas comunes de la neuropatía son la infección por herpes zoster, trauma crónico o agudo (lo que incluye la cirugía) y varias neurotoxinas. El dolor neuropático es común en el cáncer como resultado directo del cáncer en los nervios periféricos (por ejemplo, la compresión por un tumor) y como un efecto secundario de muchos fármacos quimioterapéuticos.

5 *Enfermedad microvascular* - Las enfermedades vasculares y neurales están estrechamente relacionadas y entrelazadas. Los vasos sanguíneos dependen de la función normal de los nervios, y los nervios dependen del flujo sanguíneo adecuado. El primer cambio patológico en la microvasculatura es la vasoconstricción. Cuando la enfermedad progresa, la disfunción neuronal se correlaciona estrechamente con el desarrollo de anomalías vasculares, tales como engrosamiento de la membrana del basamento capilar e hiperplasia endotelial, que contribuye a hipoxia y tensión de oxígeno disminuida. Los agentes vasodilatadores (por ejemplo, los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, α 1-antagonistas) pueden conducir a mejoras sustanciales en el flujo sanguíneo neuronal, con las correspondientes mejoras en las velocidades de conducción nerviosa.

Manifestaciones clínicas

15 La neuropatía afecta a todos los nervios periféricos: fibras de dolor, neuronas motoras, nervios autonómicos. Por lo tanto, necesariamente puede afectar a todos los órganos y sistemas ya que todos están inervados. Hay varios síndromes distintos en dependencia de los sistemas de órganos y miembros afectados, pero estos no son de ninguna manera exclusivos. Un paciente puede tener una neuropatía sensoriomotora y autonómica o cualquier otra combinación.

20 A pesar de los avances en la comprensión de las causas metabólicas de la neuropatía, los tratamientos destinados a interrumpir estos procesos patológicos se limitan por los efectos secundarios y la falta de eficacia. Por lo tanto, los tratamientos son sintomáticos y no abordan los problemas subyacentes. Los agentes para el dolor que causa la neuropatía sensoriomotora incluyen antidepresivos tricíclicos (TCA), inhibidores de la recaptación de la serotonina (SSRI) y fármacos antiepilépticos (AED). Ninguno de estos agentes revoca los procesos patológicos que conducen a la neuropatía diabética y no alteran el curso incesante de la enfermedad. Por lo tanto, sería útil tener una composición farmacéutica que pudiera tratar mejor estas condiciones y/o aliviar los síntomas.

Retinopatías adicionales

Microvasculopatía retiniana (retinopatía del SIDA)

30 La microvasculopatía retiniana se ve en el 100% de los pacientes con SIDA. Se caracteriza por hemorragias intrarretinianas, microaneurismas, manchas de Roth, manchas algodinosas (microinfartos de la capa de las fibras nerviosas) y revestimiento perivascular. La etiología de la retinopatía se desconoce aunque se piensa que se debe a inmuno-complejos circulantes, la liberación local de sustancias citotóxicas, hemorreología anormal, y la infección por VIH de las células endoteliales. La retinopatía del SIDA es ahora tan común que las manchas algodinosas en un paciente sin diabetes o hipertensión, pero en riesgo de contraer el VIH debe inducir al médico a considerar la prueba viral. No existe un tratamiento específico para la retinopatía del SIDA pero su presencia continua puede inducir a un médico a re-examinar la eficacia de la terapia contra el VIH y el cumplimiento del paciente.

Retinopatía por trasplante de médula ósea (BMT)

40 La retinopatía por trasplante de médula ósea se reportó por primera vez en 1983. Típicamente ocurre en seis meses, pero puede ocurrir tan tarde como 62 meses después del BMT. Los factores de riesgo como la diabetes y la hipertensión pueden facilitar el desarrollo de la retinopatía por BMT por realzar la microvasculopatía isquémica. No hay predilección conocida de edad, género o raza para el desarrollo de la retinopatía por BMT. Los pacientes presentan disminución de la agudeza visual y/o déficit en el campo visual. Los resultados del segmento posterior son típicamente bilaterales y simétricos. Las manifestaciones clínicas incluyen múltiples manchas algodinosas, telangiectasias, microaneurismas, edema macular, exudados duros y hemorragias retinianas. La angiografía con fluoresceína demuestra la no perfusión capilar y el goteo, anomalías microvasculares intrarretinianas, microaneurismas y edema macular. Aunque la etiología exacta de la retinopatía por BMT no se ha elucidado, parece afectarse por varios factores: toxicidad de la ciclosporina, irradiación corporal total (TBI), y agentes quimioterapéuticos. La ciclosporina es un potente agente inmunomodulador que suprime la respuesta inmune injerto-contra-hospedero. Puede conducir a daño celular endotelial y efectos neurológicos secundarios, y como resultado, se ha sugerido como la causa de la retinopatía por BMT. Sin embargo, la retinopatía por BMT se puede desarrollar en ausencia del uso de la ciclosporina, y no se demostró que la ciclosporina cause la retinopatía por BMT en los receptores de médula ósea autólogos o singénicos. La ciclosporina, por lo tanto, no parece ser la única causa de la retinopatía por BMT. La irradiación corporal total (TBI) también se implicó como causa de la retinopatía por BMT. La radiación daña la microvasculatura retiniana y conduce a la vasculopatía isquémica. Variables tales como la dosis total de radiación y el intervalo de tiempo entre la radiación y la ablación de la médula ósea parecen ser importantes. Sin embargo, la retinopatía por BMT puede ocurrir en pacientes que no recibieron TBI, y la retinopatía por BMT no se observa en los receptores de trasplantes de órganos sólidos que recibieron dosis similares de radiación. Por lo tanto, la TBI no es la única causa, pero es otro factor que contribuye al desarrollo de la retinopatía

por BMT. Los agentes quimioterapéuticos se sugirieron como un factor potencial que contribuye a la retinopatía por BMT. Medicamentos tales como el cisplatino, la carmustina y la ciclofosfamida pueden causar efectos secundarios oculares, lo que incluye edema de la papila, neuritis óptica, déficit en el campo visual y la ceguera cortical. Se sugirió que estos fármacos quimioterapéuticos pueden predisponer a los pacientes a los daños retinianos inducidos por la radiación y aumentar el efecto nocivo de la radiación. En general, los pacientes con retinopatía por BMT tienen un buen pronóstico. La retinopatía por lo general se resuelve en dos a cuatro meses después de suspender o disminuir la dosis de ciclosporina. En un informe, el 69 por ciento de los pacientes experimentaron una resolución completa de los resultados de la retina, y el 46 por ciento de los pacientes recuperó completamente su agudeza visual basal. Debido al pronóstico favorable y la naturaleza relativamente no progresiva de la retinopatía por BMT, una intervención agresiva no suele ser necesaria.

Afecciones isquémicas

La isquemia se puede dividir en dos categorías: la primera implica la aterosclerosis acelerada que ocurre comúnmente en pacientes con diabetes, es decir, en las arterias femoral, poplítea y tibial posterior. Estos vasos, a menudo solamente 1 o 2 cm de diámetro, pueden desarrollar la placa aterosclerótica, que disminuye seriamente el flujo de sangre. Después de que los grandes vasos se ocluyen completamente, pueden ocurrir, accidente cerebro vascular, infarto de miocardio, isquemia, y úlceras del pie diabético que no cicatrizan. Esta forma de isquemia es esencialmente una enfermedad de grandes vasos.

Síndrome isquémico ocular

Los pacientes que sufren de síndrome de isquemia ocular (OIS) son generalmente mayores, con edades en el intervalo entre los 50 a los 80. Los varones se afectan dos veces más frecuentemente que las mujeres. El paciente es sólo raramente asintomático. La disminución de la visión se produce en la presentación en el 90 por ciento de los casos, y el 40 por ciento de los pacientes tiene dolor concomitante en los ojos. También puede haber una historia concomitante o antecedente de ataques isquémicos transitorios o amaurosis fugaz. Los pacientes también tienen enfermedad sistémica significativa conocida o desconocida en el momento de la presentación. Las enfermedades sistémicas que se encuentran más comúnmente son la hipertensión, la diabetes, la enfermedad cardíaca isquémica, el accidente cerebro vascular, y la enfermedad vascular periférica. En menor medida, los pacientes manifiestan OIS como resultado de la arteritis de células gigantes (GCA).

Los hallazgos unilaterales se presentan en el 80 por ciento de los casos. Hallazgos comunes pueden incluir catarata unilateral avanzada, inflamación del segmento anterior, reacción asintomática de la cámara anterior, edema macular, venas retinianas dilatadas pero no tortuosas, hemorragias media-periféricas en forma de puntos y manchas, manchas algodonosas, exudados, y neovascularización del disco y de la retina. También puede haber pulsación arterial espontánea, presión intraocular elevada, y la neovascularización del iris y el ángulo con glaucoma neovascular (NVG). Mientras que el paciente puede presentar neovascularización del segmento anterior, la hipotonía ocular puede ocurrir debido a la baja perfusión arterial al cuerpo ciliar. Ocasionalmente, hay embolia retiniana visible (placas Hollenhorst).

Los hallazgos en el OIS son causados por la ulceración ateromatosa de la arteria carótida interna y la estenosis en la bifurcación de la arteria carótida común. El cinco por ciento de los pacientes con estenosis de la arteria interna desarrollan el OIS. Sin embargo, el OIS sólo se produce si el grado de estenosis supera el 90 por ciento.

La estenosis de la arteria carótida reduce la presión de perfusión en el ojo, lo que resulta en los fenómenos isquémicos antes mencionados. Una vez que la estenosis alcanza el 90 por ciento, la presión de perfusión en la arteria central de la retina (CRA) sólo desciende al 50 por ciento. A menudo, la presión arterial reducida se manifiesta como una pulsación espontánea del CRA. Los hallazgos son variables y pueden incluir cualquiera o todos los hallazgos anteriores.

Los pacientes con OIS tienen una enfermedad sistémica significativa que se debe evaluar. La muerte cardíaca es la causa principal de mortalidad en pacientes con OIS- la tasa de mortalidad a los cinco años es del 40 por ciento. Por esta razón, los pacientes con OIS deben remitirse a un cardiólogo para una serología completa, EKG, ECG y evaluación de la carótida.

En conclusión, los modos actuales de terapia para la prevención y/o tratamiento de las COPD, la degeneración macular y las enfermedades microvasculares son insatisfactorios y existe por lo tanto una necesidad, de desarrollar nuevos compuestos para este fin. Todas las enfermedades oculares y las indicaciones que se describen anteriormente en la presente, que implican la neovascularización coroidal también se pueden tratar con los nuevos compuestos de esta invención.

RTP801

El gen RTP801, se reportó primero por el cesionario de la presente solicitud. Las patentes de Estados Unidos núms. 6455674, 6555667, y 6740738, todas asignadas al cesionario de la presente solicitud, describen y reivindican *per se*

el polinucleótido y polipéptido RTP801, y los anticuerpos dirigidos hacia el polipéptido. RTP801 representa un único objetivo génico para el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) que puede regular la patogénesis inducida por hipoxia independiente de los factores de crecimiento tal como VEGF.

Las siguientes solicitudes de patente y publicaciones proporcionan aspectos de información de soporte.

- 5 El documento WO 2001070979 se refiere a marcadores de ácido nucleico que son sobreexpresados en células de cáncer ovárico.
- El documento US 6673549 divulga una combinación que comprende ADNc que se expresan diferencialmente en respuesta al tratamiento con esteroides.
- 10 La solicitud de Estados Unidos 2003165864 se refiere a los ADNc que se expresan diferencialmente en las células tratadas con un agente desmetilante del ADN.
- La solicitud de Estados Unidos 2003108871 se refiere a una composición que comprende varios ADNc que se expresan diferencialmente en cultivos de células de hígado C3A humano tratados, supuestamente útil para el tratamiento de trastornos hepáticos.
- 15 La solicitud de Estados Unidos 2002119463 describe una nueva composición, útil para el tratamiento y diagnóstico del cáncer de próstata, dicha composición comprende ADNc humanos que se expresan diferencialmente en el cáncer de próstata.
- El documento WO 2004018999 divulga un método para evaluar, caracterizar, monitorizar, prevenir y tratar el cáncer cervical.
- 20 El documento EP 1394274 se refiere a un método de prueba para el asma bronquial o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica mediante la comparación del nivel de expresión de un gen marcador en una muestra biológica de un sujeto con el nivel de expresión del gen en una muestra de un sujeto saludable.
- El documento WO 2002101075 se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada útil para detectar, caracterizar, prevenir y tratar los cánceres cervicales humanos.
- 25 El documento WO 2003010205 se refiere a inhibir la angiogénesis para tratar la curación de heridas, retinopatía, isquemia, inflamación, microvasculopatía, cura de huesos e inflamación de la piel.
- El documento WO 2002046465 se refiere a la identificación de un gen involucrado en la enfermedad para tratar las afecciones reguladas por la hipoxia. El documento WO2006/023544 se refiere a RTP801 y su inhibición, en el contexto del tratamiento de enfermedades relacionadas con la hipoxia, en particular a la angiogénesis asociada a tumores.
- 30 El documento WO 2002031111 se refiere a supuestamente nuevos polipéptidos y sus proteínas codificantes, y se proporcionan muchos usos de estos.
- El documento WO 2001012659 se refiere a ácidos nucleicos útiles en metodologías de ADN recombinante.
- El documento WO 2001077289 describe seiscientos veintitrés polinucleótidos derivados de una variedad de fuentes de tejido humano.
- 35 El documento WO 2003101283 se refiere a una combinación que comprende muchos ADNc y proteínas que supuestamente se expresan diferencialmente en los trastornos respiratorios.
- El documento JP 2003259877 se refiere a muchos marcadores de la enfermedad de fibrosis hepática.
- 40 Tzipora Shoshani, y otros. Identification of a Novel Hypoxia-Inducible Factor 1-sensible Gene, RTP801, Involved in Apoptosis. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, abr. 2002, p. 2283-2293; este documento, que es de la co-autoría del inventor de la presente invención, detalla el descubrimiento del gen RTP801 (un nuevo gen dependiente de HIF-1).
- Anat Brafman, y otros. Inhibition of Oxygen-Induced Retinopathy in RTP801-Deficient Mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004 oct; 45 (10): 3796-805; también de la co-autoría del inventor de la presente invención, este documento demuestra que en ratones knock out RTP801, la hiperoxia no causa degeneración de la red capilar de la retina.
- 45 Leif W. Ellisen, y otros REDD1, a Developmentally Regulated Transcriptional Target of p63 and p53, Links p63 to Regulation of Reactive Oxygen Species. Molecular Cell, Vol. 10, 995-1005, noviembre, 2002;este documento

demuestra que la sobreexpresión de RTP801 (referida en la misma como REDD1) conduce a un aumento de la producción de especies de oxígeno reactivas.

5 Richard DR, Berra E, y Pouyssegur J. Non-hypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha in vascular smooth muscle cells. J Biol. Chem. 2000, sep1; 275(35): 26765-71 este documento demuestra que la transcripción dependiente de HIF-1 puede ser inducida por la producción excesiva de especies de oxígeno reactivas.

Rangasami T, y otros, Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Presentado en el Diario de Investigación Clínica. Este trabajo se refiere a ratones con una defensa antioxidante comprometida (debido a la inactivación de la línea germinal de RTP801, en la misma denominado Nrf2).

10 Witmer y otros; Progress in retinal and eye research, vol.22, n°1, pp.1-19, divulga la implicación de VEGF y la angiogénesis en enfermedades oculares, y el uso de anti-VEGF en terapia.

Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona composiciones para tratar enfermedades oculares que implican neovascularización coroidea. Específicamente, esta invención está dirigida a un inhibidor de RTP801 para uso en combinación con un inhibidor de VEGF o inhibidor del receptor de VEGF en terapia para tratar a un paciente que padece una enfermedad ocular que implica neovascularización coroidal, en la que el paciente sufre glaucoma, degeneración macular, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), AMD húmeda, una enfermedad ocular secundaria a diabetes, retinopatía diabética o edema macular diabético (DME).

El inhibidor de RTP801 es una molécula de ARNip

20 Otra realización de la presente invención concierne un método para tratar un paciente que padece de degeneración macular, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801, que es una molécula ARNip, en combinación con un inhibidor de VEGF o inhibidor del receptor 1 de VEGF.

25 Otro aspecto de la presente divulgación concierne un método para tratar un paciente que padece de un trastorno microvascular, que comprende que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801.

Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 para la preparación de un medicamento para promover la recuperación en un paciente que padece de un trastorno respiratorio. En una realización, el trastorno respiratorio es COPD y el inhibidor es un ARNip.

30 Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona proporciona el uso de una dosis terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 para la preparación de un medicamento para promover la recuperación en un paciente que padece de degeneración macular, en combinación con un inhibidor de VEGF o inhibidor del receptor de VEGF. En una realización, la degeneración macular es AMD. El inhibidor es un ARNip.

35 Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 para la preparación de un medicamento para promover la recuperación en un paciente que padece de un trastorno microvascular. En una realización, el trastorno microvascular es la retinopatía diabética y el inhibidor es un ARNip.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención, en algunas de sus realizaciones, concierne la inhibición del gen RTP801 o polipéptido para el tratamiento de las enfermedades oculares. Como se describe en la presente descripción los inhibidores preferidos a usarse con la presente invención son moléculas biológicas.

45 Sin estar atados a una teoría, los inventores de la presente invención encontraron que RTP801 está involucrado en varios estados de enfermedad que incluyen trastornos microvasculares, enfermedades oculares, trastornos respiratorios, y lesión y enfermedad de la médula espinal, y sería beneficioso inhibir RTP801 para tratar cualquiera de dichas enfermedades o trastornos. Los métodos, moléculas y composiciones que inhiben RTP801 se discuten en la presente descripción con detalle, y cualquiera de dichas moléculas y/o composiciones pueden emplearse beneficiosamente en el tratamiento de un paciente que padece de cualquiera de dichas afecciones.

50 La presente invención provee composiciones para inhibir la expresión del gen RTP801 *in vivo*. En general, la composición incluye oligoribonucleótidos a saber los ARN interferentes pequeños (es decir, ARNip) que se dirigen a un ARNm particular e hibridan para este, o material de ácido nucleico que puede producir ARNip en una célula, en una cantidad suficiente para regular descendientemente la expresión de un gen objetivo por un mecanismo de

interferencia del ARN. En particular, la composición sujeto puede usarse para inhibir la expresión del gen RTP801 para el tratamiento de enfermedades oculares.

5 Así, en un aspecto la presente descripción divulga un método para tratar un paciente que padece de un trastorno microvascular, una enfermedad ocular o un trastorno respiratorio, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de RTP801 en una cantidad terapéuticamente efectiva para de ese modo tratar al paciente. La descripción divulga además un método para tratar un paciente que padece de un trastorno microvascular, una enfermedad ocular o trastorno respiratorio, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de RTP801, en una dosificación y durante un período de tiempo suficiente para promover la recuperación. La enfermedad ocular puede ser degeneración macular tal como degeneración macular relacionada con la edad (AMD), *entre otros*. El trastorno microvascular puede ser retinopatía diabética o Insuficiencia renal aguda, *entre otros*. El trastorno respiratorio puede ser enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfisema, bronquitis crónica, asma y cáncer de pulmón, *entre otros*. El inhibidor de RTP801 se selecciona de los compuestos de ARNip que se dirigen al ARNm del gen RTP801 (tal como los ARNsi de las Tablas A-C y, en particular, los ARNip Nos: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 y 50 de Tabla A), o vectores de expresión que los comprenden. Los inhibidores específicos de RTP801 se dan a continuación.

20 La presente descripción describe además un método para tratar un paciente que padece de degeneración macular, COPD o retinopatía diabética, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 que comprende un polinucleótido que que hibrida específicamente para el ARNm transcrito del gen RTP801 y / o regula descendentemente la expresión del gen RTP801 para de ese modo tratar al paciente. El polinucleótido es un ARNip que comprende nucleótidos consecutivos que tienen una secuencia idéntica a una cualquiera de las secuencias que se exponen en las Tablas A-C (sec. con SEQ ID NOS:3-344) y particularmente, ARNip núms: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 y 50 de la Tabla A.

25 Más aún, un aspecto adicional de la presente descripción concierne un método para tratar un paciente que padece de un trastorno microvascular, un trastorno respiratorio o una enfermedad ocular, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 que comprende una molécula ARNip, opcionalmente una molécula ARNip detallada en cualquiera de las Tablas A-C, en una dosificación y durante un período de tiempo para de ese modo tratar al paciente.

30 Se divulga un método adicional para tratar a un paciente que padece un trastorno microvascular, un trastorno respiratorio o una enfermedad ocular, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva de una molécula de ARN que se dirige al ARNm del gen RTP801 en una dosificación y durante un período de tiempo para tratar así al paciente. La molécula de ARN es una molécula de ARNip, tal como una molécula de ARNip detallada en las Tablas A-C y, en particular, ARNip Nos: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 y 50 de la Tabla A.

35 La presente descripción describe además un método para tratar un paciente que padece de un trastorno respiratorio, un trastorno microvascular o una enfermedad ocular o cualquiera de las afecciones descritas en la presente descripción, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva de una molécula ARNip que dirige el gen RTP801 del ARNm, opcionalmente una molécula ARNip detallada en las Tablas A-C, en una dosificación y durante un período de tiempo para de ese modo tratar al paciente. Más aun, la enfermedad ocular puede ser degeneración macular tal como degeneración macular relacionada con la edad (AMD); el trastorno microvascular puede ser retinopatía diabética o Insuficiencia renal aguda; el trastorno respiratorio puede ser COPD y los aspectos de COPD a ser tratados pueden comprender, pero sin limitarse a, enfisema, bronquitis crónica, o ambos.

45 "Tratar una enfermedad" se refiere a administrar una sustancia terapéutica efectiva para mejorar los síntomas asociados con una enfermedad, para disminuir la severidad o curar la enfermedad, o para prevenir que ocurra la enfermedad.

50 Una "dosis terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto o composición farmacéutica que es efectiva para alcanzar una mejora en un paciente o su sistema fisiológico que incluyen, pero sin limitarse a, mejora de la tasa de supervivencia, recuperación más rápida, o mejora o eliminación de los síntomas, y otros indicadores seleccionados como medidas de determinación adecuadas por aquellos con experiencia en la materia.

55 Las composiciones para uso en los métodos para tratar las enfermedades divulgadas en la presente descripción e incluidas en la presente invención pueden incluir administrar un inhibidor de RTP801 en conjunto con un inhibidor de RTP801 adicional, una sustancia que mejora las propiedades farmacológicas del ingrediente activo como se detalla más abajo, o un compuesto adicional conocido por ser efectivo en el tratamiento de la enfermedad a tratar, tales como degeneración macular, COPD, ARF, DR, *entre otros*. Por "en conjunto con" se entiende antes de, simultáneamente o posteriormente a. Otros detalles de las terapias conjuntas ilustrativas se dan más abajo.

En otro aspecto, la presente descripción divulga el uso de una dosis terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 para la preparación de un medicamento para promover la recuperación en un paciente que padece de degeneración macular, COPD, ARF, DR, o cualquier otra enfermedad ocular, afección microvascular o respiratoria como se detalla anteriormente, y el uso de una dosis terapéuticamente efectiva de un inhibidor de RTP801 para la preparación de un medicamento para tratar dichas enfermedades y afecciones. En este aspecto, el inhibidor de RTP801 puede comprender un polinucleótido que comprende nucleótidos consecutivos que tienen una secuencia que comprende una secuencia antisentido para la secuencia que se expone en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). El inhibidor de RTP801 puede ser un vector de expresión que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia que es una secuencia antisentido para la secuencia que se expone en la Figura 1 (SEQ ID NO:1). El inhibidor de RTP801 es una molécula de ARN que se dirige al ARNm del gen RTP801, a saber un ARNpi, opcionalmente un ARNip que comprende nucleótidos consecutivos que tienen una secuencia idéntica a una cualquiera de las secuencias expuestas en las Tablas A-C (SEQ ID NOs: 3-344) y en particular, ARNip Nos: 14, 22, 23, 25, 27 ;, 39, 41, 42, 49 y 50 de la Tabla A, o una ribozima.

Así, de acuerdo con la información descrita en la presente descripción, el inhibidor de RTP801 a usarse con cualquiera de los métodos descritos en la presente, en cualquiera de los usos descritos en la presente y en cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, pueden seleccionarse del grupo que consiste en una molécula ARNip, un vector que comprende una molécula ARNip, un vector que puede expresar una molécula ARNip y cualquier molécula que se procese endógenamente en una molécula ARNip. Como se detalla en la presente, dicha molécula ARNip es preferentemente un ARNip que comprende nucleótidos consecutivos con una secuencia idéntica a una cualquiera de las secuencias que se exponen en las Tablas A-C y en particular, los ARNip núms:14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 y 50 de la Tabla A.

"Trastorno microvascular" se refiere a cualquier afección que afecte los capilares microscópicos y linfáticos, particularmente las enfermedades vasoespásticas, enfermedades vasculíticas y enfermedades oclusivas linfáticas. Los ejemplos de trastornos microvasculares incluyen, entre otros: enfermedades oculares tales como Amaurosis Fugax (embólicas o secundarias a SLE), síndrome apla, deficiencia de Prot CS y ATIII, patologías microvasculares causadas por el uso del fármaco IV, disproteinemia, arteritis temporal, neuropatía óptica isquémica anterior, neuritis óptica (primaria o secundaria a enfermedades autoinmunes), glaucoma, síndrome de von hippel lindau, trastornos de la córnea, rechazo al trasplante de córnea, cataratas, enfermedad de Eales, angiitis en rama escarchada, operación de cerclaje, uveitis que incluye pars planitis, melanoma corioideo, hemangioma corioideo, aplasia del nervio óptico; afecciones de la retina tales como oclusión de la arteria de la retina, oclusión de la vena de la retina, retinopatía del prematuro, retinopatía por HIV, retinopatía de Purtscher, retinopatía de vasculitis sistémica y enfermedades autoinmunes, retinopatía diabética, retinopatía hipertensiva, retinopatía por radiación, oclusión de la vena o arteria retinal ramal, vasculitis retinal idiopática, aneurismas, neuroretinitis, embolización retinal, necrosis retinal aguda, retinocoroidopatía de Birdshot, desprendimiento de la retina de larga duración; afecciones sistémicas tales como Diabetes mellitus, retinopatía diabética (DR), patologías microvasculares relacionadas con la diabetes (como se detalla en la presente), síndromes de hiperviscosidad, síndromes del arco aórtico y síndromes isquémicos oculares, fístula carótido-cavernosa, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, arteriolitis con autoanticuerpo SS-A, vasculitis hemorrágica multifocal aguda, vasculitis resulante de la infección, vasculitis resultante de la enfermedad de Behçet, sarcoidosis, coagulopatías, neuropatías, nefropatías, enfermedades microvasculares del riñón, y afecciones microvasculares isquémicas, entre otras

Los trastornos microvasculares pueden comprender un elemento neovascular. El término "trastorno neovascular" se refiere a aquellas afecciones donde la formación de los vasos sanguíneos (neovascularización) es nociva para el paciente. Los ejemplos de neovascularización ocular incluyen: enfermedades de la retina (retinopatía diabética, edema macular diabético, glaucoma crónico, desprendimiento de la retina, y retinopatía de células falciformes); rubeosis iridis; vitreo-retinopatía proliferativa; enfermedades inflamatorias; uveitis crónica; neoplasmos (retinoblastoma, pseudoglioma y melanoma); iridociclitis heterocrómica de Fuchs; glaucoma neovascular; neovascularización de la cornea (hipoplasia inflamatoria, de trasplante y de desarrollo del iris); neovascularización después de una vitrectomía y lensectomía combinada; enfermedades vasculares (isquemia de la retina, insuficiencia corioideo vascular, trombosis corioidea y isquemia de la arteria carótida); neovascularización del nervio óptico; y neovascularización debido a la penetración del ojo o lesión ocular contundente. Todas estas afecciones neovasculares pueden tratarse usando los compuestos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

"Enfermedad ocular" se refiere a las afecciones, enfermedades o síndromes de los ojos que incluyen pero sin limitarse a cualquier afección que involucre la neovascularización corioidea (CNV), AMD húmeda y seca, síndrome de histoplasmosis ocular, estrías angioides, rupturas en la membrana de Bruch, degeneración miope, tumores oculares, enfermedades degenerativas de la retina y oclusión de la vena de la retina (RVO). Algunas afecciones descritas en la presente, tal como DR, que pueden tratarse de acuerdo con los métodos de la presente invención se han considerado como un trastorno microvascular y una enfermedad ocular, o ambos, bajo las definiciones presentadas en la presente.

"Gen RTP801" se refiere al marco de lectura abierto de la secuencia que codifica RTP801, como se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO:1), o cualquier secuencia homóloga de esta preferentemente con al menos 70% de identidad, mas preferentemente 80% de identidad, aún con mayor preferencia 90% o 95% de identidad. Esto abarca cualquier

5 secuencia derivada de la SEQ ID NO:1 la que se sometió a mutaciones, alteraciones o modificaciones como se describe en la presente. Así, en una realización preferida el RTP801 es codificado por una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Está además dentro de la presente invención que los ácido nucleicos de acuerdo con la presente invención son sólo complementarios e idénticos, respectivamente, a una parte del ácido nucleico que codifica para RTP801 cuando, preferentemente, el primer tramo y la primera hebra es típicamente más corta que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Debe conocerse además que basado en la secuencia de aminoácido de RTP801 cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácido puede ser percibida por una persona con experiencia en la técnica basado en el código genético. Sin embargo, debido al modo de acción asumido de los ácido nucleicos de acuerdo con la presente invención, es más preferido que el ácido nucleico que codifica para RTP801, preferentemente el ARNm de este, es uno presente en el organismo, tejido y/o célula, respectivamente, donde la expresión de RTP801 se va a reducir.

10 "Polipéptido RTP801" se refiere al polipéptido del gen RTP801, y se entiende que incluye, para los propósitos de la presente invención, los términos "RTP779", "REDD1", "Ddit4", "FLJ20500", "Dig2", y "PRF1", derivados de cualquier organismo, opcionalmente el hombre, variantes y fragmentos de empalme de estos que mantienen una actividad biológica, y homólogos de estos, preferentemente con al menos 70%, con mayor preferencia al menos 80%, aún con mayor preferencia al menos 90% o 95% de homología a estos. Adicionalmente, se entiende que este término abarca los polipéptidos resultantes de alteraciones menores en la secuencia codificante de RTP801, tales como, *entre otros*, mutaciones puntuales, sustituciones, deleciones e inserciones que pueden causar una diferencia en unos pocos aminoácidos entre el polipéptido resultante y el RTP801 de de origen natural. Los polipéptidos codificados por las secuencias de ácido nucleico que se unen a la secuencia codificante o secuencia genómica de RTP801 bajo condiciones de hibridación muy rigurosas, que se conocen bien en la materia (por ejemplo, Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988), actualizado en 1995 y 1998), son abarcadas también por este término. El RTP801 químicamente modificado o los fragmentos de RTP801 químicamente modificados se incluyen además en el término, siempre que la actividad biológica se mantenga. El RTP801 tiene o comprende preferentemente una secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 2. Se conoce que pueden haber diferencias en la secuencia de aminoácidos entre varios tejidos de un organismo y entre diferentes organismos de una especie o entre diferentes especies a las cuales el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede aplicarse en varias realizaciones de la presente invención. Sin embargo, basado en la enseñanza técnica proporcionada en la presente, la secuencia respectiva puede tomarse en consideración correspondientemente cuando se diseña cualquiera de los ácido nucleicos de acuerdo con la presente invención. Los fragmentos particulares de RTP801 incluyen los aminoácidos 1-50, 51-100, 101-150, 151-200 y 201-232 de la secuencia mostrada en la Figura 2. Otros fragmentos particulares de RTP801 incluyen los aminoácidos 25-74, 75-124, 125-174, 175-224 y 225-232 de la secuencia mostrada en la Figura 2.

35 RTP801 como se usa en la presente es una proteína descrita, entre otros, en WO 99/09046. RTP801 la cual se refiere además como RTP801, ha sido descrita como un objetivo transcriptional de HIF-1 α por Shoshani T y otros (Shoshani y otros, 2002, Mol Cell Biol, 22, 2283-93). Además, el estudio de Ellisen y otros (Ellisen y otros, Mol Cell, 10, 995-1005) identificó a RTP801 como un gen de respuesta al daño del ADN dependiente de p53 y como un gen dependiente de p63 involucrado en la diferenciación epitelial. Además, el RTP801 imita el patrón específico de tejido del miembro p63 de la familia p53, es efectivo similar a o adicionalmente a TP 63, es un inhibidor para la diferenciación *in vitro*, y está involucrado en la regulación de especies de oxígeno reactivas. Además de eso, RTP801 es sensible al factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) del factor de transcripción sensible a la hipoxia y típicamente se regula ascendientemente durante la hipoxia *in vitro* e *in vivo* en un modelo animal de accidente cerebro vascular isquémico. El RTP801 parece funcionar en la regulación de especies de oxígeno reactivas (ROS) y los niveles de ROS y la sensibilidad reducida al estrés oxidativo aumentan después de la expresión ectópica de RTP801 (Ellisen y otros 2002, supra; Shoshani y otros 2002, supra). Preferentemente, RTP801 es una proteína RTP801 biológicamente activa que exhibe preferentemente al menos una de esas características, preferiblemente dos o más y con la máxima preferencia todas y cada una de esas características.

50 Un gen relacionado con RTP801 es RT801L, referido además como "REDD2", fue descubierto por los inventores de la presente invención. El RTP801L es homólogo a RTP801, y reacciona de manera similar al estrés oxidativo; y así, RTP801L posee probablemente algunas funciones similares a RTP801.

55 Sin estar atados a una teoría, RTP801 es una proteína inducible por estrés (que responde a la hipoxia, estrés oxidativo, estrés térmico, estrés ER) es un factor que actúa en sintonía con la respuesta de la célula al desbalance de energía. Como tal, es *un objetivo* adecuado para el tratamiento de cualquier enfermedad donde las células deben rescatarse de la apoptosis debido a las condiciones estresantes (por ejemplo, enfermedades acompañadas por la muerte de células normales) o donde las células, que se adaptan a las condiciones estresantes debido a los cambios en la expresión de RTP801 (por ejemplo, células de cáncer), deben eliminarse. En el último caso, RTP801 puede ser observado como un factor de supervivencia para las células de cáncer y sus inhibidores pueden tratar el cáncer como una monoterapia o como fármacos sensibles en combinación con quimioterapia o radioterapia.

60 El término "polinucleótido" se refiere a cualquier molécula compuesta por nucleótidos de ADN, nucleótidos de ARN o una combinación de los dos tipos, es decir, que comprende dos o más bases guanidina, citosina, timidina, adenina, uracilo o inosina, *entre otros*. Un polinucleótido puede incluir nucleótidos naturales, nucleótidos químicamente

modificados y nucleótidos sintéticos, o análogos químicos de estos. El término incluye los "oligonucleótidos" y abarca los "ácidos nucleicos".

El término "aminoácido" se refiere a una molécula que consiste en uno cualquiera de los 20 aminoácidos de de origen natural, aminoácidos que han sido químicamente modificados (véase más abajo), o aminoácidos sintéticos.

- 5 El término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta por dos o más residuos de aminoácidos. El término incluye péptidos, polipéptidos, proteínas y peptidomiméticos.

Un "peptidomimético" es un compuesto que contiene elementos estructurales no peptídicos que es capaz de imitar las acciones biológicas de un péptido parental natural. Algunas características del péptido clásico tales como enlaces peptídicos enzimáticamente escindible no están presentes normalmente en un peptidomimético.

- 10 Por el término "péptido negativo dominante" se entiende un polipéptido codificado por un fragmento de ADNc que codifica para una parte de una proteína (véase Herskowitz I.: Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature*. 1987 sep 17-23;329(6136):219-22. Review; Roninson IB y otros, Genetic suppressor elements: new tools for molecular oncology--thirteenth Cornelius P. Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res*. 1995 sep 15;55(18):4023). Este péptido puede tener una función diferente de la proteína de la que se deriva. Este puede interactuar con la proteína completa e inhibe su actividad o puede interactuar con otras proteínas e inhibir su actividad en respuesta a la proteína de longitud completa (parental). Dominante negativo significa que el péptido es capaz de superar la proteína natural parental e inhibir su actividad para dar a la célula una característica diferente, tal como resistencia o sensibilización a la muerte o cualquier fenotipo celular de interés. Por intervención terapéutica el péptido en sí mismo puede suministrarse como el ingrediente activo de una composición farmacéutica, o el ADNc se puede suministrar a la célula utilizando métodos conocidos.

Preparación de péptidos y polipéptidos

Los polipéptidos se pueden producir mediante varios métodos, por ejemplo:

1) Sintéticamente:

- 25 Los polipéptidos sintéticos se pueden preparar por medio del uso de una máquina comercialmente disponible, por medio del uso de la secuencia conocida de RTP801 o una porción de la misma.

2) Métodos recombinantes:

- 30 Un método preferido de fabricación de los polipéptidos RTP801 de fragmentos de los mismos es clonar un polinucleótido que comprende el ADNc del gen de RTP801 en un vector de expresión y cultivar la célula que alberga el vector de manera que exprese el polipéptido codificado, y después purificar el polipéptido resultante, todo lo cual se lleva a cabo usando métodos conocidos en la materia como se describe en, por ejemplo, Marshak y otros, "Strategies for Protein Purification and Characterization. A laboratory course manual." CSHL Press (1996). Además, ver *Bibl Haematol*. 1965;23:1165-74 *Appl Microbiol*. 1967 jul;15(4):851-6; *Can J Biochem*. 1968 may; 46(5): 441-4; *Biochemistry*. 1968 jul; 7(7):2574-80; *Arch Biochem Biophys*. 1968 sep 10;126(3): 746-72; *Biochem Biophys Res Commun*. 1970 feb 20; 38(4): 825-30).

- 35 El vector de expresión puede incluir un promotor para controlar la transcripción del material heterólogo y puede ser un promotor constitutivo o inducible para permitir la transcripción selectiva. Se pueden incluir opcionalmente potenciadores que pueden requerirse para obtener los niveles de transcripción necesarios. El vehículo de expresión también puede incluir un gen de selección.

- 40 Los vectores se pueden introducir en células o tejidos por cualquiera de una variedad de métodos que se conocen dentro de la materia. Tales métodos se pueden encontrar generalmente descritos en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Baltimore, Maryland (1989), Vega y otros, *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor, MI (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston MA (1988) y Gilboa y otros. (1986).

45 3) Purificación a partir de fuentes naturales:

El polipéptido RTP801, o fragmentos de este de origen natural, se pueden purificar a partir de fuentes naturales (tales como tejidos) por medio del uso de muchos métodos conocidos por alguien con experiencia ordinaria en la materia, tales como por ejemplo: inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-RTP801, o cromatografía de afinidad con cualquier molécula que se conoce se une a RTP801 unida a una matriz.

- 50 La purificación de proteínas se practica como se conoce en la materia como se describe en, por ejemplo, Marshak y otros, "Strategies for Protein Purification and Characterization. A laboratory course manual." CSHL Press (1996).

Por "efecto biológico de RTP801" o "actividad biológica de RTP801" se entiende el efecto de RTP801 en los trastornos de las vías respiratorias, que puede ser directo o indirecto, e incluye, sin limitarse por la teoría, el efecto de RTP801 sobre la apoptosis de las células alveolares que se induce por condiciones de hipoxia o hiperoxia. El efecto indirecto incluye, pero no se limita a, RTP801 que se une a o tiene un efecto sobre una de varias moléculas, las cuales se involucran en una cascada de transducción de la señal que resulta en la apoptosis.

"Apoptosis" se refiere a un tipo fisiológico de muerte celular que resulta de la activación de algunos mecanismos celulares, es decir, la muerte es controlada por la maquinaria de la célula. La apoptosis puede ser, por ejemplo, el resultado de la activación de la maquinaria de la célula por un desencadenante externo, por ejemplo, una citoquina o un anticuerpo anti-FAS, lo que conduce a la muerte celular o por una señal interna. El término "muerte celular programada" también se puede usar de manera intercambiable con "apoptosis".

"Enfermedad relacionada con la apoptosis" se refiere a una enfermedad cuya etiología está relacionada, ya sea total o parcialmente con el proceso de la apoptosis. La enfermedad puede causarse por un mal funcionamiento del proceso de apoptosis (tal como en el cáncer o una enfermedad autoinmune) o por la sobreactividad del proceso de apoptosis (tal como en ciertas enfermedades neurodegenerativas). Muchas enfermedades que implican el RTP801 son enfermedades relacionadas con la apoptosis. Por ejemplo, la apoptosis es un mecanismo importante en la AMD seca, en la cual tiene lugar la atrofia lenta de las células fotorreceptoras y del epitelio de pigmento, principalmente en la región central de la retina (macular). La apoptosis neuroretiniana es también un mecanismo importante en la retinopatía diabética.

Un "inhibidor" es un compuesto que es capaz de inhibir la actividad de un gen o del producto de dicho gen en un grado suficiente para conseguir un efecto biológico o fisiológico deseado. Un "inhibidor de RTP801" es un compuesto que es capaz de inhibir la actividad del gen RTP801 o del producto génico RTP801, particularmente del gen RTP801 o del producto génico humano. Tales inhibidores incluyen sustancias que afectan la transcripción o traducción del gen, así como sustancias que afectan la actividad del producto génico. Un inhibidor de RTP801 también puede ser un inhibidor del promotor RTP801. Los ejemplos de tales inhibidores pueden incluir, *entre otros*: polinucleótidos tales como fragmentos AS, ARNip o vectores que los contienen; polipéptidos tales como los negativos dominantes, anticuerpos y enzimas; ARN catalíticos, tales como ribozimas, y moléculas químicas con un bajo peso molecular por ejemplo un peso molecular inferior a 2000 daltons. Los inhibidores específicos de RTP801 se dan más abajo.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que tiene la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogos en una célula ajena. Muchos vectores de expresión en procariontes y eucariotes se conocen y/o están comercialmente disponibles. La selección de vectores de expresión apropiados está dentro del conocimiento de los que tienen experiencia en la materia.

Los términos "compuesto químico", "molécula pequeña", "molécula química", "molécula química pequeña" y "compuesto químico pequeño" se usan indistintamente en la presente y se entiende que se refieren a porciones químicas de cualquier tipo particular que pueden producirse sintéticamente u obtenerse a partir de fuentes naturales y usualmente tienen un peso molecular de menos de 2000 daltons, menos de 1000 daltons o incluso menos de 600 daltons.

La presente descripción también se refiere a ácidos nucleicos funcionales que comprenden una estructura de hebra doble, su uso para la fabricación de un medicamento, una composición farmacéutica que comprende tales ácidos nucleicos funcionales y un método para el tratamiento de un paciente.

La hipoxia se reconoce como un elemento clave en el mecanismo patogénico de un buen número de enfermedades tales como el accidente cerebro vascular, el enfisema y el infarto las cuales se asocian con disponibilidad de oxígeno sub-óptima y respuestas a las condiciones de hipoxia que dañan los tejidos. En los tejidos de crecimiento rápido, que incluyen el tumor, una disponibilidad de oxígeno sub-óptima se compensa por una neo-angiogénesis indeseada. Por lo tanto, al menos en caso de enfermedades de cáncer, el crecimiento de la vasculatura no es deseado.

En vista de esto, la inhibición de la angiogénesis y el crecimiento vascular, respectivamente, se somete a intensa investigación. Ya hoy algunos compuestos están disponibles los cuales inhiben la angiogénesis y el crecimiento vascular indeseados. Algunos de los compuestos más destacados son los que inhiben el VEGF y el receptor del VEGF. En ambos casos, el efecto de VEGF se evita por el bloqueo del VEGF como tal, por ejemplo, usando un anticuerpo dirigido contra el VEGF tal como el buscado por Genentech's AVASTIN (AB monoclonal específico para VEGF) (Ferrara N.; Endocr Rev. 2004 ago;25(4):581-611), o bloqueando el receptor correspondiente, es decir, el receptor VEGF (Traxler P; Cancer Res. 2004 jul 15;64(14):4931-41; o Stadler WM y otros, Clin Cancer Res. 2004 may 15;10(10):3365-70).

Sin embargo, como la angiogénesis y el crecimiento de la vasculatura es un proceso muy básico y vital en cualquier animal y ser humano, el efecto de este tipo de compuesto tiene que enfocarse al sitio particular donde la angiogénesis y el crecimiento vascular no se desea realmente lo que hace adecuado dirigir o suministrar un asunto crítico en relación con este tipo de aproximación terapéutica.

Es así un objetivo de la presente invención proporcionar otros medios para el tratamiento de enfermedades que involucran el crecimiento indeseado de la vasculatura y la angiogénesis, respectivamente.

Por "ARN interferente pequeño" (ARNip) se entiende una molécula de ARN que disminuye o silencia (previene) la expresión de un gen/ ARNm de su contraparte celular endógena. El término se entiende que abarca el "ARN de interferencia" (ARNi). El ARN de interferencia (ARNi) se refiere al proceso de silenciamiento génico post transcripcional específico de secuencia en mamíferos mediado por los ARN interferentes pequeños (ARNip) (Fire y otros, 1998, *Nature* 391, 806). El proceso correspondiente en plantas se refiere comúnmente como silenciamiento génico post transcripcional específico o silenciamiento de ARN y se refiere además como extinción en hongos. La respuesta del ARN de interferencia puede caracterizar un complejo de endonucleasa que contiene un ARNip, comúnmente referido como un complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que media la escisión del ARN de cadena sencilla que tiene la secuencia complementaria a la cadena antisentido del ARNip bicatenario. La escisión del ARN objetivo puede tener lugar en el medio de la región complementaria a la cadena antisentido del ARNip bicatenario. (Elbashir y otros 2001, *Genes Dev.*, 15, 188). Para información reciente de estos términos y mecanismos propuestos, ver Bernstein E., Denli AM., Hannon GJ: The rest is silence. *RNA*. 2001 nov;7(11):1509-21; y Nishikura K.: A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell*. 2001 nov 16;107(4):415-8. Los ejemplos de moléculas de ARNip que se pueden usar en la presente invención se dan en las Tablas A-C.

Durante los años recientes, el ARNi emergió como uno de los métodos más eficientes para la inactivación de genes (*Nature Reviews*, 2002, v.3, p.737-47; *Nature*, 2002, v.418, p.244-51). Como un método, se basa en la capacidad de las especies de ARNbc de entrar a un complejo de proteína específico, donde este se dirige después al ARN celular complementario y lo degrada específicamente. Con más detalle, los ARNbc se digieren en ARN inhibidores (ARNip) cortos (17-29 bp) por las ARNsas de tipo III (DICER, Drosha, etc) (*Nature*, 2001, v.409, p.363-6; *Nature*, 2003, 425, p.415-9). Estos fragmentos y ARNm complementario son reconocidos por el complejo de proteína RISC específico. El proceso completo culmina por la escisión de la endonucleasa del ARNm objetivo (*Nature Reviews*, 2002, v.3, p.737-47; *Curr Opin Mol Ther.* 2003 jun; 5(3):217-24).

Para la descripción de cómo diseñar y preparar ARNip para genes conocidos ver, por ejemplo, Chalk AM, Wahlestedt C, Sonhammer EL. Improved and automated prediction of effective siRNA *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004 jun 18;319(1):264-74; Sioud M, Leirdal M., Potential design rules and enzymatic synthesis of siRNAs, *Methods Mol Biol.* 2004;252:457-69; Levenkova N, Gu Q, Rux JJ.: Gene specific ARNip selector *Bioinformatics.* 2004 feb 12;20(3):430-2. y Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K., Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference *Nucleic Acids Res.* 2004 feb 9;32(3):936-48. Ver además Liu Y, Braasch DA, Nulf CJ, Corey DR. Efficient and isoform-selective inhibition of cellular gene expression by peptide nucleic acids *Biochemistry*, 2004 feb 24;43(7):1921-7. Ver además las publicaciones PCT WO 2004/015107 (Atugen) y WO 02/44321 (Tuschl y otros), y además Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis, *RNA* 2003 sep;9(9):1034-48 y las patentes de Estados Unidos núms.5898031 y 6107094 (Crooke) para la producción de ARNip modificados/ más estables.

Se han desarrollado vectores basados en el ADN capaces de generar un ARNip dentro de las células. El método generalmente involucra la transcripción de ARN de horquilla corta que son eficientemente procesados para formar el ARNip dentro de las células. Paddison y otros *PNAS* 2002, 99:1443-1448; Paddison y otros *Genes & Dev* 2002, 16:948-958; Sui y otros *PNAS* 2002, 8:5515-5520; y Brummelkamp y otros *Science* 2002, 296:550-553. Estos reportes describen métodos para generar los ARNip capaces de dirigir específicamente numerosos genes expresados endógenamente y exógenamente.

Para suministrar ARNip, ver, por ejemplo, Shen y otros (*FEBS letters* 539: 111-114 (2003)), Xia y otros, *Nature Biotechnology* 20: 1006-1010 (2002), Reich y otros, *Molecular Vision* 9: 210-216 (2003), Sorensen y otros (*J.Mol.Biol.* 327: 761-766 (2003), Lewis y otros, *Nature Genetics* 32: 107-108 (2002) y Simeoni y otros, *Nucleic Acids Research* 31, 11: 2717-2724 (2003). Recientemente el ARNip se usó exitosamente para la inhibición en primates; para más detalles ver Tolentino y otros, *Retina* 24(1) febrero 2004 pp 132-138.

ARNip de la presente invención

Especificaciones generales de los ARNip de la presente invención

Generalmente, los ARNip que se usan en la presente invención comprenden un ácido ribonucleico que comprende una estructura de hebra doble, donde la estructura de hebra doble comprende una primera hebra y una segunda hebra, donde la primera hebra comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos y en el que dicho primer tramo es al menos parcialmente complementario a un ácido nucleico objetivo, y la segunda hebra comprende un segundo tramo de nucleótidos contiguos y donde dicho segundo tramo es al menos parcialmente idéntico a un ácido nucleico objetivo, por lo cual dicha primera hebra y / o dicha segunda hebra comprenden una pluralidad de grupos de nucleótidos modificados que tienen una modificación en la posición 2' por lo cual dentro de la hebra cada grupo de nucleótidos modificados está flanqueado en uno o ambos lados por un grupo de nucleótidos flanqueadores en el cual los nucleótidos flanqueadores que forman el grupo de nucleótidos flanqueadores es o bien un nucleótidos sin

modificar o un nucleótido que tiene una modificación distinta de la modificación de los nucleótidos modificados. Además, dicha primera hebra y/o dicha segunda hebra puede comprender dicha pluralidad de nucleótidos modificados y puede comprender dicha pluralidad de grupos de nucleótidos modificados.

5 El grupo de nucleótidos modificados y/o el grupo de nucleótidos flanqueadores puede comprender un número de nucleótidos donde el número se selecciona del grupo que comprende un nucleótido a 10 nucleótidos. En relación con cualquier intervalo especificado en la presente se entiende que cada intervalo describe cualquier número entero individual entre las cifras respectivas que se usan para definir el intervalo lo que incluye dichas dos cifras que definen dicho intervalo. En el presente caso, el grupo comprende por tanto un nucleótido, dos nucleótidos, tres nucleótidos, cuatro nucleótidos, cinco nucleótidos, seis nucleótidos, siete nucleótidos, ocho nucleótidos, nueve nucleótidos y diez nucleótidos.

10 El patrón de nucleótidos modificados de dicha primera hebra puede ser el mismo que el patrón de nucleótidos modificados de dicha segunda hebra, y puede alinearse con el patrón de dicha segunda hebra. Adicionalmente, el patrón de dicha primera hebra se puede cambiar por uno o más nucleótidos en relación con el patrón de la segunda hebra.

15 Las modificaciones que se discuten anteriormente se pueden seleccionar del grupo que comprende amino, flúor, metoxi, alcoxi y alquilo.

20 La estructura de hebra doble de los ARNip puede ser de extremos romos, en uno o ambos lados. Más específicamente, la estructura de hebra doble puede ser de extremos romos en el lado de la estructura de hebra doble, la cual se define por el extremo 5' de la primera hebra y el extremo 3' de la segunda hebra, o la estructura de hebra doble puede ser de extremos romos en el lado de la estructura de hebra doble, que se define por el extremo 3' de la primera hebra y el extremo 5' de la segunda hebra.

Adicionalmente, al menos una de las dos hebras puede tener un saliente de al menos un nucleótido en el extremo 5'; el saliente puede consistir en al menos un desoxirribonucleótido. Al menos una de las hebras también puede opcionalmente tener un saliente de al menos un nucleótido en el extremo 3'.

25 La longitud de la estructura de hebra doble del ARNip es típicamente de aproximadamente 17 a 21 y con mayor preferencia de 18 o 19 bases. Además, la longitud de dicha primera hebra y/o la longitud de dicha segunda hebra pueden independientemente una de la otra seleccionarse del grupo que comprende los intervalos de desde aproximadamente 15 a aproximadamente 23 bases, bases 17 a 21 y 18 o 19 bases.

30 Adicionalmente, la complementariedad entre dicha primera hebra y el ácido nucleico objetivo puede ser perfecta, o el dúplex que se forma entre la primera hebra y el ácido nucleico objetivo puede comprender al menos 15 nucleótidos donde hay una falta de coincidencia o dos faltas de coincidencia entre dicha primera hebra y el ácido nucleico objetivo que forma dicha estructura de hebra doble.

35 En algunos casos, tanto la primera hebra como la segunda hebra comprenden cada una al menos un grupo de nucleótidos modificados y al menos un grupo de nucleótidos flanqueadores, en el que cada grupo de nucleótidos modificados comprende al menos un nucleótido y en el que cada grupo de nucleótidos flanqueadores comprende al menos un nucleótido con cada grupo de nucleótidos modificados de la primera hebra que se alinean con un grupo de nucleótidos flanqueadores en la segunda hebra, por lo cual la mayoría de los nucleótidos 5' terminales de la primera hebra es un nucleótido del grupo de nucleótidos modificados, y la mayoría de los nucleótidos 3' terminales de la segunda hebra es un nucleótido del grupo de nucleótidos flanqueadores. Cada grupo de nucleótidos modificados puede consistir en un solo nucleótido y/o cada grupo flanqueador de nucleótidos puede consistir en un solo nucleótido.

40 Adicionalmente, es posible que en la primera hebra el nucleótido que forma el grupo flanqueador de nucleótidos es un nucleótido no modificado que está dispuesto en dirección 3' con respecto al nucleótido que forma el grupo de nucleótidos modificados, y en la segunda hebra el nucleótido que forma el grupo de nucleótidos modificados es un nucleótido modificado que está dispuesto en dirección 5' con respecto al nucleótido que forma el grupo de nucleótidos flanqueadores.

45 Además la primera hebra del ARNip puede comprender ocho a doce, preferentemente de nueve a once, grupos de nucleótidos modificados, y la segunda hebra puede comprender de siete a once, preferentemente ocho a diez, grupos de nucleótidos modificados.

50 La primera hebra y la segunda hebra pueden estar unidas por una estructura de bucle, que puede estar compuesta por un polímero de ácido no-nucleico, tales como, *entre otros*, polietilenglicol. Alternativamente, la estructura de bucle puede estar compuesta por un ácido nucleico.

Además, el extremo 5' de la primera hebra del ARNip puede estar unido con el extremo 3' de la segunda hebra, o el extremo 3' de la primera hebra puede estar unido con el extremo 5' de la segunda hebra, donde dicho enlace es a través de un conector de ácido nucleico que tiene típicamente una longitud de entre 10-2000 nucleobases.

Especificaciones particulares de los ARNip de la presente invención

5 La invención proporciona un compuesto que tiene la estructura (estructura A):

5' (N)_x - Z3' (cadena antisentido)

3'Z'-(N')y5' (cadena en sentido)

donde cada N y N' es un ribonucleótido que puede estar modificado o no modificado en su residuo azúcar y (N)_x y (N')_y es un oligómero en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' por un enlace covalente;

10 en donde cada uno de x e y es un entero entre 19 y 40;

en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente es dTdT y está covalentemente unido al terminal 3' de la hebra en la cual está presente;

y en donde la secuencia de (N)_x comprende una secuencia antisentido para ADNc del gen RTP801

15 En particular, la invención proporciona el compuesto anterior en donde la secuencia de (N)_x comprende una o más de las secuencias antisentido presentes en las Tablas A, B y C.

20 En particular, la invención proporciona el compuesto anterior en donde el enlace covalente es un enlace fosfodiéster, en donde x = y, preferentemente en donde x = y = 19, en donde Z y Z' están ausentes, en donde al menos un ribonucleótido se modifica en su residuo azúcar en la posición 2', en donde la porción en la posición 2' es metoxi (2'-O-metilo) en donde ribonucleótidos alternos se modifican en la cadena antisentido y sentido en donde los ribonucleótidos en los terminales 5' y 3' de la cadena antisentido se modifican en sus residuos azúcar, y los ribonucleótidos en los terminales 5' y 3' de la cadena en sentido no se modifican en sus residuos azúcar.

25 En particular, el ARNip utilizado en la presente invención es un oligorribonucleótido en donde una hebra comprende nucleótidos consecutivos que tienen, de 5' a 3', la secuencia expuesta en la SEQ ID NOs: 3-52 o en la SEQ ID NOs: 103-174 o en las SEQ ID NOS: 247-295 (que son hebras en sentido) en donde una pluralidad de las bases puede modificarse, preferiblemente mediante una modificación 2-O-metilo, o un homólogo de la misma, en donde hasta 2 de los nucleótidos en cada región terminal una base está alterada

30 Además, la presente descripción divulga un método para tratar a un paciente que padece un trastorno respiratorio, una enfermedad ocular, un trastorno microvascular o una lesión o enfermedad de la médula espinal que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la estructura (A) anterior (que tiene cualquiera de los específicos mencionados anteriormente) en una cantidad terapéuticamente efectiva para así tratar al paciente. Adicionalmente, la descripción divulga el uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de la estructura (A) anterior (que tiene cualquiera de los específicos mencionados anteriormente) para la preparación de un medicamento para promover la recuperación en un paciente que padece de un trastorno respiratorio, una enfermedad ocular, un trastorno microvascular o lesión o enfermedad de la médula espinal.

35 Un aspecto adicional de la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la estructura (A) anterior para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades y afecciones mencionadas en la presente.

40 Más aún, este aspecto proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más compuestos de la estructura (A) anterior para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades y afecciones mencionadas en la presente, con lo cual dichos compuestos pueden mezclarse físicamente en la composición farmacéutica en cantidades que generan una actividad igual o de cualquier otra forma beneficiosa, o pueden estar covalentemente o no-covalentemente enlazados, o unidos juntos por un enlazador de ácido nucleico de una longitud en el intervalo de 2-100, preferentemente 2-50 o 2-30 nucleótidos. Tales moléculas de ARNip están por lo tanto compuestas de una estructura de ácido nucleico de hebra doble como se describió en la presente, con lo cual dos secuencias de ARNip seleccionadas de las Tablas A-C y preferiblemente de la Tabla A, ID núms: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42 y 50 están covalentemente o no-covalentemente enlazadas o unidos por un enlazador para formar una molécula ARNip en tándem. Tales moléculas ARNip en tándem que comprende dos secuencias de ARNip pudieran ser típicamente de 38-150 nucleótidos de longitud, con mayor preferencia 38 o 40-60 nucleótidos de longitud, y mayores en consecuencia si más de dos secuencias ARNip se incluyen en la molécula en tándem. Una molécula en tándem más
50 larga compuesta por dos o más secuencias más largas que codifican el ARNip producido por vía del procesamiento celular interno, por ejemplo, ARNbc largo, también está considerada, ya que es una molécula en tándem que

codifica dos o más ARNhc. Tales moléculas en tándem se consideran además una parte de la presente invención, y más información concerniente a ellas se da más abajo.

Dichas estructuras combinadas o en tándem tienen la ventaja de que la toxicidad y/o los efectos fuera de cada ARNip se minimizan, mientras que la eficacia aumenta

- 5 Particularmente el ARNip usado en los Ejemplos se modificó de manera que un grupo 2'-O-Me estaba presente en el primer, tercer, quinto, séptimo, noveno, oncenno, decimotercer, decimoquinto, decimoséptimo y decimonoveno nucleótidos de la cadena antisentido, con lo cual una modificación muy similar, es decir, un grupo 2'-O-Me estaba presente en el segundo, cuarto, sexto, octavo, décimo, duodécimo, decimocuarto, decimosexto y decimooctavo nucleótidos de la cadena en sentido. Además, debe notarse que en el caso de estos ácidos nucleicos particulares de acuerdo con la presente invención el primer tramo es idéntico a la primera hebra y el segundo tramo es idéntico a la segunda hebra y estos ácidos nucleicos son además de extremos romos. El ARNip se fosforiló pero se consideró que una versión no fosforilada puede ser más simple para preparar a gran escala y se encontró que dicho REDD14 no fosforilado, llamado REDD-14NP es tan biológicamente activo como REDD-14 en un modelo CNV (véase el Ejemplo 6). La secuencia de este ARNip usado en los experimentos en los Ejemplos 6- 8 es la de REDD14, es decir, la secuencia que tiene la referencia interno núm. 14 (véase la Tabla A).

La región terminal de los oligonucleótidos se refiere a las bases 1-4 y/o 16-19 en las secuencias 19-mer (Tablas A y B más abajo) y a las bases 1-4 y/o 18-21 en las secuencias 21-mer (Tabla C más abajo).

- Además, los ARNip usados en la presente invención son oligoribonucleótidos en donde una hebra comprende nucleótidos consecutivos que tiene de 5' a 3', la secuencia que se expone en las sec. con SEQ ID NOS: 53-102 o SEQ ID NOS: 175-246 o SEQ ID NOS: 296-344 (cadenas antisentido) o un homólogo de esta en donde hasta en 2 de los nucleótidos en cada región terminal se altera una base. Así, en aspectos particulares el oligonucleótido comprende una estructura de hebra doble, con lo cual dicha estructura de hebra doble comprende una primera hebra y una segunda hebra, en donde la primera hebra comprende un primer tramo de los nucleótidos contiguos y la segunda hebra comprende un segundo tramo de los nucleótidos contiguos, con lo que el primer tramo es complementario o idéntico a una secuencia de ácido nucleico que codifica para el gen RTP801 y en donde el segundo tramo es idéntico o complementario a una secuencia ácido nucleico que codifica para RTP801. Dicho primer tramo comprende al menos 14 nucleótidos, preferentemente al menos 18 nucleótidos y aún con mayor preferencia 19 nucleótidos o aun al menos 21 nucleótidos. En una realización el primer tramo comprende de aproximadamente 14 a 40 nucleótidos, preferentemente aproximadamente 18 a 30 nucleótidos, con mayor preferencia de aproximadamente 19 a 27 nucleótidos y con la máxima preferencia de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos. En una realización el segundo tramo comprende de aproximadamente 14 a 40 nucleótidos, preferentemente aproximadamente 18 a 30 nucleótidos, con mayor preferencia de aproximadamente 19 a 27 nucleótidos y con la máxima preferencia de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos o aun aproximadamente 19 a 21 nucleótidos. En una realización el primer nucleótido del primer tramo corresponde a un nucleótido de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801, en donde el último nucleótido del primer tramo corresponde a un nucleótido de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801. En una realización el primer tramo comprende una secuencia de al menos 14 nucleótidos contiguos de un oligonucleótido, donde tal oligonucleótido se selecciona del grupo que comprende las SEQ ID NOS: 3-344, preferiblemente del grupo que comprende los oligoribonucleótidos que tiene la secuencia de cualquiera de los números de serie 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 y 50 en la Tabla A. Las especificaciones adicionales de las moléculas de ARNip usadas en la presente invención pueden proporcionar un oligoribonucleótido en donde el dinucleótido dTdT está covalentemente unido al terminal 3', y/o en al menos un nucleótido un residuo azúcar se modifica, posiblemente con una modificación que comprende una modificación 2'-O-metilo. Más aún, el grupo 2' OH puede reemplazarse por un grupo o porción seleccionada del grupo que comprende -H-OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂CH₃, -NH₂, y F. Más aún, los compuestos preferibles de la presente invención como los descritos anteriormente pueden ser fosforilados o no fosforilados.

Además, el ARNip usado en la presente invención puede ser un oligoribonucleótido donde en los nucleótidos alternos los azúcares modificados se localizan en las dos hebras. Particularmente, el oligoribonucleótido puede comprender una de las cadenas sentido en donde el azúcar no está modificado en los nucleótidos del terminal 5' y 3', o una de las cadenas antisentido en donde el azúcar está modificado en los nucleótidos del terminal 5' y 3'.

- Además, otros ácidos nucleicos a usarse en la presente invención comprenden al menos 14 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 13 A 344 y con mayor preferencia 14 pares de base de nucleótidos contiguos en cualquier extremo de la estructura de hebra doble comprendida del primer tramo y el segundo tramo como se describió anteriormente. Una persona con experiencia en la técnica entenderá que dada la longitud potencial del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y particularmente de los tramos individuales que forman tal ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, algunos cambios con relación a la secuencia codificante del gen RTP801 como se detalla en la SEQ ID NO:1 a cada lado es posible, donde tales cambios pueden ser hasta 1, 2, 3, 4, 5 y 6 nucleótidos en ambas direcciones, y por el que las moléculas de ácido nucleico así generadas de hebra doble estarán además dentro de la presente invención.

Un aspecto adicional de la presente invención concierne un ácido nucleico funcional que comprende una estructura de hebra doble, donde tal estructura de hebra doble comprende

una primera hebra y una segunda hebra, en donde

5 la primera hebra comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos y la segunda hebra comprende un segundo tramo de los nucleótidos contiguos, en donde

el primer tramo es complementario o idéntico a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 y en donde el segundo tramo es idéntico o complementario a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801.

10 En una realización, el ácido nucleico es RTP801 de regulación descendente, por lo que la regulación descendente de RTP801 se selecciona del grupo que comprende la regulación descendente de la función de RTP801, regulación descendente de la proteína RTP801 y regulación descendente de la expresión del ARNm RTP801.

En una realización, el primer tramo comprende al menos 14 nucleótidos, preferentemente al menos 18 nucleótidos y aún con mayor preferencia 19 nucleótidos.

15 En una realización, el primer tramo comprende de aproximadamente 14 a 40 nucleótidos, preferentemente aproximadamente 18 a 30 nucleótidos, con mayor preferencia de aproximadamente 19 a 27 nucleótidos y con la máxima preferencia de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos.

En una realización, el segundo tramo comprende de aproximadamente 14 a 40 nucleótidos, preferentemente aproximadamente 18 a 30 nucleótidos, con mayor preferencia de aproximadamente 19 a 27 nucleótidos y con la máxima preferencia de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos.

20 En una realización, el primer nucleótido del primer tramo corresponde a un nucleótido de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801, en donde el último nucleótido del primer tramo corresponde a un nucleótido de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801.

25 En una realización, un tramo comprende una secuencia de al menos 14 nucleótidos contiguos de una secuencia de ácido nucleico, en donde tal secuencia de ácido nucleico se selecciona de las secuencias descritas en las Tablas A-C, preferentemente del grupo que comprende la sec. con núms. de identi.: 53, 66, 67, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 91, 92, 93, 94, 96, 101 y 102, con mayor preferencia seleccionados del grupo que comprende la sec. con núms. de identi.: 66, 75, 79, 91, 94, 101 y 102, y con la máxima preferencia seleccionados del grupo que comprende la sec. con SEQ ID NOS: 66, 74, 75 y 79.

30 En una realización, el otro tramo comprende una secuencia de al menos 14 nucleótidos contiguos de una secuencia de ácido nucleico, en donde tal secuencia de ácido nucleico se selecciona de las secuencias descritas en las Tablas A-C, preferentemente del grupo que comprende la sec. con núms. de identi.: 3, 16, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 51 y 52, con mayor preferencia seleccionados del grupo que comprende la sec. con. SEQ ID NOS:16, 24, 25, 29, 41, 44, 51, y 52, y con la máxima preferencia seleccionados del grupo que comprende la sec. con. SEQ ID NOS: 16, 24, 25 y 29.

En una realización

35 el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 53 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 3;

el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 66 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:16;

40 el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 67 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 17;

el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 72 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.: 22;

el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con num. de ident.: 73 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.: 23;

45 el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 74 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.: 24;

el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 75 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.: 25;

- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 76 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.: 26;
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 77 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.: 27;
- 5 el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 79 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.: 29;
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 91 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.: 41;
- 10 el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 92 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.:42;
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 93 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.: 43;
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 94 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.: 44;
- 15 el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con num. de ident.:95 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.: 45;
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 96 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.:46;
- 20 el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 101 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.: 51; y
- el primer tramo tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 102 y el segundo tramo tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con. núm. de ident.: 52.
- En una realización, el primer tramo tiene una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo que comprende la SEQ ID NO: 53, 66, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 101 y 102.
- 25 Se entenderá que aunque los términos "primer" y "segundo" tramo se usan en relación con los ácidos nucleicos de la presente invención, ellos se usan por razones de conveniencia solamente, y cualquier molécula de ácido nucleico de la invención que se describe con un primer tramo con la secuencia X y un segundo tramo con la secuencia Y, pudiera igualmente ser descrito también teniendo un primer tramo con la secuencia Y y un segundo tramo con la secuencia X, siempre que se entienda que un tramo está comprendido en la cadena antisentido, el cual debe ser antisentido para una porción de la secuencia codificante del gen RTP801, y el otro tramo está comprendido en la cadena en sentido, que debe ser complementaria (aunque no 100% complementaria) a la cadena antisentido, todo de acuerdo a las definiciones y especificaciones presentadas en la presente.
- 30
- En una realización, la primera y/o la segunda hebra comprenden al menos un nucleótido saliente en el extremo 3' que es complementario o idéntico al nucleótido correspondiente de una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801.
- 35
- En una realización, la primera y/o la segunda hebra comprenden de 1 a 15 nucleótidos salientes en el extremo 3', preferentemente la primera y/o la segunda hebra comprende de 1 a 10 nucleótidos salientes en el extremo 3', con mayor preferencia la primera y/o la segunda hebra comprende de 1 a 5 nucleótidos salientes en el extremo 3', y con la máxima preferencia la primera y/o la segunda hebra comprende de 1 a 2 nucleótidos salientes en el extremo 3'.
- 40
- En una realización, la primera y/o la segunda hebra comprenden al menos un nucleótido saliente que es diferente de los nucleótidos correspondientes de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801.
- En una realización, la primera hebra comprende dos nucleótidos salientes que son diferentes de los nucleótidos correspondientes de una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801.
- En una realización, la primera hebra consiste en el primer tramo solamente.
- 45
- En una realización, la segunda hebra consiste en el segundo tramo solamente.
- En una realización, el primer tramo y/o la primera hebra comprende(n) ribonucleótidos.

ES 2 691 196 T3

- En una realización, el segundo tramo y/o la segunda hebra comprende(n) ribonucleótidos.
- En una realización, el primer tramo y/o la segunda hebra consiste(n) en ribonucleótidos.
- En una realización algunos o todos los nucleótidos se modifican.
- 5 En una realización preferido tal modificación se relaciona con la porción de nucleobase de los nucleótidos, con la porción azúcar de los nucleótidos y/o con la porción fosfato de los nucleótidos.
- En una realización más preferido la modificación es una modificación de una porción azúcar y la modificación es una modificación en la posición 2', donde el grupo 2' OH se reemplaza con un grupo o porción seleccionado del grupo que comprende -H-OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂CH₃, -NH₂, y -F.
- 10 En una realización, la modificación es una modificación de la porción de nucleobase y la modificación o la nucleobase modificada se selecciona del grupo que comprende inosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo, 2-propilo y otros alquiladeninas, 5-halo uracilo, 5-halocitosina, 5-halo citosina, 6-azacitosina, 6-aza timina, pseudo-uracilo, 4-tiouracilo, 8-halo adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol adenina, 8-tioalquil adeninas, 8-hidroxil adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-halo guaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8-tioalquil guanina, 8-hidroxilguanina y otras guaninas sustituidas, otros aza- y deaza adeninas, otros aza- y deaza guaninas, 5-trifluorometil uracilo y 5-trifluoro citosina.
- 15 En una realización, la modificación es una modificación de la porción fosfato, en donde la porción fosfato modificada se selecciona del grupo que comprende fosfotioato.
- En una realización, el primer tramo y/o el segundo tramo comprende una pluralidad de grupos de nucleótidos modificados que tienen una modificación en la posición 2', donde dentro del tramo cada grupo de nucleótidos modificados es flanqueado en uno o ambos lados por un grupo de flanqueo de nucleótidos, donde los nucleótidos flanqueadores que forman el grupo de flanqueo de los nucleótidos son nucleótidos no modificados o un nucleótido que tiene una modificación diferente de la modificación de los nucleótidos modificados.
- 20 En una realización preferido, el primer tramo y/o el segundo tramo consisten en ribonucleótidos.
- En una realización más preferido, el primer y el segundo tramo comprenden una pluralidad de grupos de nucleótidos modificados.
- 25 En una realización, el primer tramo comprende dicha pluralidad de grupos de nucleótidos modificados.
- En una realización, el segundo tramo comprende dicha pluralidad de grupos de nucleótidos modificados.
- En una realización cada grupo de nucleótidos modificados y/o cada grupo de nucleótidos flanqueadores comprende un número de nucleótidos, donde el número se selecciona del grupo que comprende un nucleótido a diez nucleótidos.
- 30 En una realización, el primer tramo comprende un primer patrón de nucleótidos modificados y el segundo tramo comprende un segundo patrón de nucleótidos modificados.
- En una realización, el primer patrón es el mismo patrón que el segundo patrón.
- En otro aspecto, el primer patrón se alinea con el segundo patrón.
- 35 En una realización preferido, el primer patrón cambia en uno o más nucleótidos con relación al segundo patrón.
- En una realización, cada uno de los grupos de nucleótidos modificados consiste en un nucleótido modificado y cada uno de los grupos de nucleótidos flanqueadores consiste en un nucleótido no modificado o un nucleótido que tiene una modificación que es diferente de la modificación de los nucleótidos modificados.
- En una realización preferido, el nucleótido modificado tiene un grupo -OMe en la posición 2'.
- 40 En una realización preferido, el nucleótido flanqueador es un ribonucleótido que tiene un grupo 2' OH.
- En una realización, el primer tramo comienza con un nucleótido modificado en el extremo 5' y cada nucleótido del tramo es además un nucleótido modificado, mientras que un segundo nucleótido comienza desde el extremo 5' y cada nucleótido es un nucleótido no modificado o un nucleótido que tiene una modificación que es diferente de la modificación del(de los) nucleótido(s) modificados(s).

En una realización, el primer tramo es en orientación antisentido a la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801.

5 Un aspecto adicional de la presente descripción se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la presente descripción y/o un vector de acuerdo con el segundo aspecto de la presente descripción y preferentemente un portador farmacéuticamente aceptable; dicha composición opcionalmente es para la administración sistémica o local.

En una realización, la composición es para el tratamiento de una enfermedad, donde la enfermedad se selecciona del grupo que comprende enfermedades tumorales.

10 En un aspecto adicional, el problema esencial de la presente descripción se resuelve mediante un método para la prevención y/o el tratamiento de un paciente que necesita tal prevención y/o tratamiento que comprende la administración de un ácido nucleico de acuerdo con la presente descripción y/o el vector de acuerdo con la presente descripción y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción.

15 En una realización adicional, un ácido nucleico de acuerdo con la presente descripción y/o un vector de acuerdo con la presente descripción se usan para la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad, donde tal enfermedad se selecciona del grupo que comprende enfermedades tumorales. La enfermedad tumoral puede seleccionarse del grupo que comprende tumores sólidos, tumores metastásicos que incluyen tumores PTEN negativos, tumores que son resistentes a los fármacos y tumores donde se puede usar la inhibición de RTP801 para la sensibilización. Más aun, la enfermedad tumoral puede ser una enfermedad tumoral en etapa terminal, o puede involucrar células que son supresores tumorales negativos; dicho supresor tumoral puede ser PTEN.

20 Un aspecto adicional de la presente descripción se resuelve mediante un método para diseñar o seleccionar un ácido nucleico que es adecuado para la regulación descendente de RTP801, que comprende las siguientes etapas:

- a) diseñar o seleccionar un ácido nucleico que es adecuado para la regulación descendente de RTP801;
- 25 b) evaluar el efecto de un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la presente invención; y
- c) comparar el efecto del ácido nucleico de la etapa a) con el efecto del ácido nucleico de la etapa b).

En una realización, el efecto es la regulación descendente de RTP801.

30 Un aspecto adicional de la presente descripción es el uso de un ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación como un sensibilizador, en particular como un sensibilizador en el tratamiento de una enfermedad, por lo que dicha enfermedad se selecciona preferentemente del grupo que comprende tumores y más particularmente los tumores que son resistentes a un tratamiento con agentes quimioterapéuticos y/o radioterapéuticos. Se describen en la presente otras enfermedades para las cuales un ácido nucleico de la presente invención puede servir como sensibilizador.

35 Esta solicitud divulga que un ácido nucleico que comprende una estructura de hebra doble la cual es específica para RTP801 es un medio adecuado de inhibir la angiogénesis/crecimiento de la vasculatura y la fuga vascular, (ambos de la vasculatura existente y de la vasculatura en crecimiento). Adicionalmente, esta solicitud describe (sin estar atados por la teoría) que RTP801 que es una proteína inducible por el estrés (inducida por hipoxia, estrés oxidativo, estrés térmico, estrés ER), es un factor que actúa en el ajuste fino de la respuesta celular al desbalance de la energía. Así, la inhibición de RTP801 por dicha hebra doble de ácido nucleico es adecuada para el tratamiento de cualquier enfermedad donde las células se deben rescatar de la apoptosis debido a condiciones de estrés (por ejemplo, las enfermedades acompañadas por la muerte de las células normales) o donde las células adaptadas a condiciones de estrés debido a los cambios en la expresión de RTP801, se deben matar (por ejemplo, las células tumorales). En este último caso, tras la inhibición de RTP801 a través de dicho ácido nucleico de hebra doble, este factor de supervivencia con función anti-apoptótica en las células hipóxicas, más particularmente en las células cancerosas hipóxicas, se hace ineficaz lo que permite de este modo, conducir a la apoptosis a las células que carecen de la protección mediada por RTP801. Esto adicionalmente se puede producir cuando otros factores promotores de la apoptosis están presentes. Tales otros factores promotores de la apoptosis incluyen, entre otros, la quimioterapia y la radioterapia. En otras palabras, el ácido nucleico de hebra doble de acuerdo con la presente invención puede ser eficaz solo (monoterapia) en el tratamiento del cáncer y también como una terapia complementaria.

50 Tal estructura de hebra doble comprende una primera hebra y una segunda hebra, por lo que la primera hebra comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos y la segunda hebra comprende un segundo tramo de nucleótidos contiguos, por lo que el primer tramo es o bien idéntico o complementario a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 y por lo cual el segundo tramo es o bien idéntico o complementario a una

5 secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801. Por medio del uso particular de RTP801 como un objetivo para dicho tipo de ácido nucleico de hebra doble, es por tanto posible dirigir inmediatamente un objetivo en la cascada implicada en el crecimiento y el desarrollo de la vasculatura y la angiogénesis, respectivamente, y de este modo, de una manera diferente comparada a la vía usada por los inhibidores de VEGF, tales como los anticuerpos VEGF. Sin desear estar atados por ninguna teoría, los presentes inventores asumen que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede ejercer su función en aquellas células que proporcionan un fondo que está implicado o se observa en relación con que se produzca cualquier enfermedad indeseada, particularmente la angiogénesis inducida por hipoxia y/o el crecimiento o desarrollo de la vasculatura. Esta interpretación se apoya en el hallazgo de que los ratones knock-out para RTP801 no presentan ningún fenotipo distinto del de los ratones de tipo salvaje bajo condiciones no hipóxicas. Sólo tras de la inducción de la hipoxia como se observa en un estado de enfermedad tal como, por ejemplo, el crecimiento del tumor, el knock-out relacionado con RTP801 resulta en una patología similar a la observada en los humanos que sufren de este tipo de enfermedad.

15 Se entenderá que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es preferentemente un ácido nucleico funcional. Tal como se usa en la presente, el término ácido nucleico funcional significa preferentemente un ácido nucleico cuya función es diferente de ser activo en la célula como un molde para la transcripción de cualquier ARNhc, ARNm, o cualquier otro producto de la transcripción, por lo que o bien dicho ARNhc, ARNm o cualquier otro producto de la transcripción, respectivamente, o el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención está sujeto a un proceso de traducción, preferentemente un proceso de traducción celular, que resulta en una proteína RTP801 biológicamente activa. Es necesario reconocer que un ácido nucleico funcional tal como se usa preferentemente en la presente es capaz de reducir la expresión de un ácido nucleico objetivo. Con mayor preferencia, dicha reducción se basa en un proceso post-transcripcional de silenciamiento génico del ácido nucleico objetivo. Aún con mayor preferencia, dicha reducción se basa en la interferencia de ARN. Con la máxima preferencia, una forma del ácido nucleico funcional es una molécula de ARNip o cualquier otra molécula que tiene el mismo efecto que una molécula de ARNip. Tal molécula adicional se selecciona del grupo que comprende los ARNip, los ARNip sintéticos, los ARNhc y los ARNhc sintéticos. Como se usa en la presente los ARNip pueden comprender adicionalmente los vectores de expresión derivados de ARNip, por lo que el vector de expresión es en una realización preferida, un virus tal como el adenovirus, los virus adeno-asociados, el virus del herpes y los lentivirus. Como se usa en la presente, ARNhc significa preferentemente ARN de horquilla corta. Tal ARNhc se puede fabricar sintéticamente o se puede generar usando los sistemas de vectores de expresión codificados, preferentemente usando los promotores de la ARN polimerasa III. En relación con esto, es necesario reconocer que la funcionalidad del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención está dirigida a RTP801 al cual también preferentemente se hace referencia en la presente como el objetivo y el ácido nucleico que codifica para dicho objetivo como el ácido nucleico objetivo.

35 Como se usa preferentemente en la presente, la estructura de hebra doble del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprende cualquier estructura de hebra doble, por lo que dicha estructura de hebra doble se genera preferentemente por el primer tramo y el segundo tramo lo proporciona el ácido nucleico que tiene el diseño básico. La estructura de hebra doble puede comprender uno o varios desajustes. Dicha estructura de hebra doble está formada por el apareamiento de bases Watson-Crick y/o el apareamiento de bases Hoogsteen y/o mecanismos similares de apareamiento de bases. En base al diseño básico del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, se prefiere que un tramo se encuentre en orientación antisentido con respecto a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 o una parte de este, mientras que el otro tramo está en la orientación sentido con una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 o una parte de este. Debido a esto, un tramo es complementario a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 o una parte de este, y el otro tramo es idéntico a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 o una parte de este. En relación con esto, es preciso reconocer que el término idéntico, por supuesto, significa también parcialmente idénticos, por lo que la identidad, expresada como homología, es al menos 80%, preferentemente 90%, con mayor preferencia 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. Similar a la definición de identidad, la complementariedad se puede definir en términos de homología, por lo que dicha homología está en el mismo intervalo que la identidad si la hebra complementaria se tradujera en la hebra idéntica de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases Watson-Crick. En una realización alternativa, un tramo es idéntico a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 o una parte de este y el otro tramo es complementario a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 o una parte de este.

55 En una realización preferida, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención regula de forma descendente la función de RTP801. La regulación descendente de la función de RTP801 preferentemente sucede por la reducción en el nivel de expresión a nivel de proteínas y/o el nivel de ARNm, con lo cual un menor nivel de expresión, preferentemente a nivel de proteínas, puede ser tan pequeño como 5% y ser tan alto como 100%, con referencia a una expresión bajo condiciones en donde el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención no se administra o no es funcionalmente activo. Tales condiciones son, preferentemente, las condiciones de o como presente en un sistema de expresión, preferentemente un sistema de expresión para RTP801. Tal sistema de expresión es preferentemente un sistema de traducción que puede ser un sistema de traducción in vitro, con mayor preferencia una célula, órgano y/u organismo. Con mayor preferencia el organismo es un organismo multicelular, con mayor preferencia un mamífero, en el que dicho mamífero se selecciona preferentemente del grupo que comprende el hombre, mono, ratón, rata, conejillo de indias, conejo, gato, perro, oveja, vaca, caballo, ganado vacuno y porcino. En relación con la regulación descendente, es preciso reconocer que dicha regulación descendente puede ser una función del tiempo, es decir, el efecto de regulación descendente no se observa necesariamente inmediatamente

después de la administración o la activación funcional de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, pero puede estar diferida en el tiempo, así como en el espacio, es decir, en diversas células, tejidos y/u órganos. Dicho aplazamiento puede variar de 5% -100%, preferentemente de 10 a 50%. Será reconocido por aquellos con experiencia en la materia que una reducción del 5% para un período de tiempo más largo podría ser tan eficaz como una reducción del 100% en un período de tiempo más corto. Aquellos con experiencia en la materia también reconocerán que dicho aplazamiento depende fuertemente de la funcionalidad del ácido nucleico particular que se use realmente, así como en la población de células objetivo y, por tanto, en última instancia, de la enfermedad a tratar y/o prevenir de acuerdo a la enseñanza técnica de la presente solicitud. En tanto, una reducción de 5% en un período de tiempo más largo podría ser tan eficaz como el 100% de reducción durante un período de tiempo más corto. También aquellos con experiencia en la materia reconocerán que el aplazamiento puede ocurrir a cualquier nivel como se describió anteriormente, es decir, un aplazamiento en función, por lo que dicha función es cualquier función exhibida por RTP801, un aplazamiento en la expresión de proteína o un aplazamiento en el nivel de expresión del ARNm.

En una realización preferida el primer tramo comprende al menos 14 nucleótidos, preferiblemente 14 nucleótidos contiguos. Aquellos con experiencia en la materia reconocerán que el primer tramo debe tener una longitud que sea adecuada para permitir direccionar específicamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 y más específicamente el ácido nucleico que codifica para RTP801 presente en el sistema de traducción, cuando la expresión de RTP801 se va a reducir. Nuevamente, sin querer limitarse por ninguna teoría o cualquier modo de acción del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, parece que hay una interacción entre el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801, preferentemente a nivel de la transcripción, es decir, tras la generación de un ARNm a partir de la correspondiente secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801. Debido a la probabilidad de que cualquier secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención sea idéntica o complementaria a una secuencia contenida en el genoma o transcriptoma del sistema de traducción, la longitud del primer tramo por lo tanto debe ser tan largo como para asegurarse que, bajo el supuesto de que algún tipo de apareamiento de bases entre el ácido nucleico que codifica para RTP801 y una de las hebras del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se produce realmente, sólo la secuencia que codifica para RTP801 pero no otra secuencia de codificación, preferentemente ningún otra secuencia de codificación esencial, del genoma o el transcriptoma está dirigida para o por dicho apareamiento de bases. Mediante esta longitud, la aparición de efectos fuera del objetivo puede reducirse y preferentemente eliminarse. Para aumentar la rigurosidad de este modo de direccionar específicamente RTP801 y la secuencia de ácido nucleico que codifica éste, el primer tramo tiene preferentemente una longitud de al menos 18 o 19 nucleótidos. El límite superior para la longitud del primer tramo es preferentemente menor que 50 nucleótidos, sin embargo, la longitud puede ser significativamente más larga y puede comprender 100, 200 o incluso 500 nucleótidos o cualquier longitud entre estas. Aparte de esto, alguien con experiencia en la materia prefiere tener un primer tramo más bien corto, tan corto como sea la secuencia, particularmente en el caso de que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se sintetiza químicamente, menos tiempo y material de consumo de la síntesis de éste y menor será la velocidad a la que los nucleótidos incorrectos se insertan en la secuencia respectiva. Otro factor que se debe tener en cuenta en relación con la fijación de la longitud del primer tramo es el hecho de que, típicamente a una longitud más allá de 50 o más nucleótidos, se puede observar una respuesta inespecífica al interferón. Depende de la afección particular a tratar si este tipo de respuesta inespecífica al interferón se puede tolerar o no. Por ejemplo, una respuesta al interferón se podría tolerar si la respuesta al interferón y/o la expresión de los genes del interferón se pueden limitar a las células patológicas.

En vista de esto, las longitudes más preferidas del primer tramo son de aproximadamente 14 a 40 nucleótidos, 18 a 30 nucleótidos, 19 a 27 nucleótidos, 21 a 25 nucleótidos y 19 a 23 nucleótidos.

Las mismas consideraciones mencionadas anteriormente para el primer tramo son aplicables al segundo tramo, el cual puede comprender por tanto cualquier longitud como se describe en la presente en relación con el primer tramo. Está también dentro de la presente invención que la longitud del primer tramo es diferente de la longitud del segundo tramo, sin embargo, se prefiere que ambos tramos tengan la misma longitud.

De acuerdo con el diseño básico del ácido nucleico, el primer tramo y el segundo tramo son partes de la primera hebra y la segunda hebra, respectivamente, del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Se reconocerá que en cualquier extremo, es decir, en el extremo 5', así como el extremo 3' la primera hebra y/o la segunda hebra pueden comprender uno o varios nucleótidos, preferentemente nucleótidos adicionales, en cualquier combinación.

En relación con lo mismo, es necesario reconocer que los nucleótidos de la hebra individual que van más allá del(de los) extremo(s) del tramo correspondiente a la hebra respectiva se pueden usar para contribuir adicionalmente a la complementariedad e identidad, respectivamente, del tramo y, por tanto el direccionamiento específico de la secuencia del ácido nucleico que codifica para RTP801.

Se reconocerá que, básicamente, sobre la base de la enseñanza técnica que se proporciona en la presente, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede dirigirse a cualquier parte de la secuencia del ácido nucleico que codifica para RTP801, preferentemente codifica para RTP801 en el sistema de traducción, cuando la expresión de RTP801 se va a reducir. En tanto, la presente invención comprende cualquier ácido nucleico que tiene las

características como las definidas en la presente, por lo cual las hebras y tramos complementarios e idénticos del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, básicamente, pueden comenzar desde cualquier nucleótido de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801. Por consiguiente, bajo la condición de que el primer tramo de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es complementario a la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801, es decir, es la cadena antisentido de esta, o está en la misma orientación antisentido, el primer nucleótido de dicho tramo, es decir, el nucleótido más al terminal 5' corresponde, es decir, se alinea con el último nucleótido de la secuencia que codifica para RTP801 en el extremo 3'. En una realización adicional dicho nucleótido más al terminal 5' corresponde al penúltimo nucleótido del ácido nucleico que codifica para RTP801 y así sucesivamente hasta que se alcanza la última posición la cual, dada la longitud del tramo antisentido, aún permite que la cadena antisentido del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención sea complementaria a la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801. En tanto, cualquier ácido nucleico de acuerdo con la presente invención está dentro de la presente invención que se podría generar mediante el escaneo de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 a partir del nucleótido más al terminal 5' de éste y, por encima del diseño básico del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y la realización de las características de dicho ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Las mismas consideraciones se aplican a las realizaciones descritas en la presente donde la complementariedad y la identidad del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se proporciona no sólo por el primer tramo y el segundo tramo, respectivamente, pero tal complementariedad e identidad también implican uno o más nucleótidos más allá del primer tramo y del segundo tramo, respectivamente, luego, son parte de la primera hebra y la segunda hebra, respectivamente.

De los diferentes ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención como se describe en la presente, se prefieren particularmente aquellos con números de referencia interna 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 y 50 (véase la Tabla A). En relación con la misma, es de señalar que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención que se pueden usar en humanos y un modelo animal tal como rata y/o ratón son particularmente útiles. La ventaja sorprendente de estos ácidos nucleicos particulares de acuerdo con la presente invención reside en el hecho de que son eficaces tanto en humanos y en un modelo animal lo cual significa que los resultados obtenidos de las pruebas en el modelo animal se pueden transferir inmediatamente a partir del modelo animal al ser humano y más particularmente sin la necesidad de realizar ningún cambio en la secuencia humana lo cual sería de otro modo necesario en caso de que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se diseñara de tal manera que comprende (una) secuencia (s) que difiere(n) entre las especies, más particularmente de las especies que se usan para las de prueba en modelos animales y el hombre como los organismos preferidos finales o el paciente. Se prefiere adicionalmente que estos ácidos nucleicos tengan un patrón de modificación tal como también se describe en los ejemplos.

Sin embargo, también está dentro de la presente invención que cualquiera de las secuencias de acuerdo con las SEQ ID NOS: 3, 16-17, 22-27, 29, 41-46, 51-53, 66-67, 72-77, 79, 91-96 y 101-102 y las combinaciones respectivas que resulten en las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que tienen números de referencia internos 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 y 50, que están sólo parcialmente contenidas en un ácido nucleico adicional de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, los ácidos nucleicos adicionales de acuerdo con la presente invención comprenden al menos 14 nucleótidos contiguos de las SEQ ID NOS:3, 16-17, 22-27, 29, 41-46, 51-53, 66-67, 72-77, 79, 91-96 y 101-102, y más preferentemente 14 pares de bases de nucleótidos contiguos en cualquier extremo de la estructura de hebra doble que comprende el primer tramo y el segundo tramo como se indica en la tabla anterior. Aquellos con experiencia en la materia entenderán que, dada la longitud potencial del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y particularmente de los tramos individuales que forman dicho ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, algunos cambios a cada lado respecto a la secuencia que codifica RTP801 es posible, por lo que tales cambios pueden ser de hasta 1, 2, 3, 4, 5 y 6 nucleótidos en ambas direcciones, y mediante el cual las moléculas de ácido nucleico de hebra doble que se generan así, también deberán estar dentro de la presente invención.

En una realización preferida de la presente invención, el primer tramo y la primera hebra tienen la misma longitud. Del mismo modo, se prefiere que la segunda hebra tenga la misma longitud que el segundo tramo, por lo que es incluso más preferido que el primer tramo y el segundo tramo tengan la misma longitud. En una realización aún más preferida, la primera hebra sólo comprende el primer tramo y la segunda hebra comprende sólo el segundo tramo. En una realización incluso más preferida ni el primer tramo, y por lo tanto la primera hebra, ni el segundo tramo, y por lo tanto la segunda hebra, comprenden un saliente. En otras palabras, está también dentro de la presente invención que los ácidos nucleicos de hebra doble de acuerdo con la presente invención sean de extremos romos, preferentemente en cada extremo de la estructura de hebra doble de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Tal estructura de extremos romos se puede realizar en relación con cualquier otra realización de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, particularmente aquellas realizaciones en la que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención tienen un patrón de modificación, con mayor preferencia un patrón de modificación como se describe en la presente.

En un aspecto adicional, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención tiene por lo tanto un diseño básico, que proporciona extremos romos en ambos extremos de la estructura del ácido nucleico de hebra doble de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, también está dentro de la presente invención que existe un saliente, es decir, un tramo de uno o más nucleótidos que sobresalen de la estructura de hebra doble. El saliente puede ser, en

principio, en el extremo 5' de la cadena antisentido, en el extremo 3' de la cadena antisentido, en el extremo 5' de la cadena en sentido y/o el extremo 3' de la cadena en sentido. Es de señalar que la realización de cualquiera de dichas opciones sola, así como cualquier combinación de estas, está dentro de la presente invención. Es más preferida una combinación, donde el saliente está situado en el extremo 3' de la cadena antisentido y en el extremo 3' de la cadena en sentido. Está también dentro de la presente invención que el saliente está en el extremo 5' de la cadena antisentido y en el extremo 5' de la cadena en sentido. Adicionalmente, está dentro de la presente invención que el saliente está situado solamente en la cadena antisentido de la estructura de hebra doble, con mayor preferencia en el extremo 3' de la cadena antisentido de la estructura de hebra doble.

En relación con los salientes, es de señalar que el saliente más el tramo forman preferentemente la hebra y las longitudes previstas para los tramos en la presente se aplican también a estas realizaciones. El saliente individual puede, independiente de su ubicación, consistir en al menos un nucleótido. Sin embargo, el saliente individual puede comprender tanto como 10 y es preferentemente dos nucleótidos de largo. Está dentro de la presente invención que el respectivo nucleótido(s) que forma el saliente(s) es/son también complementario a la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 en el caso de que la primera hebra es complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801, y el saliente está en el extremo 3' o 5' de la cadena antisentido, o que el saliente(s) es/son idénticos a la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801 en caso de que la primera hebra es idéntica a la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801. Lo mismo se aplica a cualquier saliente situado en el segundo tramo del diseño básico del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, por lo que es preciso reconocer que el diseño del saliente en el segundo tramo puede ser independiente del diseño del saliente del primer tramo.

Está también dentro de la presente invención que los nucleótidos que forman el saliente no son ni complementarios ni idénticos a los nucleótidos correspondientes de la secuencia de ácido nucleico que codifica para RTP801. Como se usa en la presente, y preferentemente en esta realización, "correspondiente" se refiere a los nucleótidos respectivos que siguen en el extremo 5' y/o el extremo 3' del tramo que tiene un nucleótido homólogo en el ácido nucleico que codifica para RTP801.

Preferentemente, la primera hebra comprende en su extremo 3' dos nucleótidos, preferentemente desoxinucleótidos y con mayor preferencia dos TT y/o este tipo de nucleótidos también en el extremo 3' de la segunda hebra, por lo cual con mayor preferencia, la longitud del primer tramo y el segundo tramo es de 19 nucleótidos. De este modo las hebras comprenden el tramo y el saliente. En esta realización, la estructura de hebra doble consiste de 19 pares de bases y un saliente de dos nucleótidos en cada extremo del extremo 3' del tramo individual.

En una realización preferida, el primer tramo y/o la primera hebra comprenden ribonucleótidos, por lo que se prefiere particularmente que el primer tramo consista en su totalidad de ribonucleótidos. Lo mismo se aplica para el segundo tramo y la segunda hebra, respectivamente. En relación con la misma, sin embargo, cada uno y cualquiera de los nucleótidos del primer tramo y segundo tramo, respectivamente, se modifican en una realización preferida. Lo mismo se aplica a la primera hebra y la segunda hebra, respectivamente. Particularmente los nucleótidos terminales, tanto si se trata de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, pueden tener un grupo OH que como tal se puede modificar. Tal grupo OH puede provenir de cualquier porción de azúcar del nucleótido, con mayor preferencia de la posición 5' en el caso del grupo 5' OH y/o de la posición 3' en el caso del grupo 3' OH o a partir de un grupo fosfato unido al porción de azúcar del nucleótido terminal respectivo. El grupo fosfato puede, en principio, estar unido a cualquier grupo OH del porción de azúcar del nucleótido. Preferentemente, el grupo fosfato está unido al grupo 5' OH del porción de azúcar en el caso del grupo 5' OH libre y/o con el grupo 3' OH del porción de azúcar en el caso del grupo 3' OH libre que todavía proporciona lo que se denomina en la presente como grupo 5' o 3' OH libre.

Como se usa en la presente con cualquier estrategia para el diseño del ARNi o cualquier realización de ARNi descrita en la presente, el término modificación del extremo significa una entidad química añadida nucleótido más 5' o 3' de la primera y/o segunda hebra. Los ejemplos de tales modificaciones del extremo incluyen, pero sin limitarse a, fosfato 3' o 5', abásicos (deoxi) invertidos, amino, fluoro, cloro, bromo, CN, CF, metoxi, imidazol, caboxilato, tioato, alquilo inferior de C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo, OCF₃, OCN, O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alquenilo; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂, N₃; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo aminoalquilamino; polialquilamino o sililo sustituido, entre otros, como se describe en las patentes Europeas EP 0 586 520 B1 o EP 0 618 925 B1.

Como se usa en la presente, alquilo o cualquier término que comprende "alquilo" preferentemente significa cualquier cadena de átomos de carbono que comprende 1 a 12, preferentemente 1 a 6 y más, preferentemente 1 a 2 átomos de C.

Una modificación del extremo adicional es un grupo biotina. Tal grupo biotina puede preferentemente estar unido al nucleótido más 5' o al más 3' de la primera y/o segunda hebra o a ambos extremos. En una realización más preferida el grupo biotina se acopla a un polipéptido o una proteína. Está además dentro del alcance de la presente invención que el polipéptido o proteína esté unida a través de otras modificaciones del extremo antes mencionadas. El polipéptido o proteína puede conferir otras características a las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Entre otros el polipéptido o proteína puede actuar como un ligando para otra molécula. Si dicha otra molécula es un receptor, la función y la actividad del receptor pueden activarse por el ligando

de unión. El receptor puede mostrar una actividad de internalización que permite una transfección efectiva de las moléculas de ácido nucleico unidas al ligando de acuerdo con la presente invención. Un ejemplo de ligando que se acopla a la molécula de ácido nucleico inventiva es VEGF y el receptor correspondiente es el receptor VEGF.

5 Varias posibles realizaciones del ARNi de la presente invención con diferentes tipos de modificación(es) del extremo se presentan en la siguiente tabla 1.

TABLA 1: VARIAS REALIZACIONES DEL ÁCIDO RIBONUCLEICO INTERFERENTE DE ACUERDO CON LA PRESENTE INVENCION

	1^{ra} hebra./1^{er} tramo	2^{da}hebra/2do tramo
1.) extremo 5' 	OH libre	OH libre
extremo 3'	OH libre	OH libre
2.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	modificación del extremo	modificación del extremo
3.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	OH libre	modificación del extremo
4.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	modificación del extremo	OH libre
5.) extremo 5'	OH libre	modificación del extremo
extremo 3'	OH libre	OH libre
6.) extremo 5'	OH libre	modificación del extremo
extremo 3'	modificación del extremo	OH libre
7.) extremo 5'	OH libre	modificación del extremo
extremo 3'	OH libre	modificación del extremo
8.) extremo 5'	OH libre	modificación del extremo
extremo 3'	modificación del extremo	modificación del extremo

10 Las distintas modificaciones del extremo como se describen en la presente se localizan preferentemente en la porción de ribosa de un nucleótido del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Más particularmente, la modificación del extremo puede estar unida a o reemplazar cualquier grupo OH de la porción de ribosa, que incluyen pero sin limitarse a la posición 2'OH, 3'OH y 5'OH, siempre que el nucleótido así modificado sea un nucleótido terminal. Los abásicos invertidos son nucleótidos, tanto desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos que no tienen una porción de nucleobase. Este tipo de compuesto se describe, entre otros, en Sternberger, M., Schmiedeknecht, A., Kretschmer, A., Gebhardt, F., Leenders, F., Czauderna, F., Von Carlowitz, I., Engle, M., Giese, K., Beigelman, L. & Klippel, A. (2002). Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 12, 131-43

15

Cualquiera de las modificaciones del extremo anteriores puede usarse en relación con las distintas realizaciones de ARNi representadas en la Tabla 1; cabe destacar que las modificaciones del extremo 5' mencionadas anteriormente están presentes generalmente sólo en la cadena en sentido de la molécula ARNip.

5 Otras modificaciones pueden relacionarse con la porción de nucleobase, la porción azúcar o la porción fosfato del nucleótido individual.

10 Dicha modificación de la porción de nucleobase puede ser tal que los derivados de adenina, guanina, citosina y timidina y uracilo, respectivamente, se modifican. Las nucleobases modificadas particularmente preferidas se seleccionan del grupo que comprende inosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo, 2-propilo y otras alquiladeninas, 5-halo uracilo, 5-halocitosina, 5-halo citosina, 6-azacitosina, 6-aza timina, pseudo-uracilo, 4-tiouracilo, 8-halo adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol adenina, 8-tioalquil adeninas, 8-hidroxil adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-halo guaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8-tioalquil guanina, 8-hidroxilguanina y otras guaninas sustituidas, otros aza- y deaza adeninas, otros aza- y deaza guaninas, 5-trifluorometil uracilo y 5-trifluoro citosina.

15 En otra realización preferida, la porción azúcar del nucleótido está modificada, en donde dicha modificación es preferentemente en la posición 2' de la porción de ribosa y desoxiribosa, respectivamente, del nucleótido. Con mayor preferencia, el grupo 2' OH se reemplaza con un grupo o porción seleccionada del grupo que comprende amino, fluoro, alcoxi y alquilo. Preferentemente, el alcoxi es metoxi o etoxi. Además preferentemente alquilo significa metilo, etil, propilo, isobutilo, butilo e isobutilo. Es aún más preferido que, no obstante el tipo de modificación, el nucleótido sea preferentemente un ribonucleótido.

La modificación de la porción fosfato es preferentemente seleccionada del grupo que comprende fosfotioatos.

20 Será de conocimiento de una persona con experiencia en la técnica que el ácido nucleico de la presente invención que consiste en una multitud de nucleótidos pueda formarse así por los nucleótidos que están enlazados a través de un enlace fosfodiéster o a través de un enlace fosfotioato, o una combinación de ambos a lo largo de la longitud de la secuencia de nucleótidos de la hebra individual y estiramiento, respectivamente.

25 Una forma adicional de los nucleótidos usados puede ser realmente ARNip que se describe, entre otros, en la solicitud de patente internacional WO 03/070918.

30 Los nucleótidos que forman el primer tramo y la primera hebra, respectivamente, del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, por lo cual el nucleótido individual modificado tiene una modificación que es preferentemente una modificación como se describe en la presente. Además de la modificación en particular, la modificación puede ser o comprender algún tipo de etiqueta, por lo que la etiqueta se selecciona del grupo de las etiquetas quimioluminiscentes, las etiquetas fluorescentes y las radioetiquetas. Aquellos con experiencia en la materia conocen este tipo de etiquetas y, por ejemplo, se describen en Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, Baltimore, Maryland, 1998. El ácido nucleico marcado de este modo, también se puede usar de acuerdo con la presente invención para propósitos de diagnóstico o para controlar el sitio de acción, así como para organizar cualquier tratamiento, preferentemente en relación con cualquiera de las enfermedades descritas en la presente.

35 En una realización preferida, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se modifica de modo que los nucleótidos de pirimidina en el tramo o cadena en sentido son nucleótidos 2' O-metil pirimidina y, ya sea adicionalmente o alternativamente, los nucleótidos de purina en el tramo o cadena en sentido son nucleótidos 2'-desoxi purina. En una realización adicional, los nucleótidos de pirimidina presentes en el tramo sentido o cadena en sentido son nucleótidos 2'-desoxi-2'-fluoro pirimidina.

En una realización alternativa, la modificación no se basa en la química de los nucleótidos, es decir, la modificación depende de si el nucleótido a modificarse es o bien un nucleótido de purina o un nucleótido de pirimidina, pero predominantemente se basa en la disposición espacial del nucleótido individual en el conjunto de la estructura de hebra doble del diseño básico del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

45 Más particularmente, ya sea la primera hebra y el primer tramo, respectivamente, o la segunda hebra y el segundo tramo, respectivamente, muestran un patrón espacial de modificación de los nucleótidos que forman dichos tramos y las hebras, respectivamente.

50 Centrándose en el primer tramo primero, hay un patrón de grupos de nucleótidos modificados y grupos de nucleótidos no modificados. Estos grupos de nucleótidos no modificados también se refieren en la presente como grupos de nucleótidos flanqueadores. Con mayor preferencia, el patrón consiste de grupos de nucleótidos modificados y nucleótidos no modificados. Aún con mayor preferencia, el patrón es un patrón regular y aún con mayor preferencia un patrón alternante a lo largo de la longitud del primer tramo del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El grupo de nucleótidos modificados o bien puede consistir de uno o de varios nucleótidos los cuales se modifican y son, preferentemente, los nucleótidos que están modificados en la posición 2', es decir tienen una modificación en el porción de azúcar. Con mayor preferencia, esta modificación es una modificación 2'-O-Me.

55

El grupo de nucleótidos no modificados puede consistir en uno o de varios nucleótidos, los cuales son no modificados, con lo que los nucleótidos no modificados son preferentemente ribonucleótidos, o los nucleótidos no modificados son nucleótidos que tienen una modificación, en donde dicha modificación es diferente de la modificación mostrada por los nucleótidos que forman el grupo de nucleótidos modificados. Aún con mayor preferencia, los nucleótidos no modificados son ribonucleótidos. Es de señalar que el término no modificado y nucleótido no modificado se usan de manera intercambiable si no se indica lo contrario. El primer tramo del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comenzar con un grupo de nucleótidos modificados o comenzar con un grupo de nucleótidos no modificados tal como se define en la presente. Sin embargo, se prefiere que el primer tramo comience con un grupo de nucleótidos modificados. Con la máxima preferencia, el grupo de nucleótidos modificados consiste de un solo nucleótido. En relación con esta realización, el primer tramo está preferentemente en orientación antisentido al ácido nucleico que codifica para RTP801. Está también dentro de la presente invención que la modificación según la que presentan los nucleótidos que forman el grupo de nucleótidos modificados es la misma para todos los grupos de nucleótidos modificados presentes en el primer tramo. Sin embargo, también está dentro de la presente invención que algunos grupos de nucleótidos modificados tengan una modificación diferente de uno o varios grupos de nucleótidos modificados presentes en el primer tramo.

En la segunda hebra del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, un patrón como se describe para el primer tramo se puede realizar también. Las mismas características que las descritas en relación con el primer tramo se pueden realizar en una realización en el segundo tramo también, por lo que se prefiere que, bajo la condición de que el segundo tramo está en orientación sentido con relación a la secuencia del ácido nucleico que codifica para RTP801, la segunda hebra del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comienza con un grupo de nucleótidos no modificados.

El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que comprende una estructura de hebra doble puede comprender un primer tramo que tiene el patrón de modificación como se describe en la presente. Alternativamente, el ácido nucleico de hebra doble de acuerdo con la presente invención puede comprender un segundo tramo que tiene el patrón de modificación como se describió anteriormente. Es, sin embargo, lo máximo preferido que el ácido nucleico de hebra doble de acuerdo con la presente invención consista de un primer tramo y un segundo tramo, en el que tanto el primer tramo y el segundo tramo tienen un patrón de modificación espacial, como se describe en la presente.

Está dentro de la presente invención que las características del patrón de modificación espacial es el mismo en ambos tramos en términos de tamaño de los grupos de nucleótidos modificados y grupos de nucleótidos no modificados y el tipo de modificaciones que realmente se usan. Preferentemente, el patrón espacial de modificación en el primer tramo se cambia de tal manera que un grupo de nucleótidos modificados en el primer tramo se opone a un grupo de nucleótidos no modificados en el segundo tramo y viceversa. Sin embargo, está también en la presente invención que los patrones están alineados exactamente, es decir, que un grupo de nucleótidos modificados en el primer tramo se opone a un grupo de nucleótidos no modificados en el segundo tramo y un grupo de nucleótidos no modificados en el primer tramo se opone a un grupo de nucleótidos no modificados en el segundo tramo. Está todavía dentro de la presente invención que el patrón espacial de modificación en el primer tramo y el segundo tramo se cambia respecto al otro de modo que sólo una primera parte de un grupo de nucleótidos modificados en un único tramo se opone a una parte de un grupo de nucleótidos no modificados en el otro tramo, mientras que la segunda parte del grupo de nucleótidos modificados se opone a otro grupo de nucleótidos modificados. Está dentro de la presente invención que la descripción que se proporciona en la presente sobre el patrón de modificación espacial del(de los) tramo(s) de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se aplica también a la(s) hebra(s) de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, se prefiere que los tramos de ácido nucleico comprendan el patrón de modificación espacial y las hebras comprendan tales tramos y uno o más salientes como se describe en la presente. Se prefiere particularmente que el saliente sea un grupo fosfato en el extremo 3' de cualquier cadena antisentido, o la cadena en sentido o ambas hebras, con lo cual es más preferido que el grupo fosfato esté en el extremo 3' tanto de la cadena antisentido y la cadena en sentido. En una realización aún más preferida, el grupo fosfato es un grupo fosfato como se define en la presente.

Está también dentro de la presente invención que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede presentar un enlazador que conecta la primera y la segunda hebra. Tal enlazador es preferentemente un polímero. El polímero puede ser cualquier polímero sintético o natural. Los posibles enlazadores sintéticos son, entre otros, PEG o un polinucleótido. Tal enlazador se diseña preferentemente de tal manera que permita el repliegue parcial o completo del primer tramo sobre el segundo tramo, y viceversa.

Por último, está dentro de la presente invención que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es sintético, uno sintetizado químicamente, uno aislado, o uno derivado de las fuentes naturales tales como, por ejemplo, preparado por medio de la tecnología recombinante. En relación con la preparación de cualquier ácido nucleico de acuerdo con la presente invención cualquier modificación como se describe en la presente se puede introducir ya sea antes, durante o después de la preparación del ácido nucleico respectivo de acuerdo con la presente invención como conocen aquellos con experiencia en la materia.

5 El vector de acuerdo con la presente invención comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Adicionalmente, el vector puede incluir elementos para controlar la orientación, la expresión y la transcripción de dicho ácido nucleico en una célula de manera selectiva, como se conoce en la materia. El plásmido puede incluir un promotor para controlar la transcripción del material heterólogo, es decir, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, y puede ser tanto un promotor constitutivo o inducible para permitir la transcripción selectiva. Se pueden incluir opcionalmente los potenciadores que puedan ser necesarios para obtener los niveles de transcripción necesarios. Los potenciadores son generalmente cualquier secuencia de ADN no traducida que trabaja contiguamente con la secuencia de codificación, por lo tanto en cis, para cambiar el nivel de la transcripción basal dictada por el promotor. Aquellos con experiencia en la materia conocen la expresión de tales construcciones y pueden hacerlo, por ejemplo, mediante el suministro de una respectiva construcción en tándem o al tener diferentes promotores para la transcripción de la primera y segunda hebra y el primer y segundo tramo, respectivamente, del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

15 Cuando el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se fabrica o se expresa, preferentemente se expresa *in vivo*, con mayor preferencia en un paciente con necesidad del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, dicha fabricación o expresión usa preferentemente un vector de expresión, preferentemente un vector de expresión de mamífero. Los vectores de expresión se conocen en la materia y comprenden preferentemente los plásmidos, los cósmidos, los sistemas de expresión viral. Los sistemas de expresión viral preferidos incluyen, pero sin limitarse a, adenovirus, retrovirus y lentivirus.

20 En la materia se conocen los métodos para introducir los vectores en las células o tejidos. Tales métodos se pueden encontrar generalmente descritos en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbour Laboratory, Nueva York (1983, 1992), o en Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons., Baltimore, Maryland, 1998.

25 Los métodos adecuados incluyen, entre otros, la transfección, la lipofección, la electroporación y la infección con vectores virales recombinantes. En relación con la presente invención, una característica adicional del vector en una realización es una característica limitante de la expresión tal como un promotor y un elemento regulador, respectivamente, que son específicos para el tipo celular deseado de modo que permiten la expresión de la secuencia del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención sólo en cuanto se proporcione el fondo que permite la expresión deseada.

30 En un aspecto adicional, la presente descripción se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o un vector de acuerdo con la presente invención y, opcionalmente, un portador, diluyente o adyuvantes u otro(s) vehículo(s) farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, dicho portador, diluyentes, adyuvantes y vehículos son inertes, y no tóxicos. La composición farmacéutica en sus diversas realizaciones está adaptada para la administración de varias maneras. Tal administración comprende la administración sistémica y local, así como la oral, la subcutánea, la parenteral, la intravenosa, la intraarterial, la intramuscular, la intraperitoneal, la intranasal, y la intratecal.

35 Aquellos con experiencia en la materia conocerán que la cantidad de la composición farmacéutica y del ácido nucleico respectivo y del vector, respectivamente, depende de la condición clínica del paciente individual, el sitio y el método de administración, el esquema de administración, la edad, el sexo, el peso corporal y otros factores del paciente conocidos por los médicos. La cantidad farmacéuticamente efectiva para los fines de prevención y/o tratamiento está determinada por tales consideraciones como las que se conocen en la materia médica. Preferentemente, la cantidad es eficaz para conseguir una mejora que incluye pero no se limita a mejorar el estado de la enfermedad o para proporcionar una recuperación más rápida, mejoría o eliminación de los síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas por aquellos con experiencia en la materia médica.

45 En un aspecto preferido, la composición farmacéutica puede comprender otros compuestos farmacéuticamente activos. Preferentemente, tales compuestos farmacéuticamente activos se seleccionan del grupo que comprende compuestos que permiten la entrega a las células para la captación intracelular, los compuestos que permiten la liberación endosomal, los compuestos que permiten mayor tiempo de circulación y los compuestos que permiten la orientación a las células endoteliales o células patológicas. Los compuestos preferidos para la liberación endosomal son la cloroquina, y los inhibidores de las bombas de H⁺ dependientes de ATP.

50 La composición farmacéutica se formula preferentemente para proporcionar una administración de dosis única o una administración de múltiples dosis.

Se reconoció que la composición farmacéutica se puede usar para cualquier enfermedad que implica el desarrollo o crecimiento no deseado de la vasculatura que incluye la angiogénesis, así como cualquiera de las enfermedades y las afecciones descritas en la presente.

55 La composición farmacéutica también se puede usar en un método para prevenir y/o tratar una enfermedad como se describe en la presente, donde el método comprende la administración de un ácido nucleico de acuerdo con la

presente invención, un vector de acuerdo con la presente invención o una composición farmacéutica o medicamento de acuerdo con la presente invención para cualquiera de las enfermedades descritas en la presente.

En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un método para el diseño o detección de un ácido nucleico que es adecuado para la regulación descendente de RTP801, más particularmente para la regulación descendente de la función de RTP801. Este método comprende el uso de una secuencia de ácido nucleico como se describe en la presente y la evaluación de dicho ácido nucleico en un ensayo adecuado. Tal ensayo se conoce en la materia y, por ejemplo, se describe en la parte de ejemplo, de esta solicitud. En una etapa adicional, se diseña un ácido nucleico de hebra doble, preferentemente de acuerdo con los principios de diseño tal como se establece en la presente, lo cual es adecuado para la regulación descendente de RTP801, preferentemente en relación con un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional, tal como el ARN de interferencia. También el que se obtiene de este modo, es decir, el ácido nucleico diseñado o detectado, se evalúa en el ensayo respectivo y el resultado se compara, es decir, el efecto tanto del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, así como del ácido nucleico recién diseñado o detectado en tal ensayo. Preferentemente, el ácido nucleico que se diseña o se detecta es más adecuado en caso de que o bien es más estable o más eficaz, preferentemente ambos. Se reconoce que el método será particularmente eficaz si cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención se usa como punto de partida. Por lo tanto, está dentro de la presente descripción que las nuevas moléculas de ácido nucleico se diseñarán en base a los principios descritos en la presente, en el que la secuencia objetivo en el ARNm de RTP801 se cambia ligeramente con respecto a la secuencia objetivo en el ARNm de RTP801 para el ácido nucleico correspondiente según la presente invención. Preferentemente, el ácido nucleico nuevo se cambiará al menos en uno o más nucleótidos en relación con el tramo en el ARNm objetivo, ya sea en la dirección 5' o 3' del ARNm que codifica para RTP801. Sin embargo, está dentro de la presente invención que el cambio se produce en ambas direcciones simultáneamente lo que significa que el nuevo ácido nucleico incorpora el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que se usa como punto de partida. Está también dentro de la presente invención que el alargamiento del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y que se usa como punto de partida se desvía ya sea al extremo 3' o el extremo 5'. En el caso de esta tendencia, ya sea el extremo 3' o el extremo 5' del nuevo ácido nucleico es más largo, es decir, más extendido que el otro extremo. Cuando la nueva molécula de ácido nucleico que se genera mediante la extensión ya sea del extremo 3' o del extremo 5' de la cadena antisentido y/o la cadena en sentido, la secuencia de etapas siguiente se aplica típicamente. Si el cambio es al extremo 5' del ARNm de RTP801, el extremo 3' de la cadena antisentido tiene que extenderse por el número de los nucleótidos por el cual se cambia el extremo 5' del ARNm de RTP801. El(los) nucleótido(s) para añadir de este modo al extremo 3' de la cadena antisentido del nuevo ácido nucleico es/son complementarios a los siguientes nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia objetivo en el ARNm de RTP801 que se usa para la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que se usa como punto de partida. Lo mismo tiene que hacerse a la cadena en sentido. Sin embargo, los nucleótidos que se añaden a la cadena en sentido tienen que corresponder, es decir, ser complementarios a los nucleótidos recién añadidos al extremo 3' de la cadena antisentido lo cual significa que se tienen que añadir al extremo 5' de la cadena en sentido. La última etapa en la cadena en sentido, sin embargo se tiene que hacer sólo en la medida en que, separado de la cadena antisentido también la cadena en sentido se cambia, que es el caso en las realizaciones preferidas de la presente invención. Aunque este cambio se puede realizar hasta un cierto punto definido por aquellos con experiencia en la materia, con mayor preferencia el cambio se realiza de tal manera que también el ácido nucleico nuevo todavía contiene un tramo de al menos 14 nucleótidos, preferentemente 14 nucleótidos contiguos como se presenta en cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente.

La síntesis de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente está dentro del conocimiento de la persona con experiencia en la materia. Tal síntesis, se describe, entre otros, en Beaucage SL y Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-2311, Beaucage SL y Iyer RP, Tetrahedron 1993, 49: 6123-6194 y Caruthers MH y otros, Methods Enzymol. 1987; 154: 287-313, la síntesis de los tioatos, se describe, entre otros, en Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 1985; 54: 367-402, la síntesis de las moléculas de ARN se describe en Sproat B., en Humana Press 2005 Editado por Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 y los procesos posteriores respectivos se describen, entre otros, en Pingoud A. y otros, en la IRL Press 1989 Editado por Oliver RWA, Kap. 7: 183-208 y Sproat B., en Humana Press 2005 Editado por Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 (supra).

El ARNip para RTP801 se puede hacer usando los métodos conocidos en la materia como se describió anteriormente, en base a la secuencia conocida de RTP801 (SEQ ID NO: 1), y se puede hacer estable por diversas modificaciones como se describió anteriormente. Para información adicional, ver el Ejemplo 9.

Adicionalmente, en relación con los métodos de la presente invención descritos en la presente, se pueden usar con dichos métodos moléculas de ARN adicionales, por ejemplo, moléculas de ARN inhibitoras de la presente invención incluyen los oligorribonucleótidos de hebra simple preferentemente que comprenden tramos de al menos 7-10 nucleótidos consecutivos presentes en las secuencias detalladas en las Tablas A- C, dichos oligorribonucleótidos son capaces de formar [y/o comprender] regiones de hebra doble, en particular conformaciones que reconocen los complejos intracelulares, que conducen a la degradación de dichos oligorribonucleótidos en pequeñas moléculas de ARN que son capaces de ejercer la inhibición de sus correspondientes genes endógenos, y las moléculas de ADN que codifican tales moléculas de ARN. El gen endógeno correspondiente es preferentemente el gen 801 y, adicionalmente, ser el gen de VEGF y/o el gen de VEGF-R1. La invención también proporciona una composición

que comprende el anterior oligorribonucleótido de hebra simple en un portador, preferentemente un portador farmacéuticamente aceptable.

Además, la presente invención proporciona la terapia combinada para las condiciones oculares divulgadas en la presente que impliquen la neovascularización coroidea. En dicha terapia combinada, tanto el gen de RTP801 y de VEGFR se inhiben con el fin de mejorar los síntomas de la enfermedad a tratar. Estos genes se pueden inhibir con una combinación de ARNip o anticuerpos (se incluyen los anticuerpos de aptámeros) o ambos. La presente invención por lo tanto proporciona también una nueva composición farmacéutica que comprende un inhibidor de RTP801 y un inhibidor de VEGF o el VEGFR-1, el inhibidor de RTP801 es un ARNip, con mayor preferencia una molécula de ARNip detallada en las Tablas A-C y en particular, los ARNip núms.: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 y 50 de la Tabla A, y el inhibidor de VEGF/VEGFR-1 opcionalmente es un anticuerpo o un aptámero. El uso combinado de dichos compuestos (es decir, RTP801 ARNip y los anticuerpos VEGF o cualquier otro ejemplo combinado descrito en la presente) en la preparación de un medicamento es también parte de la presente invención.

Así, los ARNip de RTP801 tales como una molécula de ARNip detallada en las Tablas A-C y en particular los ARNip núms.: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 y 50 de la Tabla A se pueden administrar en combinación con los agentes que se dirigen al VEGF o los receptores de VEGF 1 (VEGFR1). Dichos agentes actualmente existen en el mercado o en las distintas etapas de aprobación y trabajo a través de diferentes mecanismos. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos tales como el ranibizumab (Lucentis, Genentech) se pegan al VEGF liberado para inhibir la unión de VEGF a los receptores activos. Un aptámero que puede actuar como un ligando/anticuerpo (Macugen, Eyetech/Pfizer, aprobado recientemente por la FDA para la AMD húmeda) es también una posibilidad. Macugen une al VEGF extracelular para bloquear su actividad. Estos fármacos se administran localmente mediante inyección intravítrea. Los compuestos a base del ARNip de anti-VEGF (como el Cand5 de Acuity inhibidor de VEGF o el ARNip 027 inhibidor de VEGFR-1) están también disponibles. Además, la Escualamina, pequeña molécula de aminosterol (Genaera), que se administra sistémicamente, según se informa, interfiere en múltiples facetas del proceso angiogénico, que incluyen la inhibición de VEGF y otro factor de crecimiento de señalización en las células endoteliales.

La administración conjunta de un inhibidor de RTP801, a saber un ARNip, y cualquiera de los anteriores agentes inhibidores de VEGF/VEGFR-1 pueden tener un efecto sinérgico con lo que dicho tratamiento combinado es más eficaz que el tratamiento de cualquiera de estas composiciones individuales, independientemente de la dosis en la opción de tratamiento único. Este efecto sinérgico también está respaldado por los resultados preliminares obtenidos por el cesionario, tal como se detalla en el Ejemplo 6.

El RTP801i tiene un mecanismo de acción diferente y es potencialmente sinérgico con los inhibidores de VEGF-VEGFR. Un estudio en ratones KO para RTP801 indica que el fenotipo de protección en los ratones KO persiste a pesar del hecho de que la expresión de ARNm de VEGF en el ojo es tan alta como en los ratones WT. Nuestros datos preliminares adicionales indican que la inhibición de RTP801 puede ser sinérgica con la inhibición de VEGF-VEGFR del eje regulador en el tratamiento de la patología retinal. Los inventores de la presente invención encontraron en experimentos adecuados que la administración de ARNip contra RTP801 en el modelo de AMD (véase el Ejemplo 6 más abajo) no sólo conduce a la regulación negativa del mismo RTP801, sino también, como consecuencia, a la regulación ascendente del PEDF factor antiangiogénico y neuroprotector, así como la regulación descendente de la expresión de MCP1, una proteína quimiotáctica de macrófagos. Así, la inhibición de RTP801 simultáneamente confiere efectos antiangiogénicos, neuroprotectores y antiinflamatorios.

Se ha de entender que, en el contexto de la presente invención, cualquiera de las moléculas de ARNip que se describe en la presente, o cualquiera de las grandes moléculas de ARN de hebra doble (típicamente de 25-500 nucleótidos de longitud) que procesan los complejos celulares endógenos (tales como DICER - ver anteriormente) para formar las moléculas de ARNip descritas en la presente, o las moléculas que comprenden las moléculas de ARNip descritas en la presente, se pueden emplear en el tratamiento de las enfermedades o trastornos descritos en la presente.

Los trastornos adicionales que se pueden tratar con las moléculas y las composiciones de la presente invención incluyen todos los tipos de neovascularización coroidea (NVC), que se producen no sólo en la AMD húmeda, sino también en otras patologías oculares tales como el síndrome de histoplasmosis ocular, las estrías angiodes, las rupturas en la membrana de Bruch, la degeneración miópica, los tumores oculares y algunas enfermedades degenerativas de la retina.

Un aspecto adicional de la presente descripción proporciona los métodos para tratar una enfermedad relacionada con la apoptosis. Los métodos para la terapia de enfermedades o trastornos asociados con el crecimiento celular patológico, incontrolado, por ejemplo, el cáncer, la psoriasis, las enfermedades autoinmunes, *entre otras*, y se proporcionan los métodos para la terapia de las enfermedades asociadas con la isquemia y la falta de flujo sanguíneo apropiado, por ejemplo, el infarto de miocardio (MI) y el accidente cerebrovascular. "Cáncer" o "tumor" se refiere a una masa creciente incontrolada de células anormales. Estos términos incluyen tanto los *tumores primarios*, que pueden ser benignos o malignos, así como los *tumores secundarios* o las *metástasis*, las cuales se extienden a otros sitios en el cuerpo. Los ejemplos de enfermedades de tipo cáncer incluyen, entre otras: carcinoma (por

ejemplo: de mama, colon y pulmón), leucemia, tal como la leucemia de células B, linfoma, tal como el linfoma de células B, blastoma, tal como el neuroblastoma y melanoma.

5 La invención también proporciona una composición que comprende los compuestos de la invención en un portador, preferentemente un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede comprender una mezcla de dos o más ARNip de genes diferentes. Está prevista una composición que comprende ARNip para el gen RTP801 y ARNip para el gen de VEGF y/o el gen de VEGF-R1.

10 Otro compuesto de la invención comprende el compuesto anterior de la invención (estructura A) unido covalentemente o no covalentemente a uno o más compuestos de la invención (estructura A). Este compuesto se puede suministrar en un portador, preferentemente un portador farmacéuticamente aceptable, y los complejos celulares endógenos lo pueden procesar intracelularmente para producir uno o más ARNip de la invención. Otro compuesto de la invención comprende el compuesto anterior de la invención (estructura A) unido covalentemente o no covalentemente a un ARNip para otro gen, especialmente el gen de VEGF y/o el gen de VEGF-R1.

15 Esta invención también comprende una entidad química nueva que es un inhibidor de RTP801, a saber un ARNip, químicamente unido, covalentemente o no covalentemente, a cualquiera de los anteriores agentes inhibidores de VEGF/VEGFR-1. Una entidad química particular prevista es un ARNip inhibidor de RTP801 unido covalentemente a un anticuerpo contra el VEGF o los receptores de VEGF-1. Aquellos con experiencia en la materia conocen los métodos de producción de tales entidades químicas nuevas.

20 Esta invención también comprende una estructura de hebra doble en tándem que comprende dos o más secuencias de ARNip, que se procesan intracelularmente para formar dos o más ARNip diferentes, uno que inhibe el 801 y un segundo que inhibe el VEGF/VEGFR-1. En un aspecto relacionado, esta descripción también comprende una estructura de hebra doble en tándem que comprende dos o más secuencias de ARNip, que se degradan intracelularmente para formar dos o más diferentes ARNip, ambos inhiben el 801.

25 En particular, se prevé que un oligonucleótido largo (típicamente aproximadamente 80 a 500 nucleótidos de longitud) comprende uno o más tallos y estructuras de lazo, donde las regiones del tallo que comprenden las secuencias de los oligonucleótidos de la invención, se pueden administrar en un portador, preferentemente un portador farmacéuticamente aceptable, y los complejos celulares endógenos lo pueden procesar intracelularmente (por ejemplo, por Drosha y Dicer como se describió anteriormente) para producir uno o más pequeños oligonucleótidos de hebra doble (ARNip) que son oligonucleótidos de la invención. Este oligonucleótido se puede denominar una construcción de ARNhc en tándem. Se prevé que este oligonucleótido largo es un oligonucleótido de hebra simple que comprende uno o más estructuras de tallos y lazos, donde cada región del tallo comprende una secuencia de ARNip sentido y la correspondiente antisentido de un gen 801. En particular, se prevé que este oligonucleótido comprende las secuencias de ARNip sentido y antisentido como se representa en cualquiera de las Tablas A a C. Alternativamente, la construcción de ARNhc en tándem puede comprender la secuencia de ARNip sentido y la correspondiente antisentido de un gen 801 y, adicionalmente, la secuencia de ARNip sentido y la correspondiente antisentido de un gen diferente, tal como el VEGF o el VEGF-R1.

35 Como se mencionó en la presente, el ARNip contra RTP801 puede ser el principal componente activo en una composición farmacéutica, o puede ser un componente activo de una composición farmacéutica que contiene dos o más ARNip (o moléculas que codifican o endógenamente producen dos o más ARNip, ya sea una mezcla de moléculas o una o más moléculas en tándem que codifican dos o más ARNip), dicha composición farmacéutica adicionalmente comprende una o más moléculas de ARNip adicionales que se dirigen a uno o más genes adicionales. La inhibición simultánea de RTP801 y dicho gen adicional(s) probablemente tendrá un efecto aditivo o sinérgico para el tratamiento de las enfermedades descritas en la presente, de acuerdo a lo siguiente:

45 Degeneración macular (MD), retinopatía diabética (DR),: las composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la MD, y la DR pueden comprender las combinaciones de compuestos siguientes: 1) ARNip de RTP801 combinado con cualquiera de ARNip de VEGF, ARNip de VEGF-R1 (ya sea mezclado físicamente o en una molécula en tándem); 2) ARNip de RTP801 en combinación con dos o más ARNip de VEGF, ARNip de VEGF-R1, ARNip de VEGF R2, ARNip de PKCbeta, ARNip de MCP1, ARNip de eNOS, ARNip de KLF2, ARNip de RTP801L (mezclado físicamente o en una molécula en tándem que codifica tres ARNip, o una combinación de éstos), siendo al menos uno de ARNip de VEGF o ARNip de VEGF-R1.

50 La invención también comprende la composición o compuestos anteriores para uso en un método de tratamiento de un paciente que sufre de un trastorno tal como los trastornos descritos en la presente, que comprende administrar al paciente la composición anterior o el compuesto en una dosis terapéuticamente eficaz para de ese modo tratar al paciente.

55 Se notará que todos los polinucleótidos que se usan en la presente invención pueden sufrir modificaciones con el fin de poseer propiedades terapéuticas mejoradas. Las modificaciones o los análogos de los nucleótidos se pueden introducir para mejorar las propiedades terapéuticas de los polinucleótidos. Las propiedades mejoradas incluyen un aumento de la resistencia a las nucleasas y/o aumento de la capacidad para penetrar las membranas celulares. La

resistencia a las nucleasas, cuando sea necesario, se proporciona por cualquier método conocido en la materia que no interfiera con la actividad biológica de la AS polinucleótido, el ARNip, el ADNc y/o las ribozimas tan necesarias para el método de uso y entrega (Iyer y otros, 1990; Eckstein, 1985; Spitzer y Eckstein, 1988; Woolf y otros, 1990; Shaw y otros, 1991). Las modificaciones que se pueden hacer a los oligonucleótidos con el fin de aumentar la resistencia a las nucleasas incluyen modificar el heteroátomo de fósforo o de oxígeno en el esqueleto de fosfato. Estas incluyen preparar los metil fosfonatos, los fosforotioatos, los fosforoditioatos y los oligómeros de morfolino. En una realización, se proporciona por tener enlaces fosforotioato que enlazan las cuatro a seis bases del extremo 3' de los nucleótidos. Alternativamente, los enlaces fosforotioato enlazan todas las bases de los nucleótidos. Otras modificaciones conocidas en la materia se pueden usar donde se conserve la actividad biológica, pero la estabilidad a las nucleasas aumente sustancialmente.

Todos los análogos de, o modificación a, un polinucleótido se puede emplear con la presente invención, siempre que dicho análogo o modificación no afecte sustancialmente la función del polinucleótido. Los nucleótidos se pueden seleccionar de bases modificadas de origen natural o sintético. Las bases de origen natural incluyen adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. Las bases modificadas de nucleótidos incluyen inosina xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo, 2-propilo y otras adeninas de alquilo, 5-halo uracilo, 5-halo citosina, citosina 6-aza y timina 6-aza, pseudo uracilo, 4-tiuracilo, 8-halo adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol adenina, 8-tiolalquilo adeninas, 8-hidroxilo adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-halo guaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8-tioalquilo guaninas, 8-hidroxilo guanina y otras guaninas sustituidas, otras aza y deaza adeninas, otras aza y deaza guaninas, 5-trifluorometil uracilo y 5-trifluoro citosina.

Además, los análogos de los polinucleótidos se pueden preparar donde que la estructura del nucleótido se altera fundamentalmente y se adaptan mejor como reactivos terapéuticos o experimentales. Un ejemplo de un análogo de nucleótido es un ácido nucleico peptídico (PNA) en el que la desoxirribosa (o ribosa) del esqueleto de fosfato en el ADN (o ARN se sustituye con un esqueleto de poliamida el cual es similar al encontrado en los péptidos. Se demostró que los análogos de PNA son resistentes a la degradación por enzimas y tienen vidas extendidas in vivo e in vitro. Adicionalmente, se demostró que los PNA se unen más fuerte a una secuencia de ADN complementaria que a una molécula de ADN. Esta observación se atribuye a la falta de repulsión de carga entre la hebra de PNA y la hebra de ADN. Otras modificaciones que se pueden hacer a los oligonucleótidos incluyen esqueletos de polímeros, esqueletos cíclicos, o esqueletos acíclicos.

Los polipéptidos empleados en la presente invención también se pueden modificar, opcionalmente modificar químicamente, con el fin de mejorar su actividad terapéutica. "Químicamente modificados" - cuando se hace referencia a los polipéptidos, significa un polipéptido, donde al menos uno de sus residuos de aminoácidos se modifica ya sea por procesos naturales, tales como procesamiento u otras modificaciones postraduccionales, o mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la materia. Entre las numerosas modificaciones típicas conocidas, los ejemplos no exclusivos incluyen: acetilación, acilación, amidación, ribosilación de ADP, glicosilación, formación de anclaje GPI, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, metilación, miristilación, pegilación, prenilación, fosforilación, ubiquitinación, o cualquier otro proceso similar.

Las posibles modificaciones de polipéptidos adicionales (tales como las que resultan de la alteración de la secuencia del ácido nucleico) incluyen los siguientes:

"Sustitución conservadora" - se refiere a la sustitución de un aminoácido en una clase por un aminoácido de la misma clase, donde una clase se define por las propiedades fisicoquímicas comunes de la cadena lateral del aminoácido y las altas frecuencias de sustitución en polipéptidos homólogos encontrados en la naturaleza, como se determinó, por ejemplo, mediante un patrón de la matriz Dayhoff de frecuencia de intercambio o matriz BLOSUM. Seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos se han clasificado e incluyen: la clase I (Cys); la clase II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); la clase III (Asn, Asp, Gln, Glu); la clase IV (His, Arg, Lys); la clase V (Ile, Leu, Val, Met) y la clase VI (Phe, Tyr, Trp). Por ejemplo, la sustitución de un Asp por otro residuo de la clase III tal como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservadora. "Sustitución no conservadora" - se refiere a la sustitución de un aminoácido en una clase con un aminoácido de otra clase, por ejemplo, la sustitución de una Ala, un residuo de la clase II, con un residuo de la clase III tal como Asp, Asn, Glu o Gln.

"Supresión" - es un cambio en cualquiera de las secuencias de nucleótidos o aminoácidos en la que uno o más nucleótidos o residuos de aminoácidos, respectivamente, están ausentes.

"Inserción" o "adición" - es ese cambio en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos que ha resultado en la adición de uno o más nucleótidos o residuos de aminoácidos, respectivamente, en comparación con la secuencia de origen natural.

"Sustitución" - reposición de uno o más nucleótidos o aminoácidos por diferentes nucleótidos o aminoácidos, respectivamente. En cuanto a las secuencias de aminoácidos la sustitución puede ser conservadora o no conservadora.

En un aspecto adicional de la presente descripción, el polipéptido o polinucleótido RTP801 se puede usar para diagnosticar o detectar la degeneración macular en un sujeto. Un método de detección comprendería típicamente el ensayo del ARNm de RTP801 o el polipéptido RTP801 en una muestra derivada de un sujeto.

5 "Detección" - se refiere a un método de detección de una enfermedad. Este término se puede referir a la detección de una predisposición a una enfermedad, o a la detección de la gravedad de la enfermedad.

10 Por "homólogo/homología", tal como se usa en la presente invención, se entiende al menos aproximadamente 70%, preferentemente al menos aproximadamente 75% de homología, ventajosamente al menos aproximadamente 80% de homología, con mayor ventaja al menos aproximadamente 90% de homología, incluso con mayor ventaja al menos aproximadamente 95%, por ejemplo, al menos aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente el 99% o incluso aproximadamente 100% de homología. La invención también comprende que estos polinucleótidos y polipéptidos se pueden usar de la misma manera que los polinucleótidos y polipéptidos en la presente o antes mencionados.

15 Alternativa o adicionalmente, "homología", con respecto a las secuencias, se puede referir al número de posiciones con nucleótidos o residuos de aminoácidos idénticos, dividido por el número de nucleótidos o residuos de aminoácidos en la más corta de las dos secuencias, donde la alineación de la dos secuencias se puede determinar de acuerdo con el algoritmo de Wilbur y Lipman ((1983) Proc Natl Acad Sci., Estados Unidos, 80:726); por ejemplo, usando una ventana de tamaño de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, y una penalización por hueco de 4, el análisis asistido por computadora y la interpretación de los datos de secuencia, que incluyen la alineación, se pueden realizar convenientemente usando los programas disponibles comercialmente (por ejemplo, 20 Intelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc., CA). Cuando las secuencias de ARN se dice que son similares, o que tienen un grado de identidad o de homología de secuencia con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN. Las secuencias de ARN dentro del alcance de la invención se pueden derivar de secuencias de ADN o sus complementos, mediante la sustitución de timidina (T) en la secuencia de ADN con uracilo (U).

25 Adicionalmente o alternativamente, la similitud u homología de la secuencia de aminoácido puede determinarse, por ejemplo, usando el programa BlastP (Altschul y otros, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402) y disponible en el NCBI. Las siguientes referencias proporcionan algoritmos para comparar la identidad u homología relativa de los residuos de aminoácido de dos polipéptidos, y adicionalmente o alternativamente, con respecto a lo anterior, las enseñanzas en estas referencias pueden usarse para determinar el porcentaje de homología: Smith y otros, (1981) Adv. Appl. Math. 30 2:482-489; Smith y otros, (1983) Nucl. Acids Res. 11:2205-2220; Devreux y otros, (1984) Nucl. Acids Res. 12:387-395; Feng y otros, (1987) J. Molec. Evol. 25:351-360; Higgins y otros, (1989) CABIOS 5:151-153; and Thompson y otros, (1994) Nucl. Acids Res. 22:4673-4680.

35 "Que tiene al menos X% de homología" - con respecto a dos secuencias de aminoácido o nucleótidos, se refiere al porcentaje de residuos que son idénticos en las dos secuencias cuando las secuencias se alinean óptimamente. Así, 90% identidad de secuencia de aminoácidos significa que 90% de los aminoácidos en dos o más secuencias de polipéptidos óptimamente alineadas son idénticas.

40 Un aspecto adicional de la presente descripción concierne una composición farmacéutica que comprende un inhibidor RTP801 en una cantidad terapéuticamente efectiva como un ingrediente activo y un portador farmacéuticamente aceptable. El inhibidor puede ser un inhibidor biológico, una molécula orgánica, una molécula química, etc. Dicha composición farmacéutica puede comprender un inhibidor de RTP801 que es un polinucleótido que comprende nucleótidos consecutivos que tienen una secuencia que es una secuencia antisentido de la secuencia expuesta en la Figura 1 (SEQ ID No: 1).

45 Además, el inhibidor de RTP801 puede ser un vector que comprende estos polinucleótidos. Adicionalmente, el inhibidor de RTP801 es una molécula de ARN que se dirige al ARNm del gen RTP801, a saber una molécula de ARNip (opcionalmente representada en las Tablas A-C y, en particular, ARNip Nos: 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 y 50 de la Tabla A).

50 Los ingredientes activos de la composición farmacéutica pueden incluir oligonucleótidos que son resistentes a la nucleasa necesarios para la práctica de la invención o un fragmento de estos que muestran tener el mismo efecto dirigido contra la(s) secuencia(s) adecuada(s) y/o ribozimas. Las combinaciones de ingredientes activos que se describen en la presente invención pueden usarse, e incluyen combinaciones de secuencias antisentido.

La invención se ha descrito de manera ilustrativa, y se entenderá que la terminología usada pretende ser de la naturaleza de las palabras de la descripción y no una limitación.

55 Obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores. Se entiende, por lo tanto, que dentro del alcance de las reivindicaciones anexas, la invención puede practicarse de cualquier otra forma que como la específicamente descrita.

A través de toda esta solicitud, se citan referencias de varias publicaciones, que incluyen patentes de Estados Unidos por autores, por año y por número de patente. La divulgación de estas publicaciones y patentes y solicitudes de patente se citan por este medio en esta aplicación para describir más completamente el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

5 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 detalla la secuencia codificante del gen RTP801 (SEQ ID NO:1);

La Fig. 2 detalla la secuencia de aminoácido del polipéptido RTP801 (SEQ ID NO:2);

La Fig. 3 es un diagrama que representa los exones, CDS, SNP humanos y la posición de varias moléculas de ácido nucleico que son humano específicas o específicas para humanos, ratón y rata en paralelo;

10 La Fig. 4A-H representa un panel de los resultados del análisis de membrana de Western obtenidos con la aplicación de diversos ácidos nucleicos de hebra doble de acuerdo con la presente invención de una primera línea celular humana, donde el experimento se realizó dos veces, referidos como experimento 1 y experimento 2, y en donde el nivel de expresión de p110a y p85 se representa como controles de carga y la intensidad (densidad) de la banda RTP801 es una medida de la actividad inhibidora del ácido nucleico de hebra doble particular aplicado;

15 La Fig. 5A-F representa un panel de los resultados del análisis de membrana de Western obtenidos con la aplicación de varios ácidos nucleicos de hebra doble de acuerdo con la presente invención para una segunda línea celular humana, donde el experimento se realizó dos veces, referidos como experimento 1 y experimento 2, y en donde el nivel de expresión de p110a y p85 se representa como controles de carga y la densidad de la banda RTP801 es una medida de la actividad inhibidora del ácido nucleico de hebra doble particular aplicado;

20 La Fig. 6A-C representa un panel de los resultados del análisis de membrana de Western obtenidos con la aplicación de varios ácidos nucleicos de hebra doble de acuerdo con la presente invención para la primera línea celular humana a diferentes concentraciones, específicamente 10 nM (5A), 5 nM (5B) y 1 nM (5C), donde el experimento se realizó dos veces, referidos como experimento 1 y experimento 2, y en donde el nivel de expresión de p110a y p85 se representa como controles de carga y la densidad de la banda RTP801 es una medida de la actividad inhibidora del ácido nucleico de hebra doble particular aplicado;

25 La Fig. 7 representa un panel de los resultados del análisis de membrana de Western obtenidos con la aplicación de varios ácidos nucleicos de hebra doble de acuerdo con la presente invención para una línea celular de ratón, donde el experimento se realizó dos veces, referidos como experimento 1 y experimento 2, y en donde el nivel de expresión de p110a y p85 se representa como controles de carga y la densidad de la banda RTP801 es una medida de la actividad inhibidora del ácido nucleico de hebra doble particular aplicado;

La Fig. 8 muestra los resultados de experimentos en un sistema de modelo AMD de ratón;

La Fig. 9 muestra los resultados de experimentos adicionales en un sistema de modelo AMD de ratón;

La Fig. 10 muestra los resultados de experimentos en un sistema de modelo AMD de primate no humano;

35 La Fig. 11A-B muestra los resultados de experimentos adicionales en un sistema de modelo AMD de primate no humano;

La Fig. 12A-B muestra los resultados de otros experimentos adicionales en un sistema de modelo AMD de primate no humano;

La Fig. 13A-B representa un análisis de los resultados experimentales alcanzados en un modelo AMD de primate no humano;

40 La Fig. 14 representa un análisis adicional de los resultados experimentales alcanzados en un modelo AMD de primate no humano.

La Fig. 15 A-C muestra los resultados de un experimento que involucra la instilación intratraqueal de un plásmido que expresa RTP801 en ratones;

45 La Fig. 16 A-C muestra los resultados de un modelo de humo de cigarrillo a corto plazo (7 días) en ratones KO y WT RTP801;

La Fig. 17 A-C muestra los resultados de un modelo de humo de cigarrillo a corto plazo en ratones WT instilados con anti-RTP801 activo (REDD14) y ARNip control (REDD8).

- La Fig. 18 muestra los resultados de experimentos con ratones KO RTP801 en un modelo CS a largo plazo;
- La Fig. 19 muestra los resultados de experimentos en un sistema de modelo ARF de ratón;
- La Fig. 20 muestra los resultados de experimentos en un sistema de modelo retinopaía diabética de ratón;
- 5 La Fig. 21 muestra los resultados de experimentos adicionales en un sistema de modelo retinopaía diabética de ratón;
- La Fig. 22 muestra los resultados de otros experimentos adicionales en un sistema de modelo retinopaía diabética de ratón;
- La Fig. 23 muestra los resultados de experimentos de inhibición RTP801 / VEGF combinados en un sistema de modelo CNV de ratón;
- 10 La Fig. 24 muestra los resultados de experimentos de inhibición RTP801 / VEGF combinados adicionales en un sistema de modelo CNV de ratón;
- La Fig. 25 muestra los resultados de experimentos que estudian el efecto del ARNip RTP801 en la expresión génica en la retina neural y RPE;
- 15 La Fig. 26 A-B muestran los resultados adicionales de experimentos que estudian el efecto del ARNip RTP801 en la expresión génica en la retina neural y RPE; y
- La Fig. 27 muestra los resultados de experimentos que demuestran que RT801NP es tan activo como RTP801.

Ejemplos

- 20 Se cree que una persona con experiencia en la técnica puede, sin experimentación adicional y usando la descripción anterior, utilizar la presente invención en toda su extensión. Las siguientes realizaciones preferidas específicas son, por lo tanto, construidas meramente como ilustrativas, y de ninguna manera limitativas de la invención reivindicada.

- 25 Los protocolos estándar de biología molecular conocidos en la técnica no descritos específicamente en la presente generalmente se siguen prácticamente como en Sambrook y otros, *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), y en Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988).

- Los protocolos estándar de síntesis orgánica conocidos en la técnica no descritos específicamente en la presente generalmente se siguen prácticamente como en *Organic syntheses: Vol.1- 79*, editors vary, J. Wiley, Nueva York, (1941 - 2003); Gewert y otros, *Organic synthesis workbook*, Wiley-VCH, Weinheim (2000); Smith & March, *Advanced Organic Chemistry*, Wiley-Interscience; 5ta edición (2001).

- 30 Los métodos estándar de química medicinal conocidos en la técnica no descritos específicamente en la presente generalmente se siguen prácticamente como en las series "Comprehensive Medicinal Chemistry", de varios autores y editores, publicadas por Pergamon Press.

Las características de la presente invención descritas en la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos pueden, separadamente o en cualquier combinación de estas ser material para realizar la invención en varias formas.

- 35 Ejemplo 1

Materiales y métodos generales

Si no se indica lo contrario, los siguientes materiales y métodos se usaron en los Ejemplos 1-5:

Cultivo de células

- 40 La primera línea celular humana, concretamente, las células HeLa (Colección Americana de Cultivos Tipo) se cultivaron tal como sigue: las células HeLa (Colección Americana de Cultivos Tipo) se cultivaron como se describe en Czauderna F y otros (Czauderna, F., Fechtner, M., Ayyun, H., Arnold, W., Klippel, A., Giese, K. & Kaufmann, J. (2003). *Nucleic Acids Res*, 31, 670-82).

- 45 La segunda línea celular humana fue una línea celular humana de queratinocitos la cual se cultivó de la siguiente manera: Los queratinocitos humanos se cultivaron a 37 °C en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía 10% de FCS.

La línea celular de ratón fue la B16V (Colección Americana de Cultivos Tipo) que se cultivó a 37 °C en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía 10% de FCS. Las condiciones de cultivo fueron las descritas en Methods Find Exp Clin Pharmacol. 1997 mayo; 19(4):231-9:

5 En cada caso, las células se sometieron a los experimentos como se describe en la presente a una densidad de aproximadamente 50.000 células por pocillo y se añadió el ácido nucleico de hebra doble de acuerdo con la presente invención a 20 nM, por lo que el ácido nucleico de hebra doble se acomplejó usando 1 µg/ml de un lípido registrado.

Inducción de una condición similar a la hipoxia

10 Las células se trataron con CoCl₂ para inducir una condición similar a la hipoxia de la siguiente manera: las transfecciones de ARNip se llevaron a cabo en placas de 10-cm (30-50% de confluencia) como se describe por (Czaudema y otros, 2003; Kretschmer y otros, 2003). E resumen, los ARNip se transfectaron mediante la adición de un complejo preformado concentrado 10x de GB y lípidos en medio libre de suero a las células en medio completo. El volumen total de la transfección fue de 10 ml. La concentración lipídica final fue de 1,0 µg/ml, la concentración final de ARNip fue 20 nM a menos que se indique lo contrario. La inducción de las respuestas hipóxicas se llevó a cabo mediante la adición de CoCl₂ (100µM) directamente al medio de cultivo de tejidos 24 h antes de la lisis.

Preparación de extractos celulares e inmunotransferencia

20 La preparación de los extractos celulares y el análisis de inmunotransferencia se realizaron prácticamente como es descrito por Klippel y otros (Klippel, A., Escobedo, M.A., Wachowicz, M.S., Apell, G., Brown, T.W., Giedlin, M.A., Kavanaugh, W.M. & Williams, L.T. (1998). Mol Cell Biol, 18,5699-711; Klippel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, W.M., Apell, G., Escobedo, M.A. & Williams, L.T. (1996). Mol Cell Biol, 16, 4117-27). Los anticuerpos policlonales contra el RTP801 de longitud completa se generaron por medio de la inmunización de conejos con la proteína recombinante RTP801 producida en bacterias a partir del vector de expresión pET19-b (Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Alemania). Los anticuerpos monoclonales murinos anti-P110a y anti-p85 se describieron por Klippel y otros (supra).

Ejemplo 2

25 Reducción de la expresión de RTP801 en una primera línea celular humana

30 Se prepararon varios ácidos nucleicos de hebra doble. Su ubicación en relación con el ARNm y CDS, así como SNPs humano en el ácido nucleico que codifica para RTP801 humano (núm. de acceso en el banco de datos NM_019058) se representa en la Figura 3. La primera línea celular humana se puso en contacto con dichos ácidos nucleicos de hebra doble como se describió en el Ejemplo 1. Tras la inducción de una condición similar a la hipoxia y el tratamiento con dichos ácidos nucleicos de hebra doble las células se lisaron y los lisados celulares se sometieron a inmunotransferencia. La p110a, que es una unidad catalítica de la quinasa PI3, y la p85 se usaron como controles de carga. La intensidad de la banda RTP801 como se visualizó usando anticuerpos policlonales RTP801 es una medida de la actividad de los ácidos nucleicos de hebra doble individuales en términos de reducir el nivel de expresión de RTP801.

35 Todos y cada uno de los ácidos nucleicos de hebra doble se modificaron de tal manera que un grupo 2'-O-Me estaba presente en los nucleótidos primero, tercero, quinto, séptimo, noveno, undécimo, decimotercero, decimoquinto, decimoséptimo y decimonoveno de la cadena antisentido, por lo que la misma modificación, es decir, un grupo 2'-O-Me estaba presente en los nucleótidos segundo, cuarto, sexto, octavo, décimo, duodécimo, decimocuarto, decimosexto y decimoctavo de la cadena en sentido. Además, es de señalar que en el caso de estos ácidos nucleicos particulares de acuerdo con la presente invención, el primer tramo es idéntico a la primera hebra y el segundo tramo es idéntico a la segunda hebra y estos ácidos nucleicos son también de extremos romos..

Los experimentos se llevaron a cabo dos veces y los resultados individuales se muestran en las Figuras. 4A a H, en donde se designaron como Experimento 1 y Experimento 2, respectivamente.

45 Las representaciones h, hr y hmr en las Figuras. 4A a H indican que el respectivo ácido nucleico de hebra doble se diseñó tal como para dirigirse a una sección del ARNm de RTP801 el cual es específico para el ARNm de RTP801 humano (h), para dirigirse a una sección del ARNm de RTP801 el cual es específico para el ARNm de RTP801 de humanos y ratas (hr) y para dirigirse a una sección del ARNm de RTP801 el cual es específico para el ARNm de RTP801 de humanos, ratón y rata (hmr). El ácido nucleico de hebra doble referido como el núm. 40.1 se usó como control positivo y las células sin tratar (UT +) se usaron como control negativo.

50 De acuerdo con los resultados, los siguientes ácidos nucleicos de hebra doble se arreglaron para ser particularmente útiles en la regulación descendente de la expresión de RTP801: núm. 14, núm. 15, núm. 20, núm. 21, núm. 22, núm. 23, núm. 24, núm. 25, núm. 27, núm. 39, núm. 40, núm. 41, núm. 42, núm. 43, núm. 44, núm. 49 y núm. 50 (véase la Tabla A).

Ejemplo 3

Reducción de la expresión de RTP801 en una segunda línea celular humana

Los experimentos tal como se describieron en relación con el Ejemplo 2 se repitieron usando la segunda línea celular humana tal como se especificó en el Ejemplo 1 y los resultados se muestran en las Figuras. 5A a F.

- 5 Como se puede deducir de estas figuras, los resultados tal como se obtuvieron en relación con los experimentos descritos en el Ejemplo 2, se confirmaron usando esta segunda línea celular humana.

Ejemplo 4

Efecto de la dosificación de los ácidos nucleicos de hebra doble específicos de RTP801

- 10 En este experimento, se investigó el efecto de la dosificación de los ácidos nucleicos de hebra doble específicos de RTP801.

15 Para ello, las células HeLa se trataron como en relación con los Ejemplos 2 y 3, por lo que la concentración del ácido nucleico de hebra doble en el caldo de cultivo fue de 10 nM, 5 nM y 1 nM. Como control positivo se usó el ácido nucleico de hebra doble núm. 40.1, como control negativo, las células sin tratar (UT +). La lectura fue la misma que se describió en relación con los Ejemplos 2 y 3. Los ácidos nucleicos de hebra doble particulares que se usaron fueron aquellos con números de referencia interna 14, 22, 23 y 27 los cuales están dirigidos a tramos en el ARNm de RTP801, los cuales comparten los humanos, ratones y ratas, y los ácidos nucleicos de hebra doble con los números de referencia interna 39 y 42 los cuales están dirigidos a tramos del ARNm de RTP801 específicos para RTP801 humano.

20 Los resultados se muestran en la Figura. 6A a C. A partir de dichas figuras se puede considerar que existe una clara dependencia de la concentración del efecto de los ácidos nucleicos de hebra doble específicos para RTP801, por lo cual fueron particularmente eficaces las moléculas de ácido nucleico que tenían los números de referencia interna 1, 15, 20, 21, 24, 40, 41, 43, 44, 22, 23, 27, 39, 42, 40.1, 44.1, y 14, preferentemente 22, 23, 27, 39, 42, 40.1 y 44.1 y con mayor preferencia 14, 23 y 27 y preferentemente cada una de dichas moléculas de ácido nucleico tiene el patrón de modificación particular como se describió para ellas en la parte de ejemplo de la presente.

25 Ejemplo 5

Especificidad de especies del ácido nucleico de hebra doble específico de RTP801

30 Los ácidos nucleicos de doble cadena de acuerdo con la presente invención se diseñaron contra los tramos del ARNm de RTP801, que son el mismo o diferente en diversas especies. Para probar si había una especificidad de especie de un ácido nucleico de hebra doble específico de RTP801, los ácidos nucleicos de hebra doble con los números de referencia interna 14, 22, 23 y 27 que se dirigían a un tramo del ARNm de RTP801 que era conservado entre el ARNm de RTP801 de humano, ratón y rata, y los ácidos nucleicos de hebra doble con los números de referencia interna 39 y 42 el cual estaba dirigido a un tramo del ARNm de RTP801 que era específico para el ARNm de RTP801 humano, es decir, que estaba dirigido a un tramo que, como tal, no estaba presente en el ratón o rata, se compararon en términos de regulación descendente de RTP801 usandol mismo enfoque y lectura tal como se especificó en los Ejemplos 1 y 2.

35 Aunque todos los ácidos nucleicos de hebra doble usados eran en principio activos contra el ARNm humano y, como se mostró en los ejemplos anteriores, también eran adecuados para regular de forma descendente la expresión de RTP801, al hacer uso de una línea celular de ratón, solamente aquellos ácidos nucleicos de hebra doble que también eran específicos para el ARNm de RTP801 de ratón, redujeron efectivamente la expresión de RTP801, concretamente, los ácidos nucleicos de hebra doble núms. 14, 22, 23 y 27.

40 A partir de este resultado se pudo concluir que era posible diseñar ácidos nucleicos de hebra doble dirigidos a RTP801, los cuales fueran específicos para una o varias especies. Esto permite el uso de la misma molécula en modelos animales así como en el hombre.

Ejemplo 6

- 45 Modelos experimentales, métodos y resultados relacionados con la degeneración macular

Los compuestos de la presente invención se probaron en los siguientes, un modelo animal de neovascularización coroidea (CNV). Esta característica de la AMD húmeda se indujo en los modelos animales por tratamiento con láser.

A) modelo de ratón

Inducción de neovascularización coroidea (CNV)

5 La neovascularización coroidea (CNV), una característica de la AMD húmeda, se desencadenó mediante la fotocoagulación con láser (532 nm, 200 mW, 100 ms, 75 µm) (OcuLight GL, Iridex, Mountain View, CA) que se llevó a cabo en ambos ojos de cada ratón el día 0 por un solo individuo al que se le ocultó la asignación del grupo de fármacos. Los puntos de láser se aplicaron de una manera estandarizada alrededor del nervio óptico, usando un sistema de administración de lámpara de hendidura y un cubreobjetos como una lente de contacto.

Grupos de tratamiento

La CNV se indujo en los siguientes grupos de ratones (machos 6-8 semanas de edad):

- (1) 12 ratones WT;
- 10 (2) 12 ratones knock-out para RTP801;
- (3) 12 ratones WT inyectados con 0,25 µg de ARNip anti-RTP801 activo estabilizado sintético (REDD14) en un ojo y ARNip anti-RTP801 inactivo (REDD8 - control negativo) en el ojo contralateral, en los días 0 y 7;
- (4) 12 ratones WT inyectados con 0,25 µg de ARNip anti-RTP801 activo estabilizado sintético (REDD14) en un ojo y ARNip anti-GFP inactivo (control negativo) en el ojo contralateral en los días 0 y 7;
- 15 (5) 12 ratones WT inyectados con 0,1 µg de ARNip anti-RTP801 activo estabilizado sintético (REDD14) en un ojo y PBS (control negativo) en el ojo contralateral en los días 0 y 7;
- (6) 12 ratones WT inyectados con 0,05 µg de ARNip anti-RTP801 activo estabilizado sintético (REDD14) en un ojo y PBS (control negativo) en el ojo contralateral en los días 0 y 7.

Ambos ojos de cada ratón se trataron con láser. El volumen que se inyectó fue de 2 µl.

20 Evaluación

1. El experimento se terminó en el día 14. Para la evaluación, los ojos se enuclearon y se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 30 min a 4°C. La retina neurosensorial se separó y se cortó del nervio óptico. El restante complejo RPE-coroideas-esclera se montó en la superficie plana en el Immu-Mount (medio de montaje Vectashield, Vector) y el cubreobjetos. Los montajes planos se examinaron con un microscopio confocal de barrido láser (TCS SP, Leica, Alemania). Los vasos se visualizaron mediante la excitación con láser de argón azul. Las secciones ópticas horizontales (paso de 1 µm) se obtuvieron de la superficie del complejo RPE-coroideas-esclera. El plano focal más profundo en el cual el entorno de la red vascular coroidea se conectaba a la lesión, que se pudo identificar, se consideró que era el piso de la lesión. Cualquier vaso en el área tratada con láser y superficial a este plano de referencia se consideró como CNV. Las imágenes de cada sección se almacenaron digitalmente. El área de la fluorescencia relacionada con CNV se midió por análisis computerizado de imagen usando software Leica TCS SP. La suma de toda la zona de fluorescencia en cada sección horizontal se usó como un índice para el volumen de CNV.

2. Los ratones WT separados (5 ojos por grupo) se usaron para evaluar la expresión de ARNm de RTP801 en CNV (así como la expresión de otros genes relevantes a AMD) (no tratados y tratados con siARN) usando la PCR en tiempo real sobre el ARN extraído de RPE/coroideas, o de la retina neural.

Resultados

1. Los ratones KO para RTP801 mostraron 30% menos de fuga de los vasos sanguíneos en comparación con los ratones WT después de la inducción de CNV; ver la Figura 8.

2. El ARNip sintético estabilizado contra RTP801, REDD14, produjo una reducción dependiente de la dosis del volumen de CNV. Un máximo de inhibición de ~ 70% en comparación con los ojos inyectados con PBS se logró a una dosis de 0,25 µg de REDD14 por ojo (secuencia núm. 14 en la Tabla 1, SEQ ID NO: 16 (sentido) y 66 (antisentido)). A la misma dosis, ambos ARNip de control negativo, REDD8 y ARNip anti-GFP, mostraron sólo 27% y 33% de reducción de volumen de CNV respectivamente, lo que apoyaba tanto la eficacia superior de REDD14 y también la especificidad de su efecto.

45 B) Modelo primate no humano

Inducción de CNV

5 Ocho monos cynomoglus machos (*Macaca fascicularis*) 2-6 años de edad se usaron para el estudio. La neovascularización coroidea (CNV) se indujo por el tratamiento con láser perimacular de ambos ojos antes de la administración de la dosis. Se localizaron nueve lesiones en la mácula con un láser [foto coagulador láser OcuLight GL (532 nm) con un adaptador de lámpara portátil de hendidura IRIS Medical®], y los puntos de láser en el ojo derecho fueron el reflejo de la colocación en el ojo izquierdo. Los parámetros aproximados del láser fueron los siguientes: tamaño de punto: 50-100 µm de diámetro; potencia del láser: 300-700 milivatios; tiempo de exposición: 0,1 segundos.

Tratamiento

10 Inmediatamente después del tratamiento con láser, ambos ojos de todos los animales se sometieron a una única inyección intravítrea. El ojo izquierdo se dosificó con 350 µg de ARNip sintético estabilizado contra RTP801 (el mismo utilizado en el estudio de ratón) en el volumen final de 50 µl, mientras que el ojo contralateral recibió 50 µl de PBS (vehículo).

Evaluación

1. Todos los animales se sometieron a examen diario de mediciones del consumo de alimentos y de peso corporal.
- 15 2. Se sacrificaron 2 monos en el día 6 después de la inducción de CNV. Sus ojos se enuclearon y el polo posterior se aplanó. Después la región fóvea se extirpó y se separó en coroides y neuroretina las cuales se congelaron en nitrógeno líquido por separado (para cada animal) para su uso posterior para la extracción de ARN y la evaluación de la expresión de RTP801 por la PCR en tiempo real..
- 20 3. Los angiogramas de fluoresceína se llevaron a cabo antes del estudio, y al final de las semanas 1, 2 y 3 después de la inducción de CNV. Las fotografías se tomaron, usando de una cámara de fondo de ojo (TRC-50EX Retina Camera). Las imágenes se capturaron usando el sistema Topcon IMAGEnet™. El colorante de fluoresceína (10% fluoresceína sódica, aproximadamente 0,1 ml/kg) se inyectó a través de puertos de acceso vascular. Las fotografías se tomaron en diferentes puntos de tiempo después de la inyección del tinte, para incluir la fase arterial, la fase arteriovenosa temprana y varias fases arteriovenosas tardías con el fin de evaluar la neovascularización y para controlar la fuga de la fluoresceína asociada con las lesiones de CNV. La interpretación y el análisis de los
- 25 angiogramas de fluoresceína se llevaron a cabo de forma independiente por dos oftalmólogos.

La neovascularización (NV) se evaluó en los angiogramas tempranos y cada punto se clasificó de acuerdo con el siguiente esquema:

- | | |
|-----|--------------------------------|
| 0 | - sin signos de NV |
| 0,5 | - punto sospechoso |
| 1 | - punto "caliente" |
| 2 | - NV en la quemadura con láser |
| 3 | - NV evidente |

Las fugas se evaluaron de acuerdo con el siguiente esquema:

- | | |
|-----|---|
| 0 | - ninguna fuga |
| 0,5 | - punto sospechoso |
| 1 | - fuga evidente de pequeño punto |
| 2 | - fuga creciente con el tiempo |
| 3 | - fuga mayor que las límites anteriores (evidentemente) |

30 Además, el tamaño de cada punto se comparó entre los angiogramas tempranos y tardíos usando las mediciones morfométricas, y se calculó el aumento en el tamaño del punto resultante de la fuga.

4. Los electroretinogramas (ERG) se registraron usando un electroretinógrafo Epic 2000 según los SOP de Sierra y el estudio específico de SOP, que incluyó el uso del aparato Ganzfeld, en el pre-estudio y al final de la semana 3. Un oftalmólogo veterinario evaluó los datos de ERG tabulados.

5 El estudio se terminó en el día 21 después de la inducción de CNV. La necropsia y el examen histológico se realizaron en los órganos y tejidos, se incluyeron los ojos.

Resultados

1. El ARNip contra RTP801 redujo la expresión de RTP801 en el RPE/coroides de los animales tratados con láser, según se midió el día 6 después de la inducción de CNV por la PCR en tiempo real (véase Figura 10)..

10 2. La comparación de la clasificación de los puntos para las fugas y la neovascularización entre los ojos contralaterales en cada mono individual reveló que ambas de estas características patológicas estaban disminuidas en los ojos inyectados con el ARNip de RTP801 en comparación con el control (para los resultados de fuga, ver la Figura 11; para los resultados de neovascularización, ver la Figura 12).

15 3. El cálculo del número total de puntos con los grados mayores de fuga o neovascularización clínicamente relevantes (2 y 3) en todos los ojos inyectados con ARNip en comparación con todos los ojos inyectados con PBS de nuevo reveló que los ojos inyectados con el ARNip eran menos afectados (véase la Figura 13, a+b).

20 4. Los datos de la clasificación general para las fugas de los puntos y la neovascularización se sometió a una evaluación estadística. La existencia de diferencias entre los tratamientos de control y de ARNip se analizaron mediante el cálculo de la delta entre los intervalos de punto medio del ojo de la derecha de control (R) y el ojo izquierdo (L) inyectado con ARNip (delta=R-L). La significación de la diferencia se calculó usando un método estadístico no paramétrico, la prueba de rango de signo de Wilcoxon - una prueba de una cola. Diferentes fases de los angiogramas (arterial temprana, arterio-venosa y venosa tardía) se analizaron por separado para cada semana (1, 2, y 3).

25 La Tabla 1 muestra el significado (una prueba de una cola) de la diferencia de rango de fugas desde 0 para cada grupo (los valores de p <0.05 están subrayados). Una reducción significativa del rango de fugas se encontró en los ojos izquierdos (tratadas con ARNip) con respecto al derecho (tratado con placebo) en la semana 2 y 3 en los angiogramas tardíos.

Tabla 1

Fuga		Valor-p
Angiogramas	semana	prueba de rango de signo de Wilcoxon
temprano	1	0.2500
	2	0.5000
	3	0.5000
Arterio-venoso	1	0.3438
	2	0.1250
	3	0.2344
tardío	1	0.1250
	2	<u>0.0313</u>
	3	<u>0.0156</u>

Nótese que los angiogramas tardíos se usaron normalmente para la evaluación de los parámetros de fuga.

30 La Tabla 2 muestra el significado (la prueba de una cola) de la diferencia de rango de neovascularización (NV) desde 0 para cada grupo (los valores de p <0.05 están subrayados)).

Tabla 2

NV		Valor-p
Angiogramas	semana	prueba de rango de signo de Wilcoxon
temprano	1	0.0781
	2	<u>0.0313</u>
	3	<u>0.0313</u>
Arterio-venoso	1	0.0625
	2	<u>0.0313</u>
	3	0.1563
tardío	1	0.2500
	2	0.3438
	3	0.2500

Una reducción significativa en el rango de NV se encontró en el ojo izquierdo con respecto al derecho en la semana 2 y 3 en el período temprano y en el período arteriovenoso en la semana 2.

5 Nótese que los angiogramas iniciales se usaron normalmente para la evaluación de los parámetros de neovascularización.

5. La evaluación morfológica cuantitativa del aumento en el área de los puntos que se produjeron entre los angiogramas tempranos (fase arterial) y tardíos (fase venosa) debido a la fuga, reveló que este parámetro se redujo significativamente en los puntos de láser dentro de los ojos inyectados con ARNip (ojos izquierdos, OS) en comparación con el control (ojos derechos, OD). Dos ejemplos se mostraron en la Figura 14. Los gráficos demostraron el aumento relativo (en %) en el área de cada punto en el ojo izquierdo y derecho de los animales # 3315 y 3300.

Adicionalmente, se observó a lo largo de todos los estudios anteriores que el ARNip de anti RTP-801 no tuvo efectos adversos sobre los electroretinogramas (ERG), sobre la histología del ojo o sobre la estructura y función de otros órganos y sistemas.

15 Para resumir los experimentos y resultados anteriores:

1. La inhibición del ARNip de la expresión de RTP801 tanto genética (RTP801^{-/-}) y terapéutica en la CNV inducida por láser en el modelo de degeneración macular húmeda relacionada con la edad (AMD húmeda) resultó en la reducción significativa del volumen de CNV.

2. Se obtuvieron resultados positivos en el modelo de ratón y de primate no humano.

20 3. El examen anatomopatológico y ERG en mono no reveló ninguna toxicidad mediada por siARN, ya sea en los ojos o en otros órganos o sistemas.

C) EFICACIA DE LA TERAPIA DE COMBINACIÓN DE arnip DE RTP801 (REDD14) Y EL ANTICUERPO ANTI-VEGF

25 La eficacia de la terapia de combinación de ARNip de RTP801 (REDD14) y el anticuerpo anti-VEGF en el tratamiento de enfermedades en las que se produce la CNV se probó en el anterior modelo de CNV de ratón.

A) Estudios del volumen de CNV

TEl volumen de la neovascularización coroidea (CNV) 3 semanas después de la lesión con láser se calculó por microscopía de fluorescencia confocal como se describió previamente (Sakurai y otros IOVS 2003;44: 3578-85 & Sakurai y otros IOVS 2003; 44: 2743-2749).

30 En estudios previos se encontró que el anticuerpo (Ac) anti-VEGF-A redujo el volumen de CNV de una manera dependiente de la dosis. Una dosis de 1 ng del Ac. VEGF-A se eligió para los estudios de combinación de REDD14

+ Ac VEGF-A porque esta dosis tuvo un efecto inhibitor intermedio: El Ac. VEGF-A (1 ng) redujo el tamaño de la CNV en un $26\pm 6\%$.

Las principales conclusiones del estudio de REDD14 + anticuerpos (Ac) VEGF-A son:

- 5
- La adición de REDD14 a la dosis más baja 0,05 μg redujo el tamaño de CNV en un $27\pm 4\%$ en comparación con el Ac. VEGF-A solo.
 - La adición de REDD14 a la dosis más alta de 0,25 μg redujo el tamaño de CNV en un $55 \pm 3\%$ en comparación con el Ac. VEGF-A solo.

B) Estudios de fuga de CNV

Experimento 1

- 10 Este experimento se diseñó con el fin de identificar un potencial efecto terapéutico aditivo o sinérgico de inhibición de VEGF y RTP801 en el modelo de neovascularización coroidea inducida por láser en ratones

Materiales:

- REDD14 (RTP801 ARNip.)
 - REDD8 (control negativo)
- 15
- Anticuerpos anti-VEGF
 - IgG no específica (control negativo)

La CNV se indujo en el día cero como se describió anteriormente, el material de ensayo se inyectó a los sujetos en el día cero y el día 7.

- 20 Los resultados se evaluaron por angiografía con fluoresceína en las semanas 1, 2, 3, y por medición del volumen de CNV en 3 semanas. Cada grupo de prueba se componía de 10 ojos.

Grupos experimentales:

- Ac. VEGF 0.5 ng/ojo
 - Ac. VEGF 1 ng/ojo
 - Ac. VEGF 2 ng/ eye
- 25
- Ac. VEGF 4 ng/ojo
 - REDD14 0,05 ug/ojo
 - REDD 14 0,1 ug/ojo
 - REDD14 0,25 ug/ojo
 - REDD14 0,05 ug/ojo + Ac. VEGF 1 ng/ojo
- 30
- REDD 14 0,1 ug/ojo + Ac. VEGF 1 ng/ojo
 - REDD14 0,25 ug/ojo + Ac. VEGF 1 ng/ojo

Grupos controles

- PBS
 - IgG no específico 2 ng/ojo
- 35
- REDD8 0,1 ug/ojo
 - REDD8 0,1 ug/ojo + Ac. VEGF 1 ng/ojo

Resultados

5 Los resultados del experimento anterior se presentaron en las Figuras 23-24. Estos resultados mostraron que la administración simultánea intravítrea del Ac. VEGF y REDD14 condujo al aumento de la inhibición, dependiente de la dosis, de la neovascularización coroidea y las fugas de los vasos sanguíneos coroides, tal como se expresó en una menor incidencia de puntos grado 4 y una mayor incidencia de puntos grado 1. Los angiogramas se clasificaron usando una modificación de un régimen de clasificación semicuantitativa (1-4) previamente publicada (Sakurai y otros IOVS 2003; 44: 2743-2749). Las lesiones grado 1 se consideraron como que no se formaron, es decir, equivalente a la prevención completa. Las lesiones de grado 4 se consideraron patológicamente significativas, es decir, el equivalente a las lesiones que se tratarían en los pacientes. El Ac VEGF-A (1 ng) redujo la incidencia de lesiones de grado 4 por ojo en un 38±8% y el aumentó la incidencia de las lesiones de grado 1 por ojo en un 66±43%.

Las principales conclusiones del estudio de fugas de la combinación REDD14 + Ac. VEGF-A son:

- La adición de REDD14 a la dosis más baja 0,05 µg redujo la incidencia de las lesiones de grado 4 en un 66±12% en comparación con el Ac. VEGF-A solo.
- 15 • La adición de REDD14 a la dosis más alta 0,25 µg redujo la incidencia de lesiones de grado 4 en un 60±12% en comparación con el Ac. VEGF-A solo.
- La adición de REDD14 a la dosis más alta 0,25 µg duplicó (100±34%), la incidencia de lesiones de grado 1 en comparación con el Ac. VEGF-A solo.

Experimento 2

20 Este experimento se diseñó con el fin de estudiar el efecto de REDD14 sobre la expresión génica en la retina neural y RPE.

Diseño experimental

Grupos:

- PBS
- 25 • REDD14 0,25 mg

El tamaño del grupo fue de 5 ojos. Se indujo CNV por tratamiento con láser como se describió anteriormente en el día cero; el material de ensayo se inyectó también en el día cero, y el efecto se evaluó por análisis mediante la qPCR de la expresión génica en la retina neural y RPE en los días cero y 5.

Resultados

30 Los resultados del experimento anterior se presentan en la Figura 25. Estos resultados muestran que la administración de REDD14 causa:

- ~40% de regulación descendente de la expresión de RTP801 por debajo de la línea de base, tanto en EPR y en la retina neural (véase también la Figura 26);
- 35 • ~ 70% de regulación ascendente de la expresión de PEDF sobre la línea de base en la retina neural (*nota:* en los ojos inyectados con PBS la expresión de PEDF se reguló descendente en un 40% por debajo de la línea de base)
- ~40% de regulación descendente de la expresión VEGF164 por debajo de la línea de base en RPE (*nota:* en los ojos inyectados con PBS la expresión de VEGF164 se reguló descendente en un 20%)
- ~50% de reducción de la expresión de MCP1 en RPE/coroides (Figura 26)

Conclusiones generales de los dos experimentos:

- 40 • La inhibición simultánea de RTP801 y VEGF aumentó el efecto inhibitor sobre la neovascularización coroidea y la fuga neovascular.
- La inhibición de la expresión de RTP801 por REDD14 no sólo previno la regulación descendente de PEDF en el modelo de CNV sino aumentó su expresión en comparación con la línea base.

- La inhibición de la expresión de RTP801 condujo a la concomitante regulación descendente de MCP1 el cual debería tener un efecto antiinflamatorio:

- Sin estar limitado por la teoría, el aumento de la expresión de PEDF por REDD14 puede ser la base del efecto cooperativo de inhibición simultánea de VEGF y RTP801 observado

5 (Nota: El PEDF es un factor antiangiogénico y neuroprotector conocido.)

- Sin estar limitado por la teoría, la reducción de la expresión de MCP1 por REDD14 también puede ser la base del efecto cooperativo de inhibición simultánea de VEGF y RTP801 observado

(Nota: El MCP1 es una quimiocina proinflamatoria conocida involucrada en la patogénesis de AMD.)

Otros modelos de AMD que se pueden usar para probar los métodos de la presente invención:

10 • Animales deficientes en Ccl-2 o Ccr-2 - la deficiencia en cualquiera de estas proteínas causa el desarrollo de algunas de las principales características de AMD. Los animales deficientes en estas proteínas se pueden usar para probar los métodos de la presente invención.

Para más información sobre modelos animales de AMD, ver: Chader, Vision research 42 (2002) 393-399; Ambati y otros, Nature Medicine 9(11) (2003) 1390-1397; Tolentino y otros, Retina 24 (2004) 132-138.

15 D) Comparación de la actividad del ARNip anti RTP801, REDD14 que posee un grupo fosfato 3' en cada hebra con la misma molécula que carece de fosfatos 3' (REDD14NP) en el modelo de CNV inducida por láser.

El experimento en general se realizó y se evaluó como se describió anteriormente. Un ojo de cada ratón (12 por grupo) se inyectaron con 0.25 ug de ARNip REDD14, mientras que en el otro ojo se inyectó ARNip REDD14NP.

Resultados

20 Ambos ARNip igualmente redujeron eficazmente el volumen de CNV (Figura 27).

Ejemplo 7 [Para fines de comparación]

Modelos y resultados relacionados con la EPOC y el enfisema

Los compuestos de la presente invención se probaron en los siguientes modelos animales:

25 * El modelo de enfisema inducido por el humo del cigarrillo: la exposición crónica al humo del cigarrillo provoca enfisema en varios animales, tales como, *entre otros*, ratón, conejillo de indias.

* La actividad de la proteasa de pulmón como un desencadenante de enfisema.

* El modelo de inhibición de VEGFR del enfisema.

* Instilación bronquial con neutrófilos humanos/elastasa pancreática en roedores.

* enfisema inducido por la MMP (metaloproteasa de matriz).

30 * El enfisema inducido por inflamación.

Además, los modelos de enfisema se pueden generar a través de medios genéticos (por ejemplo, ratones que portan la mutación *TSK*), y animales enfisematosos se pueden generar por modificadores de la susceptibilidad a enfisema conocidos tales como, *entre otros*, lesión pulmonar, hipoplasia alveolar, hiperoxia, tratamiento con glucocorticoides y nutrición.

35 A. Evaluación de la influencia de la falta de RTP801 en el desarrollo de la enfermedad en modelos de enfisema en ratón (usando ratones knockout para RTP801)

40 (1) El humo de cigarrillos (CS) inducida por la apoptosis y la inflamación se inició en 5 ratones machos de 4 meses RTP801 KO y 5 de control tipo salvaje. Los ratones se sometieron a un CS intenso (como se describe en Rangasamy y otros, ver anteriormente) por 7 días. Los ratones no tratados KO y WT, del experimento de inhibición de VEGFR anterior también pueden servir como grupos de control no tratados, para este experimento. Posteriormente, los pulmones se inflaron con agarosa, se fijaron y embebieron en parafina, y el desarrollo del estrés oxidativo en los ratones KO se evaluó mediante:

- a) localización inmunohistoquímica y la cuantificación de 8-oxo-dG en las secciones de pulmón;
- b) localización inmunohistoquímica y la cuantificación de la caspasa 3 activa en las secciones de pulmón por medio del uso de anticuerpos específicos, o la evaluación cuantitativa del número de células TUNEL-positivas;
- c) medición de la concentración de ceramida en los extractos de pulmón;
- 5 d) medición de la actividad caspasa en los extractos de pulmón.

(2) Consumo de cigarrillos a largo plazo en los ratones KO.

6 ratones hembras KO y 6 WT pareados por edad se sometieron al consumo intenso de cigarrillos (5 horas al día) durante un período de 6 meses. Los ratones se sacrificaron a continuación, y el diámetro medio interseptal (un parámetro del enfisema) se evaluó por medio del uso de un enfoque morfométrico.

- 10 B. Evaluación de la influencia de la falta de RTP801 en la progresión de la enfermedad en modelos de enfisema en ratón mediante la inhibición de RTP801 endógeno mediante el empleo de la administración intra pulmonar del ARNip de inactivación de RTP801

15 La inflamación inducida por el CS se indujo por el consumo de 7 días en 2 grupos de ratones C57BL6, 10 ratones por grupo. Grupo 1: CS + administración de ARNip control (REDD8) ARNip; Grupo 2: CS + ARNip de RTP801 (REDD14). Los grupos de ratones de control se instilaron con cualquier tipo de ARNip pero se mantuvieron en condiciones de habitación con aire. TLos animales se evaluaron como en el experimento anterior con los ratones knockout.

Métodos

Exposición al consumo de cigarrillos (CS)

- 20 La exposición se llevó a cabo (7 h/día, 7 días/semana por la combustión de los cigarrillos 2R4F de referencia (2,45 mg nicotina por cigarrillo; que se adquirieron del Tobacco Research Institute, University of Kentucky, Lexington, KY, Estados Unidos) usando una máquina de humo (Modelo TE-10, Teague Enterprises, Davis, CA, Estados Unidos). Cada cigarrillo encendido se aspiró durante 2 s, una vez cada minuto para un total de ocho bocanadas, a un régimen de flujo de 1,05 l/min, para proporcionar una aspiración estándar de 35 cm³. La máquina de humo se ajustó para producir una mezcla de humo de corriente secundaria (89%) y humo de corriente principal (11%) por la combustión de cinco cigarrillos al mismo tiempo. La atmósfera de la cámara se controló para el total de partículas en suspensión y el monóxido de carbono, con concentraciones de 90 mg/m³ y 350 ppm, respectivamente.
- 25

Análisis morfológicos y morfométricos

- 30 Después de la exposición de los ratones al CS o la instilación del plásmido que expresaba RTP801, los ratones se anestesiaron con halotano y los pulmones se inflaron con 0,5% de agarosa de bajo punto de fusión a una presión constante de 25 cm como se describió anteriormente⁶. Los pulmones inflados se fijaron en 10% de formalina tamponada y se embebieron en parafina. Las secciones (5 µm) se tiñeron con hematoxilina y eosina. El diámetro medio alveolar, la longitud alveolar, y las intercepciones lineales media se determinaron por morfometría asistida por computadora con el software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos). Las secciones de pulmón en cada grupo se codificaron y las imágenes representativas (15 por sección del pulmón) se obtuvieron, por un investigador al que se le ocultó la identidad de los portaobjetos, con un microscopio Nikon E800, lente 20X.
- 35

Lavado broncoalveolar (BAL) y fenotipaje

- 40 Tras la exposición al CS o la instilación del plásmido de expresión de RTP801, los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico. El fluido BAL recogido de los pulmones de los ratones, se centrifuga (500 'g a 4°C), y el sedimento celular se resuspende en solución salina tamponada con fosfato. Se determinó el número total de células en el líquido de lavado, y 2 x 10⁴ células se citocentrifugaron (Shandon Southern Products, Pittsburgh, PA, Estados Unidos) en portaobjetos de vidrio y se tiñeron con Wright-Giemsa. El conteo diferencial de células se realizó en 300 células, de acuerdo con técnicas citológicas estándar.

- 45 Identificación de poblaciones de células apoptóticas alveolares en los pulmones.

50 Para identificar los diferentes tipos de células alveolares que experimentaban apoptosis en los pulmones, se realizó una tinción inmunohistoquímica de caspasa 3 en las secciones de pulmón de la habitación con aire (RA), así como de los ratones expuestos al CS. Para identificar las células epiteliales apoptóticas de tipo II en los pulmones, después del etiquetado con la caspasa 3 activa, las secciones de pulmón se incubaron primero con el anticuerpo anti-proteína C tensioactiva (SPC) de ratón y luego con un anticuerpo anti-conejo con rojo Texas. Las células

endoteliales apoptóticas se identificaron mediante la incubación de las secciones primero con el anticuerpo anti- CD 31 de ratón y luego con el anticuerpo secundario de conejo biotinilado anti-ratón. Las secciones de pulmón se lavaron en PBS y después se incubaron con el complejo estreptavidina conjugada con rojo Texas. Los macrófagos apoptóticos en los pulmones se identificaron mediante la incubación de las secciones primero con el anticuerpo de rata anti- Mac-3 de ratón y luego con el anticuerpo anti-rata con rojo Texas. Finalmente, se aplicó DAPI a todas las secciones del pulmón, se incubaron durante 5 minutos, se lavaron y se montaron con el medio de montaje Vectashield HardSet. La fluoresceína y DAPI se visualizaron a 330-380 nm y 465-495 nm, respectivamente. Las imágenes de las secciones de pulmón se obtuvieron con el microscopio Nikon E800, lente de 40X.

Localización inmunohistoquímica de la caspasa-3

El ensayo de tinción inmunohistoquímica de caspasa-3 se realizó por medio del uso de los anticuerpos anti-caspasa-3 activa y las células positivas a la caspasa-3- activa se contaron con un macro, por medio del uso del programa Image Pro Plus. Los conteos se normalizaron por la suma de los perfiles alveolares, denominadas en la presente como longitud alveolar y expresada en μm . La longitud alveolar se correlacionó inversamente con la intercepción lineal media, es decir, como los septos alveolares se destruyeron, los interceptos lineales medios aumentaron como la longitud total alveolar, es decir, longitud total septal alveolar disminuyó.

Ensayo de actividad de la caspasa 3

La actividad de la caspasa-3/7 se midió en extractos de tejido de pulmón por medio del uso de un ensayo fluorométrico de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tejido pulmonar congelado inmediatamente ($n = 3$ por grupo) se homogeneizó con el tampón de ensayo, seguido de sonicación y centrifugación a $800 \times g$. Después de la eliminación de los núcleos y los restos celulares, el sobrenadante (300 g de proteína) luego se incubó con el sustrato profluorescente a temperatura ambiente durante 1 h y la intensidad de fluorescencia se midió por medio del uso de un Typhoon phosphoimager (Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ, Estados Unidos). Los resultados se expresaron como la velocidad de escisión específica del sustrato de la caspasa-3, expresada en unidades de actividad enzimática de caspasa 3, normalizada por la concentración de proteína total. La caspasa 3 activa recombinante se usó como patrón para el ensayo (0-4 U). Los tejidos lisados sin sustrato, solo tampón de ensayo y los lisados con el inhibidor de la caspasa 3 se usaron como controles negativos.

Localización inmunohistoquímica de 8-oxo-dG

Para la localización inmunohistoquímica y cuantificación de 8-oxo-dG, las secciones de pulmón de los ratones expuestos al CS o instilados con el plásmido que expresa RTP801 se incubaron con el anticuerpo anti-8-oxo-dG y se tiñeron por medio del uso del kit InnoGenexTM Iso-IHC DAB por medio del uso de anticuerpos de ratón. Las células 8-oxo-dG-positivas se contaron con una macro (por medio del uso de Image Pro Plus), y los conteos se normalizaron por la longitud alveolar tal como se describió.

Instilación del plásmido de ADN en los pulmones de ratón

El ADN de los plásmidos de los vectores de expresión de RTP801 y el control se prepararon con el kit de aislamiento de ADN libre de endotoxina. Para la instilación intratraqueal, 50 μg de ADN de plásmido se suministró en 80 μl de perfluorocarbono estéril. Las propiedades de transporte de oxígeno del perfluorocarbono lo hicieron bien tolerable en estos volúmenes, mientras que sus propiedades físico-químicas permitieron la administración pulmonar distal extremadamente eficiente cuando se instiló por vía intratraqueal. Los ratones se anestesiaron mediante una breve exposición a la inhalación de halotano, la lengua se tiró suavemente hacia adelante con los fórceps y la tráquea se instiló con solución de perfluorocarbono aplicada en la base de la lengua a través de un angiocatéter romo.

Instilación de ARNip en los pulmones del ratón.

Los ratones se anestesiaron con una inyección intra-peritoneal de ketamina/xilacina (115/22 mg/kg). Se instilaron 50 μg de ARNip por vía intranasal en el volumen de 50 μl de NaCl al 0,9% mediante la administración de cinco porciones consecutivas de 10 μl . Al final de la instilación intranasal, la cabeza del ratón se mantuvo hacia arriba por 1 minuto para asegurar que toda la solución instilada drenase al interior.

Para más información, ver: Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa, RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tudor RM, Biswal S. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Submitted to Journal of Clinical Investigation; Yasunori Kasahara, Rubin M. Tudor, Carlyne D. Cool, David A. Lynch, Sonia C. Flores, and Norbert F. Voelkel. Endothelial Cell Death and Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Emphysema. Am J Respir Crit Care Med Vol 163. pp 737-744, 2001; Yasunori Kasahara, Rubin M. Tudor, Laimute Taraseviciene-Stewart, Timothy D. Le Cras, Steven Abman, Peter K. Hirth, Johannes Waltenberger, and Norbert F. Voelkel. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. J. Clin. Invest. 106:1311-1319 (2000); y una revisión del tema: Robin M. Tudor, Sharon McGrath and Enid Neptune, The patológico mecanismos of emphysema models: what do they have in common?, Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 2002.

Resultados

1. La instilación de un plásmido de expresión de RTP801 resulta en un fenotipo similar al enfisema en los pulmones del ratón lo cual es evidente por (1) el aumento en los conteos de células del lavado broncoalveolar (Fig. 15a); (2) la apoptosis de las células pulmonares del septo (Figura 15b) y el aumento del diámetro alveolar (Fig. 15c).
- 5 2. La instilación del ARNip de RTP801 (REDD14) resulta en la reducción de la expresión de RTP801 en los pulmones (Fig. 17b).
3. Los ratones KO para RTP801 estaban protegidos de desarrollo de enfisema tras 6 meses de consumo de cigarrillos como se evidenció por la falta de ampliación del diámetro alveolar. (Fig. 18).
- 10 4. Los ratones KO para RTP801 estaban protegidos de la inflamación inducida por el hábito de fumar cigarrillos, como se evidenció por la reducción del número de células inflamatorias broncoalveolares después de 1 semana de consumo de cigarrillos (Figura 16, a-b).
5. Los ratones KO para RTP801 estaban protegidos de la apoptosis de las células pulmonares septales inducida por el consumo de cigarrillos como se evidenció por la tinción de la sección de pulmón para la caspasa activada (Fig. 16c).
- 15 6. Los ratones instilados con REDD14 estaban parcialmente protegidos de la inflamación inducida por el hábito de fumar cigarrillos, como se evidenció por la reducción del número de células inflamatorias broncoalveolares después de 1 semana de consumo de cigarrillos (Figura 17a).
- 20 7. Los ratones instilados con REDD14 estaban parcialmente protegidos de la apoptosis de las células del septales del pulmón inducida por el consumo de cigarrillos como se evidenció por la tinción de la sección de pulmón para la caspasa activa y mediante la inmunotransferencia de extractos de pulmón con anticuerpos anti-caspasa 3 activa ((Fig. 17c)

Ejemplo 8.

Modelos y resultados relacionados con los trastornos microvasculares

Los compuestos de la presente invención se probaron en modelos animales de una variedad de trastornos microvasculares como se describe más abajo.

1. Retinopatía diabética

El RTP801 promueve la apoptosis de las células neuronales y la generación de especies reactivas de oxígeno in vitro. El inventor de la presente invención también encontró que en ratones knockout (KO) para RTP801 sometidos al modelo de retinopatía del prematuro (ROP), la neovascularización patológica NV se redujo bajo condiciones de hipoxia, a pesar de las elevaciones de VEGF, mientras que la ausencia de este gen no influyó en la NV fisiológica retinal neonatal. Además, en este modelo, la falta de RTP801 fue también protectora contra la apoptosis neuronal hipóxica y la vaso-obliteración hiperóxica.

Experimento 1

La diabetes se indujo en ratones de la misma camada de 8 semanas KO para RTP801 y C57/129sv tipo salvaje (WT) por inyección intraperitoneal de STZ. Después de 4 semanas, el ERG (único destello blanco, 1.4×10^4 ftc, 5 ms) se obtuvo del ojo izquierdo después de 1 hora de adaptación a la oscuridad. El RVP se evaluó de ambos ojos por medio del uso de la técnica de la permeabilidad a la albúmina con azul de Evans.

Resultados

La glucosa en sangre no fue diferente entre los diabéticos (DM) WT y los DM KO (495 ± 109 contra 513 ± 76 mg/dl), los no diabéticos (NDM) WT y los KO (130 ± 10 contra 135 ± 31 mg/dl, respectivamente). Se incrementó RVP en el grupo DM WT un 138% ($51,2 \pm 37,9$ μ l/g/h, n = 8) en comparación con NDM WT ($21,5 \pm 18,8$ μ l/g/h, n=9, p=0,055). En contraste, RVP se redujo en un 80% en DM KO ($9,5 \pm 8,5$ μ l/g/h, n=6, p= 0,023) en comparación con los ratones DM WT, que resultó en una disminución del 140% del RVP inducido por diabetes. En ratones DM WT, hubo una prolongación (p<0.05) de los tiempos implícitos de los potenciales oscilatorios para OP2 (11%), OP3 (12%), & OP4 (14%) y para la onda B (23%) comparado con NDM WT. La onda A no cambió significativamente. Estos cambios se normalizaron ~100% en los ratones DM KO para OP3 & OP4 y 65% para la onda B comparado con NDM KO. Conclusión: El knockout de RTP801 atenuó RVP inducido por diabetes y las anomalías del ERG en ratones, lo que sugirió que este gen inducible por hipoxia puede desempeñar un importante papel en la patogénesis de la enfermedad temprana de la retina diabética.

Experimento 2

Se indujo la diabetes en ratones knockout para RTP801 y en el control de tipo salvaje con el fondo genético emparejado. Además, se indujo en ratones C57B16, que se usaron posteriormente para la inyección intravítrea de los ARNip anti-RTP801 y control. Para la inducción de diabetes, los ratones se inyectaron con estreptozotocina (STZ 90 mg/kg/d durante 2 días después de ayuno durante la noche). La fisiología del animal se controló durante todo el estudio para los cambios en la glucosa en sangre, el peso corporal, y el hematocrito. Los ratones inyectados con el vehículo sirvieron como controles. Los animales adecuados se trataron mediante inyecciones intravítreas de 1 ug del ARNip de anti-RTP801 REDD14 o 1 ug de ARNip anti-GFP control. El ARNip se inyectó dos veces en el curso del estudio - en el día 0, cuando la primera inyección de STZ se llevó a cabo, y en el día 14 después de la inyección de STZ.

La fuga vascular de la retina se midió por medio el uso de la técnica de tinción con azul de Evans-(EB) en los animales después de 4 semanas de duración de la diabetes. Los ratones tenían un catéter implantado en la vena yugular derecha 24 horas antes de las mediciones de azul de Evans (EB). Las mediciones de la permeabilidad de la retina en ambos ojos de cada animal, siguió un protocolo estándar de azul de Evans.

Resultados

1. La fuga de los vasos sanguíneos de la retina se redujo en 70% en los ratones diabéticos KO para RTP801 en comparación con los ratones diabéticos de tipo salvaje (véase Figura 20).

2. El knockout para RTP801 normalizó las anomalías del ERG en ratones: En los ratones DM WT, hubo una prolongación ($p < 0,05$) de los tiempos implícitos de los potenciales oscilatorios para OP2 (11%), OP3 (12%), & OP4 (14%) y para la onda B (23%) en comparación con NDM WT. Una onda A no cambió significativamente. Estos cambios se normalizaron al 100% en los ratones DM KO para RTP801 para OP3 & OP4 y 65% 65% para la onda B en comparación con los NDM KO para RTP801 (véase Figura 21).

3. De manera similar a los resultados en los ratones KO, la fuga de los vasos sanguíneos de la retina se redujo en un 50% en ratones diabéticos que se inyectaron por vía intravítrea con el ARNip contra RTP801 REDD14 en comparación con los ratones diabéticos que se inyectaron por vía intravítrea con el control de ARNip contra GFP (véase la Figura 22).

2. Retinopatía del prematuro

La retinopatía del prematuro se indujo por la exposición de los animales de prueba a condiciones de hipoxia e hiperoxia, y, posteriormente, se probaron los efectos sobre la retina. Los resultados mostraron que los ratones KO para RTP801 estaban protegidos de la retinopatía del prematuro, lo que validó de este modo el efecto protector de la inhibición de RTP801.

3. Infarto de miocardio

La ligadura de la arteria descendente anterior izquierda indujo el infarto de miocardio en ratones, tanto a corto como a largo plazo. Resultados: reducción de los niveles en la sangre de la fracción TnT y CPK-MB a 24 horas después del infarto y mejor ecocardiograma (volumen de la fracción de eyección) a los 28 días después del infarto en ratones KO para RTP801.

4. Afecciones de isquemia microvascular

Los modelos animales para la evaluación de las condiciones de isquemia son:

1. Lesión cerrada en la cabeza (CHI) – La TBI experimental produjo una serie de eventos que contribuyeron a las cascadas neurológicas y neurometabólicas, que estaban relacionadas con el grado y el alcance de los déficits de comportamiento. La CHI se indujo bajo anestesia, mientras que se permitió la caída libre de un peso desde una altura prefijada (Chen y otros, J. Neurotrauma 13, 557, 1996) sobre el cráneo expuesto que abarcaba el hemisferio izquierdo en el plano midcoronal.

2. Oclusión transitoria de la arteria cerebral media (MCAO) - una isquemia focal transitoria de 90 a 120 minutos se llevó a cabo en ratas macho Sprague Dawley, adultas, de 300-370 g. El método que se empleó fue el de la sutura intraluminal MCAO (Longa y otros, Stroke, 30, 84, 1989, y Dogan y otros, J. Neurochem. 72, 765, 1999). En resumen, bajo anestesia con halotano, un material de sutura de nailon 3-0 recubierto con poli-L-lisina se insertó en la arteria carótida interna derecha (ICA) a través de un agujero en la arteria carótida externa. El hilo de nailon se introdujo en la ICA hacia el origen MCA de la derecha (20-23 mm). El hilo se retiró, 90-120 minutos más tarde, el animal se cerró y se dejó recuperar.

3. Oclusión permanente de la arteria cerebral media (MCAO) - la oclusión fue permanente, unilateral, se indujo por electrocoagulación de MCA. Ambos métodos condujeron a la isquemia cerebral focal del lado ipsilateral de la corteza del cerebro y dejaron el lado contralateral intacto (control). La MCA izquierda se expuso a través de una craneotomía temporal, como se describió para ratas por Tamura A. y otros, *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981;1:53-60. La MCA y su rama lenticuloestriada se ocluyó proximal al borde medial del tracto olfativo con la coagulación microbipolar. La herida se suturó y los animales regresaron a su jaula de alojamiento en una habitación de 26 ° C a 28° C. La temperatura de los animales se mantuvo todo el tiempo con un termostato automático.

5. Insuficiencia renal aguda (ARF)

La prueba del ARNip activo para el tratamiento de la ARF se puede hacer usando la ARF inducida por sepsis o la ARF inducida por isquemia-reperusión.

1. ARF inducida por sepsis

Dos modelos animales predictivos de ARF inducida por sepsis se describieron por Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, Star RA, 2003, Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice, *Kidney Int.* Nov;64(5):1620-31. Estos dos modelos fueron la administración de lipopolisacárido y la ligadura y punción cecal en ratones, preferentemente en ratones envejecidos.

2. ARF inducida por isquemia-reperusión

Este modelo animal predictivo es descrito por Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC, 2003 enero. La p53 media la respuesta apoptótica a la depleción de GTP después de la isquemia-reperusión renal: el papel protector de un inhibidor de p53, *J Am Soc Nephrol.*;14(1):128-38.

La isquemia-reperusión se indujo en ratas después de 45 minutos de restringir la arteria renal bilateral y la liberación subsiguiente de la pinza para permitir 24 horas de reperusión. Se inyectaron 250 µg de REDD14 o ARNip de GFP (control negativo) en la vena yugular 2 horas antes y 30 minutos después de la restricción. Se les administró 250µg adicionales de ARNip a través de la vena de la cola a las 4 y 8 horas después de la restricción. El ARNip contra GFP sirvió como un control negativo. La progresión de la ARF se supervisó por la medición de los niveles de creatinina en suero antes y 24 h después de la cirugía. Al final del experimento, las ratas se perfundieron a través de una línea permanente femoral con PBS caliente seguido de paraformaldehído al 4%. Los riñones izquierdos se retiraron y se almacenaron en 4% de paraformaldehído para el análisis histológico posterior. La insuficiencia renal aguda se define frecuentemente como un aumento agudo de los niveles de creatinina en suero a partir de la línea base. Un aumento de al menos 0,5 mg por dl o 44,2 µmol por l de creatinina en suero se considera como una indicación para la insuficiencia renal aguda. La creatinina en suero se midió a tiempo cero antes de la cirugía y a las 24 horas después de la cirugía de la ARF.

Para estudiar la distribución del ARNip en el riñón de rata, moléculas de ARNip marcado con Cy3 19-mer de extremo romo (2 mg/kg) que tenían la modificación O-metil alterna en los residuos de azúcar se administraron iv durante 3-5 minutos, después de lo cual se realizaron imágenes in vivo por medio del uso de la microscopía confocal de dos fotones. El análisis por microscopía confocal reveló que la mayoría de los ARNip en los riñones estaba concentrado en el compartimiento endosomal de las células tubulares proximales. Tanto la fluorescencia del ARNip endosomal y citoplasmática se mantuvieron relativamente estables durante las primeras 2 horas después de la administración y desaparecieron a las 24 h.

Como es evidente de la Figura 19, se produjo un incremento de diez veces en el nivel de creatinina en suero después de un tratamiento de 45-min de restricción de la arteria renal bilateral (tratamiento de PBS). Cuatro inyecciones de ARNip 801 (REDD14, sec. con SEQ ID NOS: 16 y 66) (2 horas antes de la restricción y 30min, 4h y 8h después de la restricción) redujeron significativamente el nivel de creatinina en suero en un 40% (P < 0,02). Estos resultados sugirieron que el ARNip 801 podía proteger el tejido renal de los efectos de la lesión por isquemia-reperusión y de este modo reducir la gravedad de la ARF.

Ejemplo 9

Preparación de los ARNip

Por medio del uso de algoritmos registrados y la secuencia conocida del gen RTP801 (SEQ ID NO: 1), se generaron las secuencias de muchos siARNs potenciales. Las moléculas de ARNip de acuerdo con las especificaciones anteriores se prepararon esencialmente como se describe en la presente.

Los ARNip de la presente invención se pueden sintetizar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la materia para la síntesis de oligonucleótidos ribonucleicos (o desoxirribonucleico). Por ejemplo, se puede usar una máquina disponible en el mercado (disponible , *entre otros*, por Applied Biosystems); los oligonucleótidos se preparan de acuerdo con las secuencias descritas en la presente. Los pares superpuestos de los fragmentos sintetizados

químicamente se pueden ligar por medio del uso de métodos que se conocen bien en la materia (por ejemplo, ver la patente de Estados Unidos núm. 6,121,426). Las hebras se sintetizan separadamente y luego se hibridan entre sí en el tubo. Después, los ARNip de doble cadena se separan por HPLC de los oligonucleótidos de hebra simple que no hibridan (por ejemplo debido al exceso de uno de ellos) por HPLC. En relación con los ARNip o los fragmentos de ARNip de la presente invención, dos o más de tales secuencias se pueden sintetizar y unir entre sí para su uso en la presente invención.

Las moléculas de ARNip de la invención se pueden sintetizar mediante los procedimientos que se conocen en la materia, por ejemplo los procedimientos descritos en Usman y otros, 1987, J. Am. Chem. Soc., 109, 7845; Scaringe y otros, 1990, Nucleic Acids Res., 18, 5433; Wincott y otros, 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684; y Wincott y otros, 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59, pueden hacer uso de grupos comunes de protección y acoplamiento de ácidos nucleicos, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5', y fosforamiditas en el extremo 3'. Los nucleótidos modificados (por ejemplo 2'-O-metilado) y nucleótidos no modificados se incorporan según se desee.

Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden sintetizar por separado y unir entre sí después de la síntesis, por ejemplo, mediante ligación (Moore y otros, 1992, Science 256, 9923; Draper y otros, Publicación Internacional PCTnúm. WO93/23569; Shabarova y otros, 1991, Nucleic Acids Research 19, 4247; Bellon y otros, 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16, 951; Bellon y otros, 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204), o por hibridación después de la síntesis y/o desprotección.

Las moléculas de ARNip de la invención también se pueden sintetizar a través de una metodología de síntesis en tándem, tal como se describe en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. US2004/0019001 (McSwiggen) en donde ambas hebras de ARNip se sintetizan como un fragmento o hebra de oligonucleótido contiguo simple separadas por un enlazador escindible que se escinde posteriormente para proporcionar fragmentos o hebras separadas de ARNip que se hibridan y permiten la purificación del dúplex de ARNip. El enlazador puede ser un enlazador polinucleótido o un enlazador no nucleotídico.

Para más información, ver la publicación PCT núm. WO 2004/015107 (ATUGEN).

Como se describió anteriormente, los ARNip de la Tabla A (más abajo) se construyeron de tal manera que los azúcares alternos tenían modificación de nucleótidos 2'-O-metilo es decir nucleótidos alternos se modificaron de este modo. En estas realizaciones preferidas, en una hebra del ARNip los nucleótidos modificados fueron los números 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 y en la cadena opuesta de los nucleótidos modificados fueron los números 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18. Así, estos ARNip fueron moléculas de ARN de 19-mer de extremos romos con modificaciones alternas 2'-O'-metilo como se describió anteriormente. Los ARNip de las Tablas 2 y 3 (más abajo) también se construyeron de esta manera, los ARNip de la Tabla B son moléculas de ARN de 19-mer de extremos romos con modificaciones alternas 2'-O'-metilo; los ARNip de la Tabla C son moléculas de ARN de 21-mer de extremos romos con modificaciones alternas 2'-O'-metilo.

En la Tabla A se detallan diversas moléculas de ARNip nuevas que se generaron y posteriormente se sintetizaron para el gen RTP801. Las dos columnas finales indican los resultados de dos experimentos realizados para examinar la actividad de las moléculas nuevas. En resumen, las células HeLa o HaCaT se transfectaron con un el ARNip nuevo específico de prueba. La expresión del polipéptido RTP801 se determinó luego mediante la transferencia de tipo Western por medio del uso de un anticuerpo contra el polipéptido RTP801. En referencia a las dos columnas de la derecha de la Tabla A, "-" significa una molécula inactiva o de baja actividad-(que no inhibió sustancialmente la expresión del gen RTP801); "+" significa una molécula de ARNip con alguna actividad inhibidora (de expresión génica de RTP801), "+ +" significa una molécula con una mayor actividad inhibidora, y así sucesivamente. Una cualquiera de las moléculas de ARNip divulgadas aquí, y en particular las moléculas activas detalladas en la Tabla A son nuevas y también se consideran una parte de la presente invención.

Tabla A

No	Nombre ID	ORG	Ubicación	POS	AS (5'→3')	SS (5'→3')	HeLaB,20nM	HaCat, 20nM
1	REDD1	h	5'UTR	128	UAGAAAGCCGAGCUAGCGC	GCGCUAGCUGGGCUUCUA	+	+
2	REDD2	hmr	CDS	337	UCCGAGCUCUCCAGGCUUG	CGAGCCUGGAGAGCUCGGA	-	-
3	REDD3	hmr	CDS	360	UGUCUGUUCAGGGACUC	GAGUCCUGGACAGCAGCA	-	-
4	REDD4	hmr	CDS	478	AGCAGCUGCAUCAGGUUGG	CCAACCUGAUGCAGCUGCU	-	-
5	REDD5	h	CDS	728	UGAGUCCAGGCGCAGCAGG	CGUGCUGGCCUUGGACUCA	-	-
6	Redd6	hmr	5'UTR	119	CAGCUAGCGCGGUCAGCGA	UCGUGAGCCGCGCUGAGCUG	-	-
7	Redd7	hmr	5'UTR	122	CCGCAGCUAGCGCGGUCAG	CUGACCGCGCUAGCUGCGGG	-	-
8	Redd8	hmr	5'UTR	125	AAGCCGCGAGCUAGCGCGGU	ACCGCGCUAGCUGCGGGCUU	-	-
9	Redd9	hmr	CDS	339	AGUCCGAGCUCUCCAGGCU	AGCCUGGAGAGCUCGCGACU	-	-
10	Redd10	hmr	CDS	341	GCAGUCCGAGCUCUCCAGG	CCUGGAGAGCUCGCGACUJG	-	-
11	Redd11	hmr	CDS	363	UGUUGCUGCUGUCCAGGGA	UCCUUGGACAGCAGCAACA	-	-
12	Redd12	hmr	CDS	369	AGCCACUGUUGCUGCUGUC	GACAGCAGCAACAGUJGGCU	-	-
13	Redd13	hmr	CDS	370	AAGCCACUGUUGCUGCUGU	ACAGCAGCAACAGUJGGCUU	-	-
14	Redd14	hmr	CDS	475	AGUGCAUCAAGGUJGGCAC	GUGCCAACCUGAUGCAGCU	+++	+++
15	Redd15	hmr	CDS	481	UGCAGCAGCUGCAUCAGGU	ACCUGAUGCAGCUGCUGCA	+	+
16	Redd16	hmr	CDS	486	UCUCCUGCAGCAGCUGCAU	AUGCAGCUGCUGCAGGAGA	-	-
17	Redd17	hmr	CDS	610	CCCCGAGGCCCGCACGGCU	AGCCGUGCGGCCUGCGGGG	-	-
18	Redd18	hmr	CDS	750	CCUGGAUUCUGGGCCAGAG	CUCUGGCCCAAGAUCAGG	-	-
19	Redd19	hmr	CDS	809	CAGCGUACAGGACUGGGCUG	CAGCCAGUCCUCCUGCAGCUG	-	-
20	Redd20	hmr	3'UTR	1097	AUGCUCAGUACUGAGGGG	CCCUCAGUACUGUAGCAU	+	+
21	Redd21	hmr	3'UTR	1419	GUCUGUAAGUAGCUGGCCU	AGGCAGCUAUCUUCACAGAC	+	+

No	Nombre ID	ORG	Ubicación	POS	AS (5'->3')	SS (5'->3')	HeLaB, 20nM	HaCat, 20nM
22	Redd22	hmr	3'UTR	1617	UUCUAGAUGGAAGACCCAG	CUGGGUCUCCAUUCUAGAA	++	++
23	Redd23	hmr	3'UTR	1670	UUGAACAUCAAGUGAUUUC	GAAUACACUUGAUGUUCAAA	++	++
24	Redd24	hmr	3'UTR	1693	AAAUUUGCAUAGGUCUUA	UAAGACCUAUGCAAUUAUUU	+	+
25	Redd25	hmr	3'UTR	1695	AAAAUUAUGCAUAGGUCU	AGACCUAUGCAAUUAUUUUU	++	++
26	Redd26	hmr	CDS	349	AGGGACUCGGCAGUCGGAGC	GCUCGGACUCGGAGUCCCU	-	-
27	Redd27	hmr	3'UTR	1673	UACUUGAACAUCAAGUGUA	UACACUUGAUGUUCUCAAUGA		
28	Redd28	hmr	3'UTR	1717	AAACAUGUUUAUUAAGAAAA	UUUUCUAAAUAACAUGUUU	-	-
29	Redd29	h	5'UTR	99	AACUGCUAAGACAAAGUGCG	CGCACUUGUCUUAAGCAGUU	-	-
30	Redd30	h	CDS	213	ACGACGACGAGAAAGCGGUC	GACCCGUUCUCGUCGUCGUCG	-	-
31	Redd31	h	CDS	393	AAGCCGUGUUCUCCUCCGG	CCGGAGGAAGACACAGGCUU	-	-
32	Redd32	h	CDS	453	AGUGUUAUCCUCACAGGUC	GACCCUGAGGAUGAACACU	-	-
33	Redd33	h	CDS	521	AGGGGUCGAGAGCCCGC	GCUGGGUCUCGACGCCCCU	-	-
34	Redd34	hr	CDS	535	AUCAGCAGGCGCGCAGGGC	GCCCCGCGGCCUUCGUGAU	-	-
35	Redd35	h	CDS	571	AGUUCUUUGCCCACCUGGC	GCCAGGUGGGCAAAGAUCU	-	-
36	Redd36	h	CDS	597	ACGGCUCGUGUAGGCCAG	CUGGCCUACAGCGAGCCGU	-	-
37	Redd37	h	CDS	625	ACGUCCAGCAGCGCCCCCCC	GGGGGGCGCUGCUGGACGU	-	-
38	Redd38	h	CDS	829	AUGACUCGGAAAGCCAGUGC	GCACUGGCUUCCGAGUCAU	-	-
39	Redd39	h	3'UTR	1046	AACUCAAUGAGCUUCCUGG	CCAGGAAGCUCAUUGAGUU	++	++
40	REDD40	h	3'UTR	1539	CUCAACUCUGCAGUACACG	CGUGUACUGCAGAGUUGAG	+	+
41	Redd41	h	3'UTR	1317	AGAUACAAAACACCCUCC	GGAGGGUUUGUUGUAUCU	+	+
42	Redd42	h	3'UTR	1350	ACAACAAAACACACUUGGUC	GACCAAGUGUUUGUUGUU	++	++
43	Redd43	hmr	CDS	473	CUGCAUCAGGUUGGCACAC	GUGUGCCAACCUUGAUGCAG	+	+

No	Nombre ID	ORG	Ubicación	POS	AS (5'→3')	SS (5'→3')	HeLaB,20nM	HaCat, 20nM
44	REDD44	h	3'UTR	955	UCCUGCCUCUAGUCUCCAC	GUGGAGACUAGAGGCAGGA	+	+
45	Redd45	hmr	CDS	476	CAGCUGCAUCAGGUUGGCA	UGCCAACCUCUGAUGCAGCUG	-	-
46	Redd46	hmr	CDS	479	CAGCAGCUGCAUCAGGUUG	CAACCUGAUGCAGCUGCUG	-	-
47	Redd47	hmr	CDS	483	CCUGCAGCAGCUGCAUCAG	CUGAUGCAGCUGCUGCAGG	-	-
48	Redd48	hmr	CDS	485	CUCCUGCAGCAGCUGCAUC	GAUGCAGCUGCUGCAGGAG	-	-
49	REDD40.1	h	3'UTR	1536	AACUCUGCAGUACACGAUG	CAUCGUGUACUCAGAGUU	++	++
50	REDD44.1	h	3'UTR	954	CCUGCCUCUAGUCUCCACC	GGUGGAGACUAGAGGCAGG	++	++

ES 2 691 196 T3

Nótese que en la Tabla A anterior, las cadenas sentido de ARNip 1-50 tienen sec. con núms.de ident.: 3-52, respectivamente, y las cadenas antisentido de ARNip 1-50 tienen sec. con núms.de ident.: 53-102, respectivamente. La molécula designada REDD 14 tiene la SEQ ID NO: 16 (cadena en sentido) y 66 (cadena antisentido).

Tabla B

No	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip en sentido	ARNip antisentido	gi950668ref 019058.1 sapiens)	NM_ (Homo)	gi21312867re fNM_029083.1 (Ratón)	gi18376838re fNM_080906.1 (Rata)	Superpuesta con pet-1 (antisentido)*
51	Humano	19	CTAGCCAGTTGGTAAGCCA	TGGCTTACCAACTGGCTAG	[556-574]	-	-	-	
52	Humano	19	TGATTCCAGTGGTTGGAAA	TTTCCAACCACTGGAATCA	[984-1002]	-	-	-	
53	Humano	19	CCAGTGGTTGGAAAACCTGA	TCAGTTTTCCAACCACTGG	[989-1007]	-	-	-	
54	Humano	19	GCTTCCGAGTCATCAAGAA	TTCCTTGATGACTCGGAAGC	[835-853]	[763-781]	-	-	
55	Humano	19	GGAAGCTCATTGAGTTGTG	CACAACCTCAATGAGCTTCC	[1049-1067]	-	-	-	
56	Humano, cynomolgus	19	CCATCTGGGTCTTCCATCT	AGATGGAAGACCCAGATGG	[1613-1631]	[1569-1583]	[1610-1624]	+	
57	Humano, cynomolgus	19	GGATGTGTGTAGCATGT	ACATGCTACACACACATCC	[1152-1170]	-	-	-	
58	Humano, cynomolgus	19	ACACATACCCCTCAGTACT	AGTACTGAGGGTATGTGT	[1090-1108]	-	[1081-1098]	-	
59	Humano, cynomolgus	19	ACATACCCCTCAGTACTGT	ACAGTACTGAGGGGTATGT	[1092-1110]	-	[1082-1100]	-	
60	Humano, cynomolgus	19	CACTGTTTCATGAATACACT	AGTGATTCATGAACAGTG	[1660-1678]	[1612-1626]	[1652-1666]	+	
61	Humano, cynomolgus	19	CCAGCTGGATGTGTGTGTA	TACACACACATCCAGCTGG	[1146-1164]	[1099-1114]	[1139-1154]	-	
62	Humano, cynomolgus	19	CGGAACAGCTGCTCATTGA	TCAATGAGCAGCTGTTCCG	[868-886]	[801-814]	[854-867]	-	
63	Humano, cynomolgus	19	GAAGCTCATTGAGTTGTGT	ACACAACCTCAATGAGCTTC	[1050-1068]	-	-	-	
64	Humano, cynomolgus	19	GGACACATACCCCTCAGTA	TACTGAGGGGTATGTGTCC	[1088-1106]	-	-	-	
65	Humano, cynomolgus	19	GGATCTTTGACACTTGAAA	TTTCAAGTGTCAAAGATCC	[1483-1501]	[1424-1442]	-	-	

No	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip en sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref 019058.1 sapiens)	NM (Homo)	gi21312867re fNM_029083.1 (Ratón)	gi18376838re fNM_080906.1 (Rata)	Superpuesta con pet-1 (antisentido) ^a
66	Humano, cynomolgus	19	GTAGCATGTACCTTATTAT	ATAATAAGGTACATGCTAC	[1162-1180]		[1112-1128]	-	-
67	Humano, cynomolgus	19	TCAGTACTGTAGCAGTGAA	TTCCATGCTACAGTACTGA	[1101-1119]		[1091-1106]		-
68	Humano, cynomolgus	19	TGTGTAGCATGTACCTTAT	ATAAGGTACATGCTACACA	[1159-1177]		[1111-1127]	[1151-1167]	-
69	Humano, cynomolgus	19	CTGGATGTGTGTAGCAT	ATGCTACACACACATCCAG	[1150-1168]		-	-	-
70	Humano, cynomolgus, ratón	19	ACACTTGATGTTCAAGTAT	ATACTTGAACATCAAGTGT	[1674-1692]		[1622-1640]		+
71	Humano, cynomolgus, ratón	19	GCATGAATGTAAGAGTAGG	CCTACTCTTACATTCATGC	[1438-1456]		[1379-1397]		-
72	Humano, cynomolgus, ratón	19	AGCAGCAACAGTGGCTTCG	CGAAGCCACTGTTGCTGCT	[372-390]		[300-318]		-
73	Humano, cynomolgus, ratón	19	ATGAATGTAAGAGTAGGAA	TTCTACTCTTACATTCAT	[1440-1458]		[1381-1399]		-
74	Humano, cynomolgus, ratón	19	CAGCAGCAACAGTGGCTTC	GAAGCCACTGTTGCTGCTG	[371-389]		[299-317]		-
75	Humano, cynomolgus, ratón	19	CATGAATGTAAGAGTAGGA	TCCTACTCTTACATTCATG	[1439-1457]		[1380-1398]		-
76	Humano, cynomolgus, ratón	19	GATGTTCAAGTATTAAGAC	GTCTTAATACITTTGAACATC	[1680-1698]		[1628-1646]		+
77	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	TGATGCAGCTGCTGCAGGA	TCCTGCAGCAGCTGCATCA	[484-502]		[412-430]	[465-483]	-
78	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	GAATACACTTGATGTTCAA	TTGAACATCAAGGTATTC	[1670-1688]		[1618-1636]		+
79	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	TGAATACACTTGATGTTCAA	TGAACATCAAGGTATTC	[1669-1687]		[1617-1635]	[1657-1675]	+

No	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip en sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref 019058.1 sapiens)	NM (Homo)	gi21312867re fNM_029083.1 (Ratón)	gi18376838re fNM_080906.1 (Rata)	Superpuesta con pet-1 (antisentido)*
80	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	ATACACTTGATGTTCAAGT	ACTTGAACATCAAGTGAT	[1672-1690]		[1620-1638]	[1660-1678]	+
81	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	CATGAATACACTTGATGTT	AACATCAAGTGATTTCATG	[1667-1685]		[1615-1633]	[1655-1673]	+
82	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	CTGGACAGCAGCAACAGTG	CACTGTTGCTGCTGTCCAG	[366-384]		[294-312]	[347-365]	-
83	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	GTTTCATGAATACACTTGAT	ATCAAGTGATTTCATGAAC	[1664-1682]		[1612-1630]	[1652-1670]	+
84	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	TCATGAATACACTTGATG	ACATCAAGTGATTTCATGA	[1666-1684]		[1614-1632]	[1654-1672]	+
85	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	TGGACAGCAGCAACAGTGG	CCACTGTTGCTGCTGTCCA	[367-385]		[295-313]	[348-366]	-
86	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	TGTGTCCCAACCTGATGCA	TGCATCAGGTTGGCACACA	[472-490]		[400-418]	[453-471]	-
87	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	TTCATGAATACACTTGATG	CATCAAGTGATTTCATGAA	[1665-1683]		[1613-1631]	[1653-1671]	+
88	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	AACCTGATGCAGCTGTGTC	GCAGCAGCTGCATCAGGTT	[480-498]		[408-426]	[461-479]	-
89	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	AGTCCCTGGACACAGCAAA	TTGCTGCTGTCCAGGGACT	[361-379]		[289-307]	[342-360]	-
90	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	CCCTCAGTACTGTAGCATG	CATGCTACAGTACTGAGGG	[1098-1116]		[1048-1066]	[1088-1106]	-

No	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip en sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref 019058.1 sapiens)	NM (Homo sapiens)	gi21312867re fNM_029083.1 (Ratón)	gi18376838re fNM_080906.1 (Rata)	Superpuesta con pet-1 (antisentido)*
91	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	CCTGGACAGCAGCAACAGT	ACTGTTGCTGCTGCCAGG	[365-383]	[293-311]	[346-364]	-	
92	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	TGTGCCAACCTGATGCAGC	GCTGCATCAGGTGGCACA	[474-492]	[402-420]	[455-473]	-	
93	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	AATACACTTGATGTTCAAG	CTTGAACATCAAGTGATT	[1671-1689]	[1619-1637]	[1659-1677]	+	
94	Humano, cynomolgus, ratón, rata	19	ATGAATACACTTGATGTTT	GAACATCAAGTGATTTCAT	[1668-1686]	[1616-1634]	[1656-1674]	-	
95	Humano, cynomolgus, rata	19	TGATGCAGCTGCTGCAGGA	TCCTGCAGCAGTGCATCA	[484-502]		[465-483]	+	
96	Humano, cynomolgus, rata	19	AGAACTGTTTACATGAAGA	TCCTCATGTAACAGTTCT	[1632-1650]		[1625-1643]	+	
97	Humano, cynomolgus, rata	19	ATCTAGAACTGTTTACATG	CATGTAACAGTTCTAGAT	[1628-1646]		[1621-1639]	+	
98	Humano, cynomolgus, rata	19	CCATGCCCTAGCCCTTGGGA	TCCCAAAGGCTAGGCATGG	[196-214]		[186-204]	-	
99	Humano, cynomolgus, rata	19	CTAGAACTGTTTACATGAA	TTCATGTAACAGTTCTAG	[1630-1648]		[1623-1641]	+	
100	Humano, cynomolgus, rata	19	GAACTGTTTACATGAAGAT	ATCTTCATGTAACAGTTCT	[1633-1651]		[1626-1644]	+	
101	Humano, cynomolgus, rata	19	GGTCTCCATCTAGAACTG	CAGTTCTAGATGGAAGACC	[1620-1638]		[1613-1631]	+	
102	Humano, cynomolgus, rata	19	CCATCTAGAAGCTGTTTACA	TGTAACAGTTCTAGATGG	[1626-1644]		[1619-1637]	+	
103	Humano, cynomolgus, rata	19	CTTCCATCTAGAAGCTGTT	AAACAGTTCTAGATGGAAG	[1623-1641]		[1616-1634]	+	

No	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip en sentido	ARNip antisentido	gi950668ref 019058.1 (Homo sapiens)	NM_ (Homo)	gi21312867re fNM_029083.1 (Ratón)	gi18376838re fNM_080906.1 (Rata)	Superpuesta con pet-1 (antisentido)*
104	Humano, cynomolgus, rata	19	TAGAACTGTTACATGAAG	CCTCATGTAAACAGTTCTA	[1631-1649]			[1624-1642]	+
105	Humano, cynomolgus, rata	19	TCTTCCATCTAGAACTGTT	AACAGTTCTAGATGGAAGA	[1622-1640]			[1615-1633]	+
106	Humano, cynomolgus, rata	19	CATCTAGAACTGTTTACAT	ATGTAAACAGTTCTAGATG	[1627-1645]			[1620-1638]	+
107	Humano, cynomolgus, rata	19	GGGCTTCCATCTAGAACT	AGTTCTAGATGGAAGACCC	[1619-1637]			[1612-1630]	+
108	Humano, cynomolgus, rata	19	TCCATCTAGAACTGTTTAC	GTAACAGTTCTAGATGGA	[1625-1643]			[1618-1636]	+
109	Humano, cynomolgus, rata	19	TCTAGAACTGTTTACATGA	TCATGTAACACAGTTCTAGA	[1629-1647]			[1622-1640]	+
110	Humano, cynomolgus, rata	19	TCCATCTAGAACTGTTTAA	TAAACAGTTCTAGATGGA	[1624-1642]			[1617-1635]	+
111	Humano, cynomolgus, rata	19	GTCITCCATCTAGAACTGT	ACAGTTCTAGATGGAAGAC	[1621-1639]			[1614-1632]	+
112	Humano, ratón	19	CAAGTATTAAGACCTATGC	GCATAGGCTTAATACTTG	[1686-1704]		[1634-1652]		+
113	Humano, ratón	19	GTATTAAGACCTATGCAAT	ATTGCATAGGCTTAATAC	[1689-1707]		[1637-1655]		+
114	Humano, ratón	19	AGTATTAAGACCTATGCAA	TTGCATAGGCTTAATACT	[1688-1706]		[1636-1654]		+
115	Humano, ratón	19	ATGTTCAAGTATTAAGACC	GGTCTTAATACTTTGAACAT	[1681-1699]		[1629-1647]		+
116	Humano, ratón	19	CACITGATGTTCAAGTATT	AATACITGAACATCAAGTG	[1675-1693]		[1623-1641]		+
117	Humano, ratón	19	CCAAGATCCAGGGGCTGTT	AACAGCCCTGGATCTTGG	[757-775]		[685-703]		-
118	Humano, ratón	19	GTTCAAGTATTAAGACCTA	TAGGCTTAATACTTTGAAC	[1683-1701]		[1631-1649]		+
119	Humano, ratón	19	TCAAGTATTAAGACCTATG	CATAGGCTTAATACTTTGA	[1685-1703]		[1633-1651]		+
120	Humano, ratón	19	AAGTATTAAGACCTATGCA	TGCATAGGCTTTAATACTT	[1687-1705]		[1635-1653]		+

No	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip en sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref 019058.1 sapiens)	NM_ (Homo)	gi21312867re fNM_029083.1 (Ratón)	gi18376838re fNM_080906.1 (Rata)	Superpuesta con pet-1 (antisentido)*
121	Humano, ratón	19	TGTTCAAGTATTAAGACCT	AGGTCTTAATACTTGAACA	[1682-1700]		[1630-1648]	+	
122	Humano, rata	19	TGGTCTTCCATCTAGAAC	GTTCTAGATGGAAGACCCA	[1618-1636]		[1570-1588]	[1611-1629]	+

Nótese que en la anterior Tabla B, las cadenas sentido de ARNip 51-122 tienen sec. con núms.de ident.: 103-174, respectivamente, y las cadenas antisentido de ARNip 51-122 tienen sec. con núms.de ident.: 175-246, respectivamente.

Tabla C

No	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip en sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref NM_019058.1 (Homo sapiens)	gi21312867re fNM_029083.1 (Mus musculus)	gi18376838re fNM_080906.1 (Rattus norvegicus)	Superpuesta con pet-1 (antisentido)
123	Humano	21	CCAGGAAGCTCATTGAGTTGT	ACAACTCAATGAGCTTCCTGG	[1046-1066]	-	-	
124	Humano	21	CCATCTGGGTCCTCCATCTAG	CTAGATGGAAGACCCAGATGG	[1613-1633]	[1610-1626]	+	
125	Humano	21	GGATGTGTGTAGCATGTAC	GTACATGCTACACACACATCC	[1152-1172]	[1142-1161]	-	
126	Humano	21	CAAGTGTGTTTGTGTTTGT	AACAAACAACAAACACACTTG	[1353-1373]	-	-	
127	Humano	21	CCTCAGTACTGTAGCATGGAA	TTCCATGCTACAGTACTGAGG	[1099-1119]	[1089-1106]	-	
128	Humano	21	GACCAAGTGTGTTTGTGTTT	AAACAACAACACACACTTGGTC	[1350-1370]	-	-	
129	Humano	21	GCTTCCGAGTCATCAAGAAGA	TCITCTTGATGACTCGGAAGC	[835-855]	[763-783]	-	
130	Humano	21	GGAGGTGGGGAATAGTGT	AAACACTATTCCTCCACCTCC	[1024-1044]	[976-986]	-	
131	Humano	21	CAGTACTGTAGCATGGAACAA	TTGTTCCATGCTACAGTACTG	[1102-1122]	[1052-1072]	-	
132	Humano, cynomolgus	21	GAATACACTTGATGTTCAAGT	ACTTGAACATCAAGTGATTTC	[1670-1690]	[1618-1638]	[1658-1678]	+
133	Humano, cynomolgus	21	CAAGTATTAAGACCTATGCAA	TTGCATAGGTCCTAATACTTG	[1686-1706]	[1634-1654]	[1674-1694]	+
134	Humano, cynomolgus	21	GAACTTTGGGGTGGAGACTA	TAGTCTCCACCCCAAAAGTTC	[944-964]	-	-	
135	Humano, cynomolgus	21	GGACATACCCCTCAGTACT	AGTACTGAGGGGTATGTGTCC	[1088-1108]	[1047-1058]	[1081-1098]	-
136	Humano, cynomolgus	21	GGAGTGGTTTGTGTATCTTA	TAAGATACACAAACACCTCC	[1317-1337]	[1256-1268]	-	
137	Humano, cynomolgus	21	GGATCTTTGACACCTTGAAAA	TTTTCAAGTGTCAAAAGATCC	[1483-1503]	[1424-1442]	-	
138	Humano, cynomolgus	21	GGTCTCCATCTAGAACTGTT	AACAGTCTAGATGGAAGACC	[1620-1640]	[1572-1588]	[1613-1633]	+
139	Humano, cynomolgus	21	TGTGTAGCATGTACCTTATTA	TAAATAGGTACATGCTACACA	[1159-1179]	[1111-1128]	[1151-1169]	-

No	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip en sentido	ARNip antisentido	gi950686ref NM_019058.1 (Homo sapiens)	gi21312867ref NM_029083.1 (Mus musculus)	gi18376838ref NM_080906.1 (Rattus norvegicus)	Superpuesta con pet-1 (antisentido)
140	Humano, cynomolgus	21	CAACAAGGCTTCCAGCTGGAT	ATCCAGCTGGAAAGCCTTGTG	[1135-1155]	-	-	
141	Humano, cynomolgus	21	CACTGGGATCTTTGACACTT	AAGTGCAAAAGATCCCAAGTG	[1477-1497]	-	-	
142	Humano, cynomolgus	21	CATCACTACTGACCTGTTGTA	TACAACAGGTCAGTAGTGATG	[1399-1419]	[1341-1356]	[1383-1398]	
143	Humano, cynomolgus	21	GTGTGTAGCATGTACCTTA	TAAGGTACATGCTACACACAC	[1156-1176]	[1106-1126]	[1146-1166]	
144	Humano, cynomolgus, ratón	21	GCATGAATGTAAGAGTAGGAA	TTCCCTACTCTTACATTCATGC	[1438-1458]	[1379-1399]	-	
145	Humano, cynomolgus, ratón	21	GACAGCAGCAACAGTGGCTTC	GAAGCCACTGTTGCTGCTGTC	[369-389]	[297-317]	-	
146	Humano, cynomolgus, ratón, rata	21	TGATGCAGCTGCTGCAGGAGA	TCTCCTGCAGCAGCTGCATCA	[484-504]	[412-432]	[465-485]	
147	Humano, cynomolgus, ratón, rata	21	TGAATACACTTGATGTTCAAG	CTTGAAACATCAAGTGATTCA	[1669-1689]	[1617-1637]	[1657-1677]	
148	Humano, cynomolgus, ratón, rata	21	CATGAATACACTTGATGTTCA	TGAACATCAAGTGATTCAATG	[1667-1687]	[1615-1635]	[1655-1675]	
149	Humano, cynomolgus, ratón, rata	21	GGACAGCAGCAACAGTGGCTT	AAGCCACTGTTGCTGCTGCTCC	[368-388]	[296-316]	[349-369]	
150	Humano, cynomolgus, ratón, rata	21	GTTTCATGAATACACTTGATGT	ACATCAAGTGATTCAATGAAC	[1664-1684]	[1612-1632]	[1652-1672]	
151	Humano, cynomolgus, ratón, rata	21	TCATGAATACACTTGATGTTCC	GAACATCAAGTGATTCAATGA	[1666-1686]	[1614-1634]	[1654-1674]	

No	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip en sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref NM_019058.1 (Homo sapiens)	gi21312867re fNM_029083.1 (Mus musculus)	gi18376838re fNM_080906.1 (Rattus norvegicus)	Superpuesta con pet-1 (antisentido)
152	Humano, cynomolgus, ratón, rata	21	TCCCTGGACAGCAGCAACAGT	ACTGTTGCTGCTGTCCAGGGA	[363-383]	[291-311]	[344-364]	-
153	Humano, cynomolgus, ratón, rata	21	AGTCCCTGGACAGCAGCAACA	TGTTGCTGCTGTCCAGGGACT	[361-381]	[289-309]	[342-362]	-
154	Humano, cynomolgus, rata	21	GAATACACTTGATGTTCAAGT	ACTTGAACATCAAGTGATTC	[1670-1690]		[1658-1678]	+
155	Humano, cynomolgus, rata	21	CTAGAACTGTTTACATGAAGA	TCTTCATGTAACAGTTCTAG	[1630-1650]		[1623-1643]	+
156	Humano, cynomolgus, rata	21	CCATCTAGAACTGTTTACATG	CATGTAACAGTTCTAGATGG	[1626-1646]		[1619-1639]	+
157	Humano, cynomolgus, rata	21	CTTCCATCTAGAACTGTTTAC	GTAACAGTTCTAGATGGAAG	[1623-1643]		[1616-1636]	+
158	Humano, cynomolgus, rata	21	TCTTCCATCTAGAACTGTTTA	TAAACAGTTCTAGATGGAAGA	[1622-1642]		[1615-1635]	+
159	Humano, cynomolgus, rata	21	CATCTAGAACTGTTTACATGA	TCATGTAACAGTTCTAGATG	[1627-1647]		[1620-1640]	+
160	Humano, cynomolgus, rata	21	GGGTCTCCATCTAGAACTGT	ACAGTTCTAGATGGAAGACCC	[1619-1639]		[1612-1632]	+
161	Humano, cynomolgus, rata	21	TCCATCTAGAACTGTTTACAT	ATGTAACAGTTCTAGATGGA	[1625-1645]		[1618-1638]	+
162	Humano, cynomolgus, rata	21	TCTAGAACTGTTTACATGAAG	CTTTCATGTAACAGTTCTAGA	[1629-1649]		[1622-1642]	+

No	Fuente	Longitud del Oligo	ARNip en sentido	ARNip antisentido	gi9506686ref NM_019058.1 (Homo sapiens)	gi21312867re FNIM_029083.1 (Mus musculus)	gi18376838re FNIM_080906.1 (Rattus norvegicus)	Superpuesta con pet-1 (antisentido)
163	Humano, cynomolgus, rata	21	TTCCATCTAGAACTGTTTACA	TGTAACACAGTTCTAGATGGAA	[1624-1644]	[1617-1637]	+	
164	Humano, cynomolgus, rata	21	GTCCTCCATCTAGAACTGTTT	AAACAGTTCTAGATGGAAGAC	[1621-1641]	[1614-1634]	+	
165	Humano, ratón	21	TGATGTTCAAGTATTAAGACC	GGTCTTAATACTTTGAACATCA	[1679-1699]	[1627-1647]	+	
166	Humano, ratón	21	GTTC AAGTATTAAGACCCTATG	CATAGGCTTTAATACTTTGAAC	[1683-1703]	[1631-1651]	+	
167	Humano, ratón	21	TCAAGTATTAAGACCCTATGCA	TGCATAGGCTTTAATACTTTGA	[1685-1705]	[1633-1653]	+	
168	Humano, ratón	21	GATGTTCAAGTATTAAGACCCT	AGGCTTAAATACTTTGAACATC	[1680-1700]	[1628-1648]	+	
169	Humano, ratón	21	TTCAAGTATTAAGACCCTATGCG	GCATAGGCTTTAATACTTTGAA	[1684-1704]	[1632-1652]	+	
170	Humano, rata	21	CTGGGCTTCCATCTAGAACT	AGTTCTAGATGGAAGACCCAG	[1617-1637]	[1610-1630]	+	
171	Humano, rata	21	TGGGCTTCCATCTAGAACTG	CAGTTCTAGATGGAAGACCCCA	[1618-1638]	[1611-1631]	+	

Nótese que en la anterior Tabla C, las cadenas sentido de ARNip 123-171 tienen sec. con núms.de ident.: 247-295, respectivamente, y las cadenas antisentido de ARNip 123-171 tienen sec. con SEQ ID NOS: 296-344, respectivamente.

Ejemplo 10

5 Farmacología y administración de fármacos

Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden administrarse bien directamente o con vectores virales o no virales. Cuando se administran directamente las secuencias generalmente se hacen resistentes a las nucleasas. Alternativamente, las secuencias se pueden incorporar en casetes de expresión o construcciones tales que la secuencia se expresa en la célula como se discute en la presente más abajo. Generalmente, la construcción
10 contiene la adecuada secuencia reguladora o el promotor para permitir que la secuencia se exprese en la célula objetivo.

Los compuestos o composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran y se dosifican de acuerdo con la buena práctica médica, que tiene en cuenta el estado clínico del paciente individual, la enfermedad a tratar, el lugar y el método de administración, el esquema de administración, la edad del paciente, el sexo, el peso corporal y
15 otros factores conocidos por los médicos.

La "cantidad eficaz" farmacéuticamente para los propósitos en la presente está determinada por consideraciones tales como las conocidas en la materia. La cantidad debe ser eficaz para conseguir una mejora que incluye, pero no se limita a la tasa de supervivencia mejorada o la recuperación más rápida, o la mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas por aquellos con experiencia en la
20 materia..

El tratamiento generalmente tiene una longitud proporcional a la longitud del proceso de la enfermedad y la eficacia del fármaco y la especie de paciente que se trata. Cabe señalar que los humanos se tratan generalmente más tiempo que los ratones u otros animales experimentales ejemplificados en la presente.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por cualquiera de las vías convencionales de administración. Cabe señalar que el compuesto se puede administrar como compuesto o como la sal farmacéuticamente aceptable y puede administrarse solo o como ingrediente activo en combinación con portadores, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos pueden administrarse por vía oral, subcutánea o parenteral se incluye la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, y administración intranasal, así como las técnicas intratecal y de infusión. Los
25 implantes de los compuestos son también útiles. Las formas líquidas se pueden preparar para inyección, el término incluye subcutánea, transdérmica, intravenosa, intramuscular, intratecal, y otras rutas de administración parental. Las composiciones líquidas incluyen las soluciones acuosas, con y sin co-disolventes orgánicos, o las suspensiones acuosas o de aceite, las emulsiones con aceites comestibles, así como los vehículos farmacéuticos similares. Adicionalmente, bajo ciertas circunstancias, las composiciones para uso en los tratamientos nuevos de la presente invención se pueden formar como aerosoles, para la administración intranasal y similares. El paciente a tratar es un animal de sangre caliente y, en particular los mamíferos, se incluye el hombre. Los portadores farmacéuticamente
30 aceptables, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos, así como portadores de implante se refieren generalmente a rellenos sólidos o líquidos no tóxicos, inertes, diluyentes o material de encapsulación que no reaccionan con los ingredientes activos de la invención.

Cuando se administra el compuesto de la presente invención parenteralmente, se formula generalmente en una unidad de dosificación inyectable (solución, suspensión, emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para reconstitución en
35 soluciones inyectables estériles o dispersiones. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), las mezclas adecuadas de éstos, y aceites vegetales.

La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. Los vehículos no acuosos tales como un aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol, o aceite de cacahuete y ésteres, tales como miristato de isopropilo, también se
40 pueden usar como sistemas solventes para las composiciones de compuesto. Adicionalmente, se pueden añadir varios aditivos que mejoran la estabilidad, esterilidad, e isotonicidad de las composiciones, incluyen conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. En muchos casos, es deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio, y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede provocar por el
45 uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. De acuerdo con la

presente invención, however, cualquier vehículo, diluyente, o aditivo usado tiene que se compatible con los compuestos.

5 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar por la incorporación de los compuestos utilizados en la práctica de la presente invención en la cantidad requerida del disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes, según se desee.

10 Una formulación farmacológica de la presente invención se puede administrar al paciente en una formulación inyectable que contiene cualquier portador compatible, tal como diversos vehículos, adyuvantes, aditivos, y diluyentes; o los compuestos utilizados en la presente invención pueden administrarse por vía parenteral al paciente en forma de implantes subcutáneos de liberación lenta, o sistemas de administración dirigidos tales como los anticuerpos monoclonales, administración por vectores, matrices iontoforéticas, matrices poliméricas, liposomas y microsferas. Los ejemplos de sistemas de suministro útiles en la presente invención incluyen las patentes de Estados Unidos núms. 5,225,182; 5,169,383; 5,167,616; 4,959,217; 4,925,678; 4,487,603; 4,486,194; 4,447,233; 4,447,224; 4,439,196; y 4,475,196. Muchos otros implantes de este tipo, sistemas de suministro, y módulos son bien conocidos por aquellos con experiencia en la materia.

15 Una formulación farmacológica del compuesto utilizado en la presente invención se puede administrar oralmente al paciente. Los métodos convencionales tales como la administración del compuesto en tabletas, suspensiones, soluciones, emulsiones, cápsulas, polvos, jarabes y similares se pueden usar. Se prefieren las técnicas conocidas de administración por vía oral o intravenosa que conservan la actividad biológica. En una realización, el compuesto de la presente invento se puede administrar inicialmente por inyección intravenosa para llevar los niveles en sangre a un nivel adecuado. Después se mantienen los niveles del paciente por una forma de dosificación oral, aunque se pueden usar otras formas de administración en dependencia de la condición del paciente y como se indicó anteriormente.

20 En general, la dosis activa del compuesto para humanos está en el intervalo de 1ng/kg a aproximadamente 20-100 mg/kg peso corporal por día, preferentemente aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 2-10 mg/kg peso corporal por día, en un régimen de una dosis por día o dos o tres o más veces por día por un periodo de 1-2 semanas o más, preferentemente por 24 a 48 h o por infusión continua durante un periodo de 1-2 semanas o más.

Administración de compuestos de la presente invención a los ojos

30 Los compuestos de la presente invención pueden administrarse al ojo por vía tópica o en forma de una inyección, tal como una inyección intravítrea, una inyección sub-retiniana o una inyección bilateral. Más información sobre la administración de los compuestos de la presente invención se puede encontrar en Tolentino y otros, Retina 24 (2004) 132-138; Reich y otros, Molecular vision 9 (2003) 210-216.

35 Las formulaciones adicionales para la administración mejorada de los compuestos de la presente invención pueden incluir compuestos no formulados, compuestos unidos covalentemente al colesterol, y compuestos unidos a anticuerpos dirigidos (Song y otros, Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors, Nat Biotechnol. 2005 jun;23(6):709-17).

Listado de secuencias

<110> Quark Pharmaceuticals, Inc. and Silence Therapeutics AG

<120> USOS TERAPÉUTICOS DE LOS INHIBIDORES DE RTP801

<130> B07132A CA/CS

40 <150> EP 04019405.2

<151> 2004-08-16

<150> US 60/601983

<151> 2004-08-17

<150> US 60/604668

45 <151> 2004-08-25

<150> US 60/609786

<151> 2004-09-14

ES 2 691 196 T3

<150> US 60/638659

<151> 2004-12-22

<150> US 60/664236

<151> 2005-03-22

5 <150> US 60/688943

<151> 2005-06-08

<160> 344

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

10 <211> 1782

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
tttggccctc gaggccaaga attcggcacg agggggggag gtgcgagcgt ggacctggga      60
cgggtctggg cggctctcgg tggttggcac gggttcgcac acccattcaa gcggcaggac      120
gcacttgctt tagcagttct cgctgaccgc gctagctgcg gcttctacgc tccggcactc      180
tgagttcatc agcaaacgcc ctggcgtctg tcctacccat gcctagcctt tgggaccgct      240
tctcgtcgtc gtccacctcc tcttcgccct cgtccttgcc ccgaactccc accccagatc      300
ggccgccgcg ctcagcctgg gggtcggcga cccgggagga ggggtttgac cgctccacga      360
gcctggagag ctcggactgc gagtccctgg acagcagcaa cagtggcttc gggccggagg      420
aagacacggc ttacctggat ggggtgctgt tgcccactt cgagctgctc agtgaccctg      480
aggatgaaca cttgtgtgcc aacctgatgc agctgctgca ggagagcctg gcccaggcgc      540
ggctgggctc tcgacgccct gcgcgccctg tgatgcctag ccagttggta agccagggtg      600
gcaaagaact actgcgctg gcctacagcg agccgtgagg cctgcggggg gcgctgctgg      660
acgtctgctg ggagcagggc aagagctgcc acagcgtggg ccagctggca ctcgacccca      720
gcctggtgcc caccttccag ctgaccctcg tgctgcgctt ggactcacga ctctggccca      780
agatccaggg gctgttttag tccgccaact ctcccttctt ccctggcttc agccagtccc      840
tgacgctgag cactggcttc cgagtcacatc agaagaagct gtacagctcg gaacagctgc      900
```

ES 2 691 196 T3

tcattgagga gtgttgaact tcaacctgag ggggccgaca gtgccctcca agacagagac 960
gactgaactt ttggggtgga gactagaggc aggagctgag ggactgattc ctgtggttgg 1020
aaaactgagg cagccaccta aggtggaggt gggggaatag tgtttcccag gaagctcatt 1080
gagttgtgtg cgggtggctg tgcattgggg acacataccc ctcagtactg tagcatgaaa 1140
caaaggctta ggggccaaca aggcctccag ctggatgtgt gtgtagcatg taccttatta 1200
tttttgttac tgacagttaa cagtgggtgtg acatccagag agcagctggg ctgctcccgc 1260
cccagcccgg cccaggggtga aggaagaggc acgtgctcct cagagcagcc ggagggaggg 1320
gggaggtcgg aggtcgtgga ggtggtttgt gtatcttact ggtctgaagg gaccaagtgt 1380
gtttgttgtt tgttttgtat cttgtttttc tgatcggagc atcactactg acctgttga 1440
ggcagctatc ttacagacgc atgaatgtaa gagtaggaag ggggtgggtgt cagggatcac 1500
ttgggatcct tgacacttga aaaattacac ctggcagctg cgtttaagcc ttccccatc 1560
gtgtactgca gagttgagct ggcaggggag gggctgagag ggtgggggct ggaaccctc 1620
cccgggagga gtgccatctg ggtcttccat ctagaactgt ttacatgaag ataagatact 1680
cactgttcat gaatacactt gatgttcaag tattaagacc tatgcaatat tttttacttt 1740
tctaataaac atgtttgtta aaacaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1782

<210> 2

<211> 232

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Ser Leu Trp Asp Arg Phe Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser
1 5 10 15
Pro Ser Ser Leu Pro Arg Thr Pro Thr Pro Asp Arg Pro Pro Arg Ser
20 25 30
Ala Trp Gly Ser Ala Thr Arg Glu Glu Gly Phe Asp Arg Ser Thr Ser
35 40 45
Leu Glu Ser Ser Asp Cys Glu Ser Leu Asp Ser Ser Asn Ser Gly Phe
50 55 60
Gly Pro Glu Glu Asp Thr Ala Tyr Leu Asp Gly Val Ser Leu Pro Asp
65 70 75 80
Phe Glu Leu Leu Ser Asp Pro Glu Asp Glu His Leu Cys Ala Asn Leu
85 90 95
Met Gln Leu Leu Gln Glu Ser Leu Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ser Arg
100 105 110
Arg Pro Ala Arg Leu Leu Met Pro Ser Gln Leu Val Ser Gln Val Gly
115 120 125

ES 2 691 196 T3

Lys Glu Leu Leu Arg Leu Ala Tyr Ser Glu Pro Cys Gly Leu Arg Gly
 130 135 140

Ala Leu Leu Asp Val Cys Val Glu Gln Gly Lys Ser Cys His Ser Val
 145 150 155 160

Gly Gln Leu Ala Leu Asp Pro Ser Leu Val Pro Thr Phe Gln Leu Thr
 165 170 175

Leu Val Leu Arg Leu Asp Ser Arg Leu Trp Pro Lys Ile Gln Gly Leu
 180 185 190

Phe Ser Ser Ala Asn Ser Pro Phe Leu Pro Gly Phe Ser Gln Ser Leu
 195 200 205

Thr Leu Ser Thr Gly Phe Arg Val Ile Lys Lys Lys Leu Tyr Ser Ser
 210 215 220

Glu Gln Leu Leu Ile Glu Glu Cys
 225 230

<210> 3

<211> 19

<212> ARN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 3

gcgcuagcug cggcuucua 19

10 <210> 4

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintetizado químicamente

<400> 4

cgagccugga gagcucgga 19

<210> 5

<211> 19

20 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 5
 gagucccugg acagcagca 19
 <210> 6
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 6
 10 ccaaccugau gcagcugcu 19
 <210> 7
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 7
 cgugcugcgc cuggacuca 19
 <210> 8
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 8
 ucgcugaccg cgcuagcug 19
 <210> 9
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 9
 cugaccgcgc uagcugcgg 19

- <210> 10
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 10
 accgcgcuag cugcggcuu 19
 <210> 11
- 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 11
 agccuggaga gcucggacu 19
 <210> 12
 <211> 19
 <212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 12
 ccuggagagc ucggacugc 19
- 25 <210> 13
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 13
 ucccuggaca gcagcaaca 19
 <210> 14
 <211> 19

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 5 <400> 14
 gacagcagca acaguggcu 19
 <210> 15
 <211> 19
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 15
 acagcagcaa caguggcu 19
 15 <210> 16
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 16
 gugccaaccu gaugcagcu 19
 <210> 17
 <211> 19
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 17
 30 accugaugca gcugcugca 19
 <210> 18
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 18
 augcagcugc ugcaggaga 19
 5 <210> 19
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 19
 agccgugcgg ccugcggg 19
 <210> 20
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 20
 20 cucuggccca agauccagg 19
 <210> 21
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 21
 cagccagucc cugacgug 19
 <210> 22
 30 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 22
 cccucagua cuguagcau 19
 <210> 23
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 23
 10 aggcagcuau cuuacagac 19
 <210> 24
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 24
 cugggucuuc caucuagaa 19
 <210> 25
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 25
 gaauacacuu gauguucaa 19
 <210> 26
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 26
 uaagaccuau gcaauuuu 19

<210> 27
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 27
 agaccuaugc aauauuuuu 19
 <210> 28
 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 28
 gcucggacug cgaguccu 19
 <210> 29
 <211> 19
 <212> ARN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 29
 uacacuugau guucaagua 19
 25 <210> 30
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 30
 uuuucuaaua aacauguuu 19
 <210> 31
 <211> 19

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 5 <400> 31
 cgcacuuguc uuagcaguu 19
 <210> 32
 <211> 19
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 32
 gaccgcuucu cgucgucgu 19
 15 <210> 33
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 33
 ccggaggaag acacggcuu 19
 <210> 34
 <211> 19
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 34
 30 gaccugagg augaacacu 19
 <210> 35
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 35
 gcugggcucu cgacgccu 19
 5 <210> 36
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 36
 gccugcgcg ccugcugau 19
 <210> 37
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 37
 20 gccagguggg caaagaacu 19
 <210> 38
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 38
 cuggccuaca gcgagccgu 19
 <210> 39
 30 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 39
 ggggggcgcu gcuggacgu 19
 <210> 40
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 40
 10 gcacuggcuu ccgagucau 19
 <210> 41
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 41
 ccaggaagcu cauugaguu 19
 <210> 42
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 42
 cguguacugc agaguugag 19
 <210> 43
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 43
 ggaggugguu uguguaucu 19

- <210> 44
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 44
 gaccaagugu guuuguugu 19
 <210> 45
- 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 45
 gugugccaac cugaugcag 19
 <210> 46
 <211> 19
 <212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 46
 guggagacua gaggcagga 19
- 25 <210> 47
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 47
 ugccaaccug augcagcug 19
 <210> 48
 <211> 19

- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- 5 <400> 48
caaccugaug cagcugcug 19
- <210> 49
- <211> 19
- <212> ARN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 49
cugaugcagc ugcugcagg 19
- 15 <210> 50
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> Sintetizado químicamente
- <400> 50
gaugcagcug cugcaggag 19
- <210> 51
- <211> 19
- 25 <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 51
- 30 caucguguac ugcagaguu 19
- <210> 52
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 52
 gguggagacu agaggcagg 19
 5 <210> 53
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 53
 uagaagccgc agcuagcgc 19
 <210> 54
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 54
 20 uccgagcucu ccaggcucg 19
 <210> 55
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 55
 ugcugcuguc cagggacuc 19
 <210> 56
 30 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 56
 agcagcugca ucagguugg 19
 <210> 57
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 57
 10 ugaguccagg cgcagcacg 19
 <210> 58
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 58
 cagcuagcgc ggucagcga 19
 <210> 59
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 59
 ccgcagcuag cgcggucag 19
 <210> 60
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 60
 aagccgcagc uagcgcggu 19

- <210> 61
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 61
 aguccgagcu cuccaggcu 19
 <210> 62
- 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 62
 gcaguccgag cucuccagg 19
 <210> 63
 <211> 19
 <212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 63
 uguugcugcu guccaggga 19
- 25 <210> 64
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 64
 agccacuguu gcugcuguc 19
 <210> 65
 <211> 19

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 5 <400> 65
 aagccacugu ugcugcugu 19
 <210> 66
 <211> 19
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 66
 agcugcauca gguuggcac 19
 15 <210> 67
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 67
 ugcagcagcu gcaucaggu 19
 <210> 68
 <211> 19
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 68
 30 ucuccugcag cagcugcau 19
 <210> 69
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 69
 ccccgaggc cgcacggcu 19
 5 <210> 70
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 70
 ccuggaucuu gggccagag 19
 <210> 71
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 71
 20 cagcgucagg gacuggcug 19
 <210> 72
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 72
 augcuacagu acugagggg 19
 <210> 73
 30 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 73
 gucuguaaga uagcugccu 19
 <210> 74
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 74
 10 uucuagaugg aagaccag 19
 <210> 75
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 75
 uugaacauca aguguauuc 19
 <210> 76
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 76
 aaauaugca uaggucua 19
 <210> 77
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 77
 aaaaauauug cauaggucu 19

- <210> 78
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 78
agggacucgc aguccgagc 19
<210> 79
- 10 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 79
uacuugaaca ucaagugua 19
<210> 80
<211> 19
<212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 80
aaacauguuu auuagaaaa 19
- 25 <210> 81
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
<400> 81
aacugcuaag acaagugcg 19
<210> 82
<211> 19

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 5 <400> 82
 acgacgacga gaagcgguc 19
 <210> 83
 <211> 19
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 83
 aagccguguc uuccuccgg 19
 15 <210> 84
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 84
 agugucauc cucaggguc 19
 <210> 85
 <211> 19
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 85
 30 agggcgucga gagcccagc 19
 <210> 86
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 86
 aucagcaggc ggcagggc 19
 5 <210> 87
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 87
 aguucuuugc ccaccuggc 19
 <210> 88
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 88
 20 acggcucgcu guaggccag 19
 <210> 89
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 89
 acguccagca ggccccc 19
 <210> 90
 30 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 90
 augacucgga agccagugc 19
 <210> 91
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 91
 10 aacucaauga gcuuccugg 19
 <210> 92
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 92
 cucaacucug caguacacg 19
 <210> 93
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 93
 agauacacaa accaccucc 19
 <210> 94
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 94
 acaacaaaca cacuugguc 19

- <210> 95
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 95
 cugcaucagg uggcacac 19
 <210> 96
- 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 96
 uccugccucu agucuccac 19
 <210> 97
 <211> 19
 <212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 97
 cagcugcauc agguuggca 19
- 25 <210> 98
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 98
 cagcagcugc aucagguug 19
 <210> 99
 <211> 19

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 5 <400> 99
 ccugcagcag cugcaucag 19
 <210> 100
 <211> 19
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 100
 cuccugcagc agcugcauc 19
 15 <210> 101
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 101
 aacucugcag uacacgaug 19
 <210> 102
 <211> 19
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 102
 30 ccugccucua guccacc 19
 <210> 103
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 103
ctagccagtt ggtaagcca 19
5 <210> 104
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
10 <223> Sintetizado químicamente
<400> 104
tgattccagt ggttgaaa 19
<210> 105
<211> 19
15 <212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 105
20 ccagtgggtg gaaaactga 19
<210> 106
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 106
gcttccgagt catcaagaa 19
<210> 107
30 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 107
 ggaagctcat tgagttgtg 19
 <210> 108
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 108
 10 ccatctgggt ctccatct 19
 <210> 109
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 109
 ggatgtgtgt gtagcatgt 19
 <210> 110
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 110
 acacataccc ctcaagtact 19
 <210> 111
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 111
 acatacccct cagtactgt 19

- <210> 112
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 112
 cactgttcat gaatacact 19
 <210> 113
- 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 113
 ccagctggat gtgtgtga 19
 <210> 114
 <211> 19
 <212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 114
 cggaacagct gtcattga 19
- 25 <210> 115
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 115
 gaagctcatt gagttgtgt 19
 <210> 116
 <211> 19

<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
5 <400> 116
ggacacatac ccctcagta 19
<210> 117
<211> 19
<212> ARN
10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 117
ggatcttga cacttgaaa 19
15 <210> 118
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
20 <223> Sintetizado químicamente
<400> 118
gtagcatgta ccttattat 19
<210> 119
<211> 19
25 <212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 119
30 tcagtactgt agcatggaa 19
<210> 120
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 120
tgtgtagcat gtaccttat 19
5 <210> 121
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
10 <223> Sintetizado químicamente
<400> 121
ctggatgtgt gtagcat 19
<210> 122
<211> 19
15 <212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 122
20 aacttgatg ttcaagtat 19
<210> 123
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 123
gcatgaatgt aagagtagg 19
<210> 124
30 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 124
 agcagcaaca gtggctcg 19
 <210> 125
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 125
 10 atgaatgtaa gagtaggaa 19
 <210> 126
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 126
 cagcagcaac agtggctc 19
 <210> 127
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 127
 catgaatgta agagtagga 19
 <210> 128
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 128
 gatgtcaag tattaagac 19

- <210> 129
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 129
tgatgcagct gctgcagga 19
<210> 130
- 10 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 130
gaatacactt gatgttcaa 19
<210> 131
<211> 19
<212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 131
tgaatacact tgatgttca 19
- 25 <210> 132
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
<400> 132
atacacttga tgttcaagt 19
<210> 133
<211> 19

- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- 5 <400> 133
 catgaataca cttgatgtt 19
- <210> 134
- <211> 19
- <212> ARN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 134
 ctggacagca gcaacagtg 19
- 15 <210> 135
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> Sintetizado químicamente
- <400> 135
 gttcatgaat acacttgat 19
- <210> 136
- <211> 19
- 25 <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 136
- 30 gttcatgaat acacttgat 19
- <210> 137
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 137
tggacagcag caacagtgg 19
5 <210> 138
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
10 <223> Sintetizado químicamente
<400> 138
tgtgtgcaa cctgatgca 19
<210> 139
<211> 19
15 <212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 139
20 ttcataaata cacttgatg 19
<210> 140
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 140
aacctgatgc agctgctgc 19
<210> 141
30 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 141
 agtccctgga cagcagcaa 19
 <210> 142
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 142
 10 ccctcagtac tgtagcatg 19
 <210> 143
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 143
 cctggacagc agcaacagt 19
 <210> 144
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 144
 tgtgccaacc tgatgcagc 19
 <210> 145
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 145
 aatacacttg atgttcaag 19

- <210> 146
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 146
atgaatacac ttgatgttc 19
<210> 147
- 10 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 147
tgatgcagct gctgcagga 19
<210> 148
<211> 19
<212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 148
agaactgttt acatgaaga 19
- 25 <210> 149
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
<400> 149
atctagaact gtttacatg 19
<210> 150
<211> 19

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 5 <400> 150
 ccatgcctag cctttggga 19
 <210> 151
 <211> 19
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 151
 ctagaactgt ttacatgaa 19
 15 <210> 152
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 152
 gaactgttta catgaagat 19
 <210> 153
 <211> 19
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 153
 30 ggtcttccat ctagaactg 19
 <210> 154
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 154
 ccatctagaa ctgtttaca 19
 5 <210> 155
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 155
 ctccatcta gaactgtt 19
 <210> 156
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 156
 20 tagaactgtt tacatgaag 19
 <210> 157
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 157
 tctccatct agaactgtt 19
 <210> 158
 30 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 158
 catctagaac tgttacat 19
 <210> 159
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 159
 10 ggtctcca tctagaact 19
 <210> 160
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 160
 tccatctaga actgtttac 19
 <210> 161
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 161
 tctagaactg ttacatga 19
 <210> 162
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 162
 ttccatctag aactgttta 19

- <210> 163
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 163
gtcttccatc tagaactgt 19
<210> 164
- 10 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 164
caagtattaa gacctatgc 19
<210> 165
<211> 19
<212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 165
gtattaagac ctatgcaat 19
- 25 <210> 166
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
<400> 166
agtattaaga cctatgcaa 19
<210> 167
<211> 19

- <212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
- 5 <400> 167
atgttcaagt attaagacc 19
<210> 168
<211> 19
<212> ARN
- 10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 168
cacttgatgt tcaagtatt 19
- 15 <210> 169
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
- 20 <223> Sintetizado químicamente
<400> 169
ccaagatcca ggggctgtt 19
<210> 170
<211> 19
- 25 <212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 170
- 30 gtccaagtat taagaccta 19
<210> 171
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 171
 tcaagtatta agacctatg 19
 5 <210> 172
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 172
 aagtattaag acctatgca 19
 <210> 173
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 173
 20 tgttcaagta ttaagacct 19
 <210> 174
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 174
 tgggtcttcc atctagaac 19
 <210> 175
 30 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 175
 tggcttacca actggctag 19
 <210> 176
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 176
 10 ttccaacca ctggaatca 19
 <210> 177
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 177
 tcagtttcc aacctgg 19
 <210> 178
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 178
 ttcttgatga ctggaagc 19
 <210> 179
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 179
 cacaactcaa tgagcttc 19

- <210> 180
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 180
 agatggaaga cccagatgg 19
 <210> 181
- 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 181
 acatgctaca cacacatcc 19
 <210> 182
 <211> 19
 <212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 182
 agtactgagg ggtatgt 19
- 25 <210> 183
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 183
 acagtactga ggggatgt 19
 <210> 184
 <211> 19

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 5 <400> 184
 agtgtattca tgaacagtg 19
 <210> 185
 <211> 19
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 185
 tacacacaca tccagctgg 19
 15 <210> 186
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 186
 tcaatgagca gctgtccg 19
 <210> 187
 <211> 19
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 187
 30 acacaactca atgagcttc 19
 <210> 188
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 188
 tactgagggg tatgtgtcc 19
 5 <210> 189
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 189
 ttcaagtgt caaatatcc 19
 <210> 190
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 190
 20 ataataaggt acatgtctac 19
 <210> 191
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 191
 ttccatgcta cagtactga 19
 <210> 192
 30 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 192
 ataaggtaca tgctacaca 19
 <210> 193
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 193
 10 atgctacaca cacatccag 19
 <210> 194
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 194
 atacttgaac atcaagtg 19
 <210> 195
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 195
 cctactctta cattcatgc 19
 <210> 196
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 196
 cgaagccact gttgctgct 19

- <210> 197
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 197
 ttctactct tacattcat 19
 <210> 198
- 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 198
 gaagccactg ttgctgctg 19
 <210> 199
 <211> 19
 <212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 199
 tcctactctt acattcatg 19
- 25 <210> 200
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 200
 gtcttaatac ttgaacatc 19
 <210> 201
 <211> 19

- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- 5 <400> 201
- tcctgcagca gctgcatca 19
- <210> 202
- <211> 19
- <212> ARN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 202
- ttgaacatca agtgtattc 19
- 15 <210> 203
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> Sintetizado químicamente
- <400> 203
- tgaacatcaa gtgtattca 19
- <210> 204
- <211> 19
- 25 <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 204
- 30 acttgaacat caagtgat 19
- <210> 205
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 205
 aacatcaagt gtattcatg 19
- 5 <210> 206
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 206
 cactgttgct gctgtccag 19
 <210> 207
 <211> 19
- 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 207
- 20 atcaagtga tcatgaac 19
 <210> 208
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 208
 acatcaagtg tattcatga 19
 <210> 209
- 30 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 209
 ccactgttgc tgctgtcca 19
 <210> 210
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 210
 10 tgcacatcaggc tggcacaca 19
 <210> 211
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 211
 catcaagtgt attcacaa 19
 <210> 212
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 212
 gcacagcctg catcaggtt 19
 <210> 213
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 213
 ttgctgctgt ccagggact 19

- <210> 214
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 214
 catgctacag tactgaggg 19
 <210> 215
- 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 215
 actgttgctg ctgtccagg 19
 <210> 216
 <211> 19
 <212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 216
 gctgcatcag gttggcaca 19
- 25 <210> 217
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 217
 cttgaacatc aagtgatt 19
 <210> 218
 <211> 19

- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- 5 <400> 218
- gaacatcaag tgtattcat 19
- <210> 219
- <211> 19
- <212> ARN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 219
- tcctgcagca gctgcatca 19
- 15 <210> 220
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> Sintetizado químicamente
- <400> 220
- tcctcatgta aacagtct 19
- <210> 221
- <211> 19
- 25 <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 221
- 30 catgtaaaca gtctagat 19
- <210> 222
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 222
 tcccaaaggc taggcatgg 19
 5 <210> 223
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 223
 ttcattgaaa cagttctag 19
 <210> 224
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 224
 20 atcttcatgt aaacagttc 19
 <210> 225
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 225
 cagttctaga tggaagacc 19
 <210> 226
 30 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 226
 tgtaaacagt tctagatgg 19
 <210> 227
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 227
 10 aaacagttct agatggaag 19
 <210> 228
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 228
 cttcatgtaa acagttcta 19
 <210> 229
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 229
 aacagttcta gatggaaga 19
 <210> 230
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 230
 atgtaaacag ttctagatg 19

- <210> 231
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 231
 agttctagat ggaagacc 19
 <210> 232
- 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 232
 gtaaacagtt ctatagga 19
 <210> 233
 <211> 19
 <212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 233
 tcatgtaaac agttctaga 19
- 25 <210> 234
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 234
 taaacagttc tagatgaa 19
 <210> 235
 <211> 19

- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- 5 <400> 235
- acagttctag atggaagac 19
- <210> 236
- <211> 19
- <212> ARN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 236
- gcataggtct taatactg 19
- 15 <210> 237
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> Sintetizado químicamente
- <400> 237
- attgcatagg tctaatac 19
- <210> 238
- <211> 19
- 25 <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 238
- 30 ttgcataggt ctaatact 19
- <210> 239
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 239
ggtcttaata ctggaacat 19
5 <210> 240
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
10 <223> Sintetizado químicamente
<400> 240
aatactgaa catcaagtg 19
<210> 241
<211> 19
15 <212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 241
20 aacagcccct ggatcttg 19
<210> 242
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 242
taggtcttaa tactgaac 19
<210> 243
30 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 243
 cataggtctt aataactga 19
 <210> 244
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 244
 10 tgcataaggtc ttaataact 19
 <210> 245
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 245
 aggtcttaact actgaaca 19
 <210> 246
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 246
 gttctagatg gaagaccca 19
 <210> 247
 <211> 21
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 247
 ccaggaagct cattgagtg t 21

- <210> 248
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 248
ccatctgggt ctccatcta g 21
<210> 249
- 10 <211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 249
ggatgtgtgt gtagcatgta c 21
<210> 250
<211> 21
<212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 250
caagtgtgtt tgtgtttgt t 21
- 25 <210> 251
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
<400> 251
cctcagtact gtagcatgga a 21
<210> 252
<211> 21

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 5 <400> 252
 gaccaagtgt gttgtgtt t 21
 <210> 253
 <211> 21
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 253
 gcttccgagt catcaagaag a 21
 15 <210> 254
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 254
 ggaggtgggg gaatagtgt t 21
 <210> 255
 <211> 21
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 255
 30 cagtactgta gcatggaaca a 21
 <210> 256
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 256
 gaatacactt gatgtcaag t 21
 5 <210> 257
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 257
 caagtattaa gacctatgca a 21
 <210> 258
 <211> 21
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 258
 20 gaacttttgg ggtggagact a 21
 <210> 259
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 259
 ggacacatac ccctcagtac t 21
 <210> 260
 30 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 260
 ggaggtggtt tgttatctt a 21
 <210> 261
 <211> 21
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 261
 10 ggatcttga cacttgaaaa a 21
 <210> 262
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 262
 ggtcttccat ctagaactgt t 21
 <210> 263
 20 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 263
 tgtgtagcat gtacctatt a 21
 <210> 264
 <211> 21
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 264
 caacaaggct tccagctgga t 21

- <210> 265
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 265
- cacttgggat ctttgacact t 21
- <210> 266
- 10 <211> 21
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 266
- catcactact gacctgtgt a 21
- <210> 267
- <211> 21
- <212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 267
- gtgtgtgtag catgtacctt a 21
- 25 <210> 268
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
- <400> 268
- gcatgaatgt aagagtagga a 21
- <210> 269
- <211> 21

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 5 <400> 269
 gacagcagca acagtggtc c 21
 <210> 270
 <211> 21
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 270
 tgatgcagct gctgcaggag a 21
 15 <210> 271
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 271
 tgaatacact tgatgtcaa g 21
 <210> 272
 <211> 21
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 272
 30 catgaataca cttgatgttc a 21
 <210> 273
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 273
 ggacagcagc aacagtggt t 21
 5 <210> 274
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 274
 gttcatgaat acactgatg t 21
 <210> 275
 <211> 21
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 275
 20 tcatgaatac acttgatgt c 21
 <210> 276
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 276
 tccttgaca gcagcaacag t 21
 <210> 277
 30 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 277
 agtccctgga cagcagcaac a 21
 <210> 278
 <211> 21
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 278
 10 gaatacactt gatgttcaag t 21
 <210> 279
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 279
 ctagaactgt ttacatgaag a 21
 <210> 280
 20 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 280
 ccatctagaa ctgtttacat g 21
 <210> 281
 <211> 21
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 281
 ctccatcta gaactgtta c 21

- <210> 282
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 282
 tcttccatct agaactgttt a 21
 <210> 283
- 10 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 283
 catctagaac tgtttacatg a 21
 <210> 284
 <211> 21
 <212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 284
 gggctctcca tctagaactg t 21
- 25 <210> 285
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 285
 tccatctaga actgtttaca t 21
 <210> 286
 <211> 21

- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- 5 <400> 286
- tctagaactg ttacatgaa g 21
- <210> 287
- <211> 21
- <212> ARN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 287
- ttcatctag aactgttac a 21
- 15 <210> 288
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> Sintetizado químicamente
- <400> 288
- gtctccatc tagaactgtt t 21
- <210> 289
- <211> 21
- 25 <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 289
- 30 tgatgtcaa gtattaagac c 21
- <210> 290
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 290
 gttcaagtat taagacctat g 21
 5 <210> 291
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 291
 tcaagtatta agacctatgc a 21
 <210> 292
 <211> 21
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 292
 20 gatgttcaag tattaagacc t 21
 <210> 293
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 293
 ttcaagtatt aagacctatg c 21
 <210> 294
 30 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 294
 ctgggtcttc catctagaac t 21
 <210> 295
 <211> 21
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 295
 10 tgggtcttcc atctagaact g 21
 <210> 296
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 296
 acaactcaat gagcttcctg g 21
 <210> 297
 20 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 297
 ctagatggaa gaccagatg g 21
 <210> 298
 <211> 21
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 298
 gtacatgcta cacacatc c 21

- <210> 299
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 299
- aacaaacaac aaacacactt g 21
- <210> 300
- 10 <211> 21
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 300
- ttccatgcta cagtactgag g 21
- <210> 301
- <211> 21
- <212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintetizado químicamente
- <400> 301
- aaacaacaaa cacacttggc c 21
- 25 <210> 302
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
- <400> 302
- tcttctgat gactcggaag c 21
- <210> 303
- <211> 21

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 5 <400> 303
 aaacactatt cccccacctc c 21
 <210> 304
 <211> 21
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 304
 ttgtccatg ctacagtact g 21
 15 <210> 305
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 305
 actgaacat caagtgatt c 21
 <210> 306
 <211> 21
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 306
 30 ttgcataggt ctaataactt g 21
 <210> 307
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 307
 tagtctccac cccaaaagtt c 21
 5 <210> 308
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 308
 agtactgagg ggtatgtgc c 21
 <210> 309
 <211> 21
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 309
 20 taagatacac aaaccacctc c 21
 <210> 310
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 310
 ttttcaagt gtcaaagatc c 21
 <210> 311
 30 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 311
 aacagttcta gatggaagac c 21
 <210> 312
 <211> 21
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 312
 10 taataaggta catgctacac a 21
 <210> 313
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 313
 atccagctgg aagccttgtt g 21
 <210> 314
 20 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 314
 aagtgcaaa gatccaagt g 21
 <210> 315
 <211> 21
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 315
 tacaacaggt cagtagtgat g 21

- <210> 316
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 316
taaggtacat gctacacaca c 21
<210> 317
- 10 <211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
- 15 <400> 317
ttcctactct tacattcatg c 21
<210> 318
<211> 21
<212> ARN
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 318
gaagccactg ttgctgctgt c 21
- 25 <210> 319
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>
- 30 <223> Sintetizado químicamente
<400> 319
tctcctgcag cagctgcatc a 21
<210> 320
<211> 21

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 5 <400> 320
 cttgaacatc aagtgattc a 21
 <210> 321
 <211> 21
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 321
 tgaacatcaa gtgtattcat g 21
 15 <210> 322
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 322
 aagccactgt tgctgctgc c 21
 <210> 323
 <211> 21
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 323
 30 acatcaagtg tattcatgaa c 21
 <210> 324
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 324
 gaacatcaag tgtattcatg a 21
 5 <210> 325
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 325
 actgttgctg ctgtccaggg a 21
 <210> 326
 <211> 21
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 326
 20 tgttgctgct gtccaggac t 21
 <210> 327
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 327
 actgaacat caagtgatt c 21
 <210> 328
 30 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

<400> 328
 tcttcatgta aacagttcta g 21
 <210> 329
 <211> 21
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 329
 10 catgtaaaca gttctagatg g 21
 <210> 330
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 330
 gtaaacagtt ctatagggaa g 21
 <210> 331
 20 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 25 <400> 331
 taaacagttc tagatggaag a 21
 <210> 332
 <211> 21
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 332
 tcatgtaaac agttctagat g 21

<210> 333
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 333
 acagttctag atggaagacc c 21
 <210> 334
 10 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 334
 atgtaaacag ttctagatgg a 21
 <210> 335
 <211> 21
 <212> ARN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 335
 ctctcatgtaa acagttctag a 21
 25 <210> 336
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 336
 tgtaaacagt tctagatgga a 21
 <210> 337
 <211> 21

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 5 <400> 337
 aaacagtct agatggaaga c 21
 <210> 338
 <211> 21
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 338
 ggtcttaata ctggaacatc a 21
 15 <210> 339
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 339
 cataggtctt aataactgaa c 21
 <210> 340
 <211> 21
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 340
 30 tgcataggtc ttaacttg a 21
 <210> 341
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 341
 aggtcttaat actgaacat c 21
 5 <210> 342
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 342
 gcataggtct taataactga a 21
 <210> 343
 <211> 21
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 343
 20 agttctagat ggaagaccca g 21
 <210> 344
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 344
 cagttctaga tggaagaccc a 21

REIVINDICACIONES

5 1. Un inhibidor de RTP801 para uso en combinación con un inhibidor de VEGF o inhibidor del receptor 1 de VEGF en terapia para tratar a un paciente que padece una enfermedad ocular que implica neovascularización coroidea, siendo dicho inhibidor de RTP801 un ARNip, en donde el paciente está padeciendo de glaucoma, degeneración macular, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), AMD húmeda, una enfermedad ocular secundaria a diabetes, retinopatía diabética o edema macular diabético (DME).

2. Un inhibidor de RTP801 para uso en terapia de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor de RTP801 es un compuesto de ARNip que tiene la estructura de hebra doble:

5' (N)_x-Z 3'

10 (hebra antisentido)

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

(hebra en sentido),

15 en donde cada N y N' es un ribonucleótido que puede estar modificado o no modificado en su residuo azúcar y cada uno de (N)_x y (N')_y es un oligómero en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' por un enlace covalente;

en donde cada uno de x y y es un entero entre 19 y 40;

en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente es dTdT y está covalentemente unido al terminal 3' de la hebra en la cual está presente;

20 en donde la secuencia de (N)_x comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos que tiene una cualquiera de las secuencias antisentido de las Tablas A-C:

en donde la secuencia de (N')_y comprende un segundo tramo de nucleótidos contiguos;

y en donde la estructura de hebra doble se genera mediante emparejamiento de bases entre el primer tramo y el segundo tramo.

25 3. Un inhibidor de RTP801 para uso en terapia de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el primer tramo de nucleótidos contiguos tiene una cualquiera de las siguientes secuencias:

AGCUGCAUCAGGUUGGCAC (SEQ ID NO:66);

UGCAGCAGCUGCAUCAGGU (SEQ ID NO:67);

AUGCUACAGUACUGAGGGG (SEQ ID NO:72);

GUCUGUAAGAUAGCUGCCU (SEQ ID NO:73)

30 UUCUAGAUGGAAGACCCAG (SEQ ID NO:74);

UUGAACAUCAAGUGUAUUC (SEQ ID NO:75);

AAUAUUGCAUAGGUCUUA (SEQ ID NO:76)

AAAAUAUUGCAUAGGUCU (SEQ ID NO:77);

UACUUGAACAUCAAGUGUA (SEQ ID NO:79);

35 AACUCAUAGAGCUUCCUGG (SEQ ID NO:91),

CUCAACUCUGCAGUACACG (SEQ ID NO:92)

AGAUACACAAACCACCUCC (SEQ ID NO:93),

ACAACAAACACACUUGGUC (SEQ ID NO:94),

CUGCAUCAGGUUGGCACAC (SEQ ID NO:95);

AACUCUGCAGUACACGAUG (SEQ ID NO:101) y

CCUGCCUCUAGUCUCCACC (SEQ ID NO:102).

4. Un inhibidor de RTP801 para uso en terapia de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el primer tramo de nucleótidos contiguos tiene una cualquiera de las siguientes secuencias:

5 AGCUGCAUCAGGUUGGCAC (SEQ ID NO:66);

UUCUAGAUGGAAGACCCAG (SEQ ID NO:74);

UUGAACAUCAAGUGUAUUC (SEQ ID NO:75);

AAAAUAUUGCAUAGGUCU (SEQ ID NO:77);

UACUUGAACAUCAAGUGUA (SEQ ID NO:79) y

10 AACUCA AUGAGCUUCCUGG (SEQ ID NO:91).

5. Un inhibidor de RTP801 para uso en terapia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el inhibidor de VEGF o inhibidor del receptor 1 de VEGF es un anticuerpo.

6. Un inhibidor de RTP801 para uso en terapia de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo anti-VEGF es Ranibizumab.

15

Figura 1

Polinucleótido RTP801 humano (SEQ ID NO: 1

TTTGGCCCTC GAGGCCAAGA ATTCCGGCAG AGGGGGGGAG GTGCGAGCGT GGACCTGGGA 60
 CGGGTCTGGG CGGCTCTCGG TGGTTGGCAC GGGTTCGCAC ACCCATTCAA GCGGCAGGAC 120
 GCACTTGTCT TAGCAGTTCT CGCTGACCGC GCTAGCTGCG GCTTCTACGC TCCGGCACTC 180
 TGAGTTCATC AGCAAACGCC CTGGCGTCTG TCCTCACCAT GCCTAGCCTT TGGGACCGCT 240
 TCTCGTCGTC GTCCACCTCC TCTTCGCCCT CGTCCTTGCC CCGAACTCCC ACCCCAGATC 300
 GGCCGCCGCG CTCAGCCTGG GGGTCGGCGA CCCGGGAGGA GGGGTTTGAC CGTCCACGA 360
 GCCTGGAGAG CTCGGACTGC GAGTCCCTGG ACAGCAGCAA CAGTGGCTTC GGGCCGGAGG 420
 AAGACACGGC TTACCTGGAT GGGGTGTCGT TGCCCGACTT CGAGCTGCTC AGTGACCCCTG 480
 AGGATGAACA CTTGTGTGCC AACCTGATGC AGCTGCTGCA GGAGAGCCTG GCCCAGGGCG 540
 GGCTGGGCTC TCGACGCCCT GCGCGCCTGC TGATGCCTAG CCAGTTGGTA AGCCAGGTGG 600
 GCAAAGAACT ACTGCGCCTG GCCTACAGCG AGCCGTGCGG CCTGCGGGGG GCGCTGCTGG 660
 ACGTCTGCGT GGAGCAGGGC AAGAGCTGCC ACAGCGTGGG CCAGCTGGCA CTCGACCCCA 720
 GCCTGGTGCC CACCTTCCAG CTGACCCCTG TGCTGCGCCT GGACTCACGA CTCTGGCCCA 780
 AGATCCAGGG GCTGTTTAGC TCCGCCAACT CTCCCTTCCT CCCTGGCTTC AGCCAGTCCC 840
 TGACGCTGAG CACTGGCTTC CGAGTCATCA AGAAGAAGCT GTACAGCTCG GAACAGCTGC 900
 TCATTGAGGA GTGTTGAACT TCAACCTGAG GGGGCCGACA GTGCCCTCCA AGACAGAGAC 960
 GACTGAACTT TTGGGGTGGG GACTAGAGGC AGGAGCTGAG GGACTGATTC CTGTGCTTGG 1020
 AAAACTGAGG CAGCCACCTA AGGTGGAGGT GGGGGAATAG TGTTTCCCAG GAAGCTCATT 1080
 GAGTTGTGTG CGGGTGGCTG TGCATTGGGG ACACATACCC CTCAGTACTG TAGCATGAAA 1140
 CAAAGGCTTA GGGGCCAACA AGGCTTCCAG CTGGATGTGT GTGTAGCATG TACCTTATTA 1200
 TTTTGTGTAC TGACAGTTAA CAGTGGTGTG ACATCCAGAG AGCAGCTGGG CTGCTCCCGC 1260
 CCCAGCCCGG CCCAGGGTGA AGGAAGAGGC ACGTGCTCCT CAGAGCAGCC GGAGGGAGGG 1320
 GGGAGGTCGG AGGTCGTGGA GGTGGTTTGT GTATCTTACT GGTCTGAAGG GACCAAGTGT 1380
 GTTTGTTGTT TGTTTTGTAT CTTGTTTTTC TGATCGGAGC ATCACTACTG ACCTGTTGTA 1440
 GGCAGCTATC TTACAGACGC ATGAATGTAA GAGTAGGAAG GGGTGGGTGT CAGGGATCAC 1500
 TTGGGATCTT TGACACTTGA AAAATTACAC CTGGCAGCTG CGTTTAAGCC TTCCCCCATC 1560
 GTGTACTGCA GAGTTGAGCT GGCAGGGGAG GGGCTGAGAG GGTGGGGGCT GGAACCCCTC 1620
 CCCGGGAGGA GTGCCATCTG GGTCTTCCAT CTAGAACTGT TTACATGAAG ATAAGATACT 1680
 CACTGTTTAT GAATACACTT GATGTTCAAG TATTAAGACC TATGCAATAT TTTTACTTTT 1740
 TCTAATAAAC ATGTTTGTTA AAACAAAAA AAAAAAAA AA 1782

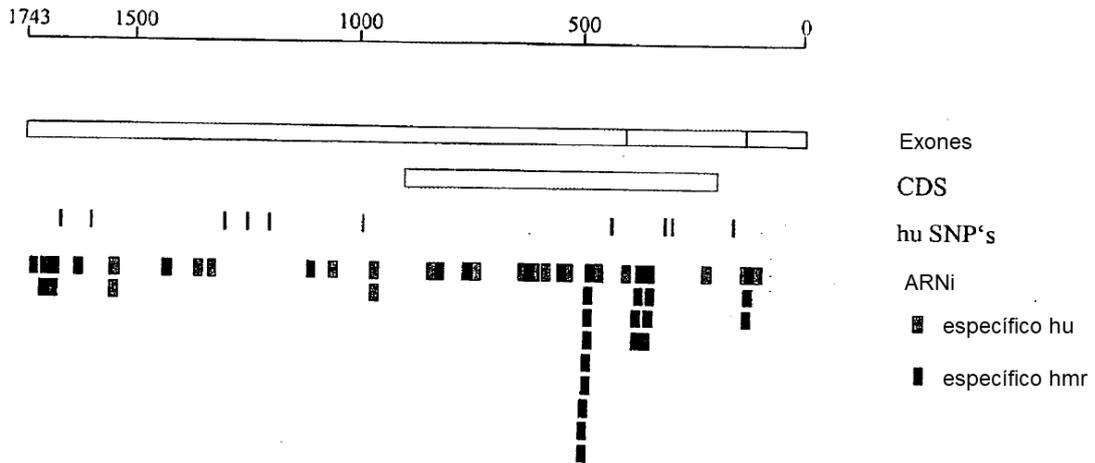
Figura 2

Polinucleótido RTP801 humano (SEQ ID NO:2)

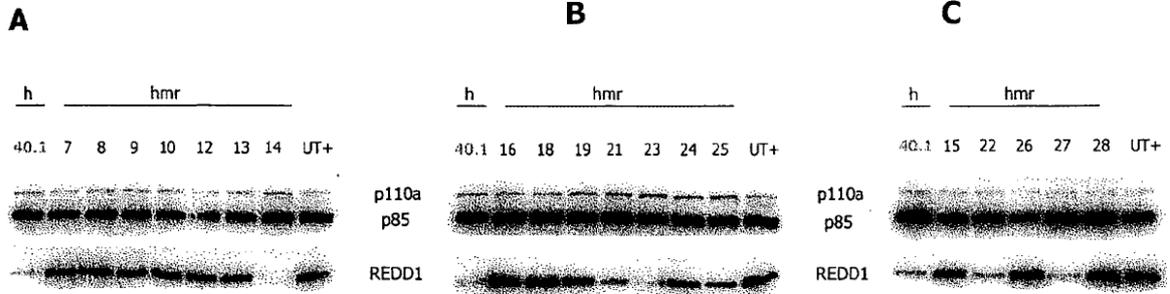
MPSLWDRFSS SSTSSSPSSL PRTPTPDRPP RSAWGSATRE EGFDRSTSLE 50
SSDCESLDSS NSGFGPEEDT AYLDGVSLPD FELLSDPEDE HLCANLMQLL 100
QESLAQARLG SRRPARLLMP SQLVSQVGKE LLRLAYSEPC GLRGALLDVC 150
VEQGKSCHSV GQLALDPSLV PTFQLTLVLR LDSRLWPKIQ GLFSSANS PF 200
LPGFSQSLTL STGFRVIKKK LYSSEQLLIE EC 232

Redd-1 humano
(NM_019058)

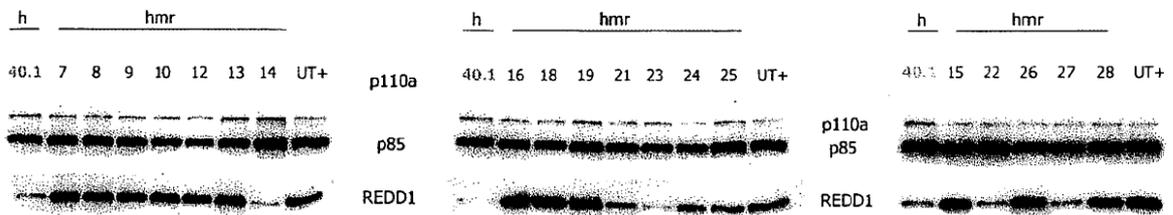
Figura 3

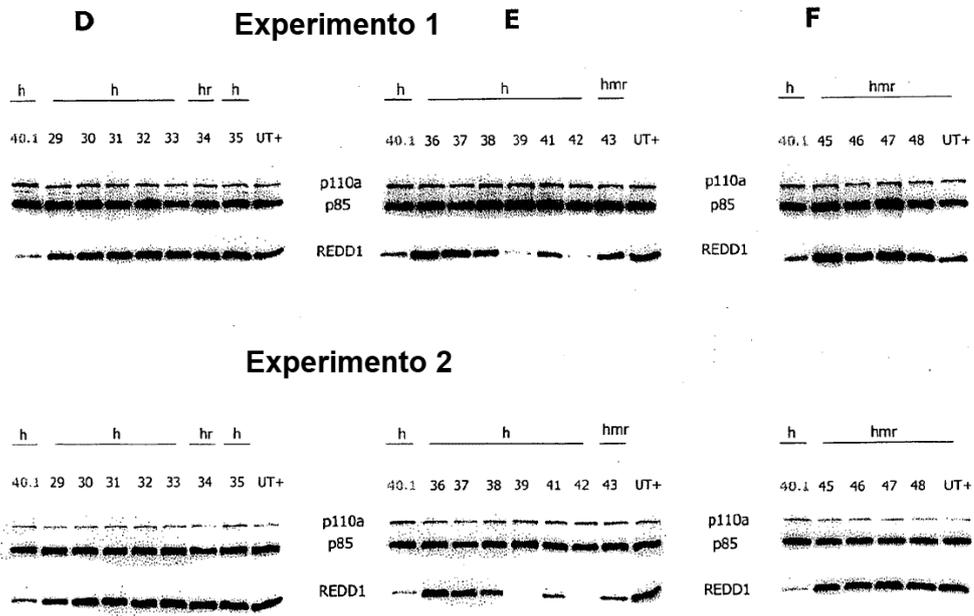


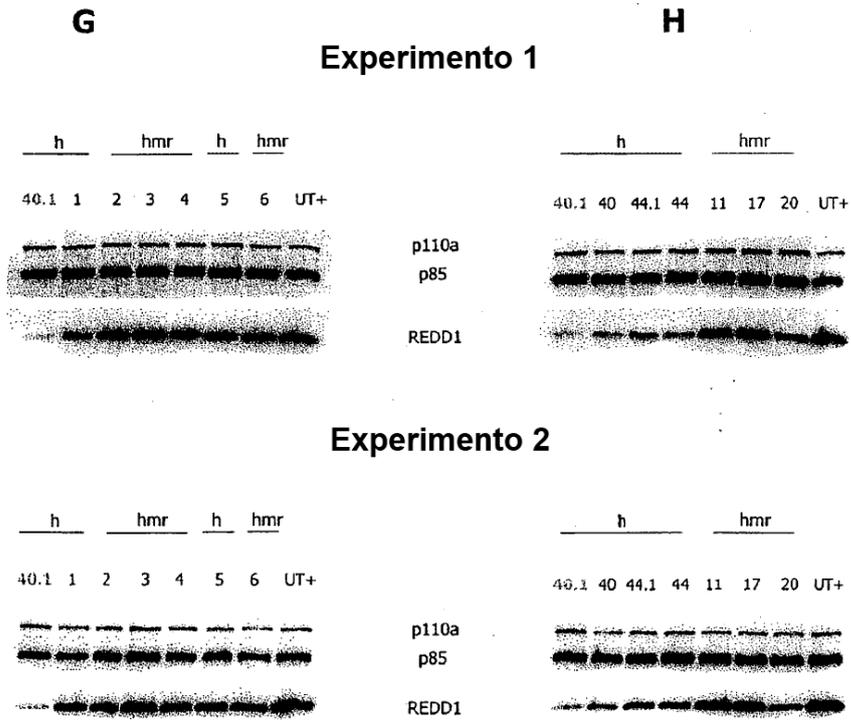
Experimento 1

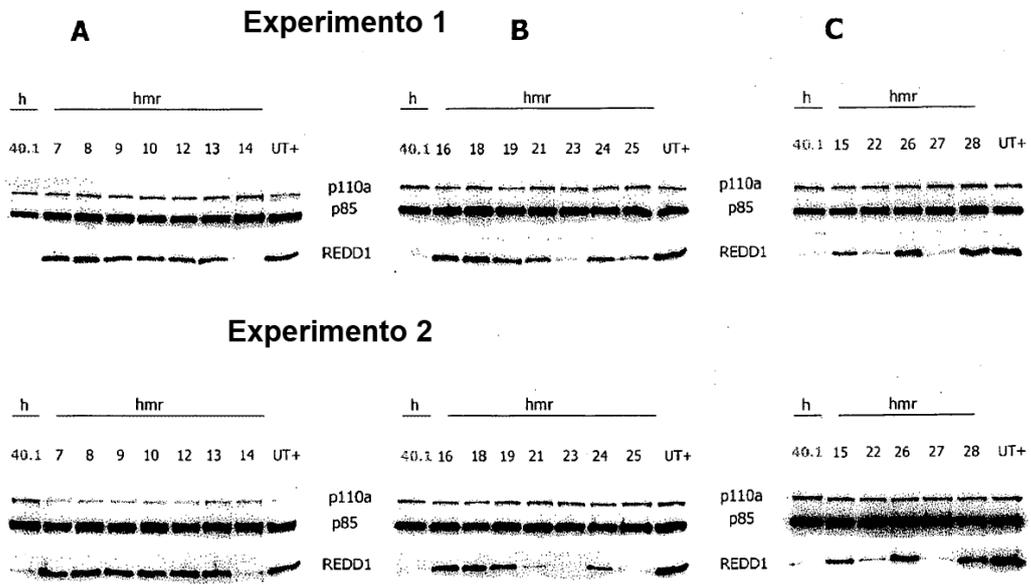


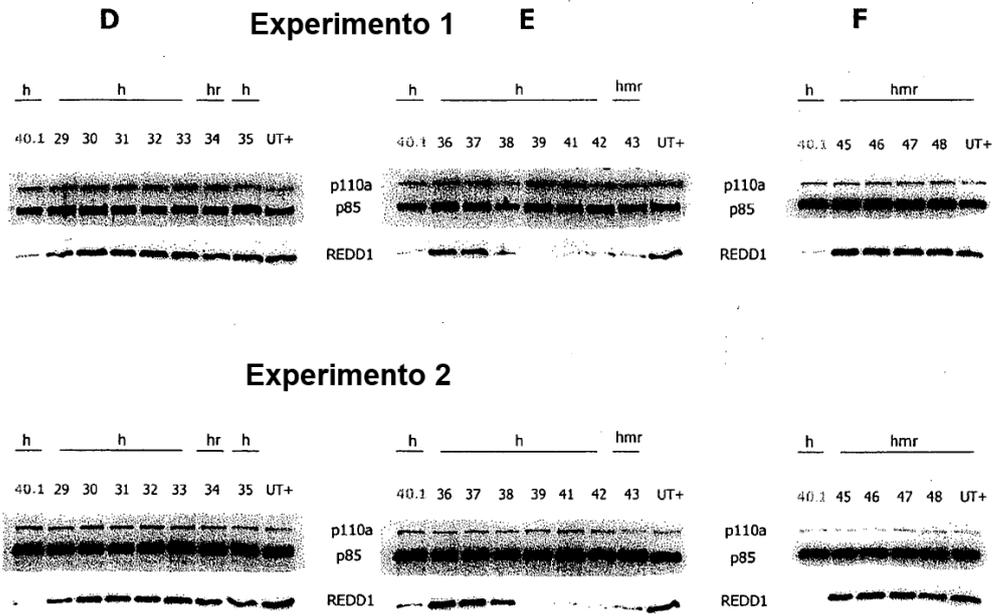
Experimento 2

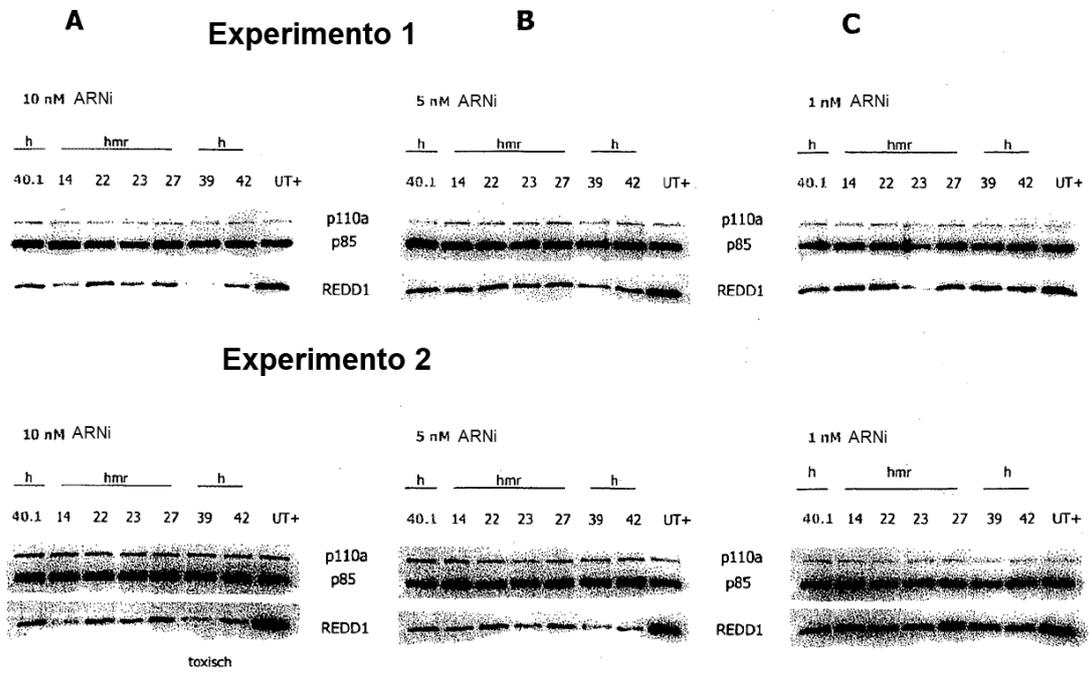




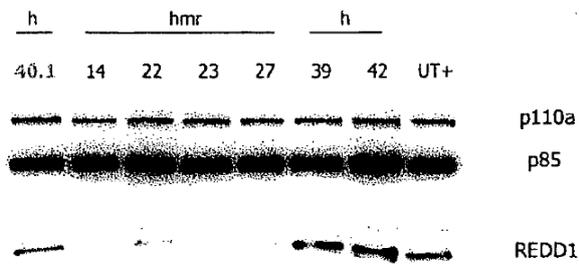








Experimento 1



Experimento 2

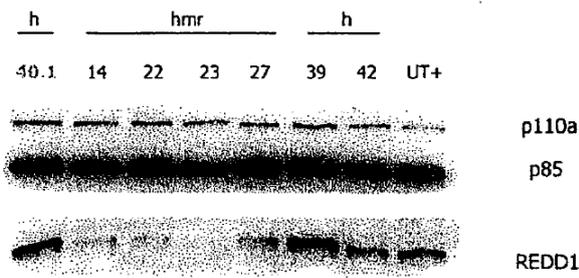


Figura 8

Fuga de vasos sanguíneos en ratones KO para RTP801 en comparación al control después de la inducción de CNV

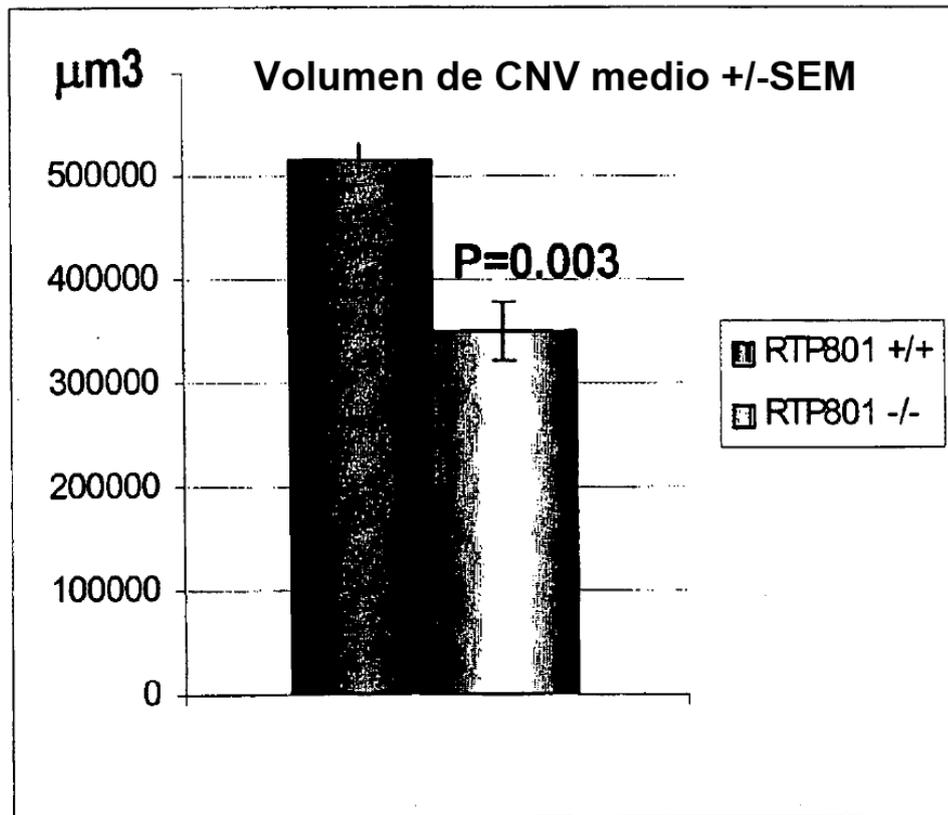


Figura 9

Reducción del volumen de CNV en respuesta a ARNip de RTP801 (REDD14 9 en comparación a los controles

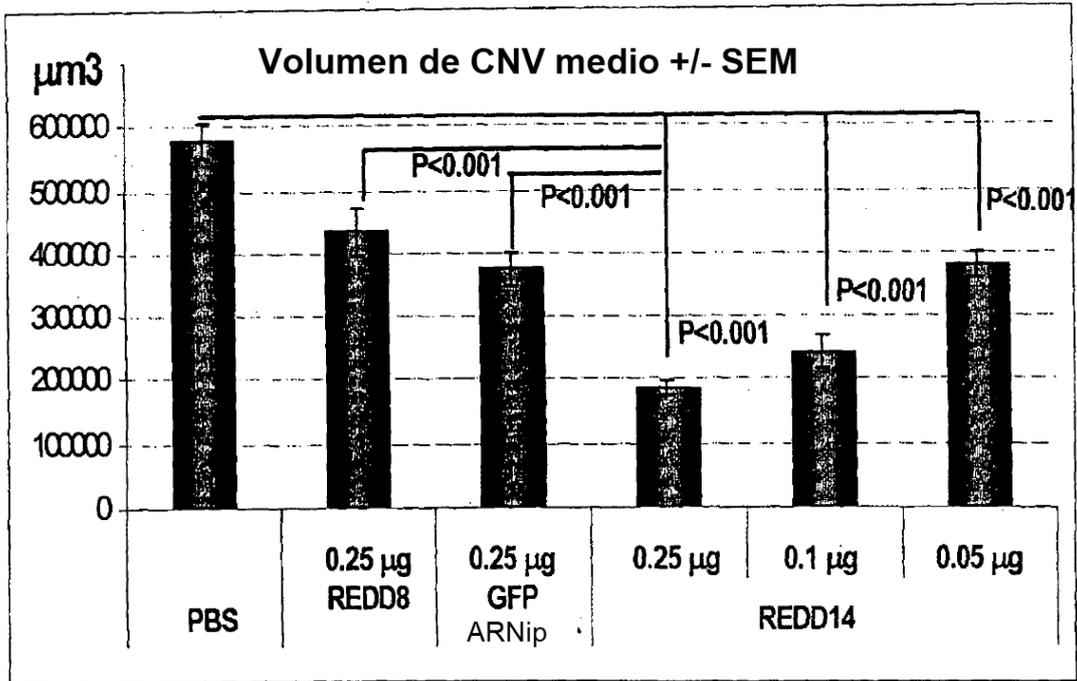


Figura 10

Reducción de la expresión de RTP801 en la coroides de monos tratados con láser en respuesta a ARNip DE RTP801 en comparación al control , medido por PCR en tiempo real

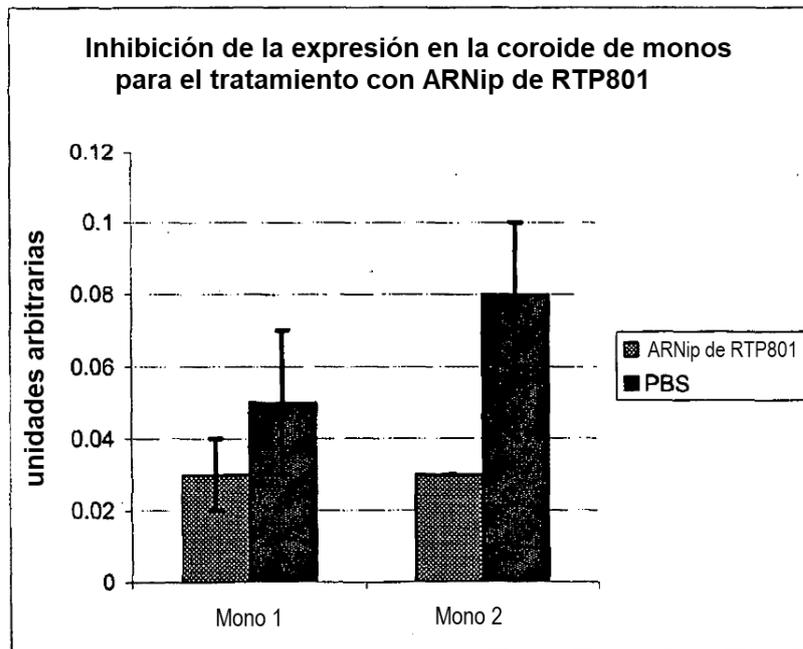
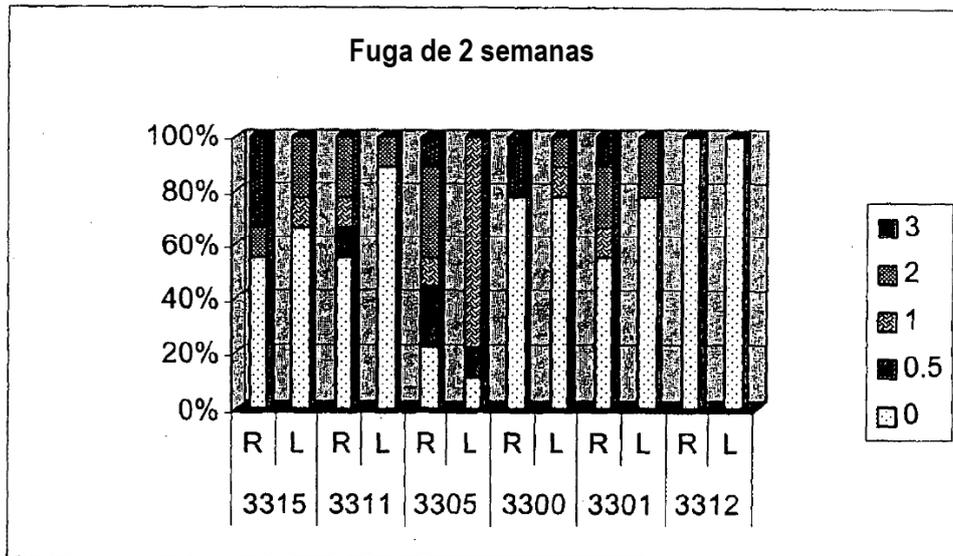


Figura. 11

Reducción de la fuga en un modelo de CNV en no primate en respuesta al ARNip de RTP801 en comparación a un control

a)



b)

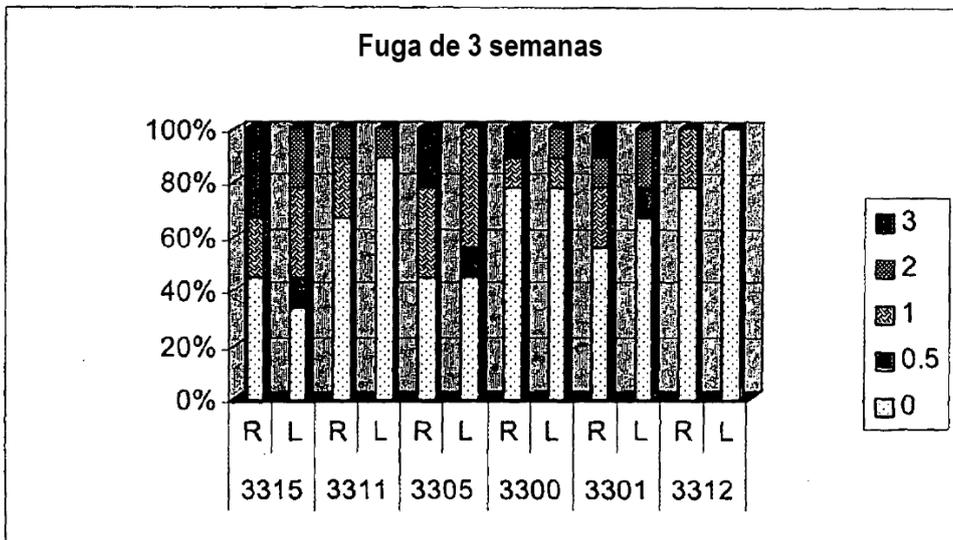
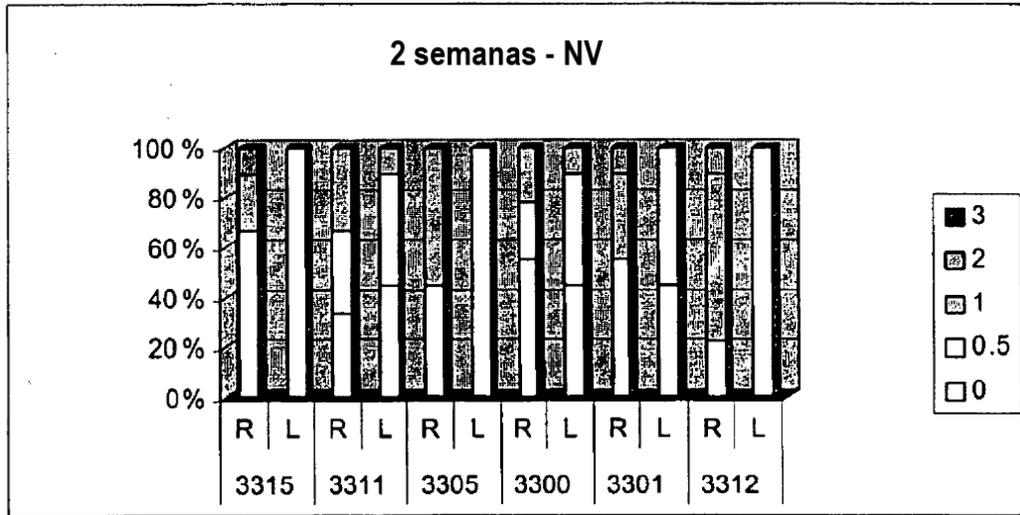


Figura 12

Reducción de neovascularización en modelo de CNV en no primate en respuesta al ARNip de RTP801 en comparación a un control

a)



b)

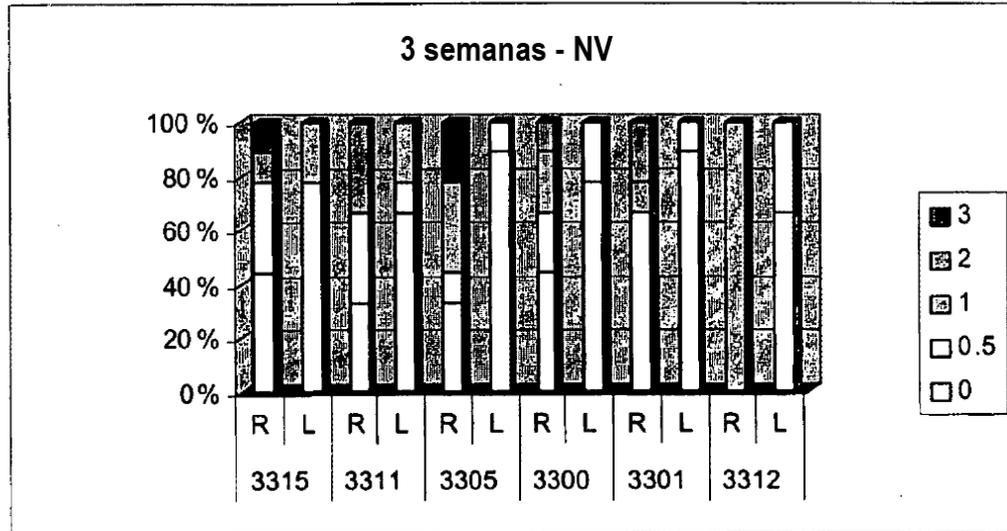
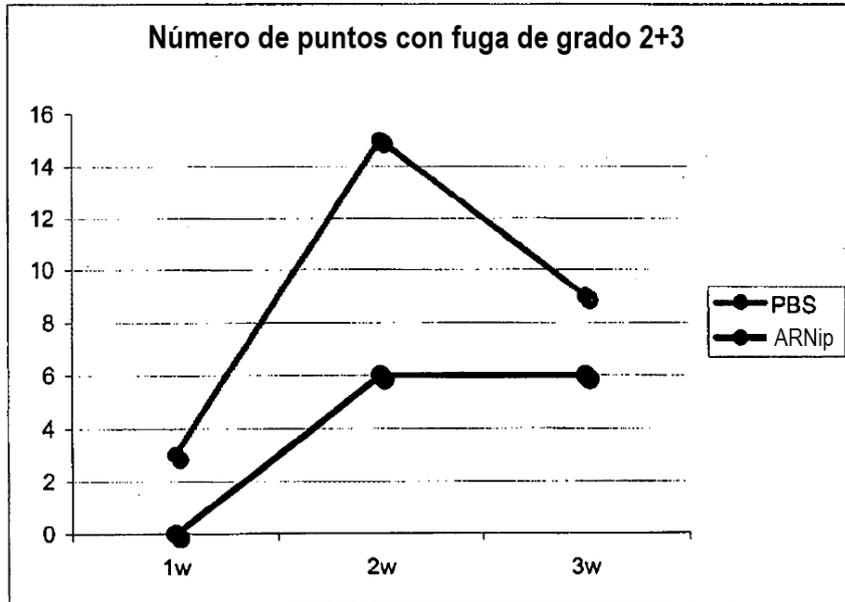


Figura 13

a)



b)

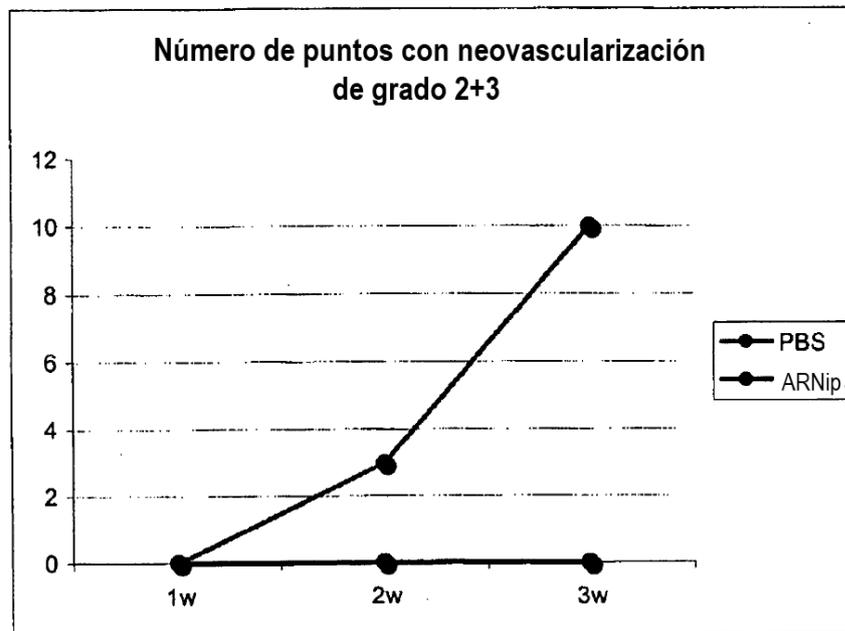


Figura 14

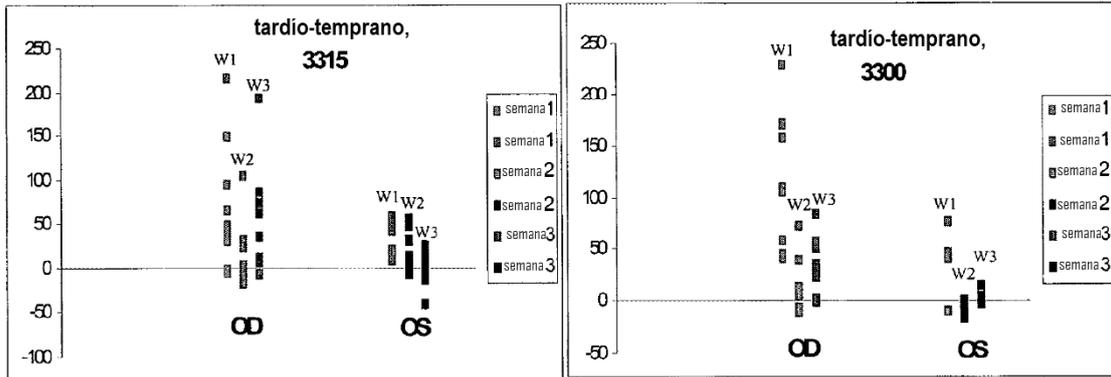
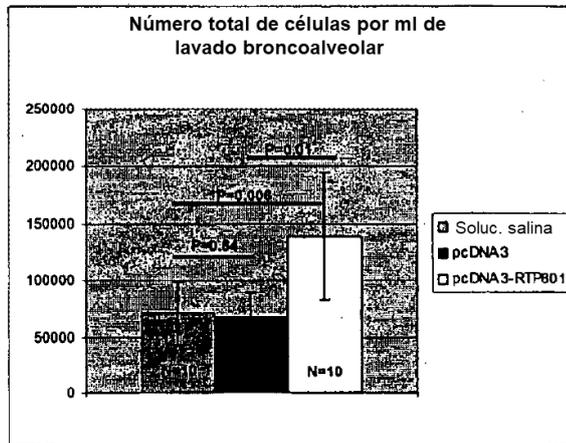
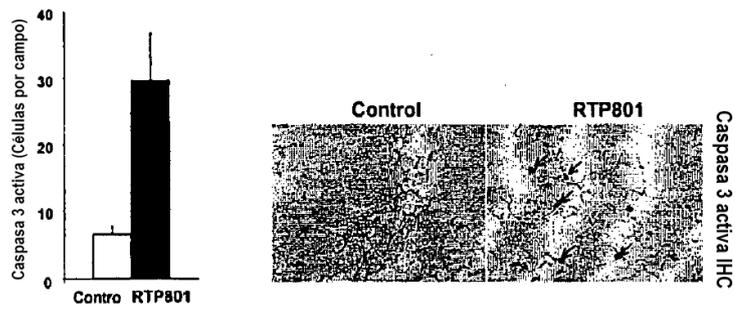


Figura 15

a.



b.



c.

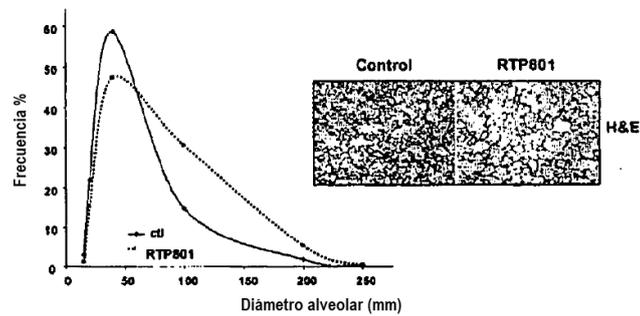
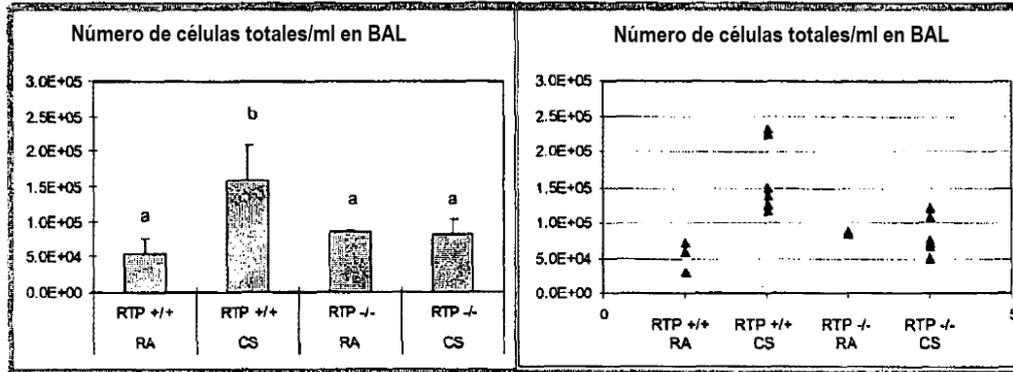
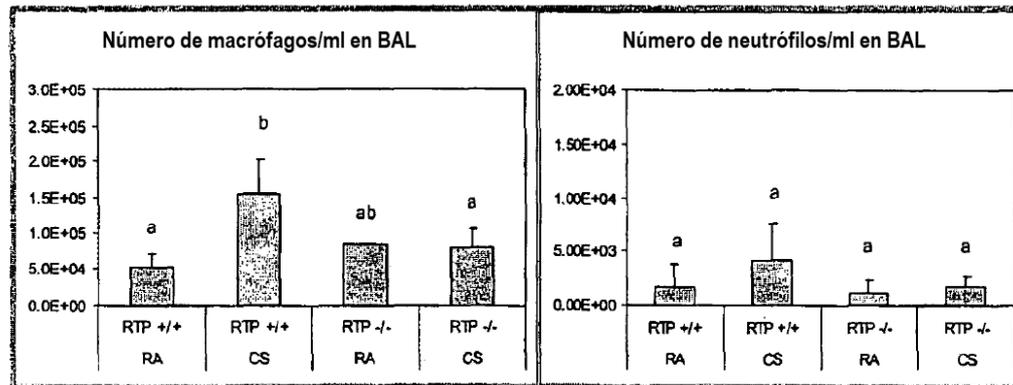


Figura 16

a.



b.



c.

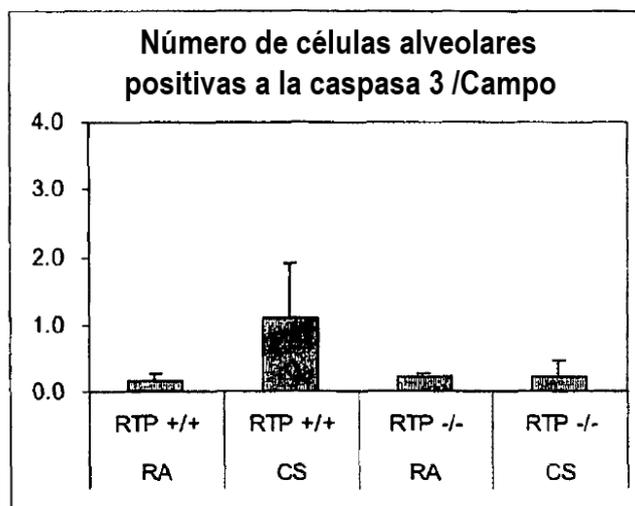
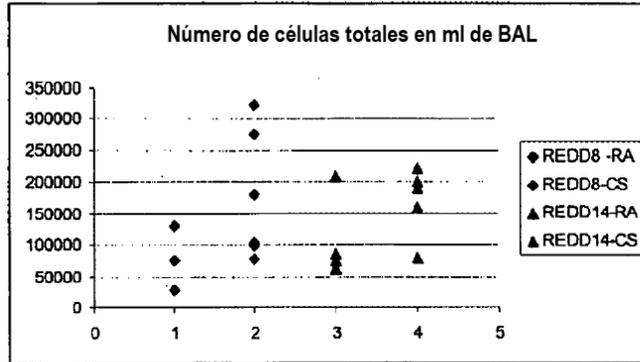
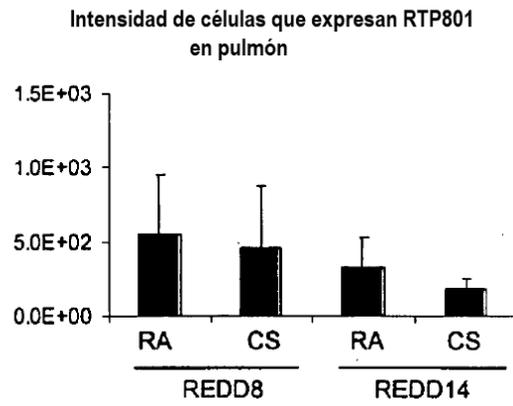


Figura 17

a.



b.



c.

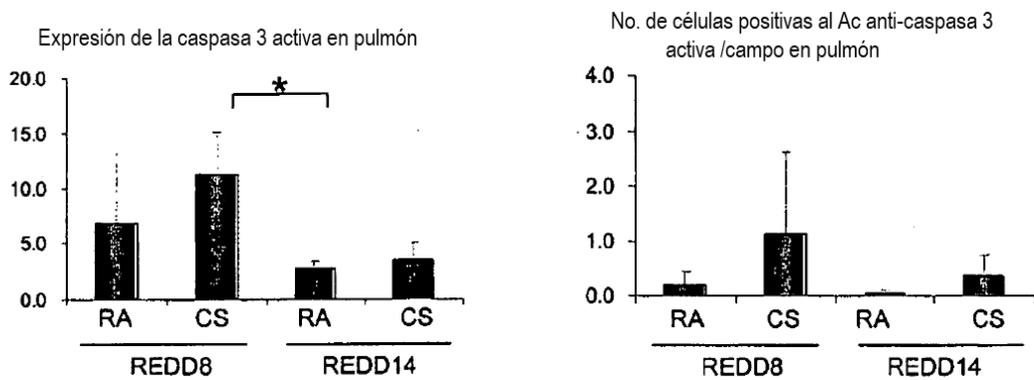


Figura 18

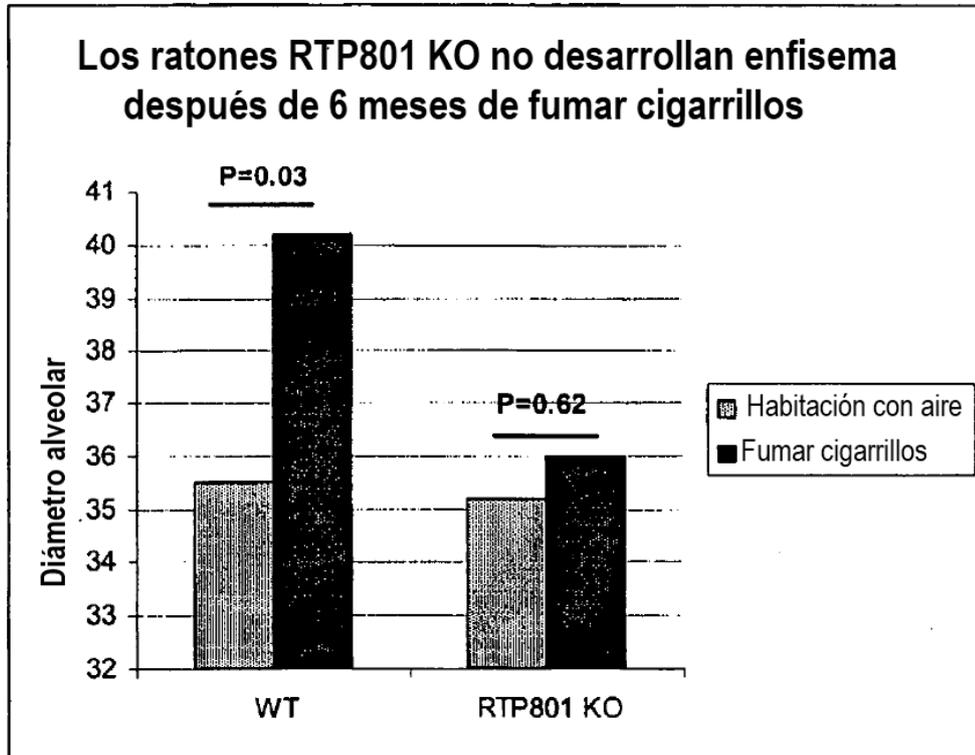


Figura 19

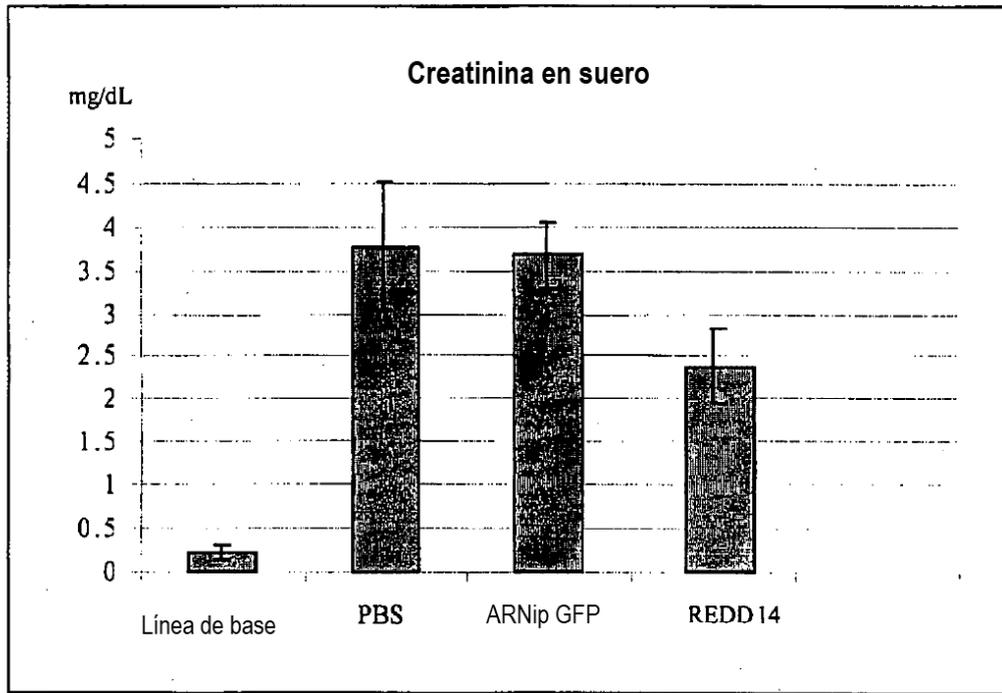


Figura 20

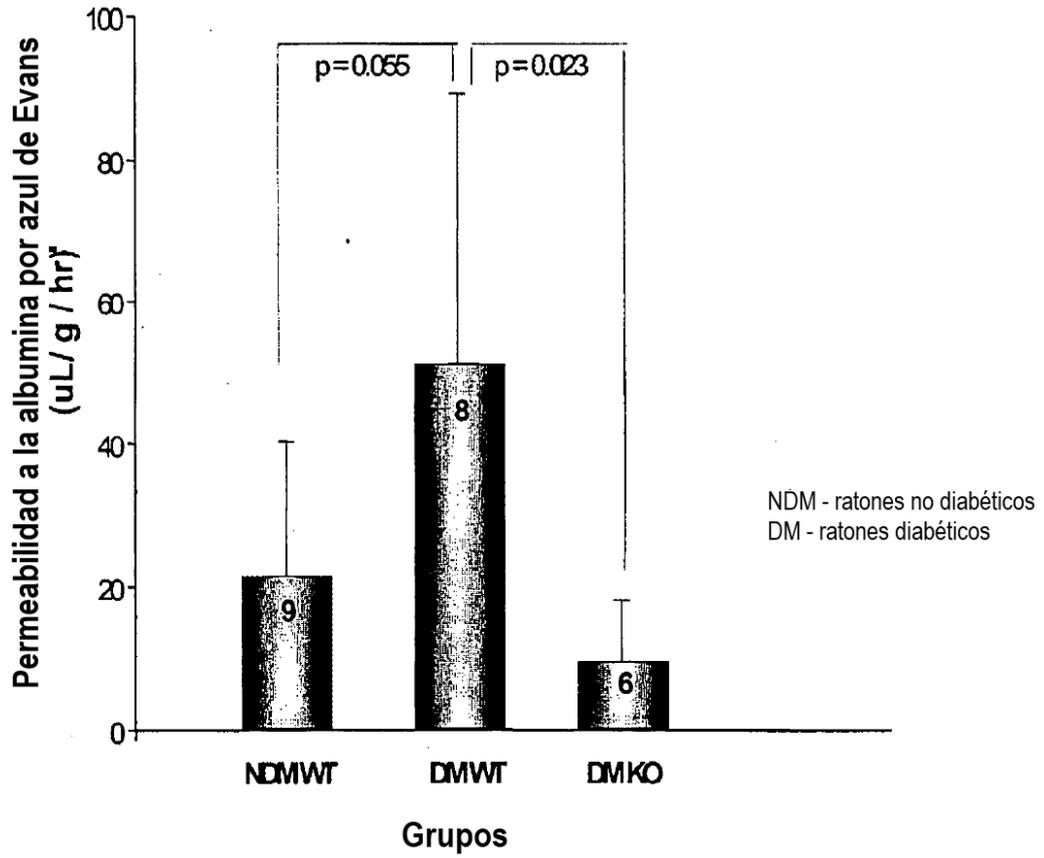


Figura 21

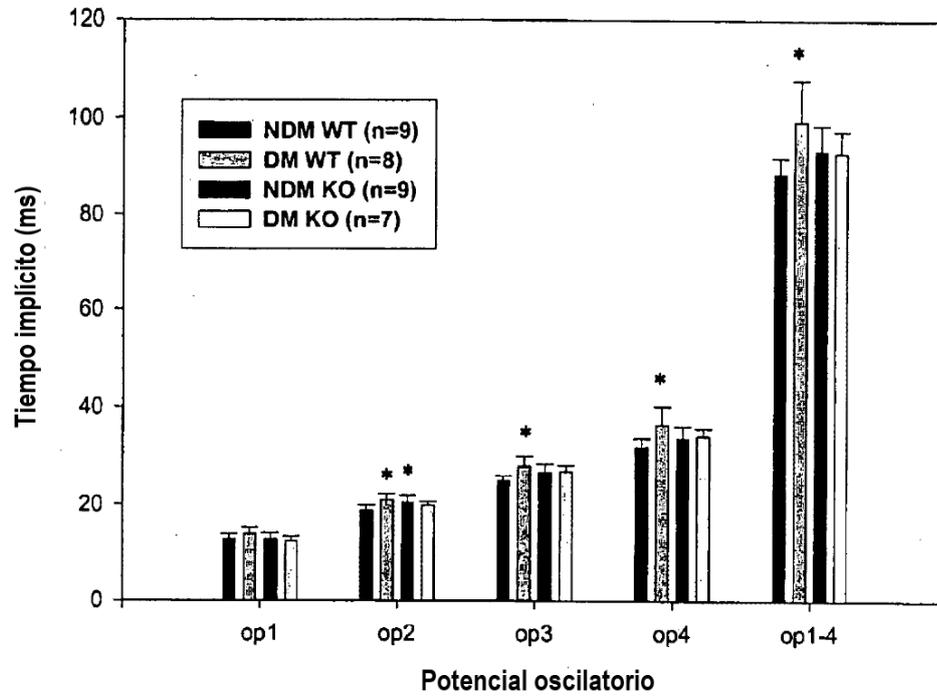


Figura 22

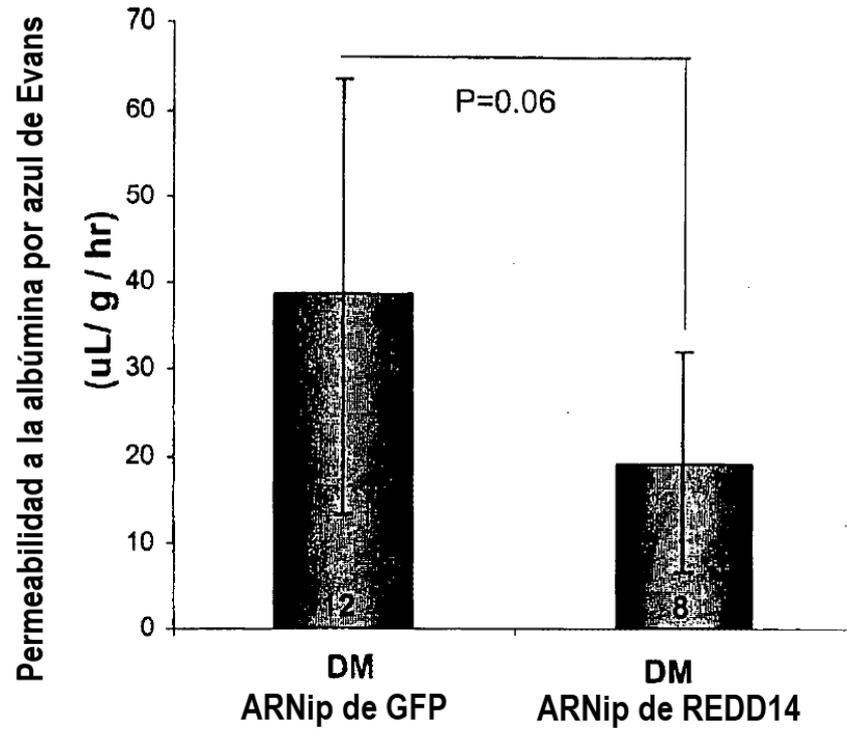


Figura 23

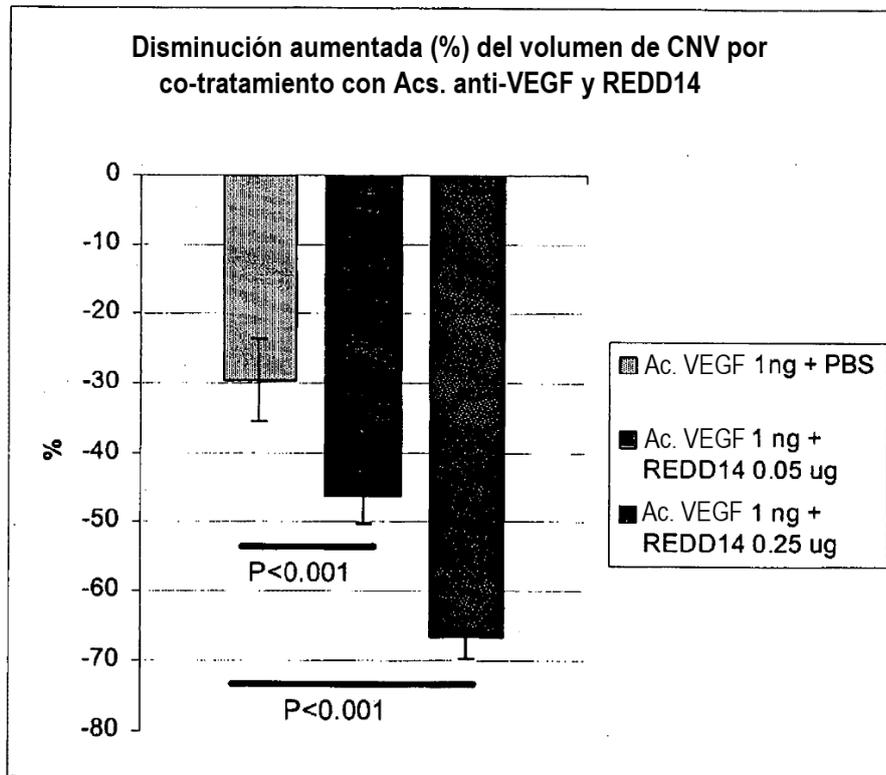


Figura 24

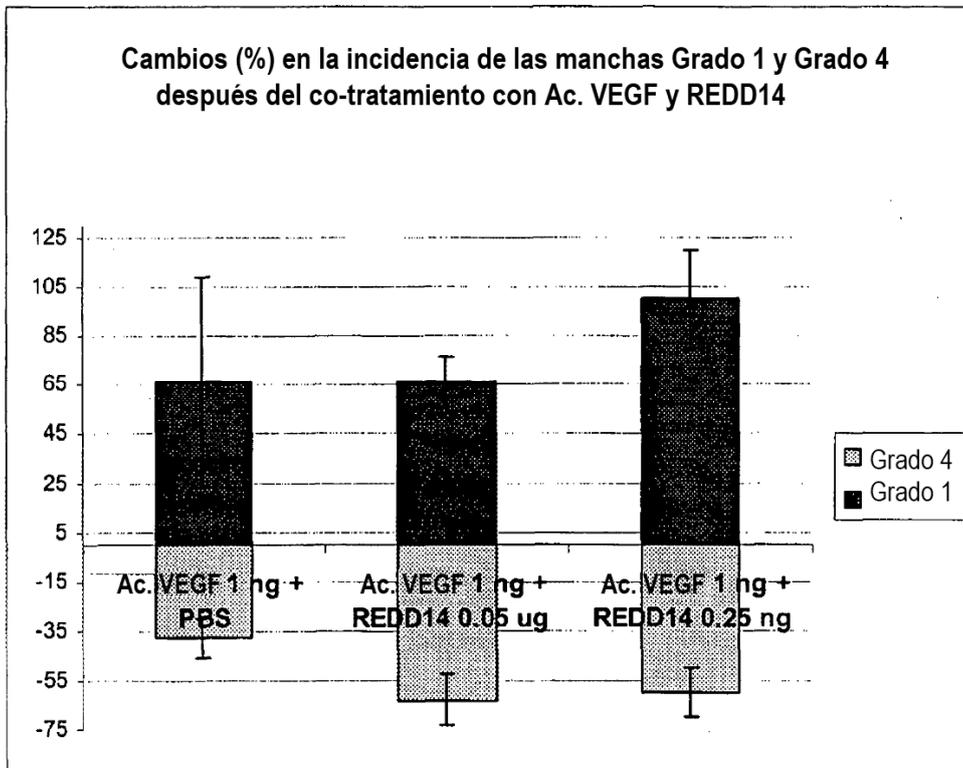


Figura 25

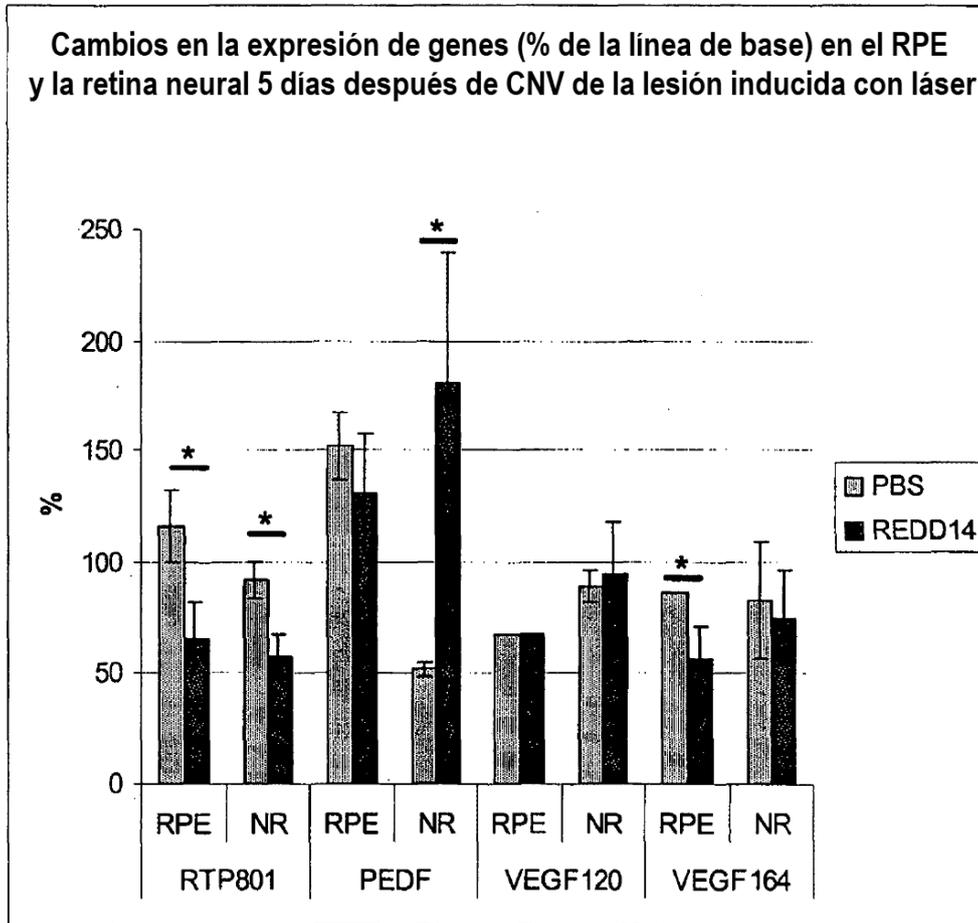
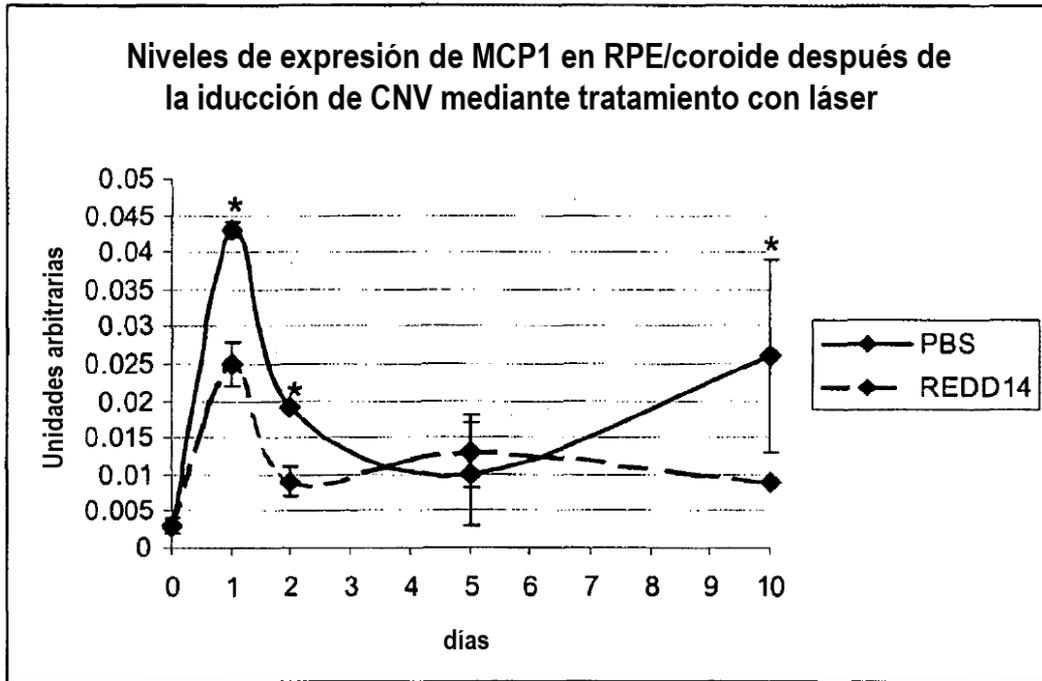


Figura 26

a)



b)

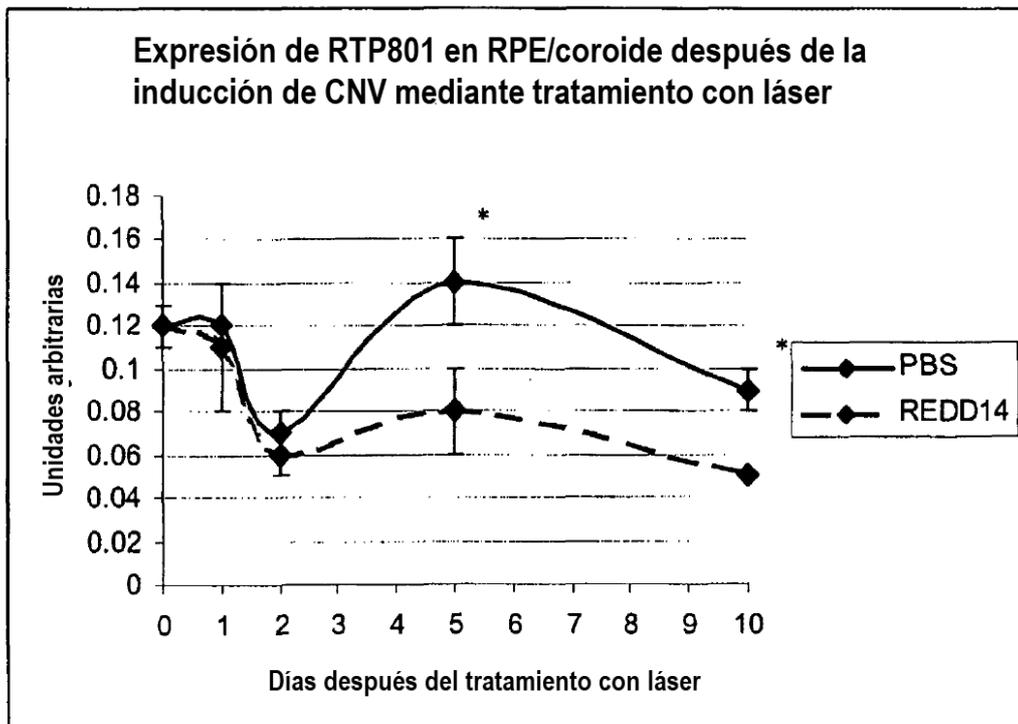


Figura 27

