

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 351**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2011 PCT/GB2011/051007**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11148193**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011 E 11723600 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2576782**

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

30 Prioridad:

27.05.2010 EP 10380074

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

22.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LOPEZ-FRAGA, MARTA;
JIMENEZ, ANA ISABEL y
VALCAREL, TAMARA MARTINEZ**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 732 351 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

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

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la provisión de productos de ARNip y a su uso en métodos y composiciones para el tratamiento y/o la prevención de afecciones oculares relacionadas con niveles altos de expresión y/o actividad del receptor vainilloide de potencial transitorio (TRPV1) usando interferencia de ARN. Entre otras, las afecciones oculares asociadas con dolor ocular tales como malestar y sensibilidad alterada de la córnea después de cirugía refractiva, uso de lentes de contacto, xeroftalmia y síndrome de Sjögren, tienen que mitigarse.

Antecedentes de la invención

15 La interferencia de ARN (iARN) es un mecanismo regulador de origen natural de la mayoría de las células eucariotas que usa moléculas de ARN bicatenario pequeño (ARNbc) para dirigir el silenciamiento génico dependiente de homología. Su descubrimiento por Fire y Mello en el gusano *C. elegans* (Fire, 1998) recibió el premio Nobel en 2006. Poco después de su primera descripción, se ha demostrado que la iARN también se produce en células de mamífero, no a través de ARNbc largos, sino mediante ARN interferentes pequeños (ARNip) bicatenarios de 21 nucleótidos de longitud (Elbashir, 2001).

Se cree que el proceso de interferencia de ARN es un mecanismo de defensa celular conservado evolutivamente usado para evitar la expresión de genes exógenos y está compartido habitualmente por diversos filos y vegetación, donde se llama silenciamiento génico postranscripcional. Desde el descubrimiento del mecanismo de iARN ha habido una explosión de investigaciones por descubrir nuevos compuestos que puedan alterar de forma selectiva la expresión génica como una nueva manera de tratar enfermedades humanas abordando dianas que por lo demás son "inmedicables" con estrategias farmacéuticas tradicionales que implican moléculas pequeñas o proteínas.

De acuerdo con el conocimiento actual, el mecanismo de iARN se inicia cuando ARN bicatenarios largos se procesan por una proteína de tipo RNasa III conocida como Dicer. La proteína Dicer normalmente contiene un dominio helicasa de ARN en el extremo N, un dominio de unión a ARN llamado Piwi/Argonaute/Zwille (PAZ), dos dominios de RNasa III y un dominio de unión a ARN bicatenario (RBDbc) (Collins, 2005) y su actividad da lugar al procesamiento de los ARN bicatenarios largos en ARNip bicatenarios de 21-24 nucleotídicos con salientes 3' de 2 bases y un grupo fosfato 5' e hidroxilo 3'. Las dobles hélices de ARNip resultantes entonces se incorporan en el complejo efector conocido como complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), donde la hebra de antisentido o e guía del ARNip guía al RISC para reconocer y escindir secuencias de ARNm diana (Elbashir, 2001) tras el desenrollamiento dependiente de trifosfato de adenosina (ATP) de la molécula de ARNip bicatenaria mediante la actividad helicasa de ARN (Nykanen, 2001). La actividad catalítica de RISC, que da lugar a la degradación del ARNm, está mediada por la endonucleasa Argonaute 2 (AGO2) (Liu, 2004; Song, 2004). AGO2 pertenece a la familia de proteínas Argonaute altamente conservada. Las proteínas Argonaute son proteínas altamente básicas de ~100 KDa que contienen dos dominios comunes, concretamente los dominios PIWI y PAZ (Cerutti, 2000). El dominio PIWI es crucial para la interacción con Dicer y contiene la actividad nucleasa responsable de la escisión de los ARNm (Song, 2004). AGO2 usa una hebra de la doble hélice de ARNip como guía para encontrar ARN mensajeros que contengan secuencias complementarias y escinde la estructura fosfodiéster entre las bases 10 y 11 respecto al extremo 5' de la hebra de guía (Elbashir, 2001). Una etapa importante durante la activación de RISC es la escisión de la hebra con sentido o pasajera mediante AGO2, eliminando esta hebra del complejo (Rand, 2005). Los estudios de cristalografía que analizan la interacción entre la hebra de guía de ARNip y el dominio PIWI revelan que solamente los nucleótidos 2 a 8 son los que constituyen una "secuencia de partida" que dirige el reconocimiento del ARNm diana por RISC, y que un emparejamiento incorrecto de un único nucleótido en esta secuencia puede afectar drásticamente a la capacidad de silenciamiento de la molécula (Ma, 2005; Doench 2004; Lewis, 2003). Una vez se ha escindido el ARNm, y debido a la presencia de extremos de ARN no protegidos en los fragmentos, el ARNm se escinde adicionalmente y se degradada por nucleasas intracelulares y ya no se traducirá en proteínas (Orban, 2005) mientras que RISC se reciclará para posteriores rondas (Hutvagner, 2002). Esto constituye un proceso catalítico que da lugar a la reducción selectiva de moléculas de ARNm específicas y las proteínas correspondientes. Es posible explotar este mecanismo natural para el silenciamiento génico con el fin de regular cualquier gen o genes de elección mediante el suministro directo de efectores de ARNip a las células o tejidos, donde activarán RISC y producirán un silenciamiento potente y específico del ARNm diana.

Se han publicado muchos estudios que describen las características ideales que debería tener un ARNip para conseguir la máxima eficacia, respecto a la longitud, estructura, composición química y secuencia. Los parámetros iniciales para el diseño de ARNip se establecieron por Tuschl y colaboradores en el documento WO02/44321, aunque se han publicado muchos estudios, algoritmos y/o mejoras posteriores desde entonces. Por ejemplo, el documento US 2008/085998 describe una lista de ARNip mejorados, kits y métodos para usar dichos ARNip, en la que dichos ARNip tienen eficacia aumentada, especialmente en sistemas de mamífero.

65

Además, se ha hecho mucho esfuerzo por potenciar la estabilidad de los ARNip ya que esto se percibe como uno de los obstáculos principales para tratamiento basado en ARNip, dada la naturaleza ubicua de las RNAsas en líquidos biológicos. Una de las estrategias principales seguida para la potenciación de la estabilidad ha sido el uso de nucleótidos modificados tales como 2'-O-metil nucleótidos, 2'-amino nucleótidos, nucleótidos que contienen enlaces 2'-O o 4'-C metileno. Además, se ha descrito la modificación de la estructura ribonucleotídica que conecta nucleótidos adyacentes, principalmente por la introducción de nucleótidos modificados con fosforotioato. Parece que la estabilidad potenciada a menudo es inversamente proporcional a la eficacia (Parish, 2000), y únicamente un determinado número, posiciones y/o combinaciones de nucleótidos modificados puede producir un compuesto de silenciamiento estable. Como este es un obstáculo importante en los tratamientos basados en ARNip, se ha publicado diferentes estudios que describen determinados patrones de modificación que muestran buenos resultados, cuyos ejemplos incluyen los documentos EP1527176, WO2008/050329, WO2008/104978 o WO2009/044392, aunque pueden encontrarse muchos más en la bibliografía. Como un ejemplo, Czauderna et al., 2003 (Nucleic Acids Research 2003, Vol. 31, n.º 11, páginas 2705-2716) describe modificaciones de 2'-O-metil, pero no moléculas con modificaciones terminales, que están protegidas contra las nucleasas derivadas del suero. Los autores describen estas moléculas modificadas como ARNip de segunda generación que muy probablemente son más adecuadas para aplicación terapéutica potencial de ARNip sintéticos *in vivo*. Sin embargo, este documento no divulga ningún ARNip dirigido a TRPV1, y el documento tampoco especula sobre que estos ARNip de segunda generación pudieran usarse para hacerlo.

El receptor vainilloide de potencial transitorio-1 (TRPV1), también llamado receptor vainilloide 1 (VR-1), es un canal de cationes abierto por ligando sensible a capsaicina, que se descubrió por primera vez en 1997 (Caterina, 1997). TRPV1 se expresa principalmente en neuronas sensitivas y sirve como detector molecular para calor, capsaicina, protones y endovanilloides (Caterina, 2001; Montell, 2002; Baumann, 2000). Aunque los autores de la presente solicitud también encontraron expresión de TRPV1 en tejidos de la glándula lagrimal y el cuerpo ciliar.

Cuando se activa TRPV1 por agonistas tales como capsaicina y otros factores tales como calor, acidosis, productos de lipoxigenasa o anandamida, entra calcio a la célula y se inician señales de dolor. La activación del canal induce liberación de neuropéptido desde los terminales nerviosos sensitivos centrales y periféricos, provocando la sensación de dolor, inflamación neurogénica y, a veces, contracción del músculo liso y tos. En realidad, las evidencias recientes sugieren una función de TRPV1 en dolor, tos, asma e incontinencia urinaria (Jia, 2005). De hecho, TRPV1 es una diana conocida para tratamientos por analgesia en respuesta a estímulos dolorosos. Además, se han descrito tratamientos diseñados para reducir los niveles de expresión de TRPV1 utilizando diferentes tecnologías en el documento WO2004/042046, o (Schubert, 2005), centrados en el tratamiento del dolor. Por ejemplo, el documento US2006/122136 describe el uso de enzimas de ADN de tipo 10-23 para escindir el ARNm de VR1, en el que estas enzimas muestran mayor estabilidad a la degradación nucleolítica. Sin embargo, este documento no divulga el uso de ARNip específicos de TRPV1 altamente eficaces, como se divulga en la presente invención.

Los nocirreceptores polimodales son el tipo de nocirreceptor más abundante encontrado en la córnea. Existen evidencias farmacológicas de que estas fibras receptoras expresan el receptor TRPV1 porque responden a capsaicina, calor y ácido. Además, Dosis altas de capsaicina inactivan la respuesta de los nocirreceptores polimodales de la córnea al calor y ácido, mientras que la sensibilidad mecánica permanece inalterada. Esto sugiere que los receptores TRPV1 presentes en los terminales nerviosos polimodales de la córnea se inactivaban selectivamente. Por lo tanto, es probable que una parte importante de la respuesta nocisensible aguda a lesión de la córnea y las sensaciones de dolor mantenido que acompañan a los procesos inflamatorios e irritantes en este tejido estén mediados por la activación de TRPV1.

El documento US2006/122136 también describe el uso de ARNip específicos de TRPV1 para el tratamiento de dolor y otras afecciones patológicas asociadas con VR1. Además, el documento WO2007/045930 describe el uso de ARNip específicos de TRPV1 para el tratamiento de patologías oculares relacionadas con dolor ocular y xeroftalmia. El documento WO2009/023025 describe además el uso de ARNip específicos de TRPV1 en combinación con ARNip dirigidos a NOX3 en un esfuerzo por reducir también la expresión de especies de oxígeno reactivo para evitar la ototoxicidad. Sin embargo, la presente invención proporciona productos mejorados para reducir la expresión de TRPV1 y el consecuente malestar ocular. La ventaja de tratar estas afecciones con productos de ARNip frente a los inhibidores químicos tradicionales es que los tratamientos basados en ARNip tendrán un efecto de duración más larga. Este resultado se debe al hecho de que una vez que la molécula efectora ya no está presente, la célula tendrá que sintetizar nuevos receptores de manera espontánea; mientras que los tratamientos tradicionales dejarían los niveles de los receptores en la membrana celular intactos.

Debido al estilo de vida actual, el número de personas afectadas por patologías oculares relacionadas con sensibilidad ocular alterada es bastante alto, y se espera que aumente con el envejecimiento de la población. La cirugía refractiva y el uso de lentes de contacto a menudo derivan en sensibilidad alterada de la córnea y una sensación de sequedad ocular por parte del paciente. Esto se agrava además por largas horas de trabajo mirando pantallas de ordenador y el uso de sistemas de aire acondicionado que habitualmente secan más la atmósfera. Además, la cantidad y calidad de las lágrimas disminuye con la edad. Los síntomas que acompañan a la xeroftalmia incluyen prurito, escozor e irritación de los tejidos oculares. Una forma más grave de xeroftalmia se produce en pacientes con síndrome de Sjögren. La presencia de una o diferentes combinaciones de estas sensaciones se denomina dolor ocular dentro del significado del presente texto. Actualmente, se estima que la xeroftalmia afecta a más de 10 millones de americanos.

Descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que muestra el perfil de expresión temporal de TRPV1, usando Qrt-PCR, después de transfección de células HeLa con diferentes ARNip dirigidos a TRPV1: un compuesto de acuerdo con la presente invención (SEQ ID NO: 2), un compuesto descrito previamente dirigido a una región diferente (SEQ ID NO: 7) y otros cuatro ARNip (SEQ ID NO: 17 a 20) diseñados para abordar TRPV1 y una secuencia mezclada usada como control negativo. Se muestran dos representaciones alternativas de los mismos resultados para asegurar la claridad.

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

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

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

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

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la divulgación se refiere a la provisión de una molécula de ARNip, en el que dicha molécula aborda específicamente la SEQ ID NO: 1 y reduce la expresión del gen de TRPV1 cuando se introduce en una célula.

Un gen se "aborda" por un ARNip de acuerdo con la presente invención cuando, por ejemplo, la molécula de ARNip disminuye de forma selectiva o inhibe la expresión del gen. La expresión "disminuye de forma selectiva o inhibe", como se usa en este documento, abarca ARNip que afectan a la expresión de un gen, en este caso de TRPV1. Como alternativa, un ARNip aborda un gen cuando el ARNip hibrida en condiciones rigurosas con el transcrito génico, es decir, su ARNm. Con capacidad de hibridación "en condiciones rigurosas" significa hibridación con la región de ARNm diana, en condiciones convencionales, por ejemplo, temperatura elevada y/o bajo contenido salino que tienden a desfavorecer la hibridación. Se describe un protocolo adecuado (que implica SSC 0,1 x, 68 °C durante 2 horas) en Maniatis, T., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, en las páginas 387-389.

Las secuencias de ácido nucleico citadas en este documento se escriben en una dirección 5' a 3' salvo que se indique de otro modo. La expresión "ácido nucleico" se refiere a ADN o ARN o una forma modificada de los mismos, que comprenden las bases de pirimidina presentes en el ADN (adenina "A", citosina "C", guanina "G", timina "T") o en el ARN (adenina "A", citosina "C", guanina "G", uracilo "U"). Los ARN interferentes proporcionados en este documento pueden comprender bases de "T", por ejemplo, en los extremos 3', aunque no se producen de forma natural bases de "T" en el ARN. En algunos casos, estas bases pueden aparecer como "dT" para diferenciar los desoxirribonucleótidos presentes en una cadena de ribonucleótidos.

La secuencia diana como se define anteriormente se describe como una secuencia de ADN diana que se usa para la definición de variantes de transcrito en bases de datos usadas con el fin de diseñar ARNip, mientras que los compuestos específicos a usar serán secuencias de ARN definidas tal cual.

Se han identificado diferentes variantes de transcrito correspondientes a TRPV1. Los números de acceso a GenBank correspondientes a cuatro transcritos de TRPV1 producidos por corte y empalme alternativo son: NM_080704 (NM_080704.3, GI: 117306161), NM_018727 (NM_018727.5, GI: 117306160), NM_080706 (NM_080706.3, GI: 117306163) y NM_080705 (NM_080705.3, GI: 117306162). Además, ENSEMBL (MBL-EBI/Wellcome Trust Sanger Institute) tiene 5 transcritos de TRPV1 adicionales publicados: ENST00000174621, ENST00000310522, ENST00000344161, ENST00000399752, ENST00000399756, ENST00000399759, ENST00000425167.

La divulgación proporciona ARNip que inhiben la expresión génica de TRPV1, siendo estos ARNip especialmente eficaces en comparación con los ya divulgados en el estado de la técnica. Especialmente eficaces significa que consiguen mayores grados de inhibición y/o un efecto más prolongado en el tiempo.

Estos novedosos ARNip se diseñan frente a una secuencia diana común para todas las variantes de transcrito de TRPV1 descritas en el párrafo anterior y, por tanto, median la degradación mediada por RISC de todos los posibles ARNm presentes en la célula que codifica la proteína TRPV1. Dicha región diana preferida identificada por la

divulgación se identifica en la SEQ ID NO: 1 (5'-AAGCGCATCTTCTACTTCA-3').

Por consiguiente, un ARNip de acuerdo con la divulgación comprenderá preferiblemente una molécula de ARN bicatenario, cuya hebra de antisentido comprenderá una secuencia de ARN sustancialmente complementaria a la SEQ ID NO: 1, y su hebra con sentido comprenderá una secuencia de ARN complementaria a la hebra de antisentido, en la que ambas hebras hibridan por emparejamiento de bases convencional entre los nucleótidos.

Dentro del significado de la divulgación, "sustancialmente complementaria" a una secuencia de ARNm diana también puede entenderse como "sustancialmente idéntica" a dicha secuencia diana. "Identidad" como sabe un experto en la materia, es el grado de relación de secuencia entre secuencias de nucleótidos determinada por acoplamiento del orden e identidad de los nucleótidos entre las secuencias. En un aspecto, la hebra de antisentido de un ARNip que tiene un 80 %, y entre un 80 % hasta un 100 % de complementariedad, por ejemplo, un 85 %, un 90 % o un 95 % de complementariedad, con la secuencia de ARNm diana, se consideran sustancialmente complementarias y pueden usarse en la presente invención. El porcentaje de complementariedad describe el porcentaje de nucleótidos contiguos en una primera molécula de ácido nucleico que puede formar pares de bases en el sentido de Watson-Crick con un conjunto de nucleótidos contiguos en una segunda molécula de ácido nucleico.

Como se sabe del estado de la técnica, se han propuesto muchas estructuras diferentes para conseguir interferencia de ARN. En general, estas moléculas bicatenarias son de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, e incluyen estructuras de extremos romos, así como aquellas con salientes. Los salientes se han descrito como ventajosos y pueden estar presentes en los extremos 5' o los extremos 3' de cualquier hebra, ya que reducen el reconocimiento por RNAsas e imitan el sustrato natural de Dicer. Algunos autores recomiendan incluir salientes en ambos extremos 3' de las moléculas, mientras que otros consideran que un saliente es suficiente. Otros han descrito el uso de estructuras con extremos romos con patrones de modificación específicos (documento EP 1527176, documento WO 2008/104978, y muchos otros).

Los salientes pueden estar compuestos entre 1 y 5 nucleótidos, normalmente los salientes están compuestos de dinucleótidos. Las moléculas clásicas usadas en el campo comprenden una molécula bicatenaria de 19 nucleótidos que comprende además salientes dinucleótidos 3' que comprenden preferiblemente desoxinucleótidos como se muestra en los estudios iniciales de Tuschl (documento WO02/44321). Estos salientes se dice que potencian además la resistencia a la degradación por nucleasa (RNasa). Posteriormente, Kim et al., 2005 describen que son necesarios productos de 21 monómeros (que contienen salientes dinucleotídicos) para cargarse en RISC. Además, Bramsen et al., 2009 describen la introducción de posibles modificaciones desestabilizantes a los salientes para aumentar adicionalmente la eficacia de silenciamiento.

Por tanto, un aspecto de la divulgación se refiere a moléculas de ARNip dirigidas a la SEQ ID NO: 1 que comprenden al menos un saliente.

Otro aspecto alternativo de la divulgación proporciona moléculas de extremos romos.

Además, un aspecto preferido de la divulgación se refiere a un ARNip que comprende o consiste en una estructura bicatenaria de 19 nucleótidos dirigida a la SEQ ID NO: 1. Sorprendentemente, se ha demostrado que dichos ARN bicatenarios de 19 nucleótidos son más resistentes a la degradación que los productos descritos previamente con 21 nucleótidos y salientes 3' como puede observarse en la figura 5.

Un aspecto particular de la divulgación se refiere a un ARNip de extremos romos bicatenario de 19 nucleótidos dirigido a la SEQ ID NO: 1. En una realización particular adicional, este compuesto se identifica como la SEQ ID NO: 2 (5'-AAGCG-CAUCUUCUACUUCA-3'). En un aspecto preferido adicional, la hebra de antisentido de este ARNip es al menos un 80 %, preferiblemente al menos un 90 %, complementaria a la SEQ ID NO: 1.

Además, como se describe en la sección denominada antecedentes de la invención, una cuestión importante con las moléculas de ARNip es su inestabilidad en líquidos biológicos debido a la naturaleza ubicua de las RNAsas. Por consiguiente, se ha descrito el uso de muchas modificaciones químicas diferentes en los nucleótidos con el fin de potenciar la estabilidad del compuesto.

Otro problema inherente de las moléculas de ARNip es su inmunogenicidad, por la que se ha descubierto que los ARNip inducen activación inespecífica del sistema inmunitario innato, incluyendo la regulación por aumento de determinadas citocinas, por ejemplo, producción de interferón de tipo I y/o de tipo II, así como IL-12, IL-6 y/o TNF-alfa. Se cree que el origen de estos efectos es la activación de receptores de tipo Toll tales como TLR7, TLR8 y/o TLR3 por ARNip.

Estos dos efectos, el reconocimiento por las RNAsas y la inmunogenicidad, también se han descrito como dependientes de la secuencia.

Algunas de las modificaciones químicas que potencian la estabilidad del compuesto disminuyendo la susceptibilidad a las RNAsas también pueden reducir la inducción del reconocimiento inmunitario de la posterior respuesta. Sin

embargo, la inserción de nucleótidos modificados químicamente en un ARNip también puede provocar eficacia de silenciamiento disminuida como se describe en la sección previa y, por tanto, debe abordarse con cautela.

5 Por consiguiente, en un aspecto preferido de la presente divulgación, el ARNip comprende además al menos un nucleótido con una modificación química.

10 Las modificaciones químicas preferidas que potencian la estabilidad y reducen los efectos inmunogénicos incluyen 2'-O-metil nucleótidos, 2'-fluoro nucleótidos, 2'-amino nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, nucleótidos que contienen enlaces 2'-O o 4'-C metileno. Además, la modificación de la estructura ribonucleotídica que conecta los nucleótidos adyacentes mediante la introducción de nucleótidos modificados con fosforotioato. Una modificación química preferida adicional dentro del significado de la divulgación se refiere a la sustitución de nucleótidos de uracilo con desoxitimidina (desoxirribonucleótidos). En otro aspecto preferido de la divulgación, el al menos un nucleótido modificado químicamente está en la hebra con sentido, en la hebra antisentido o en ambas hebras del ARNip.

15 Por consiguiente, en una realización, el ARNip se seleccionada de las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16.

20 Las moléculas de ARNip descritas anteriormente pueden suministrarse al interior celular en su estructura nativa usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando se estudia el silenciamiento génico *in vitro*, estos compuestos se administran usando reactivos de transfección convencionales. Para conseguir efectos *in vivo*, estos compuestos también pueden administrarse desnudos o usando agentes de potenciación del suministro tales como, por ejemplo, liposomas o conjugación con un resto específico, aunque se conocen muchas alternativas diferentes en la técnica, y se usan de forma diferente dependiendo del sitio diana deseado dentro del organismo.

25 Como alternativa, las moléculas de ARNip de la invención pueden expresarse dentro de células a partir de promotores eucariotas. Pueden suministrarse vectores recombinantes que pueden expresar las moléculas de ARNip y persisten en las células diana. Como alternativa, pueden usarse vectores que proporcionan expresión transitoria de moléculas de ácido nucleico. Dichos vectores pueden administrarse repetidamente según lo necesario. Una vez expresada, la molécula de ARNip interactúa con el ARN diana y genera una respuesta interferente de ARN. Las moléculas de ARNip producidas de esta manera a menudo se denominan ARNhc (ARN de horquilla corta), ya que sus hebras con sentido y de antisentido están unidas por un pequeño bucle de nucleótidos. El suministro de los vectores que expresan la molécula de ARNip puede ser sistémica, tal como mediante administración intravenosa o intramuscular, mediante la administración a células diana explantadas de un sujeto seguida de reintroducción en el sujeto, o por cualquier otro medio que permita la introducción en la célula diana deseada.

35 Un aspecto adicional se refiere al uso de ARNip dirigido a la SEQ ID NO: 1 en la preparación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento de una afección ocular caracterizada por expresión y/o actividad aumentada de TRPV1. El método comprende inhibir la expresión de TRPV1 en un paciente. El término inhibición se usa para indicar una disminución o regulación por disminución de la expresión o la actividad. Preferiblemente, la afección ocular es dolor ocular. En una realización, la afección ocular se seleccionado del grupo que comprende malestar ocular y sensibilidad alterada de la córnea después de cirugía refractiva, uso de lentes de contacto, xeroftalmia, síndrome de Sjögren y otras patologías oculares.

45 Se espera que el tratamiento terapéutico con ARNip dirigidos al ARNm de TRPV1 sea beneficioso sobre los colirios tópicos de molécula pequeña aumentando la cantidad de tiempo que se observa el efecto, permitiendo de ese modo una dosificación menos frecuente y mayor cumplimiento por parte del paciente. Es especialmente importante en casos tales como xeroftalmia y sensibilidad alterada de la córnea ya que a menudo son afecciones crónicas.

50 Teniendo en mente la preparación de dicho medicamento, el ARNip de la presente invención puede formularse. Preferiblemente, las composiciones y formulaciones de dichos ARNip pueden administrarse por vía tópica al órgano de interés. En un aspecto incluso más preferido, pueden formularse para administración tópica al ojo, preferiblemente a la superficie de la córnea del ojo. La aplicación a la superficie de la córnea puede ser, por ejemplo, en forma de colirios, un gel, loción, crema o piezas oculares. Otras formas de administración al ojo pueden incluir inyección en el ojo.

55 Un aspecto preferido adicional de la divulgación se refiere a un ARNip dirigido específicamente a la SEQ ID NO: 1 como se describe en los párrafos precedentes, para su uso como medicamento para el tratamiento de una afección ocular caracterizada por expresión y/o actividad aumentada de TRPV1. Como se describe anteriormente, puede ser un ARNip que comprende o consiste en una estructura bicatenaria de 19 nucleótidos a la SEQ ID NO: 1. Este ARNip puede ser de extremos romos. Preferiblemente, el ARNip es la SEQ ID NO: 2. Otro ARNip para su uso de acuerdo con la divulgación puede seleccionarse de las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16.

65 Dentro del contexto de la divulgación, para "abordar específicamente" una secuencia, el ARNip de la divulgación debe comprender al menos la misma secuencia de partida. Por tanto, cualquier secuencia de acuerdo con la divulgación que aborde específicamente la SEQ ID NO: 1 debe ser idéntica en las posiciones 2-8 de la hebra de antisentido.

A pesar de los anterior, los ARNip de la divulgación pueden usarse para silenciar la expresión de TRPV1 en tejidos

diferentes al ojo. Por consiguiente, dichos ARNip deben formularse en consecuencia.

Por ejemplo, una molécula de ARNip puede comprender un vehículo de suministro, incluyendo liposomas, para su administración a un sujeto. Los vehículos y diluyentes y sus sales pueden estar presentes en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse a las células mediante diversos métodos conocidos para los expertos en la materia incluyendo, sin restricción, encapsulación en liposomas, por iontoforesis o por incorporación en otros vehículos, tales como polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas, microesferas de poli ácido (láctico-co-glicólico) (PLGA) y PLCA, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteínicos. En otro aspecto, las moléculas de ácido nucleico de la invención también pueden formularse o formar complejos con polietileneimina y derivados de la misma, tales como derivados de polietileneimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o polietileneimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL).

Una molécula de ARNip de la presente invención puede formar complejos con agentes de alteración de la membrana y/o un lípido catiónico o molécula lipídica auxiliar.

Los sistemas de suministro que pueden usarse con la invención incluyen, por ejemplo, geles acuosos y no acuosos, cremas, emulsiones múltiples, microemulsiones, liposomas, pomadas, soluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, bases hidrocarbonadas y polvos, y pueden contener excipientes tales como solubilizantes, potenciadores de la penetración (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos y aminoácidos) y polímeros hidrófilos (por ejemplo, policarbófilo y polivinilpirrolidona). En un aspecto, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un liposoma o un potenciador transdérmico.

Una formulación farmacéutica de la invención está en una forma adecuada para su administración, por ejemplo, administración sistémica o local, a una célula o sujeto, incluyendo, por ejemplo, un ser humano. Las formas adecuadas, en parte, dependen del uso o la vía de entrada, por ejemplo, oral, transdérmica o mediante inyección. Otros factores son conocidos en la materia e incluyen consideraciones tales como toxicidad y formas que evitan que la composición o formulación ejerza su efecto.

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

Una dosis farmacéuticamente eficaz es esa dosis necesaria para prevenir, inhibir la aparición o tratar (aliviar un síntoma en algún grado, preferiblemente todos los síntomas) un estado patológico. La dosis farmacéuticamente eficaz depende del tipo de enfermedad, la composición usada, la vía de administración, el tipo de mamífero que se está tratando, las características físicas del mamífero específico en consideración, la medicación simultánea y otros factores que reconocerán los expertos en las técnicas médicas.

Las formulaciones o ARNip de la invención pueden administrarse en formulaciones monodosis que contienen vehículos, adyuvantes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. Las formulaciones pueden estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas a uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes o agentes conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables. Los comprimidos contienen el ingrediente activo en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos.

Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes; tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y disgregación, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas. En algunos casos, dichos recubrimientos pueden prepararse mediante técnicas conocidas para retardar la disgregación y la absorción en el tubo gastrointestinal y proporcionar de este modo una acción mantenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo en el tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas duras de gelatina en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas blandas de gelatina en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidropropil-metilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersión o humectantes pueden ser un fosfoglicérido de origen natural, por ejemplo, lecitina o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietil sorbitol o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de polietil sorbitano. Las suspensiones acuosas también pueden contener también uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo los ingredientes activos en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de Arachis, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite de vaselina tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Los agentes edulcorantes y agentes aromatizantes pueden añadirse para proporcionar preparaciones orales agradables. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

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

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite de vaselina o mezclas de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo, goma arábiga o goma de tragacanto, fosfoglicéridos de origen natural, por ejemplo, soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo, monooleato de sorbitano y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietil sorbitano. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol, glucosa o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante y agentes aromatizantes y colorantes. Las composiciones farmacéuticas o ARNip de la invención pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril.

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

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

Las moléculas de ácido nucleico de la invención también pueden administrarse en forma de supositorios, por ejemplo, para administración rectal del fármaco. Estas composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas habituales, pero líquido a temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto liberando el fármaco. Dichos materiales incluyen manteca de cacao y polietilenglicoles.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden administrarse por vía parenteral en un medio estéril. El fármaco, dependiendo del vehículo y de la concentración usada, puede suspenderse o disolverse en el vehículo. De forma ventajosa, adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes tamponantes pueden disolverse en el vehículo.

Por tanto, un aspecto preferido adicional de la divulgación se refiere a una composición farmacéutica en la que dicha composición comprende al menos un ARNip dirigido a la SEQ ID NO: 1, como se ha descrito en los párrafos precedentes.

Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto particular depende de diversos factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, vía de administración y tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular en tratamiento.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención también pueden administrarse a un sujeto en combinación con otros compuestos terapéuticos para aumentar el efecto terapéutico global. El uso de múltiples compuestos para tratar una indicación puede aumentar los efectos beneficiosos reduciendo al mismo tiempo la presencia de efectos secundarios.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Análisis *in vitro*

Para encontrar una secuencia diana particularmente eficaz para los ARNip para silenciar TRPV1 (que obtenga inhibición importante de la expresión génica), se ensayaron seis ARNip diferentes. Estos ARNip se describen como la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 (para referencia únicamente) y las SEQ ID NO: 17 a 20 (para referencia únicamente).

La SEQ ID NO: 2 es un ARNip dirigido a la SEQ ID NO: 1 de acuerdo con la divulgación, que tiene la siguiente secuencia:

Con sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'
Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

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

SEQ ID NO: 17 (para referencia únicamente)

Con sentido: 5'-CGCAUCUUCUACUUCAACU-3'
Antisentido: 5'-AGUUGAAGUAGAAGAUGCG-3'

SEQ ID NO: 18 (para referencia únicamente)

Con sentido: 5'-GCGCAUCUUCUACUUCAAC-3'
Antisentido: 5'-GUUGAAGUAGAAGAUGCGC-3'

SEQ ID NO: 19 (para referencia únicamente)

Con sentido: 5'-AAAGCCAUGCJCAACCUGC-3'
Antisentido: 5'-GCAGGUUGAGCAUGGCUUU-3'

SEQ ID NO: 20 (para referencia únicamente)

Con sentido: 5'-UGAUCGCAGGAGUAUCUUUdTdT-3'
Antisentido: 5'-AAAGAUACUCCUGCGAUCAdTdT-3'

Como modelo para ensayar la eficacia del ARNip descrito anteriormente, se usaron cultivos de células HeLa (adenocarcinoma de cuello uterino humano). Se transfectaron células HeLa con 100 nM de diferentes compuestos y Lipofectamine 2000 como agente transfectante. Todas las transfecciones se hicieron siguiendo las condiciones convencionales del fabricante. En la misma transfección, se usó un ARNip mezclado diferente como control. Los sedimentos celulares se recogieron a las 24, 48 y 72 horas para evaluar las posibles variaciones en los niveles de proteínas y se procesaron por PCR en tiempo real. Para cuantificar los resultados obtenidos por qRT-PCR en tiempo real, se usó el método de umbral comparativo.

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

Con el objetivo de proporcionar más mejorados, se introdujeron modificaciones químicas diferentes en el producto anterior, de acuerdo con la siguiente descripción:

SEQ ID NO: 3,

Con sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'
 Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

5

SEQ ID NO: 4,

Con sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'
 Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

10

SEQ ID NO: 8,

Con sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'
 Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

15

SEQ ID NO: 9

Con sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'
 Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

20

SEQ ID NO: 10 Con sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'
 Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

25

SEQ ID NO: 11

Con sentido: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'
 Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

30

En las que el subrayado representa bases que comprenden un grupo 2'-Ometilo.

SEQ ID NO: 5,

Con sentido: 5'-AAGCGCAdTCdTdTCdTACdTdTCA-3'
 Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

35

SEQ ID NO: 6,

Con sentido: 5'-AAGCGCAdTCdTdTCdTACdTdTCA-3'
 Antisentido: 5'-dTGAAGdTAGAAGAdTGCGCdTdT-3'

40

SEQ ID NO: 12 Con sentido: 5'-AAGCGCAdTCUdTCdTACdTdTCA-3'
 Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

45

SEQ ID NO: 13

Con sentido: 5'-AAGCGCAdTCUdTCdTACUdTCA-3'
 Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

50

SEQ ID NO: 14

Con sentido: 5'-AAGCGCAdTCUUCdTACUdTCA-3'
 Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

55

SEQ ID NO: 15

Con sentido: 5'-AAGCGCAdTCUUCUACUdTCA-3'
 Antisentido: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

60

SEQ ID NO: 16,

Con sentido: 5'-AAGCGCAdTCUUCUACUdTCA-3'
 Antisentido: 5'-UGAAGdTAGAAGAdTGCGCUU-3'

65

En las que algunos o todos los nucleótidos de uracilo se han sustituido por nucleótidos de desoxitimidina.

Estos compuestos se ensayaron en ensayos de inmunogenicidad junto con la SEQ ID NO: 2 (el mismo compuesto sin ningún nucleótido modificado). Los resultados mostraron que todos estos compuestos reducían significativamente la

inducción de una respuesta inmunitaria en células mononucleares de sangre periférica. Además, la mayoría de los compuestos indujeron una respuesta que era, en sus niveles más altos, tan baja como la producida por los ARNip que han avanzado hasta ensayos clínicos en seres humanos (bevasiranib y Sirna-027) que se incluyeron en los ensayos como control.

5 Como grados variables de modificación pueden alterar la capacidad de silenciamiento génico de los ARNip, estos compuestos se ensayaron adicionalmente para su capacidad de interferencia de ARN por transfección en células HeLa, y se midieron los niveles de ARNm de TRPV1 resultantes de acuerdo con el método descrito en los párrafos precedentes.

10 Como puede observarse en la figura 2, todos los compuestos retienen la capacidad de disminuir de forma eficaz los niveles de ARNm de TRPV1 en grados variables.

15 Un efecto beneficioso inesperado adicional derivado de los compuestos descritos anteriormente es su resistencia potenciada a la degradación por RNasas como puede observarse en la figura 5.

Para estos experimentos, los compuestos suspendieron en plasma humano al 10 % en PBS a una concentración final de 2 μ M y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Las muestras entonces se analizaron usando HPLC-UV y se determina la cantidad de producto intacto restante.

20 Como puede observarse en la figura 5, el compuesto bicatenario de 19 nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 (sin ninguna modificación química) es casi 3 veces más resistente a la degradación que la SEQ ID NO: 21 descrita previamente (para referencia únicamente): 5'-CAAGAUCGCACAGGAGAGCdTdT-3' (también descrita en el documento WO 2007045930) que comprende salientes 3'. Este efecto se potencia adicionalmente para el compuesto de la SEQ ID NO: 3, que incluye algunos nucleótidos modificados químicamente como se describe en los párrafos precedentes.

25 Análisis *in vivo*

30 Los modelos animales de xeroftalmia y dolor ocular a menudo hacen uso de conejos, en este caso conejos blancos de Nueva Zelanda. Para este fin, una ventaja adicional de los ARNip de la divulgación es que la secuencia diana, la SEQ ID NO: 1, es una región altamente conservada del gen de TRPV1, en todas las secuencias animales diferentes. De hecho, esta secuencia es idéntica entre el ser humano y el conejo, haciendo que este modelo animal sea especialmente adecuado para el estudio de dichas enfermedades.

35 El experimento descrito a continuación se realizó usando un modelo convencional de dolor ocular conocido para un experto en el campo (Gonzalez et al., 1993). En resumen, se indujo dolor usando instilación de 30 μ l de una solución de capsaicina al 1 % (un agonista conocido de TRPV1) al ojo usando una micropipeta apropiada. Debido a consideraciones éticas, los animales a tratar con capsaicina habían recibido previamente una dosis de capsazepina 5 mM, un conocido antagonista de capsaicina, o 40 μ l de una solución que contenía el compuesto a ensayar. Por lo tanto, se mide el efecto analgésico en comparación con capsazepina como tratamiento de referencia.

40 Los artículos de ensayo y de referencia se instilaron una vez al día desde el día 1 hasta el día 3 y dos veces al día en el día 4 (pautados cada 60 min) en el ojo derecho. En el día 4, 15 minutos después de la última instilación, se indujo dolor en la córnea en el ojo derecho de los animales mediante una única instilación de capsaicina al 1 %. El ojo contrario se instiló con PBS durante todo el estudio y sirvió como control.

45 Para medir la respuesta al dolor, se midió la abertura del párpado. Se consideró que el ojo está cerrado en respuesta al dolor, y según disminuyen las sensaciones de dolor, aumentará la abertura del párpado de nuevo a niveles normales. Se midió la abertura del párpado antes del tratamiento (referencia), justo antes de la inducción del dolor y después 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, minutos después de la inducción del dolor.

50 Como observarse de las figuras 3 y 4, se ensayó un compuesto de acuerdo con la presente invención, específicamente el compuesto de la SEQ ID NO: 2, y se observó que inducía un mayor efecto analgésico que capsazepina (recuperación del ojo medida por el grado de abertura del párpado). Por lo tanto, se ha demostrado que este compuesto es un tratamiento terapéutico eficaz para el malestar ocular.

55 Además, se realizó otro experimento *in vivo* en que se administraron los compuestos de la divulgación (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5) a ojos de conejos, junto con la SEQ ID NO: 21 (para referencia únicamente), previamente descritas en el documento WO 2007045930.

60 En este caso, los conejos (6 animales por grupo de tratamiento) recibieron una administración diaria del compuesto durante 3 días consecutivos. En el tercer día, dos horas después de la última instilación, se sacrificó a los animales. Se recuperaron los tejidos oculares de estos conejos y se analizó la presencia de ARNm específico de TRPV1 usando RT-PCR. La siguiente tabla muestra los niveles de silenciamiento génico de TRPV1 conseguidos en un tejido dado expresado como una relación del % de inhibición conseguido con el compuesto de referencia SEQ ID NO: 21 (para referencia únicamente).

65

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

Como está claro a partir de estos resultados, los compuestos de la presente invención son muchos más eficaces cuando silencian la expresión génica de TRPV1 en tejidos oculares que los compuestos descritos previamente.

La mayor eficacia junto con el efecto de mayor duración de los compuestos de la invención debe proporcionar pautas posológicas ventajosas, ya que permitir más tiempo entre las dosis mejoraría significativamente la calidad de vida de los pacientes.

Referencias

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

Rand, T. A., S. Petersen, et al., (2005). "Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation." *Cell* 123(4): 621-9.

Reynolds, A., Leake, D., et al., (2004). "Rational siRNA design for RNA interference " *Nat Biotechnol* 22(3):326-30.

Schubert, S. et al., (2005). "Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions." *J Mol Biol* 348:883-893.

Song, J. J., S. K. Smith, et al., (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." *Science* 305(5689): 1434-7.

Ui-Tei, K., Naito, Y., et al., (2004). "Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference." *Nucleic Acids Res* 32(3): 936-48.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sylentis S.A.

<120> ARNip y su uso en métodos y composiciones para el tratamiento y/o la prevención de afecciones oculares

<130> PC925428EP

<160> 41

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

aagcgcacatct tctacttca 19

<210> 2

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> ARNip dirigido a TRPV1

<400> 2

aagcgcaucu ucuacuuca 19

<210> 3

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> ARNip dirigido a TRPV1

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> el uracilo tiene un grupo 2'-o metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> el uracilo tiene un grupo 2'-o metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> el uracilo tiene un grupo 2'-o metilo

<400> 3
 aagcgcaucu ucuacuuca 19

5 <210> 4
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1)..(2)
 <223> la adenina tiene un grupo 2'-o metilo

<220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (7)..(7)
 <223> la adenina tiene un grupo 2'-o metilo

<220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (14)..(14)
 <223> la adenina tiene un grupo 2'-o metilo

<220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (19)..(19)
 <223> la adenina tiene un grupo 2'-o metilo

<400> 4
 aagcgcaucu ucuacuuca 19

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

40 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

<220>
 <221> misc-feature
 45 <222> (8)..(8)
 <223> n=desoxitimidina

<220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (10)..(11)
 <223> n=desoxitimidina

<220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (13)..(13)
 <223> n=desoxitimidina

<220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (16)..(17)
 <223> n=desoxitimidina

<400> 5
 65 aagcgcan ncnacnca 19

<210> 6
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n=desoxitimidina
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> n=desoxitimidina
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n=desoxitimidina
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> n=desoxitimidina
 30 <400> 6
 aagcgancn ncnacnca 19
 <210> 7
 <211> 21
 <212> ARN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n=desoxitimidina
 45 <400> 7
 ucgccacgac augcucuugn n 21
 <210> 8
 <211> 19
 50 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> el uracilo tiene un grupo 2'-o metilo
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> el uracilo tiene un grupo 2'-o metilo
 65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> el uracilo tiene un grupo 2'-o metilo

5 <400> 8
 aagcgcaucu ucuacuuca 19

<210> 9
 <211> 19
 10 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 20 <223> el uracilo tiene un grupo 2'-o metilo

<220>
 <221> misc-feature
 <222> (17)..(17)
 <223> el uracilo tiene un grupo 2'-o metilo

25

<400> 9
 aagcgcaucu ucuacuuca 19

<210> 10
 <211> 19
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 40 <223> la adenina tiene un grupo 2'-o metilo

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 45 <223> la adenina tiene un grupo 2'-o metilo

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 50 <223> la adenina tiene un grupo 2'-o metilo

<400> 10
 aagcgcaucu ucuacuuca 19

55

<210> 11
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 65 <223> la adenina tiene un grupo 2'-o metilo

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 5 <223> la adenina tiene un grupo 2'-o metilo

 <400> 11
 aagcgcaucu ucuacuuca 19

 10 <210> 12
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n=desoxitimidina

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n=desoxitimidina

 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n=desoxitimidina

 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> n=desoxitimidina

 <400> 12
 40 aagcgcanu ncnacnca 19

 <210> 13
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n=desoxitimidina

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n=desoxitimidina

 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n=desoxitimidina

 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)

<223> n=desoxitimidina
 <400> 13
 aagcgancu ncnacunca 19
 5
 <210> 14
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n=desoxitimidina
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n=desoxitimidina
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n=desoxitimidina
 25
 <400> 14
 aagcgancu ucnacunca 19
 30
 <210> 15
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 <220>
 <221> misc-feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n=desoxitimidina
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n=desoxitimidina
 45
 <400> 15
 aagcgancu ucuacunca 19
 50
 <210> 16
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n=desoxitimidina
 65
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n=desoxitimidina

5 <400> 16
 aagcgcancu ucuacunca 19

<210> 17
 <211> 19
 10 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

15 <400> 17
 cgcaucuucu acucaacu 19

<210> 18
 <211> 19
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

25 <400> 18
 gcgcaucuuc uacucaac 19

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

<220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

<400> 19
 40 aaagccaugc ucaaccugc 19

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

45 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

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

<400> 20
 55 ugaucgcagg aguaucuun n 21

<210> 21
 <211> 21
 <212> ARN
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

65 <220>
 <221> misc_feature

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

 <400> 21
 5 caagaucgca caggagagcn n 21

 <210> 22
 <211> 19
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

 <400> 22
 15 ugaaguagaa gaugcgcuu 19

 <210> 23
 <211> 19
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 25
 <400> 23
 ugaaguagaa gaugcgcuu 19

 <210> 24
 <211> 19
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 35
 <400> 24
 ugaaguagaa gaugcgcuu 19

 <210> 25
 <211> 19
 40 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 45
 <400> 25
 50 ugaaguagaa gaugcgcuu 19

 <210> 26
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (1)..(1) (1)
 <223> n=desoxitimidina

 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (6)..(6)
 <223> n=desoxitimidina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 5 <223> n=desoxitimidina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 10 <223> n=desoxitimidina

 <400> 26
 ngaagnagaa gangcgcn 19

 15 <210> 27
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

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

 <400> 27
 caagagcaug ucguggcgan n 21
 30
 <210> 28
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

 <400> 28
 ugaaguagaa gaugcgcu 19
 40
 <210> 29
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

 <400> 29
 ugaaguagaa gaugcgcu 19
 50
 <210> 30
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 60
 <400> 30
 ugaaguagaa gaugcgcu 19

 <210> 31
 <211> 19
 <212> ARN
 65

<213> Artificial
 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 5
 <400> 31
 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 32
 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 <400> 32
 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 20 <210> 33
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 <400> 33
 30 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 34
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 <400> 34
 40 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 35
 <211> 19
 <212> ARN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 50 <400> 35
 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 36
 <211> 19
 55 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> ARNip dirigido a TRPV1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n=desoxitimidina
 65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n=desoxitimidina

5 <400> 36
 ugaagnagaa gangcgcuu 19

<210> 37
 <211> 19
 10 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

15 <400> 37
 aguugaagua gaaugcg 19

<210> 38
 <211> 19
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

25 <400> 38
 guugaaguag aaugcg 19

<210> 39
 <211> 19
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

<400> 39
 40 gcagguugag cauggcuu 19

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

45 <220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

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

50 <400> 40
 aaagauacuc cugcgauca n 21

<210> 41
 <211> 21
 <212> ARN
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> ARNip dirigido a TRPV1

65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> n=desoxitimidina

<400> 41

5 gcucuccugu gcgaucuugn n 21

REIVINDICACIONES

1. Un ARNip, que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16, para su uso en el tratamiento de una afección ocular caracterizada por expresión y/o actividad aumentada de TRPV1, en donde dicha molécula aborda específicamente la SEQ ID NO: 1, y en donde el uso de dicho ARNip reduce la expresión y/o la actividad de TRPV1.
2. Un ARNip para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha afección ocular es dolor ocular.
3. Un ARNip para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha afección ocular se selecciona de sensibilidad alterada después de cirugía refractiva, uso de lentes de contacto, xeroftalmia y síndrome de Sjögren.
4. Uso de un ARNip, que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección ocular caracterizada por expresión y/o actividad aumentada de TRPV1, y en donde el uso de dicho ARNip reduce la expresión y/o la actividad de TRPV1.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha afección ocular es dolor ocular.
6. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en donde dicha afección ocular se selecciona de sensibilidad alterada después de cirugía refractiva, uso de lentes de contacto, xeroftalmia y síndrome de Sjögren.

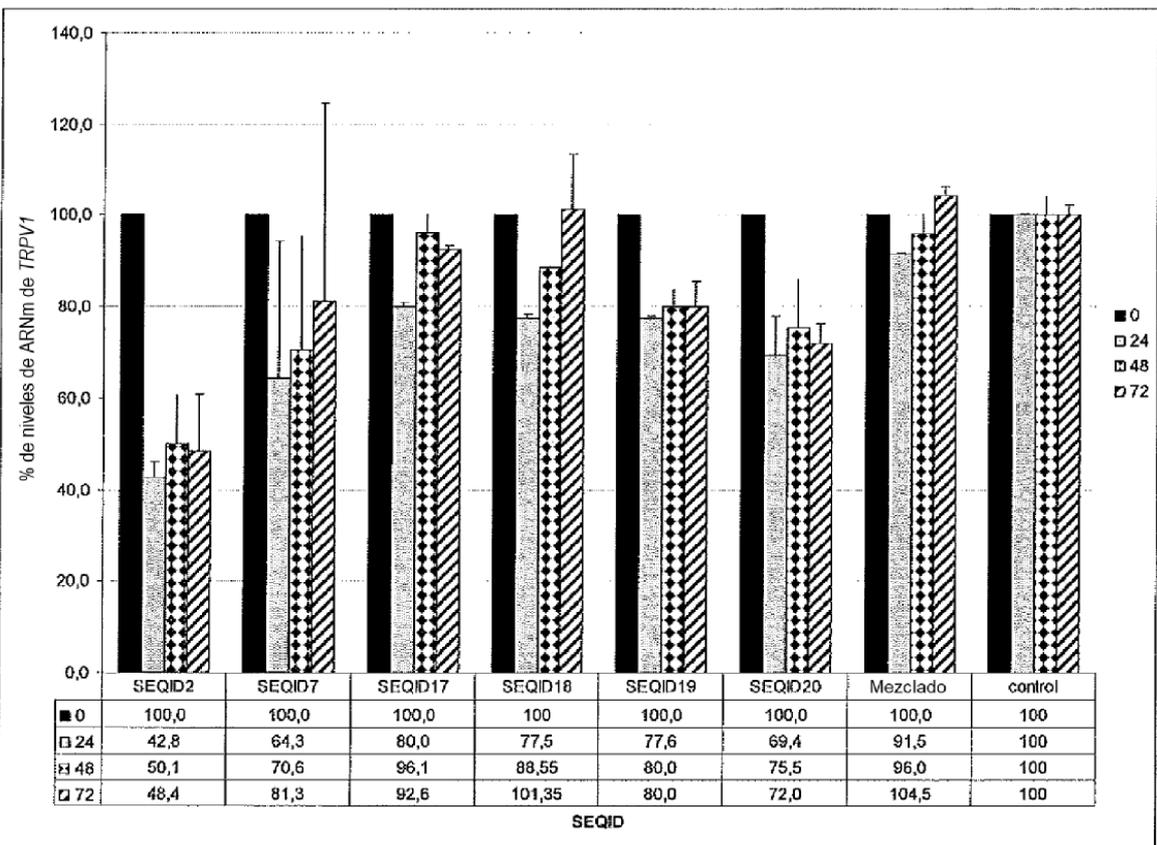
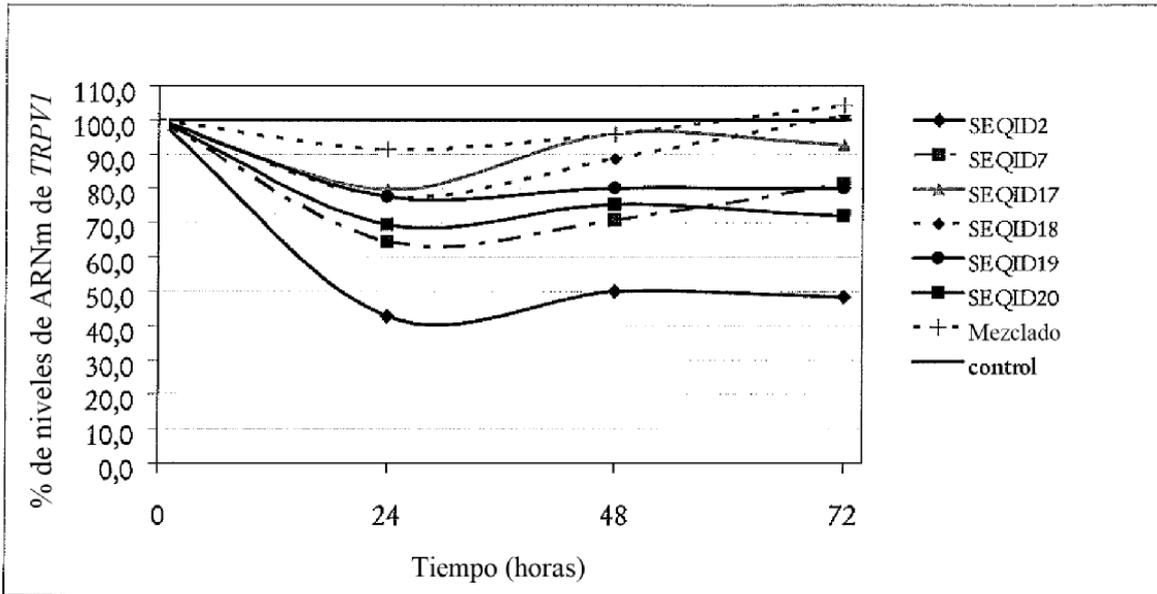


FIGURA 1

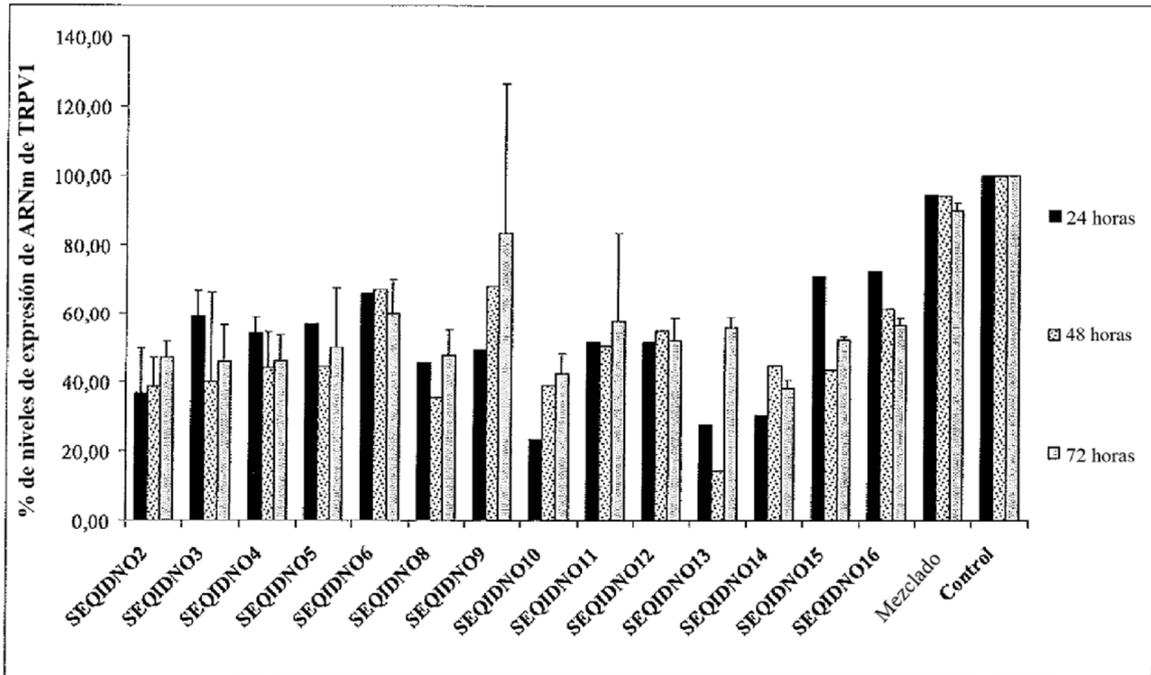


FIGURA 2

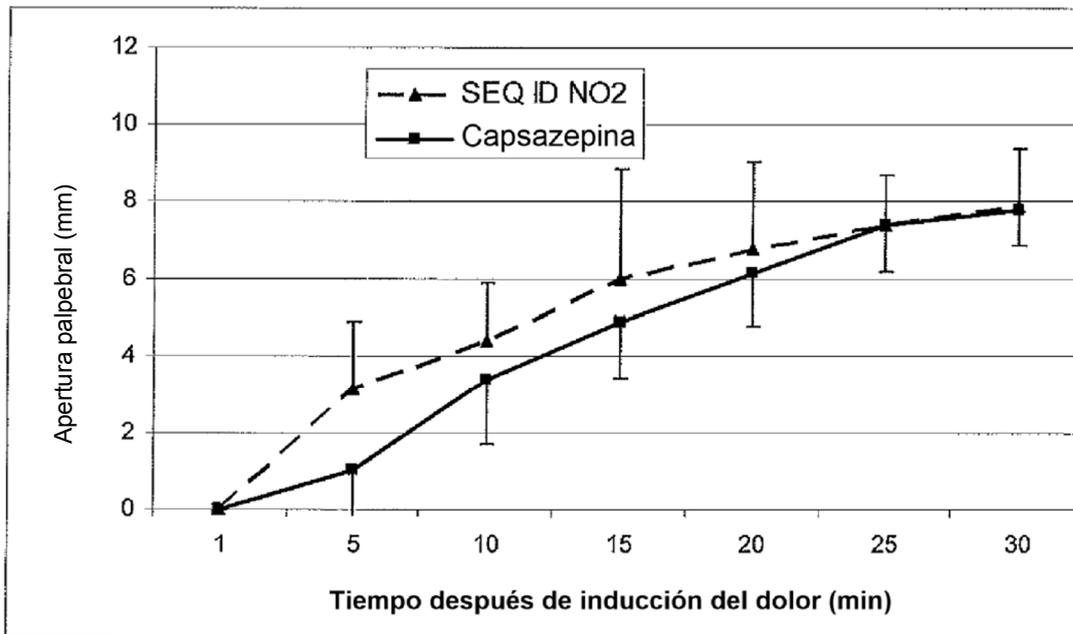


FIGURA 3

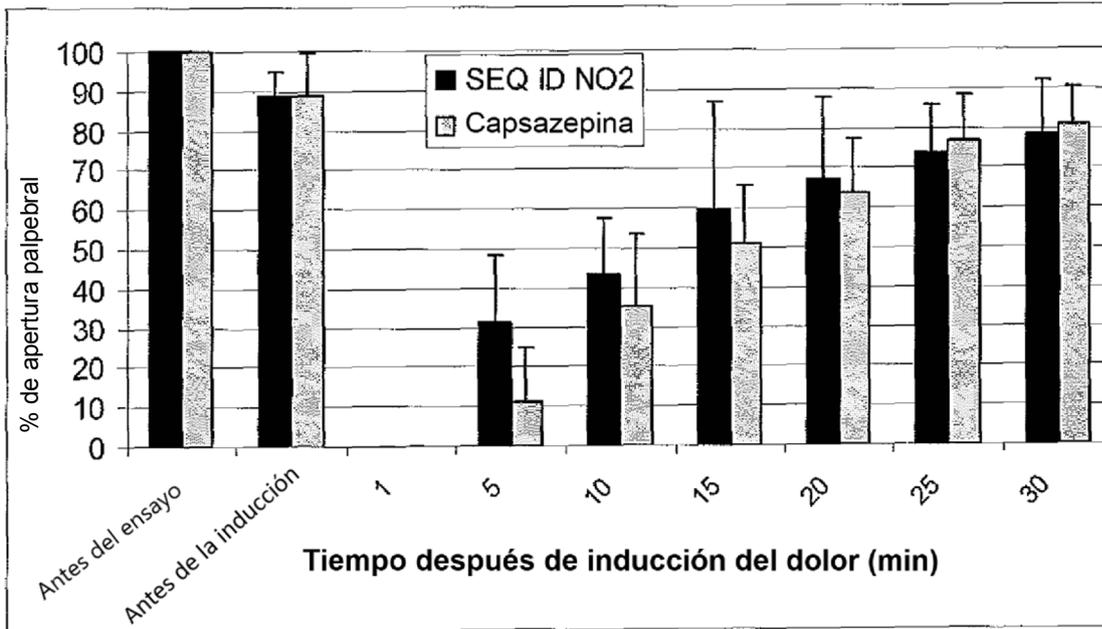


FIGURA 4

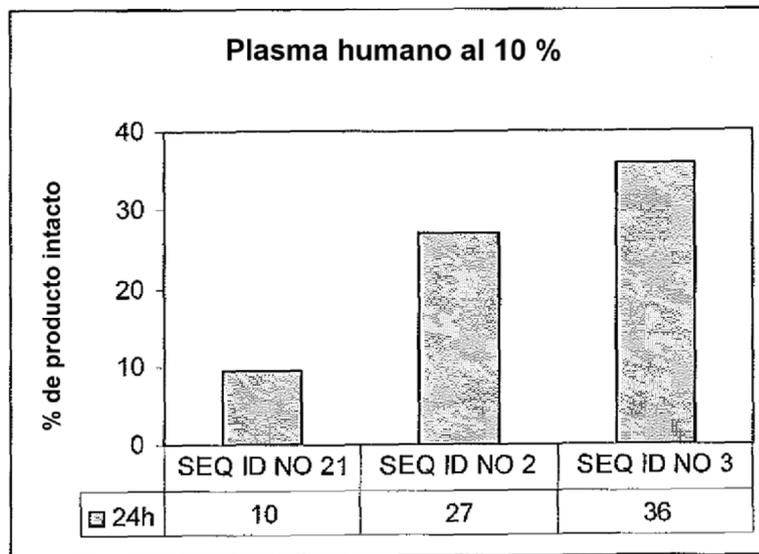


FIGURA 5