

**ARNIP Y SU USO EN MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA INHIBICIÓN  
DE LA EXPRESIÓN DEL GEN NRARP**

**CAMPO DE LA INVENCION**

5                   La presente invención se refiere al campo de los  
productos de ARNip y a su uso en métodos y composiciones para el  
tratamiento y/o la prevención de enfermedades retinianas  
relacionadas con la neovascularización, y más particularmente  
para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades retinianas  
10 relacionadas con la neovascularización que estén relacionadas  
con altos niveles de expresión y/o actividad del gen NRARP.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

                  Una retina sana es necesaria para una buena visión. Los  
15 trastornos retinianos pueden provocar pérdida de visión parcial  
o total. Muchas enfermedades retinianas comparten síntomas y  
tratamientos comunes, pero cada una presenta características  
únicas. El objetivo de los tratamientos de una enfermedad  
retiniana es detener o ralentizar la progresión de la enfermedad  
20 y preservar o restaurar la visión perdida.

                  La neurorretina es un tejido neurológico complejo  
compuesto por una red de ocho capas de células interconectadas  
responsables de la transformación de la luz visual en información  
electromecánica que es enviada a e interpretada por el cerebro  
25 a través del nervio óptico. La disposición de las células neurales

dentro de la retina requiere que la luz se desplace a través de la mayoría de las capas de células para alcanzar los fotorreceptores ubicados en la parte posterior de la retina; los fotorreceptores seguidamente transmiten la información a las

5 neuronas retinianas para el procesamiento local de la información visual y la transmisión a la corteza visual. Existen dos tipos de fotorreceptores, los bastones y los conos. Ambos tipos de fotorreceptores están presentes por toda la retina pero los bastones dominan la periferia mientras que los conos son los más

10 densos en el centro de la retina. El centro de la retina, también conocido como mácula, es una región especializada de la retina con conos densamente arracimados y una alta concentración de pigmentos donde la visión es la más aguda. Una de las principales características de la retina es su transparencia. La

15 transparencia permite que la luz alcance la capa más externa de la retina donde están ubicados los fotorreceptores. Este requisito de transparencia implica que la vasculatura necesaria para nutrir y soportar la retina sea extremadamente especializada. El suministro de sangre a la retina es

20 proporcionado por dos fuentes principales: la vasculatura retiniana y la coroides. La coroides es un tejido pigmentado altamente vascularizado que se encuentra entre la retina y la esclerótica. La coroides proporciona nutrientes, metabolitos e intercambio gaseoso a la retina mediante difusión a través de

25 coriocapilares. El epitelio pigmentario retiniano (RPE) es una

monocapa de células pigmentadas situadas entre la neurorretina y la coroides. Las células del RPE protegen, soportan y alimentan a la retina sensible a la luz. El entorno particular de la neurorretina es mantenido por la barrera hemato-retiniana (BRB), también llamada barrera hemato-retiniana. La BRB está constituida por la barrera hemato-retiniana interna y la barrera hemato-retiniana externa. La barrera hemato-retiniana interna está formada por las uniones intercelulares herméticas entre células endoteliales capilares de la vasculatura retiniana. La barrera hemato-retiniana externa está constituida por las uniones intercelulares herméticas de células del RPE. Las uniones intercelulares herméticas entre células del RPE son esenciales para controlar el transporte de compuestos líquidos y solubles a través de la BRB, así como para evitar la entrada de sustancias tóxicas al interior de la retina.

Los vasos sanguíneos se forman en la retina mediante dos procesos fundamentales: vascularización o angiogénesis. La vascularización se produce como resultado de la diferenciación de células precursoras, que ya están presentes en el tejido, en células endoteliales que contribuyen a la formación de vasos sanguíneos. La angiogénesis difiere en que los nuevos vasos sanguíneos se generan brotando a partir de la vasculatura preexistente. La angiogénesis requiere proliferación, migración y diferenciación de células endoteliales, así como maduración de los vasos recién formados. El número de células endoteliales es

normalmente estable en un organismo adulto; la estabilidad en los endotelios está controlada por un equilibrio en la concentración de factores angiogénicos y anti-angiogénicos. Las alteraciones en el equilibrio de factores causan la inducción o la supresión de la angiogénesis. La vascularización y la angiogénesis son procesos naturales que tienen lugar durante el desarrollo y otros acontecimientos tales como la cicatrización; pero estos procesos también tienen un papel en la patogenia de ciertas enfermedades. La neovascularización patológica habitualmente implica una combinación tanto de vascularización como de angiogénesis. Existen dos tipos de neovascularización que se producen en la retina y ambos pueden causar pérdida de visión: neovascularización retiniana (RNV) en la que nuevos vasos brotan de los capilares retinianos e invaden las capas retinianas vítrea y neural, y neovascularización coroidea (CNV) en la que nuevos vasos brotan de la vasculatura coroidea e invaden el espacio sub-retiniano. Aunque la RNV y la CNV se originan a partir de redes vasculares diferentes e invaden capas diferentes de la retina, mecanismos moleculares compartidos promueven el desarrollo de ambas. La RNV y la CNV son las causas más comunes de pérdida visual grave en los países desarrollados y son necesarios nuevos tratamientos.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), uno de los mediadores de la angiogénesis más importantes, está regulado positivamente durante la RNV y la CNV. Durante la última

década, los científicos han desarrollado varios nuevos fármacos "anti-VEGF". Estos ayudan a bloquear vasos sanguíneos anormales, ralentizan su permeabilidad y ayudan a reducir la pérdida de visión. El tratamiento con fármacos anti-VEGF se realiza mediante inyecciones intravítreas.

La inyección intravítrea (IVT) es el método más común para administrar fármacos a la parte posterior del ojo, que es usada por todos los fármacos aprobados actualmente para el tratamiento de una enfermedad retiniana con la excepción de la verteporfina. La verteporfina es administrada mediante inyección intravenosa seguida por tratamiento con láser, pero su uso se ha reducido significativamente debido a la comercialización de los modernos tratamientos anti-VEGF. Las razones tras el uso extendido de inyección IVT son la eficiencia en la administración de fármacos, el nivel de familiaridad con médicos especializados en retina y la capacidad del médico para controlar el cumplimiento del tratamiento (Rowe-Rendleman y col., 2014). Este método conlleva, sin embargo, su propio conjunto de desventajas muy específicas que incluyen incomodidad del paciente, riesgo de endoftalmitis, formación de cataratas y desprendimiento de retina así como un coste elevado asociado debido a la administración en consulta. Otros métodos de administración incluyen inyección periocular, inyección supracoroidea, inyección subtenoniana y también gotas oftálmicas. Sin embargo, existe cierto escepticismo sobre si puede conseguirse una

eficacia suficiente para tratar afecciones retinianas con gotas oftálmicas, dado que los principios activos tienen que ser administrados desde la córnea a su lugar de acción en la retina. Existen barreras y vías de eliminación significativas que  
5 dificultan la administración de fármacos a la parte posterior del ojo. En primer lugar solamente el 1-7% del fármaco administrado es absorbido por el ojo; la mayor parte del fármaco administrado en forma de gotas oftálmicas es drenado fuera del ojo o absorbido mediante el conducto nasolacrimal a la circulación sistémica.  
10 Además, los fármacos son eliminados rápidamente del humor vítreo. Existen dos vías de eliminación de la cavidad posterior, la anterior y la posterior. La primera conlleva la eliminación hacia la cámara anterior por el flujo de humor acuoso (AH) y seguidamente por el flujo de salida de AH a través del ángulo de  
15 la cámara anterior. La última implica la eliminación a través de la barrera hemato-retiniana. Por lo tanto, los fármacos que pueden penetrar fácilmente a través de la barrera hemato-retiniana tendrían una vida media muy corta en el humor vítreo.

20 Una alternativa a los fármacos anti-VEGF para el tratamiento de enfermedades retinianas relacionadas con la neovascularización son los fármacos basados en ARN de interferencia (ARNi).

El ARNi constituye un mecanismo regulador  
25 post-transcripcional natural presente en la mayoría de las

células eucariotas que utiliza moléculas pequeñas de ARN de cadena doble (ARNcd) para el silenciamiento génico directo dependiente de homología. En 2006, Fire y Mello fueron galardonados con el Premio Nobel por su descubrimiento en el gusano *C. elegans* {Fire y col., 1998}. Poco después de su descripción inicial también se demostró la presencia de ARNi en células de mamífero, por medio de ARN de interferencia pequeños (ARNip) de cadena doble, formados por 21 nucleótidos (Elbashir y col., 2001).

10               Se piensa que el proceso de interferencia de ARN es un mecanismo de defensa celular conservado evolutivamente que se usa para evitar la expresión de genes extraños y que es común a diversos filos y floras, en los que se denomina silenciamiento génico post-transcripcional. Desde el descubrimiento del mecanismo del ARNi la investigación se ha volcado en el descubrimiento de nuevos compuestos que pudieran alterar selectivamente la expresión génica y proporcionar una nueva forma de tratar enfermedades humanas, dirigiéndose a dianas que de otro modo serían inmedicables con estrategias farmacéuticas tradicionales que implican moléculas o proteínas pequeñas.

20               De acuerdo con los conocimientos actuales, el mecanismo del ARNi se inicia cuando los ARN largos de cadena doble son procesados por una proteína similar a la RNasa III, conocida como Dicer. La proteína Dicer contiene típicamente un dominio N-terminal de ARN-helicasa, un dominio de unión a ARN denominado

25

Piwi/Argonauta/Zwille (PAZ), dos dominios de RNasa III y un dominio de unión a ARN de cadena doble (dsRBD) {Collins y col., 2005}, y su actividad conduce al procesamiento de los ARN largos de cadena doble para dar ARNip de cadena doble de 21 a 24  
5 nucleótidos con salientes de dos bases en el extremo 3' y un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. Los dúplex de ARNip resultantes se incorporan después en el complejo efector conocido como complejo silenciador inducido por ARN (RISC), en el que la cadena antisentido o guía del ARNip guía  
10 el RISC para reconocer y cortar secuencias diana de ARNm {Elbashir y col., 2001} después del desenrollamiento dependiente de trifosfato de adenosina (ATP) de la molécula de ARNip de cadena doble mediante una actividad ARN-helicasa (Nykanen y col., 2001). La actividad catalítica del RISC, la cual produce la degradación  
15 de ARNm, es mediada por la endonucleasa Argonauta 2 (AGO2) {Liu y col., 2004; Song y col., 2004}. La AGO2 pertenece a la familia de proteínas Argonauta altamente conservada. Las proteínas Argonauta son proteínas altamente básicas de aproximadamente 100 kDa que contienen dos dominios comunes, a saber, los dominios PIWI  
20 y PAZ {Cerutti y col., 2000}. El dominio PIWI es crucial para la interacción con Dicer y contiene la actividad nucleasa responsable de la escisión de ARNm. La AGO2 utiliza una cadena del dúplex de ARNip como guía para encontrar ARN mensajeros que contengan secuencias complementarias y escinde la estructura de  
25 fosfodiéster entre las bases 10 y 11 respecto al extremo 5' de

la hebra guía {Elbashir y col., 2001}. Un paso importante durante la activación del RISC consiste en la escisión de la cadena sentido o pasajera mediante AGO2, eliminando esta cadena del complejo {Rand y col., 2005}. Estudios cristalográficos en los que se analizó la interacción entre la cadena guía de ARNip y el dominio PIWI revelan que solo los nucleótidos 2 a 8 constituyen una "secuencia germinal" que dirige el reconocimiento del ARNm diana mediante el RISC, y que un desajuste de un único nucleótido en esta secuencia puede afectar drásticamente a la capacidad de silenciamiento de la molécula {Ma y col., 2005; Doench y col., 2004; Lewis y col., 2003}. Una vez escindido el ARNm, y debido a la presencia de extremos de ARN desprotegidos en los fragmentos, el ARNm es escindido y degradado adicionalmente por nucleasas intracelulares y ya no se traducirá a proteínas {Orban y col., 2005}, mientras que el RISC será reciclado para ciclos posteriores {Hutvagner y col., 2002}. Esto constituye un proceso catalítico que da lugar a la reducción selectiva de moléculas de ARNm específicas y de las proteínas correspondientes. Es posible explotar este mecanismo nativo para el silenciamiento génico con el fin de regular cualquier gen deseado, liberando directamente ARNip efectores en las células o los tejidos, donde activan el RISC y producen un silenciamiento potente y específico del ARNm diana. El ARNi se ha aplicado en investigaciones biomédicas, por ejemplo en el tratamiento del VIH, la hepatitis vírica, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, enfermedades

metabólicas, trastornos neurodegenerativos y cáncer {Angaji SA y col., 2010}.

Se han publicado muchos estudios sobre las características ideales que deberla presentar un ARNip en cuanto  
5 a longitud, estructura, composición química y secuencia para alcanzar la máxima eficacia. Los parámetros iniciales para el diseño de ARNip fueron presentados por Tuschl y colaboradores en la patente VÍ002/44321, aunque desde entonces se han publicado numerosos estudios, algoritmos y/o mejoras posteriores. Las  
10 estrategias de selección de ARNip se tornaron más sofisticadas a medida que emergían detalles mecanísticos, y, además, el análisis más detallado de datos existentes y nuevos puede proporcionar más información para el refinamiento adicional de estas estrategias {Walton SP y col., 2010}. Alternativamente,  
15 varios estudios recientes han descrito el diseño y análisis de nuevas estructuras desencadenantes de ARNi distintas de la clásica estructura 19+2 del ARNip y que no cumplen las características clave del ARNip clásico en cuanto a salientes, longitud, o simetría, discutiendo la flexibilidad de la  
20 maquinaria de ARNi en células de mamífero {Chang CI y col., 2011}.

También, se ha realizado un gran esfuerzo por aumentar la estabilidad del ARNip, a medida que éste se percibe como uno de los principales obstáculos para el tratamiento basado en ARNip, dada la naturaleza ubicua de las RNasas en los líquidos  
25 biológicos. Otro problema inherente a las moléculas de ARNip

reside en su inmunogenicidad, ya que se ha descubierto que los ARNip inducen la activación inespecífica del sistema inmunitario innato. La atenuación de genes no deseados (ARNm) es un efecto secundario conocido del silenciamiento génico mediado por ARNip.

5 Es el resultado de una complementariedad parcial entre el ARNip y otros ARNm distintos del objetivo que causa efectos fuera del objetivo {OTE} en genes cuya secuencia es complementaria a una de las cadenas de ARNip. Una de las principales estrategias utilizadas para aumentar la estabilidad y reducir los OTE ha

10 consistido en el uso de nucleótidos modificados, tales como 2'-O-metil-nucleótidos, 2-amino-nucleótidos o nucleótidos que contienen puentes de 2'-O- o 4'-C-metileno. También, se ha descrito la modificación de la estructura ribonucleotídica que conecta nucleótidos adyacentes, principalmente mediante la

15 introducción de nucleótidos modificados por fosforotioato. Parece que la mayor estabilidad y/o la reducción de la inmunogenicidad son con frecuencia inversamente proporcionales a la eficacia {Parrish, 2000}, y sólo un determinado número, posiciones y/o combinaciones de nucleótidos modificados pueden

20 dar lugar a un compuesto silenciador estable y no inmunogénico. Puesto que esto constituye un obstáculo importante para los tratamientos basados en ARNip, se han publicado diferentes estudios que describen determinados patrones de modificación que proporcionan buenos resultados, ejemplos de los cuales incluyen

25 las patentes EP1527176, W02008/050329, W02008/104978 ó

W02009/044392, aunque se pueden encontrar muchos más en la bibliografía {Sanghvi YS., 2011; Deleavey y col., 2012}.

El ojo es un compartimento tisular relativamente aislado, que proporciona ventajas para la utilización de fármacos basados en ARNip para tratar enfermedades retinianas relacionadas con la neovascularización. La viabilidad del uso de ARNip para el tratamiento de la CNV se ha demostrado usando ARNip administrados mediante inyección intravítrea dirigida contra el VEGF o el receptor 1 del VEGF (VEGFR1) {Campochiaro PA., 2006}.

La administración de ARNip mediante instilación tópica al segmento posterior es un verdadero desafío, debido a la distancia relativamente grande que tienen que atravesar los ARNip a través del cuerpo vítreo antes de alcanzar la retina {Guzman-Aranguez A. y col., 2013}. Además, el tratamiento farmacéutico de enfermedades retinianas que afectan al segmento posterior del ojo también se torna un desafío por barreras hemato-oculares restrictivas tales como la barrera hemato-acuosa {BAB} y la BRB, que separan el ojo de la circulación sistémica. Además, la estructura compartimentada del ojo limita el paso de ARNip desde la cámara anterior al segmento posterior del ojo {Duvvuri S y col., 2003}. Finalmente, una vez que los ARNip han conseguido entrar en la parte posterior del ojo, mecanismos de eliminación eficaces actúan para eliminar rápidamente las moléculas administradas {Del Amo EM y col., 2008}. Por lo tanto, la inyección directa en la cavidad vítrea se ha convertido en el

medio más eficiente para administrar agentes terapéuticos basados en ARNip al segmento posterior del ojo {Edelhauser HF y col., 2010}. La inyección intravítrea de ARNip alcanza altas concentraciones de ARNip que están disponibles localmente para los tejidos retinianos al tiempo que limita la exposición sistémica. Sin embargo, la concentración de ARNip se agota rápidamente en el segmento posterior debido a la degradación por endonucleasas vítreas y/o mediante permeación a través de la BRB y mediante difusión a través de la cámara vítrea a la anterior. Por lo tanto, son necesarias múltiples inyecciones intravítreas para mantener concentraciones de ARNip óptimas dentro del segmento posterior del ojo. La principal desventaja de esta vía de administración es que múltiples inyecciones intravítreas están asociadas a un aumento de la presión intraocular, hemorragia vítrea o retiniana, desprendimiento de retina, lágrimas retinianas, endoftalmitis, cataratas, moscas volantes y visión borrosa transitoria {Edelhauser HF y col., 2010}. Por lo tanto, aunque las inyecciones intravítreas garantizan la administración de una alta concentración de ARNip a la retina, esta vía de administración también conlleva su propio conjunto de riesgos particulares. En consecuencia, la administración tópica de ARNip podría reducir los riesgos y conllevar una vía de administración más cómoda para el paciente.

Los ARNip desnudos han demostrado alcanzar ciertas regiones después de aplicaciones tópicas, pero el acceso a

regiones más profundas tales como la capa más interna de la retina y la captación celular eficaz requieren el desarrollo de estrategias que garanticen que la suficiente concentración del compuesto alcance el citoplasma de células ubicadas en la zona  
5 diana y provoque una respuesta fisiológica o terapéutica deseada. Estrategias físicas para administrar ARNip a través de la barrera del estrato córneo incluyen microagujas (Chong, Gonzalez-Gonzalez y col., 2013), inyección intradérmica (Leachman, Hickerson y col., 2010), electroporación (Nakai,  
10 Kishida y col., 2007), iontoforesis (Kigasawa, Kajimoto y col., 2010) entre otras. Las modificaciones de la molécula y/o la formulación también pueden permitir que la molécula penetre en la región requerida y mejore la captación celular.

Se ha descrito la administración tópica de agentes  
15 terapéuticos a base de ARNip para el tratamiento de enfermedades retinianas; por ejemplo, el documento US20130123330 describe el tratamiento de retinopatía diabética y otras enfermedades de neovascularización ocular administrando al menos un dúplex de ARNip que se une a moléculas de ARNm que codifican el VEGF o el  
20 VEGFR2, o un cóctel que combina dúplex de ARNip dirigidos a genes tanto del VEGF como del VEGFR2. Esta solicitud de patente describía que los dúplex de ARNip pueden administrarse al ojo por vía tópica, por vía subconjuntiva o por vía intravítrea. Sin embargo, la memoria descriptiva solamente incluye ejemplos de  
25 compuestos administrados por vía intravítrea o por vía

subconjuntiva. La patente W02010048352 (Quark Pharmaceuticals) describe el uso de compuestos de ARNip modificados químicamente para el tratamiento de enfermedades, trastornos y lesiones oculares asociadas a degeneración o muerte de células ganglionares retinianas, incluyendo retinitis pigmentaria (RP),  
5 retinopatía diabética (DR), edema macular diabético (DME) y degeneración macular asociada a la edad (AMD). Aunque se ha demostrado que la administración tópica al tejido retiniano de compuestos de ARNip regula negativamente la expresión de genes  
10 diana asociados a la pérdida de esas células, tales como los genes CASP2, RTP801, TIGASEII y p53, solamente los compuestos de ARNip dirigidos a Caspasa 2 han demostrado proporcionar un efecto neuroprotector ocular incrementando la supervivencia de las células ganglionares retinianas.

15 La selección del gen diana desempeña un papel clave en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades retinianas relacionadas con la neovascularización con agentes terapéuticos basados en ARNip. La proteína de repetición anquirina regulada por Notch (NRARP), es inducida por Notch en puntos de ramificación  
20 recién formados, donde modula de forma diferente la actividad de señalización de Notch y Wnt para equilibrar la proliferación de tallos y la estabilidad de los vasos. La regulación negativa de NRARP mediada por ARNip en HUVEC se correlaciona con un incremento de Notch, que en células seguidoras se traduce en regresión del  
25 vaso mientras que un aumento de Notch conduce a la formación de

nuevas células líderes {Phng LK, Potente M, y col., 2009}. Por lo tanto, es probable que la NRARP desempeñe un papel importante en la regulación de los procesos de angiogénesis y/o neovascularización en tejidos retinianos.

5            Los agentes terapéuticos basados en ARNip pueden ralentizar y prevenir la progresión de la RNV y la CNV en enfermedades retinianas, pero los beneficios terapéuticos pueden reducirse por una administración ineficiente de ARNip y la duración limitada de la biodisponibilidad del ARNip, que requiere  
10           regímenes de tratamiento prolongados de inyecciones intravítreas repetidas- Por lo tanto, deben diseñarse agentes terapéuticos basados en ARNip mejorados y no invasivos dirigidos a genes diana nuevos y de la invención para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades retinianas relacionadas con la  
15           neovascularización.

#### **COMPENDIO DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona productos mejorados para reducir la expresión de la NRARP y, en consecuencia, las  
20           enfermedades retinianas relacionadas con la neovascularización. Una de las ventajas del tratamiento de enfermedades retinianas relacionadas con la neovascularización con productos de ARNip frente a los agentes terapéuticos anti-angiogénicos tradicionales es que los tratamientos basados en ARNip tendrán  
25           un efecto de larga duración. Esta característica se debe a que

los ARNip bloquean la síntesis de la proteína diana. Cuando se suspende el tratamiento, la célula tendrá que sintetizar nuevas proteínas diana desde el principio; mientras que en los tratamientos tradicionales la proteína diana permanecería  
5 intacta, lista para estar activa de nuevo una vez que el inhibidor ya no esté presente. Otra ventaja podría ser incrementar la potencia usando una combinación de diferentes ARNip para tratar la afección; esto podría conseguirse combinando ARNip dirigidos a la NRARP con otros moduladores de la NRARP y/u otros mediadores  
10 moleculares de la neovascularización, tales como el VEGF o el VEGFR2. El mecanismo de acción del ARNip implica que, una vez que la molécula activa alcanza el citoplasma, la misma molécula puede usarse para mediar en la degradación de muchas moléculas de ARNm; este no es el caso con los anticuerpos, que requieren una  
15 estequiometría 1:1. Por lo tanto, se prevé que serán necesarias dosis más bajas de los compuestos para conseguir la misma eficacia clínica, reduciendo de este modo potencialmente los efectos secundarios.

## 20 **DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

**Figura 1:** Muestra los fragmentos cortos de la secuencia génica diana de la NRARP seleccionados como secuencias diana para los ARNip de la presente invención.

25 **Figura 2:** Muestra las secuencias de oligonucleótidos

para las moléculas de ARNip de la presente invención dirigidas a NRARP y abarcadas por la presente invención. Las secuencias SEQ ID NO. expuestas en la figura se refieren a la cadena sentido (5' -> 3'); los ARNip se administran típicamente en forma de ARNcd, de manera que los ARNip incluyen tanto la cadena sentido como la cadena antisentido complementaria. Las SEQ ID NO. 10 a SEQ ID NO. 18 son ARNip dirigidos a las SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 9 respectivamente. En general, un ARNip incluye las cadenas sentido y antisentido y puede incluir también dinucleótidos salientes en el extremo 3' (por ejemplo dTdT). Sin embargo, esto no es esencial.

**Figura 3:** ARNip modificados dirigidos a NRARP. Las SEQ ID NO. 19 a SEQ ID NO. 40 se refieren a la cadena sentido modificada (5' -> 3') y la cadena antisentido modificada (5' -> 3') de la SEQ ID NO. 10 de ARNip, que está dirigida a la secuencia SEQ, ID NO. 1 del gen NRARP. Leyenda: cadena sentido (S), cadena antisentido (AS), minúscula (ribonucleótidos 2'OMe), \* (PS o enlace fosfotioato), *minúscula* (4'-Tiorribosa o 4'S), pU o 5pU (5- Propiniluracilo 3'), MAYÚSCULA (ribonucleótidos 2'F), minúscula (5'-metiluridina o 5mU), dT (desoxitimina o 2' H timina).

**Figura 4:** Niveles de expresión *in vitro* del gen NRARP después de la transfección de uno de los siguientes ARNip dirigidos a NRARP: SEQ ID NO. 10 (SYL136001), SEQ ID NO. 11 (SYL136005), SEQ ID NO. 12 (SYL136003) y SEQ ID NO. 13 (SYL136004)

en células HeLa humanas.

**Figura 5:** Viabilidad celular *in vitro* después de la transfección de uno de los siguientes ARNip dirigidos a NRARP: SEQ ID NO. 10 (SYL136001), SEQ ID NO. 11 (SYL136005), SEQ ID NO. 12 (SYL136003) y SEQ ID NO. 13 (SYL136004) en células HeLa humanas.

**Figura 6:** Niveles de expresión *in vitro* del gen NRARP después de la transfección de ARNip de la SEQ ID NO. 10 dirigido a NRARP y sus homólogos modificados: SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37 y SEQ ID NO. 39 en células HeLa humanas.

**Figura 7:** Niveles de expresión *in vitro* del gen NRARP después de la transfección de ARNip de la SEQ ID NO. 10 dirigido a NRARP y sus homólogos modificados: SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37 y SEQ ID NO. 39 en células BEAS-2B humanas.

**Figura 8:** Niveles de expresión *in vitro* del gen NRARP después de la transfección de la SEQ ID NO. 10 y sus homólogos modificados: SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37 y SEQ ID NO. 39 en células C2C12 murinas.

**Figura 9:** Niveles de expresión *in vitro* del gen NRARP después de la transfección de la SEQ ID NO. 10 o la SEQ ID NO. 37 en células ARL6 de rata.

**Figura 10:** Viabilidad celular *in vitro* después de la transfección de la SEQ ID NO. 10 y sus homólogos modificados: SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37 y SEQ ID NO. 39 en células HeLa humanas.

**Figura 11:** Viabilidad celular *in vitro* después de la transfección de la SEQ ID NO. 10 y sus homólogos modificados: SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37 y SEQ ID NO. 39 en células BEAS-2B humanas.

**Figura 12:** Viabilidad celular *in vitro* después de la transfección de la SEQ ID NO. 10 y sus homólogos modificados: SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37 y SEQ ID NO. 39 en células C2C12 murinas.

**Figura 13.** Viabilidad celular *in vitro* después de la transfección de la SEQ ID NO. 10 o la SEQ ID NO. 37 en células ARL6 de rata.

**Figura 14:** Niveles de ARNm de NRARP en la retina después de la inducción de CNV mediante láser. Los datos representan las medias  $\pm$  e.e.m. de tres animales (seis ojos) por punto de tiempo.

**Figura 15:** Niveles de ARNm de NRARP en la coroides/RPE después de la inducción de CNV mediante láser. Los datos representan las medias  $\pm$  e.e.m. de al menos dos animales (cuatro

ojos) por punto de tiempo.

**Figura 16:** Diagrama de barras de mediciones de la lesión a las tres semanas después del tratamiento con láser con vehículo o la SEQ ID NO. 37 (5 mg/ml) administrado por vía tópica, o con  
 5 inyección intravítrea de anti-VEGF (5 µg/ojo). Las áreas de las lesiones se determinaron mediante angiografía con fluoresceína que se cuantificaron (en píxeles<sup>2</sup>) usando software de análisis de imágenes computarizado excluyendo la zona de avascularización en el centro de la lesión. Los datos representan las medias ±  
 10 e.e.m. de seis animales (doce ojos) por punto de tiempo.

**Figura 17:** Variables estudiadas para evaluar las estructuras: 1.- Número de uniones principales; 2.- Número de segmentos principales; 3.- Longitud total de segmentos principales; 4.- Número de mallas; 5.- Área total de las mallas.

**Figura 18:** Cambio en los diferentes parámetros estudiados en respuesta por el medio completo. Se representan los  
 15 siguientes parámetros: número de uniones principales; número de segmentos principales; longitud total de los segmentos principales; número de mallas; área total de las mallas. Se  
 20 obtuvieron los resultados a partir de células cultivadas en placas de cultivo cubiertas con matrigel utilizando: el medio EBM sin suplementos como control negativo (basal), o medio completo con suplementos y el 10% de FCS (control positivo).

**Figura 19:** Análisis de los diferentes parámetros  
 25 estudiados en respuesta a la SEQ ID NO. 37 o ARNip para el KDR.

**Figura 20:** Imágenes de las estructuras formadas en respuesta a las diferentes condiciones.

**Figura 21:** A. Proliferación de células HUVEC en respuesta a las diferentes concentraciones del VEGF. B. Inhibición de la proliferación inducida por el VEGF mediante bevacizumab.

**Figura 22:** Efecto del ARNip anti KDR o ARNip, SEQ ID No. 37, en la proliferación inducida por el medio completo (10% del FCS y VEGF de 100 ng/ml) en células HUVEC.

**Figura 23:** Migración de las células HUVEC en respuesta al incrementar las dosis del VEGF.

**Figura 24:** Efecto del ARNip anti KDR o ARNip, SEQ ID NO. 37, en la migración de las células HUVEC inducida por el medio sin suplementos y el medio completo (10% del FCS + VEGF de 100 ng/ml).

**Figura 25:** Imágenes de las células en el compartimento superior (migración) en respuesta a las diferentes condiciones.

**Figura 26:** A. cuantificación de la cicatrización de herida en condiciones basales y en respuesta al VEGF de 10 ng/ml. B. Imágenes de la lesión en el tiempo, en el tiempo 0 y 24 h después de la inducción.

**Figura 27:** Cuantificación de la cicatrización de herida en condiciones basales y en respuesta al medio completo (10% del FCS y VEGF de 100 ng/ml).

**Figura 28:** Imágenes que muestran las heridas en el

tiempo 0 y 16 h después de la inducción en diferentes condiciones ensayadas.

**Figura 29:** niveles de ARNm de la NRARP en las células HUVEC.

5

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a la disposición de una molécula de ARNip para su uso como medicamento, en el tratamiento y/o la prevención de una afección del ojo caracterizada por una mayor expresión y/o actividad de la NRARP, donde tal molécula se dirige específicamente a una secuencia seleccionada del grupo formado o constituido por: SEQ ID NO. 1 a la SEQ ID NO. 9 y reduce la expresión del gen NRARP cuando se introduce en una célula. Preferentemente la secuencia diana comprende o consiste de la SEQ ID NO. 1.

Un ARNip, de acuerdo con la presente invención, se "dirige" a un gen cuando, por ejemplo, la molécula de ARNip disminuye o inhibe selectivamente la expresión del gen. La expresión "disminuye o inhibe selectivamente" como se usa en el presente documento abarca ARNip que afectan a la expresión de un gen, en este caso de NRARP. De forma alternativa, un ARNip se dirige a un gen cuando (una cadena del) ARNip se hibrida en condiciones restrictivas con el transcrito génico, es decir, su ARNm. La hibridación "en condiciones restrictivas" significa la alineación con la región diana del ARNm en condiciones

convencionales, por ejemplo temperatura elevada y/o bajo contenido en sal, que tienden a desfavorecer la hibridación. En Maniatis, T., y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, páginas 387-389, se describe un protocolo adecuado (que implica 0.1xSSC, 68 °C durante 2 horas).

Las secuencias de ácido nucleico citadas en la presente memoria aparecen en dirección 5' a 3', salvo que se indique lo contrario. La expresión "ácido nucleico" se refiere a ADN o ARN o a una forma modificada del mismo que comprenda las bases de purina o pirimidina presentes en el ADN (adenina "A", citosina "C", guanina "G", timina "T") o en el ARN (adenina "A", citosina "C", guanina "G", uracilo "U"). Los ARN de interferencia proporcionados en la presente memoria pueden comprender bases de "T", por ejemplo en los extremos 3', aunque las bases de "T" no existan de forma natural en el ARN. En algunos casos, estas bases pueden aparecer como "dT" para distinguir los desoxirribonucleótidos presentes en una cadena de ribonucleótidos.

La secuencia diana como se ha definido anteriormente se describe como una secuencia de ADN diana que se usa para definir variantes de transcripción en las bases de datos usadas con el fin de diseñar ARNip, mientras que los compuestos específicos que se han de usar son secuencias de ARN definidas como tales.

Un experto en este campo puede acceder a cualquier

secuencia génica diana a través de bases de datos públicas. Por ejemplo, el número de acceso al GenBank correspondiente al ARNm del NRARP humano es NP\_001004354.1 y NM\_001004354.2 (Gene ID: 441478). Asimismo, el ENSEMBL (MBL-EBI/Wellcome Trust Sanger Institute) tiene el siguiente número de acceso para el NRARP humano: ENSG00000198435. Toda esta información se encuentra en la base de datos de acceso libre Ensembl.

Tal región diana preferida identificada en la presente invención comprende o consiste de al menos una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 9.

En una modalidad preferida, tal región diana preferida comprende o consiste de la SEQ ID NO. 1.

Estas secuencias presentan una homología del 100% en las especies siguientes: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Canis lupus familiaris* y *Sus scrofa domestica*.

En el ámbito del ARNi, cuando los estudios *in vitro* demuestran que un ARNip humano no es capaz de inducir la atenuación del gen en el modelo animal, se sintetiza un compuesto sustituto (análogo activo en el animal) con el fin de analizar la eficacia del ARNip en el modelo animal en cuestión. Este sustituto se diseña contra la misma región que el ARNip humano, de modo que los dos ARNip presentan la misma secuencia a excepción de unos pocos nucleótidos, dependiendo de la homología existente entre el gen diana humano y del animal. Esta aproximación se ha usado ampliamente en el desarrollo de otros oligonucleótidos,

especialmente en estudios toxicológicos y de eficacia {Kornbrust D. y col., 2013}.

En una modalidad más preferida, tal región diana preferida comprende o consiste de la SEQ ID NO. 1 (5'-  
5 CACCAGGACATCGTGCTCT -3').

En consecuencia, un ARNip de acuerdo con los aspectos de la presente invención comprende preferentemente una molécula de ARN de cadena doble, cuya cadena antisentido comprende una secuencia de ARN sustancialmente complementaria a al menos una  
10 secuencia que se compone de la SEQ ID NO. la SEQ ID NO. 9, y cuya cadena sentido comprende una secuencia de ARN complementaria a la cadena antisentido, en la que ambas cadenas se hibridan por apareamiento convencional de bases entre nucleótidos. Más preferentemente, un ARNip de acuerdo con los aspectos de la  
15 presente invención comprende preferentemente una molécula de ARN de cadena doble, cuya cadena antisentido comprende una secuencia de ARN sustancialmente complementaria a la SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 9, y aún más preferentemente la cadena antisentido comprende o consiste de una secuencia de ARN sustancialmente complementaria  
20 a la SEQ ID NO. 1.

Dentro del significado de la presente invención, "sustancialmente complementaria" a una secuencia de ARNm diana puede entenderse también como "sustancialmente idéntica" a tal secuencia diana. "Identidad" es, como se conoce por alguien con  
25 experiencia ordinaria en la técnica, el grado de similitud de

secuencia existente entre las secuencias de nucleótidos determinado por comparación del orden y la identidad de nucleótidos en las secuencias. En una modalidad, la cadena antisentido de un ARNip que presente una complementariedad del  
5 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ARNm diana se considera sustancialmente complementaria y se puede usar en la presente invención. El porcentaje de complementariedad describe el porcentaje de nucleótidos contiguos en una primera molécula de  
10 ácido nucleico que se puede aparear en el sentido de Watson- Crick con un conjunto de nucleótidos contiguos en una segunda molécula de ácido nucleico. En una modalidad preferida, la cadena antisentido del ARNip es 100% complementaria a la secuencia de ARNm diana, y la cadena sentido es 100% complementaria a la cadena  
15 antisentido en la porción de doble cadena del ARNip. El ARNip también puede incluir sobresalientes no apareados, por ejemplo sobresalientes de dinucleótidos en el extremo 3', preferentemente de dTdT.

En una modalidad preferida, tal afección del ojo  
20 (preferentemente una afección retiniana del ojo) identificada mediante la presente invención es una enfermedad o trastorno relacionado con la neovascularización. Más preferentemente, tal afección del ojo se selecciona entre degeneración macular asociada a la edad (AMD), retinopatía isquémica, edema macular  
25 diabético (DME), retinopatía diabética proliferativa (PDR),

isquemia retiniana diabética (DRI), edema retiniano diabético (DRE), neovascularización miópica y retinopatía de prematuridad (ROP) y combinaciones de las mismas.

Como se conoce a partir del estado de la técnica, se han propuesto muchas estructuras diferentes para lograr una interferencia de ARN. Generalmente, estas moléculas de cadena doble presentan una longitud de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos e incluyen estructuras romas así como sobresalientes. Se ha descrito que los sobresalientes resultan ventajosos y que pueden estar presentes en los extremos 5' o en los extremos 3' de cualquiera de las cadenas, pues reducen el reconocimiento por las RNasas e imitan el sustrato natural de Dicer. Algunos autores recomiendan la inclusión de sobresalientes en ambos extremos 3' de las moléculas, mientras que otros consideran que una saliente es suficiente. Otros han descrito el uso de estructuras romas con patrones de modificación específicos (patentes EP1527176, W02005062937, W02008104978, EP2322617, EP2348133, US20130130377 y muchas otras).

Los sobresalientes pueden contener entre 1 y 5 nucleótidos; los sobresalientes se componen típicamente de dinucleótidos. Las moléculas clásicas usadas en este campo comprenden una molécula de doble cadena de 19 nucleótidos que comprende adicionalmente sobresalientes de dinucleótidos en 3' que comprenden preferentemente desoxirribonucleótidos, como se enseñó por Tuschl en sus estudios iniciales (patente W00244321).

Se cree que estos sobresalientes aumentan adicionalmente la resistencia a la degradación por nucleasas (RNasa). Posteriormente, Kim y col. (2005) describieron que los productos 21-méricos (que contienen sobresalientes de dinucleótidos) son  
5 necesarios para la incorporación en el RISC. Además, Bramsen y col. (2009) describieron la introducción de posibles modificaciones desestabilizadoras en los sobresalientes para aumentar la eficacia del silenciamiento.

Como tal, una modalidad preferida de los distintos  
10 aspectos de la presente invención se refiere a moléculas de ARNip dirigidas a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 9 que comprenden al menos un sobresaliente, preferentemente un sobresaliente en 3' en la cadena sentido y/o antisentido. Más preferentemente, tales  
15 moléculas de ARNip se dirigen a SEQ ID NO. 1. Cuando la invención se refiera a una molécula de ARNip dirigida a al menos una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 9, el ARNip incluirá una cadena antisentido de longitud equivalente y complementaria a la diana, y una cadena sentido de longitud  
20 equivalente y complementaria a la cadena antisentido. Las cadenas antisentido y sentido pueden incluir asimismo bases adicionales que no sean complementarias a la otra cadena o a la diana y/o que no se apareen en la porción de doble cadena del ARNip. Por ejemplo, la SEQ ID NO. 1 es una secuencia de 19 nucleótidos; el ARNip puede  
25 incluir una región de doble cadena de 19 pb en esta porción de

identidad de secuencia y sobresalientes de dinucleótidos adicionales.

Una modalidad preferida de los distintos aspectos de la presente invención se refiere a moléculas de ARNip dirigidas  
5 a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 1 a la SEQ ID NO. 9, en la que cada cadena de las moléculas de ARNip de doble cadena es de aproximadamente 18 a aproximadamente 28 o más (por ejemplo, aproximadamente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ó 28 o más) nucleótidos de largo.

10 Otra modalidad preferida de los distintos aspectos de la presente invención se refiere a moléculas de ARNip de 18 a 28 nucleótidos o más que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 10 a SEQ ID NO. 18. Más preferentemente, las moléculas de ARNip de cadena  
15 doble presentan una longitud de al menos 19 nucleótidos y se seleccionan del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 10 a SEQ ID NO. 18.

Otra modalidad alternativa de los distintos aspectos de la presente invención proporciona moléculas de extremos romos.

20 Además, una modalidad preferida de la presente invención se refiere a un ARNip que comprende o consiste de una estructura de doble cadena de 19 nucleótidos dirigida a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 9. Más preferentemente, el ARNip comprende o  
25 consiste de una estructura de doble cadena de 19 nucleótidos

dirigida a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 9, y aún más preferentemente dirigida a la SEQ ID NO. 1.

Una modalidad particular de la presente invención se refiere a un ARNip de cadena doble de 19 nucleótidos con extremos romos dirigido a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 1 a la SEQ ID NO. 9. Más preferentemente, el ARNip está dirigido contra al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 1 a la SEQ ID NO. 9, y aún más preferentemente el ARNip está dirigido contra la SEQ ID NO. 1. En otra modalidad particular, este compuesto comprende o consiste de al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 10 a SEQ ID NO. 18. En aún otra modalidad preferida, la cadena antisentido de este ARNip presenta una complementariedad de al menos un 80%, preferentemente de al menos un 90%, con al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 9.

En una modalidad preferida, este compuesto comprende o consiste de al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 10 a SEQ ID NO. 18.

En otra modalidad preferida, este compuesto comprende o consiste de una cadena sentido que comprende o consiste de al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 10 a SEQ ID NO. 18, y una cadena antisentido que es

complementaria a la cadena sentido.

En una modalidad más preferida, este compuesto comprende o consiste de la SEQ ID NO. 10 (5'- CACCAGGACAUCGUGCUCU -3' cadena sentido y 5'- AGAGCACGAUGUCCUGGUG -3' cadena antisentido), correspondiente al compuesto mencionado llamado SYL136001.

Además, como se ha descrito en la sección denominada "Antecedentes de la invención", un problema importante de las moléculas de ARNip es su inestabilidad en líquidos biológicos debido a la naturaleza ubicua de las RNasas. En consecuencia, se ha descrito el uso de numerosas modificaciones químicas diferentes realizadas en los nucleótidos, con el fin de mejorar la estabilidad del compuesto.

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

También se ha descrito que ambos efectos, el reconocimiento por RNasas y la inmunogenicidad, son dependientes de secuencia.

Algunas de las modificaciones químicas que aumentan la estabilidad del compuesto reduciendo la susceptibilidad a RNasas también son capaces de disminuir la inducción del reconocimiento por el sistema inmunitario y en consecuencia reducir la respuesta  
5 inmunitaria subsiguiente. Sin embargo, la inserción de nucleótidos modificados químicamente en un ARNip también puede reducir la eficacia del silenciamiento, como se ha descrito en la sección anterior, y, por ello, debe abordarse con precaución.

Por consiguiente, en una modalidad preferida de los  
10 distintos aspectos de la presente invención, el ARNip comprende adicionalmente al menos un nucleótido con una modificación química.

Las modificaciones químicas preferidas que incrementan la estabilidad y reducen los efectos inmunogénicos incluyen 2'-O-  
15 metil-nucleótidos, 2'-fluoro-nucleótidos, 2'-amino-nucleótidos, 2'-desoxi-nucleótidos o nucleótidos que contengan puentes de 2'-O- o 4'-C-metileno. Otras modificaciones químicas preferidas para la protección frente a exonucleasas incluyen el patrón de modificación ExoEndoLight (EEL):  
20 modificación de todas las pirimidinas en la cadena sentido a restos de 2'-O-metilo, y modificación de todas las pirimidinas en un motivo 5'-UA-3' o 5'-CA-3' en la cadena antisentido a los restos 2'-O-metilo. Además, la posición 1 de la cadena sentido también se puede convertir en 2'-O-metilo, para evitar la  
25 fosforilación de la cadena sentido en 5' y aumentar así la

especificidad del ARNip. Además, la cadena sentido también puede  
 incluir una modificación 2'-O- metilo en la posición 14, puesto  
 que los restos 2'-O-Me en esta posición inactivan la cadena  
 sentido y, por lo tanto, aumentan la especificidad de cadena de  
 5 los ARNip. Además, otras modificaciones químicas preferidas para  
 la protección frente a nucleasas incluyen el patrón de  
 modificación Metil-Fluoro (MEF): alternancia de modificaciones  
 2'-fluoro y 2'-O-metilo partiendo (extremo 5') con un 2'-F en la  
 cadena sentido y partiendo con 2'-o-Me en la cadena antisentido.  
 10 Además, la posición 1 de la cadena sentido también puede  
 convertirse en 2'-O-Me y la posición 1 de la cadena antisentido  
 en 2'-F (puesto que los restos 2'F son compatibles con la  
 fosforilación en 5' mientras que los restos 2'-O-Me son  
 voluminosos y en general alteran la fosforilación). Este patrón  
 15 de modificación no solamente estabiliza la molécula sino que  
 además inactiva la capacidad del RISC de usar la cadena sentido,  
 promoviendo de este modo la especificidad de cadena. Asimismo,  
 la modificación de la estructura de ribonucleótidos puede  
 realizarse uniando los nucleótidos usando enlaces fosforotioato  
 20 en lugar de fosfodiéster. Otra modificación química preferida en  
 el sentido de la presente invención se refiere a: 4'-Tiorribosa,  
 5-Propiniluracilo 3',5'-metiluridina o la sustitución de  
 ribonucleótidos de uracilo por  
 desoxitimidina(desoxirribonucleótidos). En otra modalidad  
 25 preferida de la presente invención, el al menos un nucleótido

modificado químicamente y/o la al menos una modificación química en la estructura de ribonucleótidos se encuentra en la cadena sentido, en la cadena antisentido o en ambas cadenas del ARNip.

Por consiguiente, en una modalidad, el ARNip comprende  
5 o consiste de al menos una secuencia con una cadena sentido y/o una cadena antisentido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 19 a SEQ ID NO. 66.

En una modalidad preferida, el ARNip comprende o  
consiste de una cadena sentido que comprende o consiste de al  
10 menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 33, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37, SEQ ID NO. 39, SEQ ID NO. 41, SEQ ID NO. 43, SEQ ID NO. 45, SEQ ID NO. 47, SEQ ID NO. 49, SEQ ID NO. 51, SEQ  
15 ID NO. 53, SEQ ID NO. 55, SEQ ID NO. 57, SEQ ID NO. 59, SEQ ID NO. 61, SEQ ID NO. 63 y SEQ ID NO. 65, y una cadena antisentido que es complementaria a la cadena sentido que se selecciona del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 24, SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 28, SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 32,  
20 SEQ ID NO. 34, SEQ ID NO. 36, SEQ ID NO. 38, SEQ ID NO. 40, SEQ ID NO. 42, SEQ ID NO. 44, SEQ ID NO. 46, SEQ ID NO. 48, SEQ ID NO. 50, SEQ ID NO. 52, SEQ ID NO. 54, SEQ ID NO. 56, SEQ ID NO. 58, SEQ ID NO. 60, SEQ ID NO. 62, SEQ ID NO. 64 y SEQ ID NO. 66, respectivamente.

25 Las moléculas de ARNip descritas anteriormente se

pueden liberar en el interior de las células con su estructura nativa usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en los estudios de silenciamiento génico *in vitro* estos compuestos se administran usando reactivos de transfección convencionales.

5 Para lograr los efectos *in vivo*, estos compuestos también se pueden administrar desnudos o usando agentes que fomenten la liberación, como, por ejemplo, liposomas, conjugación con un resto específico, etc., si bien en la técnica se conocen muchas alternativas diferentes que se usan de forma diferente  
10 dependiendo de cuál sea el sitio diana dentro del organismo.

De forma alternativa, las moléculas de ARNip de los distintos aspectos de la invención se pueden expresar dentro de las células a partir de promotores eucarióticos. Se pueden liberar en las células diana vectores recombinantes capaces de  
15 expresar las moléculas de ARNip y que persistan en ellas. De forma alternativa, se pueden usar vectores que proporcionen una expresión transitoria de moléculas de ácido nucleico. Tales vectores se pueden administrar repetidas veces según sea necesario. Una vez expresada, la molécula de ARNip interactúa con  
20 el ARNm diana y genera una respuesta de interferencia de ARN. Las moléculas de ARNip producidas de esta manera se denominan con frecuencia ARNhc (ARN horquillado corto), puesto que sus cadenas sentido y antisentido están unidas mediante un pequeño bucle de nucleótidos. La liberación de los vectores que expresan moléculas  
25 de ARNip puede ser sistémica, por ejemplo por administración

intravenosa o intramuscular, por administración a células diana explantadas de un sujeto y su reintroducción posterior en el sujeto o mediante cualquier otro medio que permita la introducción en la célula diana deseada.

5                   Un aspecto de la invención se refiere al uso de un ARNip dirigido a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 9 en la preparación de un medicamento para su uso en un método para el tratamiento de una afección del ojo caracterizada por una mayor expresión y/o  
10 actividad de la NRARP. Más preferentemente, tal secuencia es la SEQ ID NO. 1. El método comprende la inhibición de la expresión de la NRARP en un paciente. El término "inhibición" se usa para indicar una reducción o regulación por disminución de la expresión o actividad. Preferentemente, la afección del ojo es  
15 una enfermedad o trastorno relacionado con la neovascularización. En una modalidad, la afección del ojo se selecciona del grupo que comprende la degeneración macular asociada a la edad (AMD), retinopatía isquémica, edema macular diabético (DME), retinopatía diabética proliferativa (PDR),  
20 isquemia retiniana diabética (DRI), edema retiniano diabético (DRE), neovascularización coroidea miópica (también denominada comúnmente como neovascularización subretiniana, mancha de Fuchs o mancha retiniana de Forster-Fuchs, y degeneración disciforme en miopía patológica) y retinopatía de prematuridad (ROP) y  
25 combinaciones de las mismas.

También se proporciona un método para el tratamiento de una afección del ojo caracterizada por una mayor expresión y/o actividad de la NRARP. El método comprende la inhibición de la expresión de la NRARP en un paciente. El método puede comprender  
5 la administración de ARNip dirigido a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 1 a la SEQ ID NO. 9. Más preferentemente, tal secuencia es la SEQ ID NO. 1.

Se espera que el tratamiento terapéutico con ARNip dirigidos contra ARNm de NRARP sea beneficioso respecto a agentes  
10 terapéuticos anti-angiogénicos tradicionales debido a su especificidad, estabilidad, potencia, mecanismo de acción natural y naturaleza química uniforme con otros agentes de ARNip dirigidos a las mismas o diferentes dianas génicas, puesto que difieren solamente en la secuencia de nucleótidos. Los  
15 tratamientos basados en ARNip bloquean la síntesis de la proteína diana, lo que provoca una reducción prolongada de la expresión génica de NRARP y un efecto de mayor duración que puede evitar las consecuencias de una inyección intravítrea. Esto es especialmente importante en casos tales como enfermedad o  
20 trastorno relacionado con la neovascularización, que comprenden, pero no se limitan a, degeneración macular asociada a la edad (AMD), retinopatía isquémica, edema macular diabético (DME), retinopatía diabética proliferativa (PDR), isquemia retiniana diabética (DRI), edema retiniano diabético (DRE),  
25 neovascularización miópica y retinopatía de prematuridad (ROP),

puesto que a menudo son afecciones crónicas que requieren numerosas inyecciones intravítreas durante su tratamiento. Las inyecciones intraoculares repetitivas aumentan el riesgo de efectos secundarios perjudiciales que incluyen, entre otros, mayor presión en el ojo, inflamación, hemorragia, infección, daños a la retina o los nervios o estructuras circundantes, pérdida de visión, pero también efectos secundarios de los medicamentos que se usan durante el procedimiento, tales como aquellos derivados del uso de antibióticos o fármacos para dilatar las pupilas. Además, pueden diseñarse ARNip para silenciar la expresión de alelos de genes mutantes que difieren de los alelos de tipo silvestre en tan solo un único nucleótido. Por lo tanto, los tratamientos basados en ARNip pueden modular ventajosamente la expresión de genes que presentan mutaciones puntuales para ralentizar o incluso prevenir una enfermedad, inactivando selectivamente alelos mutantes de la enfermedad mientras se permite que continúe la expresión de la proteína de tipo silvestre.

Teniendo en mente la preparación de un medicamento de este tipo, el ARNip de los distintos aspectos de la presente invención se puede formular en forma de composición farmacéutica. Preferentemente, las composiciones y formulaciones de tales ARNip se pueden administrar por vía tópica en el órgano de interés. En una modalidad aún más preferida, se pueden formular para la administración tópica en el ojo, preferentemente en la

superficie corneal del ojo. La administración en la superficie corneal se puede realizar, por ejemplo, en forma de gotas oftálmicas, geles, lociones, cremas o insertos oculares. Otras formass de administración en el ojo pueden incluir inyección en  
5 el ojo.

Otra modalidad preferida de los distintos aspectos de la presente invención se refiere a un ARNip dirigido específicamente a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 1 a la SEQ ID NO. 9 como se ha descrito  
10 en los párrafos anteriores para su uso en un medicamento para el tratamiento de una afección del ojo caracterizada por una mayor expresión y/o actividad de la NRARP. Más preferentemente, tal secuencia es la SEQ ID NO. 1. Como se ha descrito anteriormente, puede ser un ARNip que comprenda o se componga de una estructura  
15 de doble cadena de 19 nucleótidos dirigida a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO 1 a la SEQ ID NO. 9. Este ARNip puede presentar extremos romos. Preferentemente, el ARNip comprende o consiste de al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO.  
20 10 a SEQ ID NO. 18. Otro ARNip para su uso de acuerdo con la presente invención comprende o consiste de al menos una secuencia con una cadena sentido y/o una cadena antisentido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 19 a SEQ ID NO. 66.

En el contexto de la presente invención, para  
25 "dirigirse específicamente" a una secuencia, el ARNip de la

invención comprende preferentemente al menos la misma secuencia germinal. Por lo tanto, cualquier secuencia de acuerdo con la presente invención dirigida específicamente a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 1 a la SEQ ID NO. 9 es preferentemente idéntica en las posiciones 2-8 de la cadena antisentido. Más preferentemente, tal secuencia seleccionada dirigida específicamente es la SEQ ID NO. 1.

No obstante lo anterior, los ARNip de los distintos aspectos de la presente invención se pueden usar para silenciar la expresión de la NRARP en tejidos distintos del ojo. Por consiguiente, tales ARNip se deberán formular de forma correspondiente.

Por ejemplo, una molécula de ARNip puede comprender un vehículo de liberación, que incluye liposomas, para la administración a un sujeto. Las formulaciones farmacéuticamente aceptables pueden presentar portadores y diluyentes, así como sus sales. Las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar en las células mediante diversos métodos conocidos por aquellos con experiencia en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, la encapsulación en liposomas, la iontoforesis o la incorporación en otros vehículos, tales como polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas, microesferas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y PLCA, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteináceos. Los componentes de liberación intracelular también

pueden ser componentes virales que incluyen, pero no se limitan a, un péptido viral fusogénico para romper endosomas, permitiendo al ácido nucleico evitar la degradación lisosomal, proteínas virales para mantener la expresión (por ejemplo, integrasa, elementos LTR, proteínas rep, proteínas oriP y EBNA-1) o componentes virales que interactúan con las proteínas de la superficie celular. Los componentes virales de liberación intracelular adecuados incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, virus del herpes simple, adenovirus y preferentemente virus adeno-asociados (VAA). En una modalidad, la molécula de ARNip se libera mediante un portador de ARNip específico de célula que combina componentes de un virus con liposomas. En otra modalidad, las moléculas de ácido nucleico de la invención también se pueden formular o complejar con polietilenimina y derivados de la misma, como derivados de polietilenimino-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o polietilenimino-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL). Las composiciones preferidas de la invención son soluciones acuosas, específicamente soluciones salinas tales como una solución salina tamponada con fosfato (PBS) con un intervalo de pH de aproximadamente 7.0 a aproximadamente 7.4, preferentemente con un pH de  $7.2 \pm 0.5$ .

Una molécula de ARNip de la invención se puede complejar con agentes de ruptura de membranas y/o un lípido catiónico o una

molécula lipídica auxiliar.

Los sistemas de liberación que se pueden usar en la invención incluyen, por ejemplo, geles acuosos y no acuosos, cremas, múltiples emulsiones, microemulsiones, liposomas, pomadas, soluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, bases hidrocarbonadas y polvos, y pueden contener excipientes tales como solubilizadores, agentes promotores de la permeación (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos y aminoácidos) y polímeros hidrófilos (por ejemplo, policarbófilo y polivinilpirrolidona). En una modalidad, el portador farmacéuticamente aceptable es un liposoma o un potenciador de la penetración transdérmica.

Una formulación farmacéutica de la invención se presenta en una forma adecuada para su administración, por ejemplo para su administración sistémica o local, a una célula o un sujeto, el cual incluye, por ejemplo, a un ser humano. Las formas adecuadas dependen, en parte, del uso o de la vía de entrada, por ejemplo oral, transdérmica o por inyección. En la técnica se conocen otros factores que incluyen consideraciones tales como la toxicidad y formas que impidan que la composición o formulación ejerza su efecto.

La presente invención también incluye composiciones preparadas para el almacenamiento o la administración y que incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz de los compuestos deseados en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son conocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, se pueden añadir conservadores, estabilizadores, colorantes y agentes aromatizantes. Estos incluyen benzoato sódico, ácido sórbico y  
5 ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. Además se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

Una dosis farmacéuticamente eficaz es la dosis necesaria para prevenir, inhibir la aparición de o tratar (aliviar hasta cierto punto un síntoma, preferentemente todos los  
10 síntomas) un estado patológico. La dosis farmacéuticamente eficaz depende generalmente del tipo de enfermedad, de la composición usada, de la vía de administración, del tipo de mamífero que se esté tratando, de las características físicas del mamífero específico en cuestión, de la medicación concomitante  
15 y de otros factores que reconocerán los expertos en materia médica.

Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad de un ARNip suficiente para retrasar o minimizar la aparición de un trastorno ocular asociado a  
20 neovascularización, preferentemente de la coroides o la retina. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente terapéutico que proporcione un beneficio terapéutico en el tratamiento o el manejo de un trastorno ocular asociado a neovascularización, preferentemente de la coroides o  
25 la retina. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con

respecto al ARNip de la invención se refiere a aquella cantidad del agente terapéutico, solo o en combinación con otras terapias, que proporcione un beneficio terapéutico en el tratamiento o el manejo de un trastorno ocular asociado a neovascularización, preferentemente de la coroides o la retina. En relación con una cantidad de un ARNip de la invención, el término puede abarcar una cantidad que mejore la terapia en general, reduzca o evite los efectos no deseados o potencie la eficacia terapéutica de o actúe sinérgicamente con otro agente terapéutico.

Un beneficio terapéutico del tratamiento o manejo de un trastorno ocular relacionado con la neovascularización es la disminución prolongada de la neovascularización. Dado que el ARNip reduce los niveles de NRARP en la célula, la célula debe volver a sintetizar nuevas proteínas una vez suspendido el tratamiento. Por lo tanto, las terapias basadas en tratamientos con ARNip tendrán un efecto más prolongado que el que cabría esperar al usar moléculas pequeñas diseñadas para inhibir la NRARP o bloquear la función de los receptores del VEGF u otra proteína asociada a la neovascularización. Esto se considera un aumento significativo de la eficacia terapéutica.

Un beneficio adicional resultante del uso de ARNip reside en la probabilidad mínima de efectos secundarios o toxicidad derivados de su presencia en la circulación sistémica y asociados con frecuencia a varios tratamientos basados en gotas oftálmicas. Esto se debe al hecho de que cuando el compuesto entra

en el torrente sanguíneo/ es degradado rápidamente por las RNasas presentes en la sangre.

Por otra parte, el hecho de que la molécula de ARNip se pueda comercializar en viales monodosis significa que se puede  
5 prescindir de la adición de conservadores antimicrobianos a la formulación. Estos conservadores pueden producir intolerancia en algunos pacientes, lo que requiere la suspensión del tratamiento.

Una de las vías de administración preferidas es la vía tópica por instilación directa en el ojo, preferentemente usando  
10 gotas oftálmicas. Teniendo en cuenta que la gran mayoría de los fármacos aprobados actualmente para el tratamiento de enfermedades retinianas son administrados por inyección intravítrea, también se espera que la calidad de vida de los pacientes mejore, puesto que las gotas oftálmicas causan una  
15 incomodidad menor y tienen menos efectos secundarios que las inyecciones intravítreas.

Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, también se pueden usar vías de administración que no impliquen la administración directa en el ojo. La dosis y la pauta de  
20 administración exactas que se han de emplear para la formulación también dependerán de la vía de administración. Un experto entenderá que la dosificación y la pauta de administración exactas que se han de emplear también dependen de la gravedad del trastorno y que las deberá decidir el profesional en función de  
25 las circunstancias de cada paciente. También se entiende que la

dosis específica para un sujeto concreto depende de diversos factores, incluidos la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración  
5 y la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se esté tratando.

Las formulaciones o el ARNip de la invención descritos en la presente memoria se pueden administrar en formulaciones de dosis unitarias que contengan portadores, adyuvantes y/o  
10 vehículos no tóxicos y farmacéuticamente aceptables convencionales. Las formulaciones se pueden presentar en una forma adecuada para la administración oral, por ejemplo en forma de comprimidos, trociscos, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas  
15 duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones previstas para la administración oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la preparación de composiciones farmacéuticas, y tales composiciones pueden contener uno o más agentes edulcorantes, aromatizantes,  
20 colorantes o conservadores con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables. Los comprimidos contienen el principio activo en mezcla con excipientes no tóxicos y farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de comprimidos.

25 Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes

inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, fosfato cálcico o fosfato sódico; agentes de granulación y desintegrantes, por ejemplo almidón de maíz o ácido algínico; aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o goma arábiga; y  
5 agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o se pueden recubrir mediante técnicas conocidas. En algunos casos, estos recubrimientos se pueden preparar mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el  
10 tracto gastrointestinal, proporcionando de este modo una acción mantenida durante un periodo de tiempo prolongado. Se puede usar, por ejemplo, un agente retardante como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las formulaciones para la administración oral también  
15 se pueden presentar en forma de cápsulas de gelatina dura, en las que el principio activo está mezclado con un diluyente sólido inerte, por ejemplo carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín, o en forma de cápsulas de gelatina blanda, en las que el principio activo está mezclado con agua o un medio oleoso, por ejemplo  
20 aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen los principios activos en mezcla con excipientes adecuados para la preparación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica,  
25 metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, alginato sódico,

polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido presente en la naturaleza, por ejemplo lecitina o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo poli (estearato de oxietileno), 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 poli (oxietilen-sorbitol), o productos de condensación de óxido de etileno con ásteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilensorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservadores, tal como p-hidroxibenzoato de etilo o de n-propilo, uno o más colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo los principios activos en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de ajonjolí o aceite de coco, o en un aceite mineral, tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un espesante, por ejemplo cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir edulcorantes y agentes aromatizantes para proporcionar preparaciones orales agradables al paladar. Estas

composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante, tal como el ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua  
5 proporcionan el principio activo en mezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservadores. Ejemplos de agentes dispersantes o humectantes o de agentes de suspensión adecuados son los que ya se han mencionado anteriormente. También pueden estar presentes  
10 excipientes adicionales, por ejemplo edulcorantes, agentes aromatizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden encontrarse en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede componerse de un aceite vegetal o de  
15 un aceite mineral o de mezclas de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas presentes en la naturaleza, por ejemplo goma arábiga o goma tragacanto, fosfátidos presentes en la naturaleza, por ejemplo lecitina de soja, y ásteres o ásteres parciales derivados de ácidos grasos  
20 y hexitol, anhídridos, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de tales ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietilen-sorbitán. Las emulsiones también pueden contener edulcorantes y agentes aromatizantes.

25 Los jarabes y elixires se pueden formular con

edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol, glucosa o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservador, un agente aromatizante y un colorante. Las composiciones farmacéuticas o el ARNip de la  
5 invención descritos en la presente memoria se pueden presentar en forma de suspensión acuosa u oleaginosas inyectables estériles.

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

Una preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico y parenteralmente aceptable, por ejemplo una solución en 1,3-butandiol. Entre los vehículos y disolventes  
15 aceptables que se pueden usar se encuentran el agua, la solución de Ringer y una solución isotónica de cloruro sódico. Convencionalmente también se usan aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Con este fin se puede usar cualquier aceite no volátil suave, incluidos mono- o diglicéridos  
20 sintéticos. Asimismo se pueden usar ácidos grasos, tales como ácido oleico, en la preparación de inyectables.

En modalidades preferidas, las composiciones de la invención se formulan en una solución, preferentemente en una solución salina tamponada tal como PBS, o en un gel para su  
25 administración tópica en el ojo, tal como, por ejemplo, en forma

de gotas oftálmicas. En estas modalidades, las formulaciones pueden ser emulsiones catiónicas y/o contener biopolímeros que incluyen, pero no se limitan a, poli (lactida-co-glicolido), carbopol, ácido hialurónico y ácido poliacrílico.

5 Las moléculas de ácido nucleico de la invención también se pueden administrar en forma de supositorios, por ejemplo para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperaturas ambientales pero  
10 líquido a la temperatura rectal y que, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao y polietilenglicoles.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden administrar por vía parenteral en un medio estéril.  
15 Dependiendo del vehículo y la concentración usados, el fármaco se puede suspender o disolver en el vehículo. Ventajosamente se pueden disolver en el vehículo adyuvantes tales como anestésicos locales, conservadores y agentes tampón.

Como tal, otra modalidad preferida de la presente  
20 invención se refiere a una composición farmacéutica en donde tal composición comprende al menos un ARNip dirigido a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 9, como se ha descrito en los párrafos anteriores. Más preferentemente, tal secuencia es la SEQ ID NO. 1.

25 Las moléculas de ácido nucleico de la presente

invención también se pueden administrar 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.

A continuación se incluyen definiciones para facilitar la comprensión de la invención.

Por "tratar", los solicitantes quieren decir ocuparse médicamente. El término incluye administrar el compuesto de la invención para aliviar los síntomas de una enfermedad retiniana, tales como la disminución de la agudeza visual que acompaña a la degeneración macular, así como para abordar los cambios fisiológicos asociados a la enfermedad, tales como el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos que acompaña a esa afección.

La expresión "enfermedad retiniana" significa cualquier enfermedad en la que la retina resulte afectada debido a etiologías múltiples y variadas.

El término "vascularización" se refiere al proceso de formación de redes microvasculares funcionales con perfusión de glóbulos rojos.

El término "angiogénesis" se refiere a la prominencia y proliferación de yemas y brotes de capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes.

El término "neovascularización retiniana (RNV)" se refiere al brote de nuevos vasos en la retina.

El término "neovascularización coroidea (CNV)" se refiere al brote de nuevos vasos a partir de la vasculatura coroidea.

El término "enfermedad o trastorno relacionado con la  
5 neovascularización" se refiere a cualquier enfermedad o  
trastorno que genere los nuevos vasos patológicos mencionados  
anteriormente. Para tal enfermedad o trastorno, pueden  
mencionarse degeneración macular asociada a la edad (AMD),  
retinopatía isquémica, edema macular diabético (DME),  
10 retinopatía diabética proliferativa (PDR), isquemia retiniana  
diabética (DRI), edema retiniano diabético (DRE),  
neovascularización miópica, oclusión venosa central de la retina  
(OVCR) y retinopatía de prematuridad (ROP), entre otras, pero no  
se limitan a estas. Otras enfermedades o trastornos oculares  
15 relacionados con la neovascularización incluyen, por ejemplo,  
neovascularización del iris (Rubeosis iridis) y  
neovascularización corneal (NC). La neovascularización del iris  
a menudo está asociada a diabetes, retinoblastoma, oclusión  
venosa central de la retina, síndrome isquémico ocular o  
20 desprendimiento crónico de retina. La neovascularización corneal  
a menudo está causada por el uso de lentes de contacto, aunque  
también está asociada a la inflamación como resultado de  
traumatismo o lesión, y de blefaritis, uveitis, o queratitis,  
úlceras corneales, glaucoma y otras enfermedades de la superficie  
25 ocular como rosácea o lupus. La degeneración macular, también

denominada degeneración macular asociada a la edad (AMD), es la causa más común de pérdida de visión en los Estados Unidos en personas de 50 o más años, y su prevalencia aumenta con la edad. La causa subyacente para la AMD parece ser la acumulación de material residual producido por los procesos de renovación de la parte externa de los fotorreceptores de la retina en el epitelio pigmentario retiniano (RPE). La acumulación de este material no degradado, conocido como drusas en el RPE, causa la producción de mediadores inflamatorios que causan la degeneración de los fotorreceptores en la retina central, o mácula (Bird AC, 2010). El centro de la mácula, llamado fovea, media en la visión de alta agudeza; por lo tanto su degeneración causa una pérdida de visión grave. En las fases tempranas de la enfermedad, las acumulaciones de drusas son pequeñas y a menudo se observan junto con hipo- o hiperpigmentación del RPE. A medida que avanza la enfermedad, tanto el tamaño como la cantidad de drusas aumentan. La AMD se clasifica como húmeda (neovascular) o seca (no neovascular). La forma seca de la enfermedad es la más común. Se produce cuando la retina central se ha deformado, pigmentado, o de la forma más habitual, adelgazado, un proceso asociado a la atrofia del epitelio pigmentario retiniano y la pérdida de fotorreceptores maculares. El resultado es atrofia geográfica central. La forma húmeda de la enfermedad es más grave que la forma seca y causa pérdida de visión grave. La forma húmeda está asociada habitualmente al envejecimiento, pero otras enfermedades que

pueden causar degeneración macular húmeda incluyen miopía grave y algunas infecciones infraoculares tales como histoplasmosis, que pueden resultar exacerbadas en individuos con sida. La forma húmeda se caracteriza por vasos sanguíneos anormales que crecen  
5 a través del epitelio pigmentario retiniano, dando como resultado hemorragia, exudación, aparición de cicatrices o desprendimiento de retina.

La retinopatía isquémica es un componente común de la patogenia tanto de la CNV como de la RNV. La isquemia causa hipoxia  
10 celular que activa vías de señalización celular para regular positivamente la expresión de estimuladores angiogénicos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El VEGF es una glucoproteína secretada con potente actividad pro-angiogénica. El VEGF se une a los receptores del VEGF (VEGFR)  
15 en las células endoteliales para estimular la proliferación y la migración celulares. Numerosos estudios han demostrado que el VEGF está regulado positivamente durante la patogenia de la CNV y la RNV, y que el VEGF es un mediador clave de la patogenia de la CNV y la RNV.

20 La retinopatía diabética (RD) sigue siendo la principal causa de ceguera entre individuos en edad laboral en países desarrollados. Aunque la retinopatía diabética proliferativa (PDR) es la lesión potencialmente dañina para la vista más común en diabetes tipo 1, el edema macular diabético (DME) es la  
25 principal causa de mala agudeza visual en diabetes tipo 2. Debido

a la elevada prevalencia de la diabetes tipo 2, el DME es la causa principal de alteración visual en pacientes diabéticos. En un estudio basado en una gran población, / la incidencia del DME durante un periodo de 10 años era del 20% en pacientes con diabetes

5 tipo 1 mientras que esta tasa era casi del 40% en pacientes con diabetes tipo 2. Además, el DME está presente de forma casi invariable cuando se detecta PDR en pacientes diabéticos de tipo 2. La neovascularización debida a hipoxia grave es el sello de la PDR mientras que la permeabilidad vascular debida a la rotura

10 de la BRB es el principal acontecimiento implicado en la patogenia del DME.

La retinopatía de prematuridad (PDR) se produce en lactantes prematuros que son expuestos a hiperoxia relativa antes de que la fase angiogénica del desarrollo de la retina esté

15 completa. Esto resulta problemático, dado que la fase angiogénica del desarrollo de la retina normalmente está dirigida por hipoxia en el útero. Por lo tanto, el desarrollo angiogénico normal de la retina está alterado en la PDR, causando obliteración vascular y la formación de una retina en gran medida avascular. En ausencia

20 de un suministro sanguíneo adecuado, la retina avascular es isquémica, lo que promueve la RNV destructiva, y puede provocar desprendimiento de retina y la formación de tejido cicatricial, dando como resultado pérdida de visión permanente.

El término "paciente" como se usa en la presente memoria

25 se refiere a animales, incluidos mamíferos, preferentemente

seres humanos.

La invención se describe con más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes

5

## **EJEMPLOS**

### **1. Análisis *In vitro***

**1.1 Niveles de expresión génica de NRARP después de la transfección de la SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 y SEQ ID NO. 13.**

Se transfectaron células HeLa humanas con 100 nM de un ARNcd de extremos romos de 19 pb que se compone de una cadena sentido que se compone de una de las siguientes secuencias SEQ ID NO. 10 (SYL136001), SEQ ID NO. 11 (SYL136005), SEQ ID NO. 12 (SYL136003) y SEQ ID NO. 13 (SYL136004), junto con la cadena antisentido complementaria, con Lipofectamine 2000 como agente de transfección. La referencia a SYL después de cada SEQ ID NO. se refiere a una referencia para el compuesto de ARNcd. Nótese que en todos estos ejemplos (a menos que el contexto deje claro lo contrario), donde se menciona administración o transfección de una SEQ ID NO. particular, esto indica que se administró o se transfectó ARNcd de 19 pb que se compone de una cadena sentido que se compone de la SEQ ID NO., y la cadena antisentido complementaria como se indica en las figuras 2 y 3. Todas las transfecciones se realizaron según las instrucciones

convencionales del fabricante. En el mismo experimento se usó una secuencia de ARNip con las mismas bases ordenadas al azar como control de la especificidad de la interferencia. Se recogieron sedimentos celulares y se procesaron para evaluar posibles variaciones en los niveles de ARNm como consecuencia del mecanismo de acción del ARNip. Los niveles de ARN se cuantificaron mediante PCR en tiempo real usando un método de cuantificación relativa, el método comparativo del ciclo umbral  $2^{-\Delta\Delta CT}$  {Livak y Schmittgen, 2001}. Todos los experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron por triplicado y se repitieron en tres experimentos independientes. La media y la EEM se calcularon y se representan en las figuras. Como muestra la Figura 4, los niveles de ARNm de NRARP disminuyeron significativamente (50-60%) en células HeLa humanas en respuesta a la transfección de la SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 y SEQ ID NO. 13 en los tres puntos de tiempo estudiados. Como se esperaba, la secuencia de ARNip con las mismas bases ordenadas al azar no modulaba los niveles de expresión de la NRARP en cualquiera de los puntos de tiempo estudiados.

20

## **1.2 Viabilidad celular de líneas celulares humanas tras la transfección con ARNip de la presente invención.**

Para analizar la viabilidad celular tras la transfección de los ARNip de la presente invención, se estudió la toxicidad *in vitro* tras la transfección de 100 nM de una de

25

las siguientes secuencias: SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 y SEQ ID NO. 13, con Lipofectamine 2000 como agente de transfección en células HeLa humanas. Todas las transfecciones se realizaron según las instrucciones convencionales del fabricante. En el mismo experimento se usó una secuencia de ARNip con las mismas bases ordenadas al azar como control de la especificidad de la interferencia. Se recogieron sedimentos celulares 24, 48 y 72 horas después de la transfección que se procesaron para evaluar posibles variaciones de la viabilidad celular. La viabilidad celular se midió usando el ensayo de proliferación celular no radiactivo acuoso CellTiter 96® de Promega. Este método está basado en la capacidad de las células vivas para reducir el compuesto de MTS de tetrazolio a formazán. La cantidad de formazán se cuantifica midiendo la absorbancia a 490 nm. La media y la EEM se calcularon y se representan gráficamente en la figura 5. La figura 5 muestra que no se produjeron cambios en la viabilidad celular en respuesta a la transfección de cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 y SEQ ID NO. 13. En resumen, se descubrió que los ARNip de la presente invención eran no tóxicos y son bien tolerados.

**1.3 Niveles de expresión, de la NRARP tras la transfección de ARNip modificado químicamente y no modificado de la presente invención en diferentes líneas celulares.**

Con el fin de mejorar la estabilidad del ARNip de la presente invención y garantizar que no hay activación inmunogénica, se introdujeron diferentes modificaciones químicas optimizadas para el ARNip en la secuencia canónica SEQ ID NO. 10 (SYL136001); de este modo se obtuvieron las siguientes nuevas entidades químicamente modificadas: SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37 y SEQ ID NO. 39. Las nuevas secuencias químicamente modificadas se transfectaron individualmente en células humanas, murinas y de rata para analizar su capacidad para reducir los niveles de ARNm de NRARP. En la figura 3 se detallan las modificaciones químicas. Se seleccionaron células HeLa humanas, BEAS-2B humanas y C2C12 murinas debido a que estas células expresan niveles significativos de NRARP y se considera que son buenos modelos para estudiar el efecto del ARNip sobre la expresión de la NRARP. Las células se transfectaron individualmente con 100 nM de una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37 y SEQ ID NO. 39, con Lipofectamine (células HeLa), Mirus Transit-X2 (BEAS-2B), Dharmarfect 3 (C2C12) y siPORT NeoFX (ARL6) como agentes de transfección. La expresión génica se analizó en tres puntos de tiempo (24, 48 y 72 horas) después de la transfección. Todas las transfecciones se realizaron según las instrucciones convencionales del fabricante. En el mismo experimento se usó una

secuencia de ARNip con las mismas bases ordenadas al azar como control de la especificidad de la interferencia. Los niveles de ARN se cuantificaron mediante PCR en tiempo real usando un método de cuantificación relativa, el método comparativo del ciclo umbral  $2^{-\Delta\Delta CT}$  {Livak y Schmittgen, 2001}. Todos los experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron por triplicado y se repitieron en tres experimentos independientes. La media y la EEM se calcularon y se representan gráficamente en los gráficos mostrados en las figuras 6~9. La figura 6 muestra los resultados obtenidos en células HeLa. En esta línea celular SEQ ID NO. 10 (SYL136001) redujo los niveles de ARNm de NRARP un 60% 24 horas después de la transfección y un 50% 48 y 72 horas después de la transfección. La secuencia químicamente modificada SEQ ID NO. 19 redujo los niveles de ARNm de NRARP un 60% 24 horas después de la transfección y un 40% 48 horas después de la transfección; 72 horas después de la transfección los niveles basales estaban completamente recuperados. La SEQ ID NO. 23 redujo los niveles de ARNm de NRARP un 40% 24-48 horas después de la transfección y un 10% 72 horas después de la transfección. La SEQ ID NO. 25 redujo los niveles de ARNm de NRARP un 50-60% 24-48 horas después de la transfección y un 20% 72 horas después de la transfección. La SEQ ID NO. 27 redujo los niveles de ARNm de NRARP un 30% 24-48 horas después de la transfección y los niveles basales se recuperaron 72 horas después de la transfección. La SEQ ID NO. 29 redujo muy eficazmente los niveles de ARNm de NRARP. Se observó

una reducción de aproximadamente el 80% 24-48 horas después de la transfección en respuesta a esta secuencia; seguidamente los niveles de ARNm aumentaron pero seguían estando un 40% por debajo de los niveles basales 72 h después de la transfección. La SEQ ID NO. 31 redujo eficazmente los niveles de NRARP, se observó una reducción del 60% frente a los niveles basales en los tres puntos de tiempo estudiados. La SEQ ID NO. 35 redujo los niveles de ARNm de NRARP un 60% 24-48 horas después de la transfección; se descubrió una brusca recuperación de los niveles de ARNm 72 horas después de la transfección, por lo tanto los niveles de ARNm de NRARP estaban un 10% por debajo de los niveles basales. La SEQ ID NO. 37 era el compuesto que causaba la mayor reducción de los niveles de ARNm de NRARP. Se observaron reducciones del 90%, 80% y 70 % 24, 48 y 72 horas después de la transfección de este compuesto. La SEQ ID NO. 39 redujo los niveles de ARNm de NRARP un 70% 24 horas después de la transfección y un 50% 48 horas después de la transfección; seguidamente los niveles de ARNm se incrementaban bruscamente pero los niveles basales no se habían recuperado completamente 72 horas después de la transfección. La figura 7 muestra los resultados obtenidos en células BEAS-2B humanas. En esta línea celular, SEQ ID NO. 10 (SYL136001) y SEQ ID NO. 19 redujeron los niveles de NRARP un 70% 24 horas después de la transfección, seguidamente los niveles de ARNm aumentaban lentamente pero los niveles basales no se habían recuperado completamente en el marco temporal del estudio con niveles de ARNm

de NRARP aún un 50% por debajo de los niveles basales 48 horas después de la transfección y un 40%-50% 72 horas después de la transfección. La SEQ ID NO. 23 y SEQ ID NO. 27 redujeron ligeramente los niveles de ARNm de NRARP en células BEAS-2B humanas, las reducciones fueron de aproximadamente un 20-30% en los tres puntos de tiempo estudiados; los niveles basales no se habían recuperado completamente 72 horas después de la transfección. La SEQ ID NO. 25 y SEQ ID NO. 39 redujeron gradualmente y de forma dependiente del tiempo los niveles de ARNm de NRARP alcanzando una reducción máxima del 50%-60% 72 horas después de la transfección. La SEQ ID NO. 31 y SEQ ID NO. 35 redujeron eficazmente los niveles de ARNm de NRARP; los niveles de ARNm estaban aproximadamente un 60-70% por debajo de los niveles basales en respuesta a cualquiera de los compuestos en los tres puntos de tiempo estudiados. La SEQ ID NO. 29 y SEQ ID NO. 37 fueron los productos más eficaces para reducir los niveles de ARNm de NRARP en esta línea celular, causando una reducción brusca y prolongada de aproximadamente un 80% y un 90% respectivamente en los tres puntos de tiempo estudiados. Como se esperaba, la secuencia de ARNip con las mismas bases ordenadas al azar no reducía los niveles de expresión de la NRARP en cualquiera de los puntos de tiempo estudiados. La figura 8 muestra los resultados obtenidos en células C2C12 murinas. La SEQ ID NO. 10 (SYL136001) redujo los niveles de NRARP un 60% 24 horas después de la transfección, seguidamente los niveles de ARNm aumentaron

lentamente pero los niveles basales no se habían recuperado completamente 72 horas después de la transfección; momento en el que los niveles de ARNm de NRARP seguían estando un 40% por debajo de los niveles basales. La SEQ ID NO. 19 redujo los niveles de ARNm de NRARP aproximadamente un 30% 24 horas después de la transfección, se descubrió una reducción drástica del 80% 48 horas después de la transfección, seguidamente los niveles aumentaron pero 72 horas después de la transfección, los niveles de ARNm de NRARP seguían estando un 40% por debajo de los niveles basales.

La SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25 y SEQ ID NO. 27 redujeron ligeramente los niveles de ARNm de NRARP, la reducción observada en respuesta a la transfección de cada una de estas secuencias era aproximadamente un 20-40% en los tres puntos de tiempo estudiados. La SEQ ID NO. 29 y SEQ ID NO. 39 redujeron eficazmente los niveles de ARNm de NRARP 24 y 48 horas después de la transfección, los niveles en estos puntos de tiempo estaban un 50% y 60% por debajo de los niveles basales respectivamente. La respuesta a ambas secuencias 72 horas después de la transfección fue un aumento con respecto a puntos de tiempo anteriores aunque los niveles basales aún no se habían recuperado en este punto de tiempo. La SEQ ID NO. 31 redujo los niveles de ARNm de NRARP aproximadamente un 40% 24 horas después de la transfección, se descubrió una gran reducción del 70% 48 horas después de la transfección, seguidamente los niveles aumentaron pero 72 horas después de la transfección, los niveles de ARNm de NRARP seguían estando un 40%

por debajo de los niveles basales. La SEQ ID NO. 35 y SEQ ID NO. 37 fueron los compuestos que causaron la mayor reducción de los niveles de ARNm de NRARP en esta línea celular, con SEQ ID NO. 35 y SEQ ID NO. 37 reduciendo los niveles de ARNm de NRARP un 60% 24 horas después de la transfección y aproximadamente un 80% 48 horas después de la transfección. Una recuperación parcial de los niveles basales se producía 72 horas después de la transfección. De nuevo, como se esperaba, la secuencia de ARNip con las mismas bases ordenadas al azar no reducía los niveles de ARNm de NRARP en cualquiera de los puntos de tiempo estudiados en células C2C12. La figura 9 muestra los resultados obtenidos en células ARL6 de rata. La SEQ ID NO. 10 (SYL136001) redujo los niveles de ARNm de NRARP un 50% 24-48 horas después de la transfección y un 60% 72 horas después de la transfección. La SEQ ID NO. 37 redujo los niveles de NRARP un 50% 24 horas después de la transfección, un 60% 48 horas después de la transfección y un 70% 72 horas después de la transfección.

#### **1.4 Viabilidad celular de líneas celulares humanas tras la transfección con ARNip no modificados y ARNip modificados químicamente de la presente invención en diferentes líneas celulares.**

Con el fin de analizar la viabilidad celular tras la transfección de los ARNip de la presente invención, se realizaron estudios de toxicidad *in vitro* tras la transfección de 100 nM de

una de las siguientes secuencias. La SEQ ID NO. 10 (SYL13600), SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37 y SEQ ID NO. 39 en células HeLa y BEAS-2B humanas y en células C2C12 murinas con Lipofectamine 2000, Mirus Transit-X2, Dharmafect 3 como agentes de transfección, respectivamente. Todas las transfecciones se realizaron según las instrucciones convencionales del fabricante. En los mismos experimentos se usó una secuencia de ARNip con las mismas bases ordenadas al azar como control de la especificidad de la interferencia. Se recogieron sedimentos celulares 24, 48 y 72 horas después de la transfección y se procesaron para evaluar posibles variaciones en los niveles de viabilidad celular como consecuencia de la transfección de ARNip. La viabilidad celular se midió usando el ensayo de proliferación celular no radiactivo acuoso CellTiter 96® de Promega. Este método se basa en la capacidad de las células vivas para reducir el compuesto de MTS de tetrazolio a formazán, que se mide por absorbancia a 490 nm. La media y la EEM se calcularon para cada experimento y se representan gráficamente en las figuras 10-12. Las figuras 10, 11 y 12 muestran que no se produjeron cambios en la viabilidad celular en respuesta a la transfección de cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO. 10 (SYL13600), SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 31, SEQ ID NO. 35, SEQ ID NO. 37 y SEQ ID NO. 39 en cualquiera de las líneas celulares usadas.

Además, los niveles de viabilidad celular se evaluaron también en células ARL6 de rata en respuesta a la transfección a una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO. 10 (SYL136001) y SEQ ID NO. 37 usando siPORT NeoFX como agente de transfección. La figura 13 muestra que no se produjeron cambios significativos en la viabilidad celular en células ARL6 en respuesta a cualquiera de las secuencias sometidas a ensayo. Se puede llegar a la conclusión, por lo tanto, de que todos los ARNip de la presente invención son no tóxicos y bien tolerados.

10

### **1.5 Eficacia de los ARNip de la presente invención en la angiogénesis en un modelo in vitro de células HUVEC.**

Con la finalidad de estudiar el efecto de los ARNip de la presente invención en la angiogénesis, se realizaron experimentos con células HUVEC y un análisis de la expresión de la NRARP en estas células.

En particular, el objetivo de este conjunto de estudios fue estudiar el efecto antiangiogénico del ARNip modificado para NRARP, SEQ ID NO. 37 (un ARN de doble cadena de extremos romos de 19 pb modificado genéticamente que tiene una hebra sentido que consiste de la secuencia SEQ ID NO. 37 y una hebra antisentido que consiste de la secuencia SEQ ID NO. 38) en un modelo in vitro de células HUVEC.

25

#### **1.5.1 Introducción.**

La angiogénesis es la formación de nuevas venas a partir de las preexistentes. Este proceso, esencial durante el desarrollo y muchos otros procesos fisiológicos, se puede desregularizar en el ojo lo que lleva a diferentes tipos de enfermedades de la retina, tales como la degeneración macular asociada a la edad (AMD) y la retinopatía diabética (DR). Las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) son células primarias que se han preservado después de 1-3 pasos desde el material de origen inicial. Estas células se pueden introducir para formar estructuras tubulares en respuesta a los agentes angiogénéticos, tales como el VEGF.

### **1.5.2 Materiales.**

Transcriptasa inversa multiscríbe 50U/ml (Applied Biosystems N/P 4311235).

Inhibidor de RNasa 20U/μl (Applied Biosystems N/P N8080119).

TaqMan 2X Universal Master Mix.

Qiagen® RNeasy® Microkit 74004.

Sonda de Nrarp humano: Taqman GHene Expression Assay Hs01104102\_s1.

Control Endógeno de GAPDH: Taqman Gene Expression Assay Hs00266705\_g1.

Sonda de Nrarp de ratas: Taqman Gene Expression Assay Rn 03810258\_s1

Control Endógeno de 18S: Taqman Gene Expression Assay

Hs99999901\_s1.

### 1.5.3 Métodos.

#### i) Células

5 Las células HUVEC (Ref: CC-2519 / Número de lote: 000191772) se obtuvieron desde Lonza. Todos los experimentos se realizaron con el mismo lote de las células en los pasos 6-9 y con cultivos a una densidad celular de 75-85%. Se realizaron transfecciones utilizando siPORT NeoFX™ después de un  
10 procedimiento estándar. Se siguió con el procedimiento publicado en "Hernandez JL et al. 2004 Anguigenesis. 7:235-241", para la electroporación, en breve, se realizó electroporación a  $1 \times 10^6$  células al aplicar un pulso de 20 ms a 1200  $\mu$ F utilizando el cell manipulator® 600 (BTX). Cada electroporación se realizó  
15 utilizando 2  $\mu$ g de material genético.

Para los estudios de eficacia, se realizó transfección a las células utilizando el protocolo de electroporación y se dejó que se repusieran por un periodo de 24 h; después de eso, las células se cultivaron en placas de 96 pozos a una densidad de  
20 30.000 células/pozo y los parámetros mencionados en lo anterior se analizaron 6 h después del cultivo en placa. Después del análisis de estructura, se transfirieron las células, medios y matrigel a un tubo sin RNasa y se añadieron 600 $\mu$ L de amortiguador RLIT + mercaptoetanol  $\beta$ .

25 ii) Análisis de la expresión de genes diana

(1) Aislamiento del ARN y transcripción inversa

Se aisló el ARN total a partir de cultivos celulares, utilizando el kit de extracción de ARN RNeasy (Invitrogen, CA, USA). Se transcribieron de manera inversa 4 µg del ARN total utilizando  
 5 el kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

(2) PCR cuantitativa

Se realizó PCR cuantitativa utilizando el sistema de  
 10 detección Stepone plus (Applied Biosystems). Se amplificaron 50 nanogramos de cada muestra en un TaqMan 2X Universal Master Mix bajo las siguientes condiciones: 95 °C por 10 min., seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 s, y 60 °C por 1 min.

15 **1.5.4 Resultados.**

Dado el desenlace exitoso de la electroporación para introducir el ARNip en las células HUVEC, se utilizó este método para estudios subsiguientes en los que se evaluó el papel del ARNip modificado para NRARP SEQ ID NO. 37 en la formación de estructuras  
 20 capilares en matrigel, migración, cicatrización de herida y ensayos de proliferación.

i) Formación de estructuras capilares.

(1) Preparación del ensayo

Se cultivaron 15.000 células/pozo, privadas durante un periodo  
 25 de 4h, en una placa de 96 pozos cubierta con matrigel. Se utilizó

el medio basal de células endoteliales (EBM) sin suplementos, como un control negativo (ninguna formación de estructuras) mientras que se utilizó el medio completo con suplementos (EGF humano, hidrocortisona, extracto de cerebro bovino, gentamicina, heparina) y el 10% de FCS como un control positivo que induce un número máximo de estructuras tubulares. Se realizaron ensayos por triplicado en 3-6 experimentos independientes. Se analizaron los cultivos 24 h después del cultivo en placas.

Además, se ha preparado un nuevo método para analizar las estructuras. Este método se basa en la cuantificación de 5 variables, utilizando el software Angiogenesis Analyzer desarrollado por Gilles Carpentier para NIH ImageJ. Este software brinda una vista global sobre el proceso angiogénico. Las variables estudiadas se muestran en la figura 17.

La figura 18 muestra el cambio en las variables estudiadas en respuesta al medio completo (suplementos +10% de FCS). Como se muestra en la figura, el medio completo incrementa significativamente el número de estructuras formadas sin alterar el área total de las estructuras.

## (2) Eficacia del ARNip SEQ ID NO. 37.

Se realizó transfección a las células mediante electroporación y se permitió que se repusieran en el medio completo durante un periodo de 24 h y se privaron del suero por dos horas adicionales; después de eso, se cultivó a las células en placas a una densidad celular de 30.000 células/pozo en una placa de 96 pozos cubierta

con matrigel para permitir la formación de estructuras. Las estructuras formadas se analizaron 6h y 24h después de la siembra. Se ensayaron las siguientes condiciones para probar la eficiencia de SEQ ID NO. 37:

- 5       - Células sin transfección
- Células con electroporación simulada
- Células con transfección con 1 $\mu$ M de ARNip anti KDR (Life Technologies, Ref: 145034)
- Células con transfección con 1 $\mu$ M de ARNip SEQ ID NO: 37.

10   Se ensayaron todas las condiciones en un medio sin suplementos y con medio con 10% de FCS y VEGF de 100ng/ml.

Se realizó un primer ensayo con células que se habían privado en suero sin medio por 2 h antes de sembrar las células en el matrigel. Este procedimiento desestabilizó ligeramente las estructuras y,  
 15   por lo tanto, se repitió sin la etapa de privación. Los resultados del último estudio se muestran en las Figuras 19 y 20.

En resumen, la electroporación afecta severamente la función de las células; por lo tanto, se hicieron comparaciones entre la condición de electroporación simulada y las condiciones  
 20   experimentales. En ausencia de suplementos, tanto el ARNip-KDR como el ARNip-NRARP SEQ ID NO. 37 redujeron la formación de estructuras angiogénicas; el efecto de ARNip-KDR fue mayor que el de ARNip SEQ ID NO. 37. El efecto inhibidor de ambos ARNip en la formación de estructuras angiogénicas fue más claro en la  
 25   presencia del medio completo con suplementos en el punto de tiempo

de 6h; esto puede ser debido al hecho de que el privar a las células de suero y suplementos puede reducir la viabilidad de las células. El análisis realizado 24 h después de sembrar las células en el matrigel no fue concluyente debido a que las estructuras ya habían  
5 empezado a desensamblarse.

ii) Efecto en la proliferación

(1) Preparación del ensayo.

Las células privadas por 24h se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 3000 células/pozo y se cultivaron bajo  
10 las diferentes condiciones. Cinco días después se evaluó la proliferación por medio del ensayo de MTT. Las condiciones utilizadas se siguieron como sigue: 2% de FCS y diferentes concentraciones de VEGF (20-30-50 ng/ml). 2% de FCS se requieren para que las células se mantengan en una tasa de proliferación  
15 basal y evitar que el cultivo entre en la detención de las células. La figura 21A muestra una inducción triple en la proliferación de las células en respuesta al VEGF, independientemente de la concentración probada. Con la finalidad de analizar el efecto inhibidor de un agente anti VEGF, se cultivó a las células en  
20 presencia de 30 ng/ml de VEGF y concentraciones decrecientes (diluciones 1:2 que comienzan a 12 Nm) de Bevacizumab (Avastin) con la finalidad de determinar la CI50. Como se muestra en la figura 21B, se encontraron que la CI50 de bavacizumab era de 0.85 nM.

25 (2) Eficacia de ARNip SEQ ID NO. 37.

Se realizó la electroporación a las células y se sembraron a una densidad de 5000 células/pozo en una placa de 96 pozos recubierta con 1% de gelatina; después de eso, se permitió que se repusieran las células por un periodo de 24 h. Después de la reposición, las células se cultivaron en un medio basal con suplementos de 10% FCS y VEGF de 100 ng/ml. Tres días después de sembrar las células, se analizó la proliferación mediante MTT. Las condiciones probadas fueron como sigue:

- Células sin transfección
- Células con electroporación simulada
- Células con transfección con 1µM de ARNip anti KDR (Life Technologies, Ref: 145034)
- Células con transfección con 1µM de ARNip SEQ ID NO. 37.

Los resultados, mostrados en la figura 22, indican que tanto el ARNip anti KDR como el ARNip SEQ ID No. 37 reducen la tasa de la proliferación inducida por el VEGF en aproximadamente 40%, en comparación con las células con electroporación simulada.

iii) Efecto en la migración.

(1) Preparación del ensayo.

Estos estudios se realizaron en placas del sistema transwell de 24 pozos con filtros opacos de membrana de 8 µm (Transwell HTS FluroBlok™ Multiwell Insert System de Becton Dickinson). Ambas superficies de la membrana se cubrieron con colágeno de tipo I a una concentración de 15 µg/ml durante 2h a

37°C para facilitar la absorción celular. Las células se sembraron a una densidad de 50.000 células/pozo y se privaron de suero durante un periodo de 4h y, después de eso, se añadió el estímulo de migración. 24h después de añadir el estímulo en la parte interior del transwell, se analizó el número de células que habían migrado al compartimento superior después de la tinción con Celceína AM.

El número de células migratorias en el medio completo (10% de FCS y suplementos) se utilizó como un control positivo de la migración de las células y esta respuesta se comparó con la que se produjo al incrementar la concentración del VEGF (1-100 ng/ml).

Como se muestra en la figura 23, el VEGF induce un incremento, dependiente de la dosis, en el número de células que migran al compartimento superior. El incremento máximo en respuesta al VEGF se observó en respuesta a la concentración más grande del VEGF (100 ng/ml) y la magnitud de la respuesta estaba alrededor de 5-6 veces sobre condiciones basales.

(2) Eficacia del ARNip SEQ ID NO. 37.

Se realizó la electroporación a las células y se permitió que se repusieran durante un periodo de 24h; después de eso, se colocaron en placas las células a una densidad de 10.000 células/pozo en placas transwell de 96 pozos con filtros opacos de membrana de 8 µm recubiertos con 15µg/ml de colágeno. Todas las condiciones probadas se ensayaron en la presencia de medio

basal y medio completo (con suplemento con 10% de FCS y un VEGF de 100 ng/ml). Las condiciones probadas fueron como sigue y la migración se analizó 24 h después de cultivar en placas y teñir las células con calceína AM:

- 5       - Células sin transfección
- Células con electroporación simulada
- Células con transfección con 1µM de ARNip anti KDR (Life Technologies, Ref: 145034)
- Células con transfección con 1µM de ARNip SEQ ID NO. 37.

10               Los resultados obtenidos indican que la electroporación tiene un efecto nocivo en la capacidad de migración de las células; por lo tanto, las células tratadas se compararon con la condición de electroporación simulada con la finalidad de descartar el efecto de electroporación. Las células

15   en el medio basal no migraron, pero la presencia de 10% de FCS y el VEGF de 100 ng/ml provocó que las células migraran al pozo opuesto en el sistema transwell. El efecto del 10% de FCS y el VEGF de 100 ng/ml se bloqueó parcialmente (30%) por la electroporación ya sea del ARNip SEQ ID NO. 37 o del ARNip anti

20   KDR (Figuras 24 y 25).

iv) Estudios de cicatrización de herida.

(1) Preparación del ensayo.

Las células se sembraron a una densidad de 50.000 células/pozo en placas de 96 pozos recubiertas con 1% de gelatina

25   y se cultivaron en un medio basal por 24h. Después de eso, se

realizó una lesión al raspar un área estrecha del cultivo y se  
añadió al cultivo un VEGF de 10ng/ml. Inmediatamente después, y  
24 h después de realizar la lesión, se midieron las áreas y se  
compararon por medio del software NIH ImageJ. Se cuantificó el  
5 porcentaje del área cicatrizada como sigue:

$$\text{Cicatrización de herida (\%)} = \frac{\text{Área Final}}{\text{Área Inicial}} \times 100$$

Como se muestra en la figura 26, el VEGF de 10 ng/ml  
indujo un incremento de 2.5 veces en la tasa de la cicatrización  
10 de herida en comparación con la condición no tratada.

(2) Eficacia del ARNip SEQ ID NO. 37.

Se realizó electroporación a las células y se permitió  
que se repusieran durante un periodo de 24 h, después de eso, se  
cultivaron las células a una densidad de 70.000 células/pozo en  
15 placas de 96 pozos con 1% de gelatina. 24h después del cultivo  
en placas, se indujeron lesiones al raspar un área estrecha de  
las células y se analizaron los cultivos 16 h después de la  
inducción de lesiones. El análisis se realizó al teñir las células  
con 10 µM de calceína AM y al analizar las áreas raspadas y el  
20 porcentaje del área que se cubrió con células de nuevo. Todas las  
condiciones probadas se ensayaron en la presencia de un medio  
basal y un medio completo (con suplemento con 10% de FCS y un VEGF  
de 100 ng/ml). Las condiciones se probaron como sigue y se analizó  
la migración 24 h después del cultivo en placas:

25 - Células sin transfección

- Células con electroporación simulada
- Células con transfección con 1 $\mu$ M de ARNip anti KDR (Life Technologies, Ref: 145034)
- Células con transfección con 1 $\mu$ M de ARNip SEQ ID NO.

5 37.

Como en experimentos anteriores, los resultados muestran un efecto nocivo de la electroporación en la cicatrización de herida, por esa razón todas las condiciones se compararon con las células con electroporación simulada. Como se muestra en las figuras 27 y 28, el ARNip SEQ ID NO. 37 redujo de manera muy efectiva la tasa de cicatrización de herida en el medio basal. El efecto del ARNip SEQ ID NO. 37 incluso fue mayor que el del ARNip anti KDR del control positivo. Sin embargo, este efecto en la cicatrización de herida se oculta cuando las células se cultivan en el medio completo, más probablemente debido al potente efecto del FCS en la migración de células.

15 v) Niveles de ARNm de NRARP en células a partir de los experimentos mencionados en lo anterior.

Las células HUVEC de los estudios mencionados en lo anterior se recogieron y se les extrajo todo su ARN para analizar mediante la PCR cuantitativa los niveles del gen diana NRARP. La figura 29 muestra la reducción en los niveles de ARNm de NRARP en respuesta a la electroporación del ARNip SEQ ID NO. 37.

Con los resultados presentados en el presente estudio tomados en conjunto, se puede concluir que el ARNip SEQ ID NO. 37 muestra

un efecto antiangiogénico en las células HUVEC, como se muestra por una reducción en la proliferación, migración y formación de estructuras capilares.

## 5                    **2. Análisis in vivo**

### **2.1 Expresión de la NRARP en la retina y la coroides en un modelo en rata de neovascularización coroidea inducida por LÁSER**

10

#### **2.1.1            Objetivo**

El objetivo del presente estudio era evaluar la expresión de la NRARP en diferentes puntos de tiempo en la retina y la coroides de ratas Brown Norway en las que se había inducido CNV por LÁSER. El análisis de la expresión de este gen diana sirvió para un doble propósito i) evaluar si NRARP está regulado positivamente en respuesta a CNV para estudiar si la diana es un candidato a ser silenciado con el objetivo de desarrollar un nuevo compuesto para el tratamiento de enfermedades retinianas relacionadas con la neovascularización, ii) estudiar la expresión provisional de NRARP para determinar el mejor momento para tratar a los animales con el fin de silenciar el gen diana.

15

20

#### **2.1.2 Introducción**

25                    La CNV es una lesión no específica común a varias

enfermedades coriorretinianas. Estas lesiones se caracterizan por una secuencia de acontecimientos que conllevan una rotura o ruptura de la membrana de Brunch, inducción de inflamación y angiogénesis con invasión de células endoteliales coriocapilares, pericitos y células inflamatorias en el espacio subretiniano y/o el epitelio pigmentario subretiniano {Grossniklaus HE y col., 2010}. La penetración de coriocapilares en el espacio subretiniano es un sello común de varias enfermedades retinianas. Algunos ejemplos de estas enfermedades incluyen la AMD, la PDR o el DRE.

La CNV puede inducirse en modelos animales induciendo una lesión en la membrana de Brunch; esta lesión inicia los acontecimientos moleculares que causan una CNV completamente desarrollada caracterizada por un aumento de factores angiogénicos y mediadores inflamatorios.

Se ha usado el modelo de CNV inducido por láser en ratas Brown Norway validadas en EyeCRO para analizar la expresión de dianas seleccionadas en diferentes puntos de tiempo después de la inducción de las lesiones. Para este fin, se indujeron tres lesiones en cada ojo de 18 animales que fueron sacrificados posteriormente y los ojos se recogieron y se enviaron a Sylentis para análisis adicionales. La diana analizada era la NRARP. La NRARP es una glucoproteína relacionada con la activación de células endoteliales vasculares. El gen está expresado en exceso en toda una gama de cánceres y su expresión en exceso está correlacionada

con la metástasis y una tasa de supervivencia corta. Además, los niveles de expresión de este gen en cáncer de mama humano están correlacionados con la formación de vasos sanguíneos y se ha descubierto que la proteína codificada por este gen tiene un papel en la migración de células endoteliales y la generación de vasculatura independiente del VEGF {Faibish MR y col., 2011}.

### 2.1.3 Métodos

#### i) Animales

10

**Tabla 1. Animales**

|                                                            |                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Especie</b>                                             | Rata                                                                                                                   |
| <b>Cepa</b>                                                | Brown Norway                                                                                                           |
| <b>Proveedor</b>                                           | Charles River Laboratories                                                                                             |
| <b>Número y sexo</b>                                       | 18 hembras                                                                                                             |
| <b>Intervalo de edad en el momento de la inducción</b>     | 6-8 semanas                                                                                                            |
| <b>Aleatorización y asignación a grupos de tratamiento</b> | Los animales fueron asignados aleatoriamente a los diferentes grupos experimentales.                                   |
| <b>Identificación</b>                                      | Etiqueta aurícula                                                                                                      |
| <b>Alojamiento</b>                                         | Los animales se alojaron en grupos de 3, en condiciones convencionales.                                                |
| <b>Condiciones ambientales, lechos, agua y dieta</b>       | En condiciones controladas (iluminación, temperatura y humedad). Dieta convencional y agua corriente <i>ad libitum</i> |

#### ii) Grupos experimentales

15

**Tabla 2 - Grupos experimentales**

| Grupo | Número de animales | Inducción                               | Evaluación                                                                     | Momento de la recogida de tejido |
|-------|--------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 1     | 3                  | Ninguno                                 | Enucleación de los ojos y extracción individual de la retina y el RPE/coroides | -                                |
| 2     | 3                  | CNV por láser 3 lesiones/ojo, bilateral |                                                                                | 6 h                              |
| 3     | 3                  |                                         |                                                                                | 24 h                             |
| 4     | 3                  |                                         |                                                                                | 72 h                             |
| 5     | 3                  |                                         |                                                                                | 168 h                            |
| 6     | 3                  |                                         |                                                                                | 504 h                            |

### iii) Criterios de exclusión

Cualquier ojo donde la hemorragia es evidente en  $\geq 2$  de entre 3 lesiones por láser inmediatamente después de la aplicación del láser.

Todas las muestras de tejido se colocaron en criotubos identificados apropiadamente, y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Los criotubos se identificaron con las condiciones experimentales y se enviaron en hielo seco a Sylentis.

### iv) Análisis de la expresión del gen diana

#### (1) Aislamiento y retrotranscripción de ARN

Se aisló el ARN total de la retina y la coroides usando el kit de extracción de ARN RNeasy (Invitrogen, CA, EE. UU.). Se retrotranscribieron 4  $\mu$ g de ARN total usando el kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### (2) PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa se realizó usando el sistema de detección Stepone plus (Applied Biosystems). Se amplificaron 500 nanogramos de cada muestra en un TaqMan 2X Universal Master Mix en las condiciones siguientes: 95 °C durante 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 minuto. Todas las amplificaciones por PCR cuantitativa se realizaron por triplicado y se repitieron en al menos dos experimentos independientes, incluyendo siempre controles de transcripción inversa y controles sin plantilla.

10

#### **2.1.4 Resultados - Expresión de la NRARP**

La expresión de la NRARP se analizó en la retina y en el RPE/Coroides en puntos de tiempo diferentes después de la inducción de CNV por láser. Los resultados obtenidos muestran una ligera disminución de los niveles de ARNm de NRARP en la retina 24 h después de la inducción de lesiones por láser. 72 h después de la inducción de lesiones los niveles de ARNm de NRARP aumentan ligeramente (1.5 veces respecto a tiempo =0). Al final del estudio (t= 504 h) los niveles de NRARP eran equivalentes a los observados antes de la inducción de lesiones (figura 14).

20

Los niveles de ARNm de NRARP fueron regulados positivamente de forma drástica en la coroides/RPE 6 h después de la inducción de CNV (-2.7 veces) y comenzaron a disminuir lentamente a continuación. Los niveles basales no se recuperaron en el marco temporal del estudio (figura 15).

25

### **2.1.5 Conclusiones**

Tomando conjuntamente los resultados de este estudio puede llegarse a la conclusión de que la NRARP es una diana eficaz contra la que puede desarrollarse un tratamiento para controlar la neovascularización en la retina. El patrón de expresión tanto en la retina como en la coroides indica que podría ser un buen candidato a silenciar, dada la significativa inducción de su expresión en el modelo usado en este estudio y su papel en la angiogénesis.

10

## **2.2 Evaluación de ARNip dirigido a NRARP en la reducción del tamaño de la lesión y la permeabilidad en un modelo en rata de neovascularización coroidea inducida por láser.**

15

### **2.2.1 Objetivo**

Para determinar los efectos anti-angiogénicos/de disrupción vascular de un agente de ensayo (ARNip SEQ ID NO.37) después de la administración tópica en un modelo en rata de neovascularización coroidea inducida por láser (CNV por láser).

20

### **2.2.2 Resumen del estudio**

Se llevó a cabo un estudio de 2 6 días con ratas Brown Norway hembra para determinar los efectos de disrupción vascular/anti- angiogénicos de la instilación tópica de la SEQ ID NO: 37 en un modelo inducido por láser de neovascularización

25

coroidea.

Un total de 18 ratas se dividieron en 3 grupos de 6 ratas por grupo. Los días 1-26, los grupos 1 y 3 recibieron instilación tópica una vez al día de vehículo (grupo 1), o 5 mg/ml de la SEQ ID NO: 37 (grupo 3). El día 7, el grupo 3 recibió inyección intravítrea bilateral de 5 µg/ojo de anti-VEGF (control positivo).

El día 3, se realizaron tratamientos con láser usando un láser térmico a 520 nm para generar un total de tres lesiones por ojo.

El día 26 (3 semanas después del tratamiento con láser), se realizó una angiografía con fluoresceína y se determinó el área del tamaño de la lesión usando software de análisis de imágenes (ImageJ). Las ratas que recibieron ya sea 5 µg/ojo de anticuerpo anti- VEGF, o instilación tópica de 5 mg/ml de la SEQ ID NO: 37, mostraban una reducción significativa del tamaño de la lesión en comparación con su respectivo grupo de control con vehículo.

### **2.2.3 Materiales y Métodos**

2.2.3.1 Neovascularización coroidea (CNV) inducida por láser en ratas

Días 1-26: Instilación tópica de vehículo o agente de ensayo, una vez al día (Grupos 1, 2)

Día 5: Tratamiento bilateral con láser para producir 3 lesiones por ojo

Día 7: Inyección intravítrea bilateral de control positivo (Grupo 3)

Día 26: Angiografía con fluoresceína in vivo

Día 26: Enucleación de los ojos y extracción individual de la retina y el RPE/coroides Grupos del estudio

#### 2.2.3.2 Grupos del Estudio

TABLA 3. Asignación a los Grupos

| Grupo | Inducción                               | Tratamiento                                                  | Detalles del tratamiento                         | Evaluación                                                                               |
|-------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1     | CNV por láser 3 lesiones/ojo, bilateral | PBS (n=6 ratas)                                              | Instilación tópica los días 1-26, una vez al día | Angiografía con fluoresceína in vivo el día 26;                                          |
| 2     | CNV por láser 3 lesiones/ojo, bilateral | SEQ ID NO.37 5 mg/ml (n=6 ratas)                             | Instilación tópica los días 1-26, una vez al día | Enucleación de los ojos y extracción individual de la retina y el RPE/coroides el día 26 |
| 3     | CNV por láser 3 lesiones/ojo, bilateral | Anticuerpo anti-VEGF R&D Systems AF564, 5 µg/ojo (n=6 ratas) | Inyección intravítrea bilateral el día 7         |                                                                                          |

#### 2.2.3.3 Animales

Cepa: Brown Norway

Sexo: Femenino

Intervalo de edad: 6-8 semanas de edad

Intervalo de peso: 120-150 g

Proveedor: Charles River Laboratories

Número de animales en estudio: 18

#### 2.2.3.4 Requisitos de Alojamiento

Todos los animales se alojaron en grupos de 3 en grandes jaulas mantenidas en estantes ventilados en condiciones de cuidado animal convencionales.

#### 5                   2.2.3.5 Preparación y almacenamiento de la formulación

Se utilizaron materiales de la USP (Farmacopea Estadounidense) y recipientes estériles para todas las formulaciones, usando las siguientes alícuotas del material de  
10    ensayo:

Vehículo tópico- 26 alícuotas/130 µl cada una + 2 extra.

ARNip de la SEQ ID NO.37 5 mg/ml- 26 alícuotas/130 µl cada una + 2 extra.

Todas las formulaciones se almacenaron a  $4 \pm 3$  °C.

#### 15                   2.2.3.6 Anestesia

Se mezclaron Ketamina y Xilazina usando una jeringa U-100 utilizando 20 unidades de Ketamina (100 mg/ml) y 100 unidades de Xilazina (20 mg/ml). La mezcla anestésica se aplicó mediante inyección intraperitoneal (IP) a 1 µl/g (peso corporal).

#### 20                   2.2.3.7 Aplicación de láser para producir lesiones de CNV

Los ojos de los animales se dilataron con una solución de Cyclogyl al 1% y se protegieron de la luz. Después de la dilatación observable, los animales se sedaron con  
25    ketamina/xilazina. El fondo del ojo de los animales sedados se

observó y se grabó usando un fundoscopio Micron III para animales pequeños (Phoenix Research). Los tratamientos con láser se realizaron usando un láser térmico conectado a través de la conexión láser personalizada del Micron III. Se implementaron un  
5 total de 3 lesiones por ojo usando una longitud de onda de 520 nm. Las imágenes del fondo de ojo resultantes se grabaron y se evaluaron para confirmar que el láser ha producido con éxito una burbuja a través de la membrana de Bruch.

#### 10 2.2.3.8 Administración intravítrea

Los animales se anestesiaron con ketamina/xilazina y las pupilas se dilataron con administración tópica de Cyclogyl y/o Tropicamida. Después de la sedación y la dilatación,- se inyectó un volumen total de 5 µl por ojo en el humor vítreo en  
15 la parte plana usando una jeringa de Hamilton y una aguja del calibre 33.

#### 2.2.3.9 Exclusiones

Cualquier ojo que presente signos de hemorragia después  
20 de la aplicación del láser o la inyección intravítrea se excluyeron del análisis.

#### 2.2.3.10 Angiografía con fluoresceína

Los animales fueron anestesiados con ketamina/xilazina  
25 y a continuación recibieron una inyección IP de fluoresceína

sódica al 10% a 1 µl/gramo de peso corporal. Las imágenes del fondo de ojo se capturaron como archivos TIFF de 8 bits usando el Micron III y filtros excitadores/de barrera para una longitud de onda diana de 488 nm. También se capturaron fotografías convencionales  
5 en color del fondo de ojo para cada ojo.

#### 2.2.3.11 Captura de imágenes y cuantificación de la lesión

Todas las imágenes TIFF se cuantificaron usando un  
10 software de análisis de imágenes computarizado (ImageJ, NIH, EE. UU.). Las lesiones se trazaron individualmente a mano alzada con el fin de cuantificar el área en píxeles y las fotografías del fondo de ojo en color se usaron como referencia para la ubicación de la lesión. Las áreas de avascularización en el centro de las  
15 lesiones se excluyeron de los cálculos del área. Si había hemorragia o dos lesiones solapantes, estas lesiones se excluyeron del análisis.

#### 2.2.3.12 Recogida de tejido

20 Los animales fueron anestesiados con ketamina/xilazina (80/10 mg/kg) y a continuación fueron sacrificados mediante administración IP de Euthasol (pentobarbital) a 200 mg/kg. Después del sacrificio, los ojos fueron enucleados y fijados individualmente en paraformaldehído al 4%. Después de la  
25 fijación, todos los ojos se almacenaron en tubos de polipropileno

con tapón de rosca de 2 ml individuales.

#### 2.2.3.13 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el software  
 5 Graphpad Prism (versión 4.0) usando una prueba t de Mann-Whitney  
 bilateral. Solamente los cambios con un valor  $p < 0.05$  se  
 consideran estadísticamente significativos.

#### 2.2.4 Resultados

10 El efecto de la administración por instilación tópica  
 de la SEQ ID NO: 37 se evaluó en un modelo en rata de CNV inducida  
 por láser. A las 3 semanas después del tratamiento con láser, se  
 realizó una angiografía con fluoresceína para cuantificar el  
 tamaño (área en píxeles) de la lesión de CNV en los ojos de rata.

15 La aplicación tópica de 5 mg/ml de la SEQ ID NO: 37  
 redujo el tamaño de la lesión en los ojos de rata con respecto  
 a la instilación de vehículo en solitario. La diferencia del  
 tamaño promedio de la lesión con respecto al grupo tratado con  
 vehículo era significativa (figura 16; \*,  $p \leq 0.05$ , prueba t con  
 20 datos independientes con post-prueba de Mann-Whitney bilateral).

La inyección intravítrea bilateral del control  
 positivo, el anti-VEGF, redujo significativamente el tamaño de  
 la lesión con respecto al control (figura 16; \*\*,  $p \leq 0.01$ , prueba  
 t con datos independientes con post-prueba de Mann-Whitney  
 25 bilateral).

### 2.2.5 Conclusiones

En un modelo en rata de neovascularización coroidea, la instilación tópica de 5 mg/ml de la SEQ ID NO. 37 reduce significativamente el tamaño de la lesión con respecto a la  
5 instilación tópica del vehículo en solitario.

### REFERENCIAS

- **Angaji S.A, Hedayati S.S, Poor R.H, et al.** "Application of RNA interference in treating human diseases" *J Genet.* 2010. Vol. 89. 4. 527-37.
- 10 • **Bird AC.** "Therapeutic targets in age-related macular disease". *J Clin Invest.* 2010 Sep; 120(9):3033-41.
- **Brainsen J.B., Laursen M.B., Nielsen A. F., et al.** "A large-scale Chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and  
15 low toxicity" *Nucleic Acids Res* 2009 Vol. 37 Ejemplar: 9 Páginas: 2867-81.
- **Campochiaro PA.** "Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders". *Gene Ther.* 2006 Mar;13(6):559-62.
- 20 • **Cerutti, L., N. Mian, et al.** "Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain". *Trends Biochem Sci.* 2000 25(10): 481-2.
- **Collins, R. E. and X. Cheng.** "Structural domains  
25 in RNAi". *FEBS Lett* 2005 579(26): 5841-9.

- **Chang C.I, Kim H.A, Dua P, et al.** "Structural Diversity Repertoire of Gene Silencing Small Interfering RNAs" *Nucleic Acid Ther.* 2011. Vol. 21. 3. 125-31.
- **Chong RH, Gonzalez-Gonzalez E, et al.** "Gene  
5 silencing following siRNA delivery to skin via coated Steel microneedles: In vitro and in vivo proof-of-concept". *J Control Release* 2013, 166:211-9.
- **Del Amo EM and Urtti A.** "Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior  
10 segment". *Drug Discov Today* 2008, 13:135-143.
- **Deleavey G.F and Damha M.J.** "Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing". *Chem Biol.* 2012 Vol.19.8. 937-54.
- **Duwuri S, Majumdar S, Mitra AK.** "Drug delivery  
15 to the retina: challenges and opportunities". *Expert Opin Biol Ther* 2003, 3:45-56.
- **Edelhauser HF, Rowe-Rendleman CL, Robinson MR, Dawson DG, et al.** "Ophthalmic drug delivery systems for the treatment of retinal diseases: basic research to clinical  
20 applications". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010, 51:5403-5420.
- **Elbashir, S. M., W. Lendeckel, et al.** "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs". *Genes Dev.* 2001 15(2): 188-200.
- **Faibish M, Francescone R, Bentley B, et al.** "A  
25 YKL-40- Neutralizing Antibody Blocks Tumor Angiogenesis and

Progression: A Potential Therapeutic Agent in Cancers". *Mol Cáncer Ther* 2011; 10:742-751.

- **Fire A, Xu S, et al.** "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*". *Nature*. 1998 391(6669): 806-11.  
5
- **Grossniklaus HE, Kang SJ, et al.** "Animal models of choroidal and retinal neovascularization" *Prog Retin Eye Res* 2010 29(6): 500-19.
- **Guzman-Aranguéz A, Loma P y Pintor J.**  
10 "Small-interfering RNAs (siRNAs) as a promising tool for ocular therapy". *British Journal of Pharmacology*. 2013. 170 730-747.
- **Hutvagner G, y Zamore PD.** "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex". *Science*. 2002. 297(5589): 2056-60.
- 15 • **Kigasawa K, Kajimoto K, et al.** "Noninvasive delivery of siRNA into the epidermis by iontophoresis using an atopic dermatitis-like model rat". *Int J Pharm* 2010, 383:157-60.
- **Kim DH, Behlke MA, Rose SD, et al.** "Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy" *Nat*  
20 *Biotechnol* 2005. Vol. 23 Ejemplar: 2 Páginas: 222-6.
- **Kornbrust D, Cavagnaro J, Levin A, et al.** "Oligo safety working group exaggerated pharmacology subcommittee consensus document" *Nucleic Acid Ther* 2013 Vol. 23, 1, Pag: 21-8.
- 25 • **Leachman SA, Hickerson RP, et al.**

"First-in-human mutation-targeted siRNA phase Ib trial of an inherited skin disorder". *Mol Ther* 2010, 18:442-6.

- **Lewis BP, Shih I, et al.** "Prediction of mammalian micro RNA targets". *Cell*. 2003 115:787-798.

5                   • **Liu J, Carmell MA, et al.** "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi". *Science*. 2004 305(5689): 1437-41.

- **Livak KJ and Schmittgen TD.** "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method" *Methods*. 2001; Vol: 25, Ejemplar: 4, Página: 402-8.

- **Ma JB, Yuan YR, et al.** Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi.

- **Maniatis T, et al.,** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, en las páginas 387-389.

- **Nakai N, Kishida T, et al.** "Therapeutic RNA interference of malignant melanoma by electrotransfer of small interfering RNA targeting Mitf". *Gene Ther* 2007, 14:357-65.

20                   • **Nykanen A, Haley B, et al.** "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway". *Cell* 2001 107 (3): 309-21.

- **Orban TI and Izaurralde E.** "Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome". *Rna*. 2005 11(4): 459-69.

- **Phng LK, Potente M, et al.** "Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis". *Dev Cell* 2009 16(1): 70-82.
- **Rand TA, Petersen S, et al.** "Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation". *Cell*. 2005 123(4): 621-9.
- **Rowe-Rendleman CL, Durazo SA, et al.** "Drug and gene delivery to the back of the eye: from bench to bedside". *Investigative ophthalmology & visual Science*. 2014 55(4): 2714-30.
- **Sanghvi YS.** "A status update of modified oligonucleotides for chemotherapeutics applications" *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2011 Vol. 4 . 411-22.
- **Song JJ, Smith SK, et al.** "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity". *Science*. 2004 305(5689): 1434-7.
- **Walton SP, Wu M, Gredell JA and Chan C.** "Designing highly active siRNAs for therapeutic applications" *FEBS J.* 2010. Vol. 277. 23. 4806-13.