

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
28 de enero de 2010 (28.01.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/010208 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 15/12 (2006.01) A61P 27/06 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/000376

(22) Fecha de presentación internacional:
17 de julio de 2009 (17.07.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200802214 24 de julio de 2008 (24.07.2008) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID [ES/ES]; Avda. Séneca 2, E-28040 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): PINTOR JUST, Jesús Jerónimo [ES/ES]; Escuela Universitaria de óptica, Avda. Arcos de Jalón, E-28037 Madrid (ES). CROOKE ÁLVAREZ [ES/ES]; Escuela Universitaria de óptica, Avda. Arcos de Jalón, E-28037 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE,

AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: siRNA AND shRNA FOR THE PRODUCTION OF DRUGS FOR HIGH INTRAOCULAR PRESSURE

(54) Título: SIRNA Y SHRNA PARA LA ELABORACIÓN DE MEDICAMENTOS FRENTE A LA PRESIÓN INTRAOCULAR ELEVADA

(57) Abstract: The invention relates to the use of siRNA and shRNA for the production of drugs for high intraocular pressure. The invention relates to siRNA and shRNA molecules for the selective silencing of the gene of purinergic receptor P2Y₂. Said molecules can be used to produce pharmaceutical compositions that can reduce intraocular pressure and, as such, are suitable for use in relation to diseases associated with high intraocular pressure, such as glaucoma, uveitis and diabetic retinopathy, as well as certain infectious and systemic diseases.

(57) Resumen: siRNA y shRNA para la elaboración, de medicamentos frente a la presión intraocular elevada. La presente invención proporciona moléculas de siRNA y de shRNA para silenciar de manera selectiva el gen del receptor purinérgico P2Y₂. Estas moléculas son útiles para la elaboración de composiciones farmacéuticas con capacidad de disminuir la presión intraocular por lo que su aplicación es de utilidad en aquellas enfermedades que cursan con presión intraocular elevada como son el glaucoma, la uveítis, la retinopatía diabética así como determinadas enfermedades infecciosas o sistémicas.



WO 2010/010208 A1

TITULO

siRNA y shRNA para la elaboración de medicamentos frente a la presión intraocular elevada.

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención trata de la elaboración de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la hipertensión ocular. Más concretamente se refiere al empleo de la tecnología de los siRNA para
10 silenciar de manera selectiva el gen del receptor purinérgico P2Y₂.

ESTADO DE LA TECNICA

15 Desde hace relativamente poco tiempo los investigadores han observado que el RNA de doble hebra (dsRNA, del inglés *doble strand* RNA) tiene propiedades interesantes al ser capaz de inhibir la expresión de genes. Esta capacidad de silenciar un gen tiene un amplio potencial para el tratamiento de algunas enfermedades humanas motivo por el cual tanto empresas como
20 laboratorios de las universidades están poniendo un gran esfuerzo en el desarrollo de nuevas terapias basadas en esta tecnología.

Se considera que el mecanismo principal que tiene el dsRNA para inducir el silenciamiento de genes en mamíferos es la degradación del RNA mensajero (mRNA). En este caso, al dsRNA que degrada el mRNA se le llama siRNA
25 (del inglés *small interference* RNA) o iRNA (interferente RNA).

Los primeros abordajes para el uso de dsRNA con el fin de silenciar un gen en particular tuvieron como resultado la síntesis de cadenas demasiado
30 grandes que condujeron a fenómenos no deseados. De hecho, se ha comprobado que existe una limitación en mamíferos: siRNA de longitud superior a 30 nucleótidos producen respuesta inespecífica a interferón debido

a que activan un mecanismo celular de defensa ante infecciones víricas. Esta observación puso de manifiesto la necesidad de buscar cadenas de dsRNA que no fuesen demasiado grandes.

- 5 Recientemente, se ha podido comprobar que cadenas entre 18 y 30 pares de bases de dsRNA pueden entrar en células y tejidos y, si su secuencia está bien escogida, pueden destruir selectivamente un mRNA sin disparar la respuesta del interferón. A estas moléculas de dsRNA con una secuencia específica para destruir a su vez a un mRNA en particular se les ha
10 denominado siRNA, como se ha descrito anteriormente.

La estructura de los denominados siRNA proviene del procesamiento de los dsRNA por mediación del enzima DICER, una proteína que pertenece a la familia de la RNasa III, que escinde el dsRNA en fragmentos pequeños. Un
15 complejo de proteínas denominado RISC (del inglés *RNA induced silencing complex*) recoge estos siRNA y a continuación busca y destruye cualquier RNA presente en la célula con una secuencia complementaria, como es el mRNA diana para el que se diseñó el dsRNA. El mecanismo de acción de los siRNA así como algunos de sus usos se pueden ver en las siguientes
20 referencias: Provost et al. (2002) *Ribonuclease Activity and RNA Binding of Recombinant Human Dicer*, *EMBO J.* 21(21): 5864-5874; Tabara et al. (2002) *The dsRNA Binding Protein RDE-4 Interacts with RDE-1, DCR-1 and a DexH-box Helicase to Direct RNAi in C. elegans*, *Cell* 109(7):861-71; Martínez et al., (2002) *Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi*, *Cell* 110(5):563-574; Hutvagner & Zamore (2002) *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*, *Science* 297:2056; (para la revisión
25 vea Bosher & Labouesse (2000) *RNA interference: genetic wand and genetic watchdog*. *Nat. Cell. Biol.* 2 (2): E31-E36). De modo resumido, el fenómeno de la interferencia o silenciamiento del RNA se completa mediante los
30 siguientes pasos: (i) en primer lugar se produce el reconocimiento del dsRNA y la unión a DICER; (ii) a continuación, la actividad RNasa III de DICER produce la escisión del dsRNA dando lugar a la producción de siRNA; (iii) se

produce la asociación de los siRNA al complejo proteico RISC que (iv) reconoce el mRNA complementario diana y (v) induce la ruptura del mRNA diana en el centro de la región complementaria al siRNA; (vi) el último paso consiste en la degradación del mRNA diana y el reciclaje del complejo RISC.

5

Las dos principales ventajas de esta tecnología consisten en que el efecto es bastante más duradero que el de un fármaco normal y que la interferencia se mantiene, *in vitro*, después de numerosas divisiones celulares. Otra característica fundamental es que el siRNA se diseña de manera específica por lo que se puede inhibir la expresión de un gen sin afectar a ningún otro (Kisielow, M. et al. (2002) *Isóform-specific knockdown and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA*, *J. Biochem.* 363:1-5). Esto no solo permite aplicaciones selectivas para patologías muy complejas sino que, además, los siRNA pueden emplearse para comprobar la participación de un determinado gen (y por ende su proteína) en los procesos bioquímicos y fisiológicos de una célula.

15

Se han utilizado diversos sistemas en los que, con el empleo de siRNA, se ha logrado la supresión específica de la biosíntesis de proteínas en diferentes líneas celulares mamíferas, de modo que este método ha permitido asignar una función a los genes. Por ejemplo, se ha podido demostrar la inhibición de la expresión génica a nivel postranscripcional en células eucarióticas. En este contexto, los iRNA son una herramienta excelente para evaluar rápidamente la función del gen y para revelar fenotipos nulos.

25

Más allá de los posibles papeles de este tipo de RNA como herramienta para comprender el significado de los genes está el empleo con fines terapéuticos. De este modo se podría emplear los iRNA para tratar enfermedades.

30

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa que ocurre en muchos casos como consecuencia del incremento en la presión intraocular (PIO) que estrangula la arteria ciliar privando de flujo sanguíneo a la retina e induciendo

la muerte de las células retinianas con la consiguiente pérdida de visión. Si la PIO es muy elevada el nervio óptico puede ser incluso estrangulado con lo que el proceso es, si cabe, más grave. El caso más habitual de glaucoma es el que se acaba de comentar, que se denomina de ángulo abierto, y su
5 prevalencia es notable en mayores de 40 años, entre quienes tiene una incidencia de un caso cada 200 personas.

No se conocen bien los motivos que pueden desencadenar el glaucoma, pero parece que podría tener un componente genético. Por ejemplo, el gen de la
10 miocilina, presenta más de 30 mutaciones y se ha comprobado que es responsable del 5% de los casos de glaucoma de ángulo abierto (véase las revisiones en Wirtz & Samples (2003) *The genetic loci of open angle glaucoma. Ophthalmol. Clin. North Am.* 16: 505-514, y Khaw et al., (2004) *Glaucoma -1: diagnosis. BMJ*, 328: 97-99).

15 Las terapias que actualmente se están desarrollando frente al glaucoma pasan por la cirugía y la farmacología, con el fin de hacer caer la presión intraocular anormalmente elevada en estos pacientes. Al margen de la cirugía, la farmacología se lleva a cabo por medio de 5 tipos de familias de
20 fármacos:

- Inhibidores de las anhidrasas carbónicas;
- Agentes betabloqueantes;
- Agentes agonistas alfaadrenérgicos;
- 25 Parasimpáticomiméticos;
- Análogos de las prostaglandinas.

Todas y cada una de estas aproximaciones presentan ventajas e inconvenientes y son precisamente los inconvenientes los que demandan la
30 generación de nuevas estrategias para el tratamiento de esta patología.

Recientemente en la patente WO2006021817 se describe el diseño y empleo de iRNA para el tratamiento de las patologías oculares y en particular en el tratamiento del glaucoma. Sin embargo, las dianas seleccionadas por los inventores nada tienen que ver, ni ponen en compromiso alguno, con la invención que aquí se describe. La mencionada patente reivindica 1829 secuencias oligonucleotídicas para las anhidrasas carbónicas II, IV y XII, para los receptores adrenérgicos beta1 y beta2, alfa1a, para la acetilcolinesterasa, ciclooxigenasas 1 y 2, ATPasas, ELAM, el sistema renina angiotensina y la coclina. En ningún momento se reivindica el uso de un iRNA para silenciar el gen de la proteína que se reivindica en este documento.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un siRNA para la elaboración de medicamentos frente a la presión intraocular elevada en animales y humanos. Patologías como el glaucoma, la uveitis y los procesos inflamatorios suelen ocurrir con incrementos notables de la presión intraocular. El siRNA de la invención es específico para el silenciamiento del gen que codifica el receptor purinérgico P2Y₂, que es uno de los receptores purinérgicos P2Y con influencia en el comportamiento del humor acuoso. El silenciamiento y la no expresión de este gen se deben al empleo de un RNA de doble hebra que directamente interfiere con el mRNA del receptor P2Y₂.

En la presente invención el gen del receptor purinérgico P2Y₂ se denomina también gen diana puesto que es su expresión la que especifica y selectivamente se silencia.

El diseño del siRNA se establece entorno a unos criterios generales como son una longitud entre 21 y 26 pares de bases, la selección de la región homóloga dentro del gen, distancia del codón de iniciación, contenido G/C y la localización de dímeros de adenosina. Dado que esto no es un proceso

exacto es necesario diseñar varias secuencias y ensayarlas para así seleccionar aquella más adecuada.

De una manera más detallada, para una buena selección de la secuencia de un siRNA se deben seguir los siguientes pasos:

- 1.- En la secuencia del mRNA, buscar una región localizada de 50 a 100 nucleótidos en sentido 3' desde el codón AUG de iniciación.
- 2.- En esta región se buscan las secuencias AA(N19), CA(N19), es decir, secuencias de 19 pares de bases precedidas bien por AA o bien por CA.
- 3.- El porcentaje ideal de G/C debe ser superior al 30% pero no sobrepasar el 70% (50% sería ideal).
- 4.- Se evitan secuencias con las siguientes repeticiones: AAA, CCC, GGG, TTT, AAAA, CCCC, GGGG, TTTT.
- 5.- Se realiza una predicción de la estructura secundaria del mRNA.
- 6.- Se realiza una búsqueda por homología de secuencias en bases de datos especializadas (es decir, un BLAST a través de las bases de datos tipo NCBI ESTs) con las secuencias que se ajustan mejor a los requisitos aquí expuestos, para garantizar que solo se va a silenciar el gen que nos interesa.

La secuencia oligonucleotídica para la que se han diseñado los siRNA de la invención incluye 19 nucleótidos del gen del receptor purinérgico P2Y₂ y es la siguiente (SEQ ID NO 1):

CCTGTACTGCAGCATCCTC

Esta secuencia es la secuencia diana y se corresponde con la del fragmento de mRNA del receptor purinérgico P2Y₂ contra la que se ha diseñado los siRNA.

La invención también se refiere a siRNA de entre 19 y 26 nucleótidos cuyas secuencias contienen los 19 nucleótidos diseñados frente a la secuencia diana definida más arriba.

- 5 Por otro lado, las dos hebras de los siRNA de la invención pueden tener uno o más nucleótidos en el extremo 3', preferentemente dos, que no se complementan con la hebra complementaria. Estos nucleótidos libres pueden ser tanto ribonucleótidos como deoxyribonucleótidos. Por ejemplo, las dos hebras de los siRNA de la invención pueden comprender dos desoxitimas
- 10 (TT) o dos uridinas (uu) libres en ambos extremos 3'.

- Además, la invención incluye siRNA cuyas secuencias difieren de la de los siRNA frente a SEQ ID NO 1 en uno o más nucleótidos, pero que cumplen el requisito de mediar la degradación del mRNA del gen diana por la acción del
- 15 fenómeno de interferencia de RNA. Los nucleótidos en que difieren las secuencias de estos siRNA pueden haber sido modificados mediante procedimientos químicos o enzimáticos.

- Además del silenciamiento mediante siRNA, otra posibilidad es el
- 20 silenciamiento mediado por shRNA o RNA en horquilla. El shRNA es una molécula de RNA que contiene una secuencia nucleotídica "sentido" (5'-3'), una secuencia nucleotídica antisentido(3'-5'), y una secuencia corta entre la "secuencia sentido" y la "antisentido". Debido a la complementariedad de las secuencias sentido y antisentido, tales moléculas de RNA tienden a formar un
- 25 RNA de doble cadena con un bucle (el bucle es la secuencia corta). El shRNA se reproduce a partir de un vector, bajo la expresión de un promotor de la RNA polimerasa III. El shRNA expresado se exporta al citoplasma donde es procesado por el DICER de igual forma que el dsRNA y, de esta manera, se incorpora a la ruta de silenciamiento del siRNA. Esta forma de silenciar se
- 30 utiliza cuando se quiere conseguir un silenciamiento duradero, "estable".

Uno de los aspectos de esta invención se refiere a un shRNA cuya cadena antisentido contiene la secuencia complementaria a SEQ ID NO 1 y que es capaz de silenciar la expresión del gen del receptor purinérgico P2Y₂. Ambas cadenas (sentido y antisentido) pueden contener de 19 a 29 nucleótidos distribuidos indistintamente entre ambas secuencias.

La invención también incluye shRNA cuyas secuencias difieren de la de los shRNA frente a SEQ ID NO 1 en uno o más nucleótidos, pero que cumplen el requisito de mediar la degradación del mRNA del gen diana por la acción del fenómeno de interferencia de RNA. Los nucleótidos en que difieren las secuencias de estos shRNA pueden haber sido modificados mediante procedimientos químicos o enzimáticos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un compuesto farmacéutico que incluye cualquiera de las versiones de siRNA o shRNA frente a SEQ ID NO 1 que se han detallado en esta descripción así como su uso en la elaboración de un medicamento para disminuir la PIO anormalmente elevada debido a enfermedades como el glaucoma, la uveítis, la retinopatía diabética o determinadas enfermedades infecciosas o sistémicas.

También se refiere a un método para tratar la PIO mediante el uso de siRNA o shRNA frente a la secuencia diana del gen del receptor purinérgico P2Y₂ en pacientes con PIO elevada debido a cualquiera de las enfermedades mencionadas.

Las preparaciones que contienen los siRNA o shRNA pueden tener diversas formulaciones, de modo que los siRNA o shRNA puedan estar preparados en un vehículo adecuado para permitir una penetración más eficaz del principio activo (como por ejemplo liposomas). Dichos vehículos deben poseer propiedades aceptables para la administración ocular y pueden comprender, además de los mencionados liposomas, polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas, microesferas, dendrímeros o

vectores para proteínas. En otros casos el siRNA o el shRNA podrá estar formulado con polietileneimina o derivados como polietileneimina polietilenglicol-N-acetilgalactosamina o polietilenglicol-triN-acetilgalactosamina. Los siRNA y shRNA también pueden prepararse con
5 agentes que permiten la permeabilización a través de membranas, como pueden ser preparados lipídicos.

La administración de los siRNA y shRNA puede realizarse en soluciones acuosas y no acuosas, geles acuosos y no acuosos, cremas, emulsiones,
10 microemulsiones, liposomas, aceites, lociones o aerosoles.

El siRNA se aplica de manera tópica como manera más sencilla, aunque también se pueden emplear otros protocolos y composiciones. Los siRNA preparados pueden aplicarse de manera sistémica o local, por vía oral,
15 transdérmica o en inyecciones. En este último caso, son especialmente interesantes las inyecciones intracamerular, subconjuntival e intravítrea.

La dosis farmacéuticamente efectiva será aquella que prevenga, inhiba la aparición o trate el estado patológico en cuestión. Esto varía dependiendo de
20 la patología que produzca la hipertensión ocular, la composición, la vía de administración, el tipo de animal a tratar y otros aspectos que dependen del análisis médico por parte del especialista (como otros tratamientos simultáneos). De manera general se administra una cantidad que oscila entre 0.1 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal al día.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para facilitar la comprensión de las principales características de la invención y formando parte integrante de esta memoria descriptiva, se acompaña una
30 figura. Con carácter ilustrativo y no limitativo se ha representado lo siguiente:

Figura 1: Efecto del siRNA frente al gen del receptor P2Y₂ donde se puede ver la bajada de la presión intraocular (PIO) en los animales tratados cuando se compara con los ojos contralaterales tratados solamente con solución salina.

5

MODO DE REALIZACIÓN

Habiendo descrito la presente invención, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no son limitativos de su alcance; dicho alcance viene definido exclusivamente por la nota reivindicatoria adjunta.

Ejemplo 1

Para el diseño del siRNA específico del receptor P2Y₂ de conejo fue necesario clonar dicho receptor. El clonaje se realizó a partir de RNA total de epitelio corneal de conejo utilizando oligonucleótidos degenerados y las técnicas RT-PCR y RACE (*Rapid Amplification of cDNA ends*) que cualquier experto en al materia conoce. Para obtener las secuencias diana con mayor probabilidad de éxito de silenciamiento por siRNA, se utilizó el sistema de búsqueda de Applied Biosystems con el que, mediante una serie de criterios empíricos, se seleccionaron 9 secuencias. Los siRNA que reconocen esas secuencias dianas fueron proporcionados por Applied Biosystems en la forma anillada, purificados y liofilizados. Para medir la eficacia de dichos siRNA *in vitro*, se resuspendieron en agua libre de RNasas y para su aplicación *in vivo* fueron resuspendidos en NaCl 0.9%.

Ejemplo 2

El siRNA fue ensayado en el modelo animal del conejo de Nueva Zelanda. Para ello se usó siRNA cuya secuencia es complementaria a la secuencia anteriormente descrita (SEQ ID NO 1) y cuya obtención se ejemplifica en el

ejemplo 1 de esta memoria. La secuencia de conejo es la homóloga para el receptor humano por lo que el siRNA diseñado puede utilizarse en el ser humano.

5 Los estudios para valorar la especificidad de los siRNA se realizaron tanto *in vitro* como *in vivo*. Se realizaron estudios *in vitro* que demostraron la eficiencia y especificidad de los siRNA diseñados al silenciar, en cultivos celulares primarios de epitelio, los niveles del mRNA correspondiente al receptor P2Y₂. El análisis de la eficacia de dichos siRNA se determino
10 mediante inmunocitoquímica, a partir de células de epitelio corneal de conejo transfectadas con 300nM de dichos siRNAs. Este análisis reveló la eficiencia de silenciamiento del siRNA que tenía como secuencia diana la secuencia caracterizada por SEQ ID NO 1.

15 Posteriormente se realizaron estudios *in vivo*. Por un lado se estudió el silenciamiento *in vivo* del receptor por técnicas inmunohistoquímicas. Para ello se trató al animal con el siRNA y en el momento de máxima disminución de la presión intraocular se sacrificó para realizar técnicas
20 inmunohistoquímicas de los procesos ciliares con el anticuerpo para el receptor P2Y₂, empleando el anticuerpo comercial de la casa Santa Cruz (SC-1520), y realizando la inmunohistoquímica siguiendo las especificaciones del fabricante. Estos resultados demostraron la desaparición de la proteína, y permitieron realizar a continuación estudios del efecto de los siRNA sobre la presión intraocular.

25

Los estudios de la presión intraocular se realizaron en conejos de la raza Nueva Zelanda midiéndoles la presión intraocular. El ojo del conejo es especialmente interesante al ser grande y de ese modo poderse realizar
30 medidas de presión intraocular de una manera precisa. La presión intraocular de estos animales, entorno a 20mm Hg, puede disminuir hasta el 40% con el uso de tratamientos comerciales para la hipertensión ocular.

Los animales empleados fueron normotensos ya que de ese modo la reproducibilidad de las medidas de presión intraocular y la facilidad de las mismas estaban garantizadas.

- 5 Los conejos se mantuvieron en jaulas individuales con libre acceso a comida y bebida. Estaban sometidos a ciclos de luz/ oscuridad de 12 horas para evitar las oscilaciones debidas a los ciclos circadianos. Para la realización de la experimentación se siguió la directiva europea 86/609/EEC para el uso y manejo de los animales de experimentación.

10

Los siRNA se aplicaron instilando tópicamente un volumen de 40µl en la superficie de la córnea. El ojo contralateral recibió un volumen equivalente del vehículo utilizado, es decir, solución salina, y se utilizó como ojo control.

- 15 Las medidas de la presión intraocular se realizaron por medio de un tonómetro de rebote TonoVet. Este tonómetro es mínimamente invasivo, por lo que no requiere el uso de anestesia. Las medidas se realizaron midiendo el nivel basal de la presión intraocular y el experimento se repitió un total de 8 veces. Para evitar problemas, los experimentos se realizaron siempre a la
20 misma hora del día, lo que permitió obtener una valoración más objetiva de los resultados.

- El protocolo de aplicación del siRNA fue el siguiente: las dosis del siRNA preparadas en solución salina (NaCl 0.9% p/v) en un volumen final de 40µl se
25 aplicaron en cada ojo durante cuatro días consecutivos a la misma hora. El ojo contralateral recibió 40µl de solución salina, durante el mismo número de días y a la misma hora. La presión intraocular fue medida antes de cada aplicación y cada 2, 4 y 6 horas durante los siguientes 7 días. Las máximas respuestas en la bajada de la presión intraocular se obtuvieron a las 24 horas
30 de comenzar el tratamiento y duraron hasta el quinto día.

La figura 1 muestra los resultados obtenidos. Los cuadrados negros indican los datos obtenidos a partir del ojo en el que se aplicó únicamente solución salina; los círculos blancos reflejan los resultados obtenidos en el ojo que se trató con el siRNA de la invención. El eje de las X expresa el tiempo en horas y el de las Y indica el valor de la PIO y cómo varía respecto al control (al que se le da un valor del 100 %) Como se aprecia en la figura 1, el resultado del tratamiento con el siRNA mostró una disminución de la presión intraocular que, además, resultó estadísticamente significativa, objetivo fundamental de todas las terapias para patologías que cursan con hipertensiones oculares como el glaucoma. Comparativamente con el ojo contralateral tratado con solución salina, que apenas fluctuó, los ojos tratados con el siRNA de la invención disminuyeron la presión intraocular por debajo de la línea base hasta un 50% (figura 1). Dichos valores fueron normalizados sobre los valores de la línea base y los puntos en la figura representan la media y el error estándar de la media.

El efecto del siRNA no solamente fue notable en su capacidad hipotensora de la presión intraocular sino que además su efecto fue muy duradero ya que llegó a durar cuatro días, en clara comparación con los fármacos comerciales cuya duración es de unas pocas horas.

Adicionalmente, no se observaron efectos secundarios ni durante ni después del tratamiento con el siRNA. Los posibles efectos secundarios que se estudiaron fueron irritación corneo conjuntival, edema corneal, tindall en cámara anterior y formación de cataratas.

REIVINDICACIONES

1. Molécula aislada de siRNA que comprende una secuencia de 19 nucleótidos complementaria a la secuencia diana SEQ ID NO 1 del gen del receptor purinérgico P2Y₂.
5
2. Molécula aislada de siRNA, según la reivindicación 1, cuya secuencia contiene hasta 7 nucleótidos más que SEQ ID NO 1 distribuidos indistintamente en ambos extremos.
10
3. Molécula aislada de siRNA, según la reivindicación 1, cuya secuencia contiene dos nucleótidos más que SEQ ID NO 1 en el extremo 3' de cada una de las hebras siendo esos dos nucleótidos o bien dos desoxitimas (TT) o bien dos uridinas (uu).
15
4. Molécula aislada de siRNA, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene nucleótidos modificados química o enzimáticamente.
5. Molécula aislada de shRNA cuya cadena antisentido es complementaria a la secuencia diana caracterizada por SEQ ID NO 1 del gen del receptor purinérgico P2Y₂.
20
6. Molécula aislada de shRNA, según la reivindicación 5, cuyas secuencias (sentido y antisentido) contienen de 19 a 29 nucleótidos distribuidos indistintamente entre ambas secuencias.
25
7. Molécula aislada de shRNA, según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, que contiene nucleótidos modificados química o enzimáticamente.
8. Composición farmacéutica que comprende la molécula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
30

9. Uso de la molécula de RNA de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para elaborar un medicamento para el tratamiento de la presión intraocular elevada.
- 5 10. Uso, según la reivindicación 9, donde la presión intraocular elevada está causada por glaucoma.
11. Uso, según la reivindicación 9, donde la presión intraocular elevada está causada por retinopatía diabética.
- 10 12. Uso, según la reivindicación 9, donde la presión intraocular elevada está causada por una uveítis.
13. Uso, según la reivindicación 9, donde la presión intraocular elevada está causada por una enfermedad sistémica.
- 15 14. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde el medicamento se administra tópicamente en el ojo del paciente.
- 20 15. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde el medicamento se administra en el ojo del paciente a través de una inyección intracamerular.
16. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde el medicamento se administra en el ojo del paciente a través de una inyección subconjuntival.
- 25 17. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde el medicamento se administra en el ojo del paciente a través de una inyección intravítrea.
- 30

18. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde el medicamento se administra en la córnea del paciente.
19. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 10-18, donde el paciente es
- 5 un ser humano.

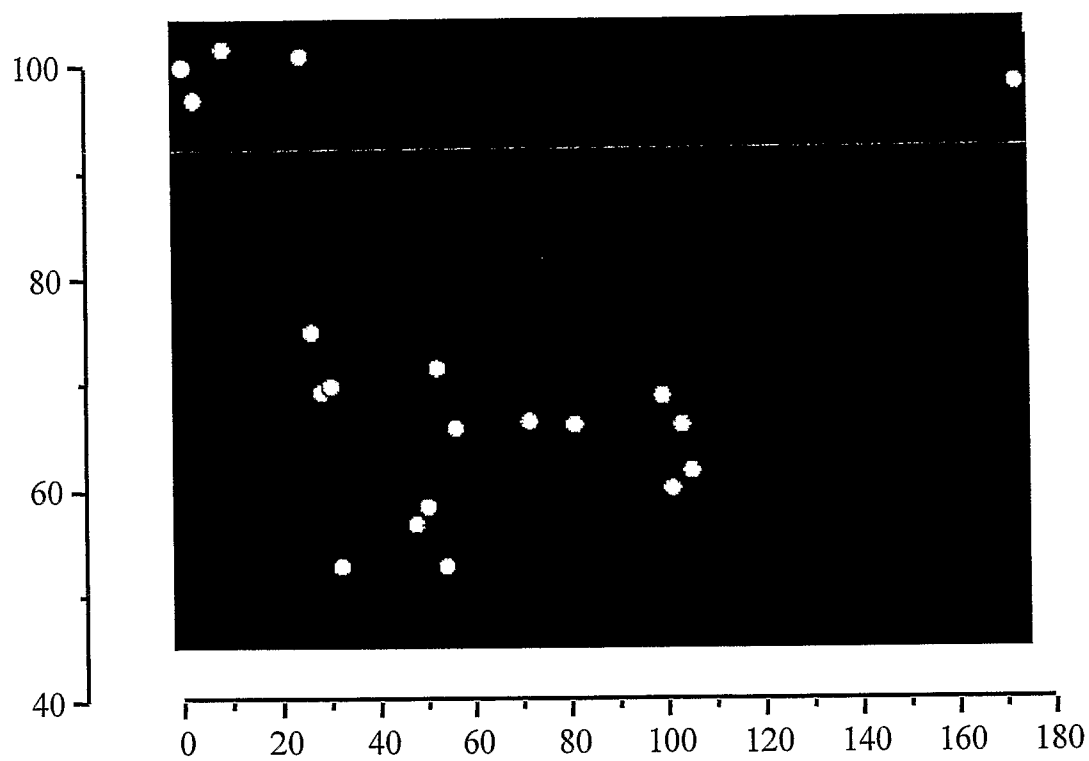


Fig. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/000376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, EBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Crooke A. et al. Silencing of P2Y ₂ receptor delays Ap ₄ A-corneal re-epithelialization process. Molecular Vision. 11.06.2009, Vol. 15, pages 1169-1178 (the whole document).	1-3, 5
Y	Crooke A. et al. Nucleotides in ocular secretions: their role in ocular physiology. Pharmacology and Therapeutics. 01.07.2008, Vol. 119, pages 55-73 (the whole document).	1-3, 5, 8-19
Y	WO 2004/094636 A1 04.11.2004 GALAPAGOS GENOMICS N.V. AND VAN DER SCHUEREN, J. pages 1-34; pages 39 and 260.	1-3, 5, 8-19
A	Pintor J. et al. Immunolocalisation of P2Y receptors in the rat eye. Purinergic Signalling. 2004, Vol. 1, pages 83-90 (the whole document).	1-3, 5, 8-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2009 (27.11.2009)

Date of mailing of the international search report

(09/12/2009)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M. Cumbreño Galindo

Telephone No. +34 91 349 68 80

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/000376

C (continuation).

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Abbracchio M. P. et al. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. Pharmacological Reviews. 2006, Vol. 58, N° 3, pages 281-341 (the whole document).	1-3, 5, 8-19
A	Campochiaro P. A. Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. Gene Therapy. 2006, Vol. 13, pages 559-562 (the whole document).	1-3, 5, 8-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/000376

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **Claims 4, 6 and 7**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The subject matter of claims 4, 6 and 7 does not meet the requirements in respect of clarity and concision (PCT Article 6) to such an extent that it was not possible to carry out a meaningful search on the basis of these claims, since they contain terms that are vague and ambiguous.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/000376

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004094636 A1	04.11.2004	AU 2003224132 A	19.11.2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/000376

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2009/000376

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, EBI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
PX	Crooke A. et al. Silencing of P2Y ₂ receptor delays Ap ₄ A-corneal re-epithelialization process. Molecular Vision. 11.06.2009, Vol. 15, páginas 1169-1178 (todo el documento).	1-3, 5
Y	Crooke A. et al. Nucleotides in ocular secretions: their role in ocular physiology. Pharmacology and Therapeutics. 01.07.2008, Vol. 119, páginas 55-73 (todo el documento).	1-3, 5, 8-19
Y	WO 2004/094636 A1 04.11.2004 GALAPAGOS GENOMICS N.V. AND VAN DER SCHUEREN, J. páginas 1-34; páginas 39 y 260.	1-3, 5, 8-19
A	Pintor J. et al. Immunolocalisation of P2Y receptors in the rat eye. Purinergic Signalling. 2004, Vol. 1, páginas 83-90 (todo el documento).	1-3, 5, 8-19

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

27 Noviembre 2009 (27.11.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

09-DICIEMBRE-2009 (09/12/2009)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. Cumbreño Galindo

N° de teléfono +34 91 349 68 80

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000376

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	Abbracchio M. P. et al. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. Pharmacological Reviews. 2006, Vol. 58, N° 3, páginas 281-341 (todo el documento).	1-3, 5, 8-19
A	Campochiaro P. A. Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. Gene Therapy. 2006, Vol. 13, páginas 559-562 (todo el documento).	1-3, 5, 8-19

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/000376

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones N°s: 4, 6 y 7
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
El objeto de las reivindicaciones 4, 6 y 7 no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Artículo 6 del PCT hasta tal extremo que una búsqueda significativa, basada en esas reivindicaciones, resulta imposible ya que incluyen términos ambiguos y confusos.
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000376

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 2004094636 A1	04.11.2004	AU 2003224132 A	19.11.2004

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/000376

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)