

19



Octrooi Centrum
Nederland

11

2000439

12 C OCTROOI²⁰

21

Aanvraagnummer: 2000439

51

Int.Cl.:

C12N15/11 (2006.01)

C07K14/47 (2006.01)

A61K31/713 (2006.01)

22

Ingediend: 17.01.2007

30

Voorrang:

20.01.2006 US 60/760586

01.05.2006 US 60/796901

10.10.2006 US 60/851000

41

Ingeschreven:

23.07.2007

47

Verleend:

16.03.2009

45

Uitgegeven:

06.05.2009

73

Octrooihouder(s):

Quark Biotech, Inc. te Fremont, Californië,
Verenigde Staten van Amerika (US).

Atugen AG te Berlijn, Bondsrepubliek
Duitsland (DE).

72

Uitvinder(s):

Elena Feinstein te Rehovot (IL).

Rami Skaliter te Nes Ziona (IL).

74

Gemachtigde:

Ir. A. van Westenbrugge c.s. te 2502 LS
Den Haag.

54

Therapeutische toepassingen van inhibitoren van RTP801.

57

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op nieuwe siRNA-moleculen die de expressie van het RTP801-gen remmen.

Tevens verschaft de onderhavige uitvinding, methoden voor de behandeling van microvasculaire stoornissen, oogziekten, ademhalingsziektetoestanden en gehoorstoornissen en toestanden geassocieerd met angiogenese en apoptose. De methoden van de onderhavige uitvinding zijn gebaseerd op de inhibitie van het RTP801-gen en/of een proteïne.

NL C 2000439

Dit octrooi is verleend ongeacht het bijgevoegde resultaat van het onderzoek naar de stand van de techniek en schriftelijke opinie. Het octrooischrift komt overeen met de oorspronkelijk ingediende stukken. Octrooi Centrum Nederland is een agentschap van het ministerie van Economische Zaken.

THERAPEUTISCHE TOEPASSINGEN VAN INHIBITOREN VAN RTP801

GEBIED VAN DE UITVINDING

5 De onderhavige uitvinding heeft betrekking op nieuwe siRNA-moleculen die het RTP801-gen remmen en op de toepassing van deze moleculen ter behandeling van ademhalingsstoornissen van allerlei soorten (waaronder longstoornissen), oog-
ziekten en -toestanden, microvasculaire stoornissen, toestanden geassocieerd met
angiogenese en apoptose, en gehoorstoornissen.

10

ACHTERGROND VAN DE UITVINDING

Chronische obstructieve longziekte (COPD)

Chronische obstructieve longziekte (COPD) tast meer dan 16 miljoen
15 Amerikanen aan en is de vierde grootste doodsoorzaak in de Verenigde Staten. Sigaretten roken veroorzaakt de meeste gevallen van deze slopende ziekte, maar andere milieufactoren kunnen niet uitgesloten worden (Petty TL. 2003. *Definition, epidemiology, course, and prognosis of COPD*. Clin. Cornerstone, 5-10).

Pulmonair emfyseem is een hoofdverschijnsel van COPD. Permanente
20 destructie van perifere luchtruimten, distale tot terminale bronchiolen is het kenmerk van emfyseem (Tuder R.M. et al., *Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor blockade*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 29:88-97; 2003). Emfyseem wordt tevens gekenmerkt door een accumulatie van inflammatoire cellen, zoals macrofagen en neutrofielen in bronchiolen en alveolaire
25 structuren (Petty, 2003).

De pathogenese van emfyseem is complex en multifactorieel. Bij de mens heeft men een deficiëntie van inhibitoren van proteasen die door ontstekingscellen geproduceerd worden, zoals bijvoorbeeld α 1-antitrypsine, aangetoond als zijnde een
bijdrage tot een protease/antiproteaseonbalans, waardoor de destructie van alveolaire
30 extracellulaire matrix in door sigarettenrook (CS) geïnduceerd emfyseem bevorderd wordt (Eriksson, S. 1964. *Pulmonary Emphysema and Alpha1-Antitrypsin Deficiency*. Acta Med Scand 175:197-205. Joos, L., Pare, P.D., en Sandford, A.J. 2002. *Genetic risk factors of chronic obstructive pulmonary disease*. Swiss Med Wkly 132:27-37).

Matrixmetalloproteïnasen (MMP's) spelen een centrale rol in experimenteel emfyseem, zoals gedocumenteerd is door de weerstand van macrofaag metallo-elastase-knock-outmuizen tegen emfyseem veroorzaakt door de chronische inhalatie van CS (Hautamaki et al.: *Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. Science* 277:2002-2004). Bovendien resulteert de pulmonaire overexpressie van interleukine-13 in transgene muizen in MMP- en cathepsine-afhankelijk emfyseem (Zheng, T. et al., 2000. *Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. J Clin Invest* 106:1081-1093). Recente onderzoeken beschrijven de rol van ceptale celapoptose in longweefseldestructie die tot emfyseem leidt (Rangasami T. et al., *Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice*. Ingediend bij het *Journal of Clinical Investigation*; Tudor R.M. et al., *Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor blockade. Am J Respir Cell Mol Biol*, 29:88-97; 2003; Yokohori N., Aoshiba K., Nagai A., *Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. Chest. februari 2004; 125(2):626-32; Aoshiba K., Yokohori N., Nagai A., Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes, Am J Respir Cell Mol Biol. mei 2003; 28(5):555-62).*

Onder de mechanismen die ten grondslag liggen aan beide paden van longdestructie in emfyseem, dient de buitengewoon sterke vorming van reactieve zuurstofspecies (ROS) op de eerste plaats te worden vermeld. Vastgesteld is dat een pro-oxidans/antioxidansonbalans in het bloed en in het longweefsel van rokers bestaat (Hulea S.A. et al.: *Cigarette smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stress: a case-control study. J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1995; 14(3-4):173-80; Rahman I., MacNee W., *Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. Am J Physiol.* december 1999; 277(6 Pt 1):L1067-88; MacNee W., *Oxidans/antioxidans and COPD. Chest.* mei 2000; 117(5 Suppl 1):303S-17S; Marwick J.A., Kirkham P., Gilmour P.S., Donaldson K., MacNee W., Rahman I. *Cigarette smoke-induced oxidative stress and TGF-beta1 increase p21waf1/cip1 expression in alveolar epithelial cells. Ann N Y Acad Sci.* november 2002; 973:278-83; Aoshiba K., Koinuma M., Yokohori N., Nagai A. *Immunohistochemical evaluation of oxidative stress in murine lungs after cigarette smoke exposure. Inhal Toxicol.* september 2003; 15(10):1029-38; Dekhuijzen P.N., *Antioxidant*

properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J. april 2004; 23(4):629-36; Tudor R.M., Zhen L., Cho C.Y., Taraseviciene-Stewart L., Kasahara Y., Salvemini D., Voelkel N.F. en Flores S.C. *Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor blockade. Am J Respir Cell Mol Biol*, 29:88-97; 2003). Na een blootstelling van muizen gedurende één uur aan CS is er een dramatische toename van 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in de alveolaire epitheliale cellen, in het bijzonder van Type II (zie *Inhal Toxicol.* september 2003; 15(10):1029-38, hierboven).

Overgeproduceerde reactieve zuurstofspecies staan bekend om hun cytotoxische activiteit, die afkomstig is van een rechtstreeks DNA-schadelijk effect en van de activering van apoptotische signaaltransductiepaden (Takahashi A., Masuda A., Sun M., Centonze V.E., Herman B. *Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH_m). Brain Res Bull.* 15 Februari 2004; 62(6):497-504; Taniyama Y., Griendling K.K. *Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. Hypertension.* December 2003; 42(6):1075-81. Gepubliceerd 27 oktober 2003; Higuchi Y. *Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. Biochem Pharmacol.* 15 Oktober 2003; 66(8):1527-35; Punj V., Chakrabarty A.M. *Redox proteins in mammalian cell death: an evolutionarily conserved function in mitochondria and prokaryotes. Cell Microbiol.* April 2003; 5(4):225-31; Ueda S., Masutani H., Nakamura H., Tanaka T., Ueno M., Yodoi J. *Redox control of cell death. Antioxid Redox Signal.* Juni 2002; 4(3):405-14).

ROS-en zijn niet alleen cytotoxisch *per se*, maar zijn tevens pro-ontstekingsstimuli, aangezien zij prominente activatoren van redoxgevoelige transcriptiefactoren NFκB en AP-1 zijn (besproken in Rahman I. *Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* September 2002; 1(3):291-315).

Beide transcriptiefactoren zijn op hun beurt sterk betrokken bij de stimulering van transcriptie van proinflammatoire cytokinen (besproken in Renard P., Raes M. *The proinflammatory transcription factor NFκappaB: a potential target for novel therapeutic strategies. Cell Biol Toxicol.* 1999; 15(6):341-4; Lentsch A.B., Ward P.A. *The NFκappaB/IkappaB system in acute inflammation. Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2000; 48(2):59-63) en matrixontledende proteïnasen (Andela V.B., Gordon

A.H., Zotalis G., Rosier R.N., Goater J.J., Lewis G.D., Schwarz E.M., Puzas J.E., O'Keefe R.J. NFkappaB: *a pivotal transcription factor in prostate cancer metastasis to bone*. *Clin Orthop*. Oktober 2003; (415 Suppl):S75-85; Fleenor D.L., Pang I.H., Clark A.F. *Involvement of AP-1 in interleukin-1alpha-stimulated MMP-3 expression in human trabecular meshwork cells*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Augustus 2003; 44(8):3494-501; Tuhul Amin A.R., Senga T., Oo M.L., Thant A.A., Hamaguchi M. *Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1beta: a role for the dual signalling pathways, Akt and Erk*. *Genes Cells*. Juni 2003; 8(6):515-23). Pro-inflammatoire cytokinen op hun beurt dienen als attractoren van inflammatoire cellen die tevens matrixontledende enzymen, cytokinen en reactieve zuurstofspecies afscheiden. Derhalve schijnt het zo te zijn dat een pathogene factor, zoals bijvoorbeeld CS een pathologisch netwerk stimuleert waarbij reactieve zuurstofspecies als hoofdmediatoren van longdestructie fungeren.

Zowel reactieve zuurstofspecies (ROS) afkomstig van geïnhaleerde sigarettenrook als die welke endogeen worden gevormd door ontstekingscellen, dragen bij tot een verhoogde intrapulmonaire oxidansbelasting.

Eén additionele pathogene factor met betrekking tot COPD-pathogenese is de waargenomen afgenomen expressie van VEGF en VEGFR_{II} in longen van patiënten die aan emfyseem lijden (Yasunori Kasahara, Rubin M. Tudor, Carlyne D. Cool, David A. Lynch, Sonia C. Flores, en Norbert F. Voelkel. *Endothelial Cell Death and Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Emphysema*. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 163, blz. 737-744, 2001). Bovendien leidt de inhibitie van VEGF-signalering gebruikmakend van een chemische VEGFR-inhibitor tot alveolaire septale endotheliale en vervolgens tot epitheliale celapoptose, waarschijnlijk te wijten aan de verstoring van de nauwe structurele/functionele verbondenheid van beide typen cellen binnen alveoli (Yasunori Kasahara, Rubin M. Tudor, Laimute Taraseviciene-Stewart, Timothy D. Le Cras, Steven Abman, Peter K. Hirth, Johannes Waltenberger en Norbert F. Voelkel. *Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema*. *J. Clin. Invest.* 106:1311-1319 (2000); Voelkel N.F., Cool C.D. *Pulmonary vascular involvement in chronic obstructive pulmonary disease*. *Eur Respir J Suppl*. November 2003; 46:28s-32s).

Maculaire degeneratie

De meest gebruikelijke oorzaak van afgenomen best gecorrigeerd zichtvermogen in 65 jaar oude personen in de Verenigde Staten is de retinale stoornis die bekend staat als ouderdomsmaculaire degeneratie (AMD). Naarmate AMD voort-
 5 schrijdt wordt de ziekte gekenmerkt door een verlies aan scherp, centraal zichtvermogen. Het gebied van het oog dat door AMD beschadigd wordt is de Macula, een klein gebied in het centrum van de retina, hoofdzakelijk samengesteld uit fotoreceptorcellen. Zogenoemde “droge” AMD, verantwoordelijk voor ongeveer 85 tot 90% van de AMD-patiënten, omvat veranderingen in de oogpigmentverdeling, verlies aan fotoreceptoren
 10 en verminderde retinale functie die te wijten is aan een algemene atrofie van cellen. De zogenoemde natte AMD omvat de proliferatie van abnormale choroïdale vaten welke tot samenklontering en littekens in de subretinale ruimte leidt. Dus geschiedt het optreden van de natte AMD vanwege de vorming van een abnormaal choroïdaal neovasculaire netwerk (choroïdale neovascularisatie, CNV) onder de neurale retina. De nieuw
 15 gevormde bloedvaten lekken in sterke mate. Dit leidt tot een accumulatie van subretinaal vocht en bloed die tot verlies aan visuele scherpte leidt. Eventueel is er een totaal verlies aan functionele retina in het gebied dat hierbij betrokken is, naarmate een groot disciform litteken dat choroïden en de retina treft, wordt gevormd. Terwijl droog AMD-patiënten een gezichtsvermogen van afgenomen kwaliteit kunnen behouden re-
 20 sulteert AMD vaak in blindheid (Hamdi & Kenney, *Age-related Macular degeneration - a new viewpoint, Frontiers in Bioscience*, e305-314, mei 2003). CNV geschiedt niet slechts bij de natte AMD, maar tevens in andere oculaire pathologieën, zoals bijvoorbeeld een oculair histoplasmosissyndroom, angiodesrepen, breuken in het membraan van Bruch, myopiedegeneratie, oculaire tumoren en enkele retinale degeneratieve
 25 ziekten.

Verscheidene onderzoeken die uitgevoerd zijn, hebben verscheidene risicofactoren voor AMD bepaald, zoals bijvoorbeeld roken, oud worden, familiegeschiedenis (Milton, *Am J Ophthalmol* 88, 269 (1979); Mitchell et al., *Ophthalmology* 102, 1450-1460 (1995); Smith et al., *Ophthalmology* 108, 697-704 (2001)) geslacht (7-
 30 maal hogere kans bij vrouwen: Klein et al., *Ophthalmology* 99, 933-943 (1992) en ras (blanken zijn meer vatbaar). Additionele risicofactoren kunnen oogkenmerken, zoals verziendheid (hyperopia) en lichtgekleurde ogen, alsmede cardiovasculaire ziekte en

hypertensie omvatten. Bewijs van genetische betrokkenheid in de progressie van het optreden van de ziekte is eveneens gedocumenteerd (zie Hamdi & Kenney hierboven).

Twee firma's, Acuity Pharmaceuticals en Sirna Therapeutics, hebben recentelijk beide een IND ingediend voor siRNA-moleculen die VEGF respectievelijk VEGF-R1 (Flt-1) remmen, ter behandeling van AMD. Deze moleculen worden Cand5-inhibitor en respectievelijk 027-inhibitor genoemd.

Microvasculaire aandoeningen

Microvasculaire aandoeningen zijn samengesteld uit een brede groep van aandoeningen die hoofdzakelijk de microscopische capillairen en lymfatica beschadigen en derhalve buiten het domein van de rechtstreekse chirurgische interventie vallen. De microvasculaire ziekte kan breed gegroepeerd zijn in de vasospastische, de vasculitische en de lymfatische occlusieve ziekte-toestand. Bovendien hebben vele van de bekende vasculaire ziekte-toestanden een microvasculair element dat hiermee geassocieerd is.

- Vasospastische ziekte - Vasospastische ziekten zijn een groep van betrekkelijk gebruikelijke ziekte-toestanden waarbij om onbekende oorzaken, de perifere vasoconstrictieve reflexen hypersensitief zijn. Dit resulteert in een ongeschikte vasoconstrictie en weefselischemie, zelfs tot het bereiken van weefselverlies. Vasospastische symptomen zijn gewoonlijk gerelateerd aan temperatuur of de toepassing van een vibrerende inrichting, maar kunnen secundair zijn aan andere ziekte-toestanden.
- Vasculitische ziekte - Vasculitische ziekten zijn die welke een primair ontstekingsproces in de microcirculatie omvatten. Vasculitisch is gewoonlijk een component van een autoimmuun of bindweefsel-aandoening en is niet-algemeen vatbaar voor chirurgische behandeling, maar vereist een immunosuppressieve behandeling indien de symptomen ernstig zijn.
- Lymfatische occlusieve ziekte - Chronische zwelling van het lagere of bovenste ledemaat (lymfoedema) is het resultaat van een perifere lymfatische occlusie. Dit is een betrekkelijk zeldzame ziekte-toestand die een groot aantal oorzaken heeft die soms erfelijk en soms verworven zijn. De hoofdbehandelingswijzen zijn de op de juiste wijze aangebrachte drukverbanden en de toepassing van intermitterende drukapparaten.

Microvasculaire pathologieën die met diabetes geassocieerd zijn

Diabetes is de hoofdoorzaak van blindheid, de hoofdoorzaak van amputaties en impotentie, en één van de meest frequent optredende chronische ziekten in de kinderjaren. Diabetes is tevens de hoofdoorzaak van de eindstadiumnierziekte in de Verenigde Staten met een prevalentiepercentage van 31% vergeleken met andere ziekten van de nieren. Diabetes is tevens de meest frequente indicatie voor niertransplantatie die verantwoordelijk is voor 22% van alle transplantatie-ingrepen.

In het algemeen kunnen diabetische complicaties breed worden geclassificeerd als microvasculaire of macrovasculaire ziekte. Microvasculaire complicaties omvatten neuropathie (schade aan de zenuwen), nefropathie (nierziekte) en aandoeningen van het gezichtsvermogen (bijvoorbeeld retinopathie, glaucoma, cataract en corneale ziekte). In de retina, glomerulus en vasa nervorum, kenmerken vergelijkbare pathofysiologische kenmerken diabetesspecifieke microvasculaire ziekte.

Microvasculaire pathologieën die met diabetes geassocieerd zijn, zijn gedefinieerd als een ziekte van de kleinste bloedvaten (capillairen) die bijvoorbeeld bij mensen kunnen optreden, die reeds lang aan diabetes lijden. De wanden van de vaten worden abnormaal dik, maar zijn zwak. Derhalve bloeden zij, proteïne lekt hieruit en de bloedstroom door het lichaam wordt vertraagd.

Klinische en diermodeldata geven aan dat chronische hyperglycemie de centraal initiërende factor is voor alle typen diabetische microvasculaire ziekte. Duur en omvang van hyperglycemie zijn beide sterk gecorreleerd met de mate en graad van progressie van de diabetische microvasculaire ziekte. Ofschoon alle diabetische cellen blootgesteld worden aan verhoogde plasmaglucosespiegels, is de hyperglycemische schade tot deze celtypen (bijvoorbeeld endotheliale cellen) beperkt die intracellulaire hyperglycemie ontwikkelen. Endotheliale cellen ontwikkelen intracellulaire hyperglycemie omdat zij, anders dan vele andere cellen, glucosetransport niet benedenwaarts kunnen reguleren wanneer zij aan extracellulaire hyperglycemie blootgesteld worden. Dat intracellulaire hyperglycemie noodzakelijk en voldoende is voor de ontwikkeling van een diabetische pathologie is verder bewezen door het feit dat overexpressie van het GLUT1-glucosetransportmiddel in mesangiale cellen gekweekt in een normaal glucosemedium het diabetische fenotype nabootst, waardoor dezelfde toename in colla-

geen Type IV, collageen Type I en fibronectinegenexpressie als diabetische hyperglycemie geïnduceerd worden.

Abnormale endotheliale celfunctie: Vroeg tijdens het verloop van diabetes mellitus voordat structurele veranderingen duidelijk zijn, veroorzaakt hyperglycemie abnormaliteiten in de bloedstroom en vasculaire permeabiliteit in de retina, glomerulus en perifere zenuw vasa nervorum. Van de toename in de bloedstroom en intracapillaire druk wordt gedacht dat deze de hyperglycemiegeïnduceerde afgenomen stikstofoxide (NO)-productie aan de aanvoerszijde van capillaire bedden en mogelijk een verhoogde gevoeligheid voor angiotensine II, weergeeft. Ten gevolge van een verhoogde intracapillaire druk en endotheliale celdysfunctie, vertonen retinale capillairen een verhoogde lekkage van fluoresceïne en glomerulaire capillairen hebben een verhoogde albumineafscheidingssnelheid (AER). Vergelijkbare veranderingen treden in het vasa vasorum van de perifere zenuw op. Vroeg tijdens het verloop van diabetes is een verhoogde permeabiliteit omkeerbaar; na verloop van tijd wordt dit echter onomkeerbaar.

Verhoogde vaatwandproteïneaccumulatie

Het gemeenschappelijke pathofysiologische kenmerk van de diabetische microvasculaire ziekte is de progressieve vernauwing en uiteindelijke occlusie van vasculaire lumina, die in een niet-adequate perfusie en functie van de beschadigde weefsels resulteert. Vroege door hyperglycemie geïnduceerde microvasculaire hypertensie en een verhoogde vasculaire permeabiliteit dragen bij tot onomkeerbare microvaatocclusie via drie processen:

- Het eerste is een abnormale lekkage van perijoodzuur-Schiff-(PAS)-positieve koolhydraat bevattende plasmaproteïnen die in de capillaire wand afgezet worden en die perivasculaire cellen, zoals pericyten en mesangiale cellen kunnen stimuleren ter productie van groeifactoren en extracellulaire matrix.
- Het tweede is extravasatie van groeifactoren, zoals transformerende groeifactor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), die de overproductie van extracellulaire matrixcomponenten stimuleert en apoptose in bepaalde complicatierelevante celtypen kunnen induceren.
- Het derde is de door hypertensie geïnduceerde stimulatie van pathologische genexpressie door endotheliale cellen en hulpcellen die glut-1 glucosedragers, groeifactoren, groeifactorreceptoren, extracellulaire matrixcomponenten en adhesie-

moleculen die circulerende leukocyten kunnen activeren, omvatten. De waarneming dat unilaterale reductie in de ernst van de diabetische microvasculaire ziekte aan de zijde met optalmische of renale vaatstenosis optreedt is in overeenstemming met dit concept.

5

Microvasculair celverlies en vaatocclusie

De progressieve vernauwing en occlusie van diabetische microvasculaire lumina gaan tevens gepaard met microvasculair celverlies. In de retina induceert diabetes mellitus de geprogrammeerde celdood van Müller-cellen en ganglioncellen, pericyten en endotheliale cellen. In de glomerulus wordt de afnemende renale functie geassocieerd met de breed voorkomende capillaire occlusie en podocytenverlies, maar de mechanismen die aan glomerulair celverlies ten grondslag liggen zijn nog niet bekend. In het vasa nervorum treden endotheliale cel- en pericytdegeneratie op en deze microvasculaire veranderingen schijnen aan de ontwikkeling van diabetische perifere neuropathie vooraf te gaan. De multifocale verdeling van axonale degeneratie in diabetes ondersteunt een causale rol voor microvasculaire occlusie, maar kunnen door hyperglycemie geïnduceerde afnamen in neurotrofinen bijdragen tot het verhinderen van normale axonale reparatie en regeneratie.

Een ander gemeenschappelijk kenmerk van de diabetische microvasculaire ziekte wordt hyperglycemisch geheugen of de persistentie of progressie van door hyperglycemie geïnduceerde microvasculaire veranderingen tijdens hierop volgende perioden van normale glucosehomeostasis, genoemd. Het meest frappante voorbeeld van dit verschijnsel is de ontwikkeling van ernstige retinopathie in histologisch normale ogen van diabetische honden die geheel optrad tijdens een 2 ½ jaar durende periode van genormaliseerd bloedglucose na een periode van 2 ½ jaar hyperglycemie. Door hyperglycemie geïnduceerde toenames in de geselecteerde matrixgentranscriptie blijft tevens gedurende weken voortduren na herstel van normoglycemie *in vivo* en een minder uitgesproken, maar kwalitatief vergelijkbare, verlenging van door hyperglycemie geïnduceerde toename in geselecteerde matrixgentranscriptie treedt in gekweekte endotheliale cellen op.

Voor verdere informatie zie “Shared pathophysiologic features of microvascular complications of diabetes” (Larsen: Williams Textbook of Endocrinology, 10^{de} druk, copyright © 2003 Elsevier).

Microvasculaire complicaties treden niet slechts op in duidelijke diabetes, maar is tevens te wijten aan de verminderde glucosetolerantie (IGT). Microvasculaire competenties van IGT: neuropathie, retinopathie en renale microproteïnuria.

5 Diabetische neuropathie.

Diabetische neuropathieën zijn neuropathische stoornissen (perifere zenuw-schade) die met diabetes mellitus geassocieerd zijn. Deze ziekte-toestanden resulteren gewoonlijk van diabetisch microvasculair letsel waarbij kleine bloedvaten betrokken zijn die zenuwen (vasa nervorum) voorzien. Betrekkelijk gebruikelijke ziekte-toestan-
 10 den die geassocieerd kunnen zijn met diabetische neuropathie, omvatten derde zenuw-verlamming; mononeuropathie; mononeuropathische multiplex; diabetische amyotro-
 fie; een pijnlijke polyneuropathie; autonome neuropathie; en thoracoabdominale neuro-
 pathie en de meest gebruikelijke vorm, perifere neuropathie die hoofdzakelijk de voe-
 ten en de benen beschadigen. Er zijn vier factoren die betrokken zijn bij de ontwikke-
 15 ling van diabetische neuropathie: microvasculaire ziekte, gevorderde glucose bevat-
 tende eindproducten, proteïne-kinase C en het polyolpad.

Microvasculaire ziekte in diabetische neuropathie

Vasculaire en neurale ziekten zijn nauw geassocieerd met elkaar en zijn
 20 sterk met elkaar gerelateerd. Bloedvaten hangen van normale zenuwfunctie af en ze-
 nuwen zijn afhankelijk van een adequate bloedstroom. De eerste pathologische veran-
 dering in de microvasculatuur is vasoconstrictie. Naarmate de ziekte voortschrijdt, cor-
 releert de neuronale dysfunctie sterk met de ontwikkeling van vasculaire abnormalitei-
 ten, zoals de capillaire basismembraanverdikking en de endotheliale hyperplasie die
 25 bijdragen tot een verminderde zuurstofspanning en hypoxia. Neuronale ischemie is een
 algemeen aanvaard kenmerk van de diabetische neuropathie. Vasodilatoire middelen
 (bijvoorbeeld angiotensine-converterende enzym-inhibitoren, α_1 -antagonisten) kun-
 nen leiden tot aanmerkelijke veranderingen in de neuronale bloedstroom met de corres-
 ponderende verbeteringen in zenuwgeleidingssnelheden. Dus treedt de microvasculaire
 30 dysfunctie vroeg in diabetes op, loopt parallel met de progressie van de neurale dys-
 functie en kan voldoende zijn om de ernst van de structurele functie te ondersteunen, en
 in diabetische neuropathie waargenomen klinische veranderingen. Perifere neuropathie

(benen), sensorimotorneuropathie is een significante component in de pathogenese van beenzweren in diabetes.

Neuropathie is een gebruikelijke complicatie van diabetes die na verloop van tijd optreedt in meer dan de helft van patiënten met Type 2 diabetes. Zenuwgeleidingsonderzoekingen demonstreren dat neuropathie reeds aanwezig is in 10 tot 18% van de patiënten ten tijde van diabetesdiagnose, hetgeen suggereert dat perifeer zenuwstelsel in de eerdere stadia van de ziekten en met een mildere glycemische disregulering optreedt. Het concept dat neuropathie een vroeg klinisch teken van diabetes is werd meer dan 40 jaar geleden voorgesteld en de meeste onderzoeken rapporteren een associatie tussen IGT en neuropathie. De meest patiënten met IGT en geassocieerde neuropathie hebben een symmetrische, distale sensorische polyneuropathie met een prominente neuropathische pijn. IGT-neuropathie (*Microvascular complications of impaired glucose tolerance - Perspectives in Diabetes*, J. Robinson Singleton, in *Diabetes* 1 december 2003) is fenotypisch vergelijkbaar met de vroege diabetische neuropathie die tevens sensorische symptomen veroorzaakt, waaronder pijn en een autonome dysfunctie. In een overzichtstudie van 669 patiënten met een vroege diabetische neuropathie waren sensorische symptomen aanwezig in meer dan 60%, impotentie in ca. 40% en andere autonome betrokkenheid in 33%, maar bewijs van motorische betrokkenheid in slechts 12%. Deze klinische bevindingen suggereren een prominente vroege betrokkenheid van de kleine niet-gemyelineerde zenuwvezels die pijn, temperatuur en autonome signalen dragen. Rechtstreekse kwantificering van niet-gemyelineerde intra-epidermale zenuwvezels afkomstig van huidbiopsieën laat een vergelijkbaar vezelverlies en een gewijzigde morfologie in patiënten met neuropathie geassocieerd met IGT en vroege diabetes zien.

Een autonome dysfunctie, in het bijzonder een erectiele dysfunctie en gewijzigde cardiale vagale respons zijn gebruikelijke vroege kenmerken van neuropathisch letsel in diabetes. Werk met IGT-patiënten suggereert tevens een prevalentie van vagale dysautonomia: afzonderlijke onderzoeken hebben een abnormaal hartsnelheidsherstel na oefening, een verminderde R-R-intervalvariabiliteit ten aanzien van diep ademen en een gereduceerde expiratie- tot inspiratieverhouding (alle zijn maten van vagale dysautonomia) in een grotere fractie van IGT-patiënten dan normoglycemische controlepatiënten met een overeenkomstige leeftijd, zien.

Zenuwschade in diabetes beïnvloedt de motorische, sensorische en autonome vezels. Motorische neuropathie veroorzaakt spierzwakte, atrofie en paresis. Sensorische neuropathie leidt tot verlies aan de beschermende sensaties van pijn, druk en hitte. De afwezigheid van pijn leidt tot vele problemen in de ongevoelige voet, waaronder zweervorming, niet-waargenomen traumata en Charcot-neuroartropathie. De patiënt zou mogelijkerwijze niet om behandeling vragen tot het tijdstip nadat de wond in een vergevorderd stadium voorkomt. Een combinatie van sensorische en motorische dysfunctie kan er de oorzaak van zijn dat de patiënt een abnormale belasting legt op de voet hetgeen resulteert in traumata die tot infectie kunnen leiden. Autonome sympathetische neuropathie veroorzaakt vasodilatatie en een verminderd zweten hetgeen resulteert in warme, zeer droge voeten die in het bijzonder de neiging hebben tot huidafbraak alsmede functionele veranderingen in de microvasculaire stroom. Autonome dysfunctie (en ontzenuwing van dermale structuren) resulteert tevens in het verlies aan huidintegriteit hetgeen een ideale plaats voor microbiële invasie verschaft. De neuropathische voet vormt niet spontaan zweren, maar is eerder de combinatie van enige vorm van trauma geassocieerd met neuropathie.

Microvasculaire dysfunctie treedt vroeg in diabetes op, loopt parallel met de progressie van neurale dysfunctie en kan voldoende zijn om de ernst van structurele, functionele en klinische veranderingen die in diabetische neuropathie waargenomen worden, te ondersteunen.

Vergevorderde glucose bevattende eindproducten - Verhoogde intracellulaire niveaus van glucose veroorzaken een niet-enzymatische covalente binding met proteïnen, die hun structuur verandert en hun functie vernietigt. Bepaalde van deze glucose bevattende proteïnen zijn betrokken in de pathologie van diabetische neuropathie en andere lange-termijncomplicaties van diabetes.

Proteïne kinase C (PKC) - PKC is betrokken bij de pathologie van diabetische neuropathie. Verhoogde spiegels van glucose veroorzaken een toename in intracellulaire diacylglycerol die PKC activeert. PKC-inhibitoren in diermodellen zullen zenuwgeleidingsnelheid verhogen door een verhoging van de neuronale bloedstroom.

30

Sensorimotorische polyneuropathie

Langere zenuwvezels worden in grotere mate beïnvloed dan de korte omdat zenuwgeleidingsnelheid evenredig met de zenuwlengte vertraagd wordt. In dit syn-

droom treden een verlaagd gevoel en verlies aan reflexen eerst in de tenen bilateraal op en breidt zich in bovenwaartse richting uit. Het wordt gewoonlijk beschreven als de zogenoemde “handschoenverdeling” van ongevoeligheid, verlies aan sensorische eigenschappen, dysesthesia en pijn gedurende de nacht. De pijn kan ondervonden worden als verbranding, steken, jeuk of sloomheid. Het gevoel van naalden en pinnen is gebruikelijk. Verlies aan proprioceptie, dat wil zeggen het gevoel dat het lid of ledemaat in de ruimte ligt is eerder aangetast. Deze patiënten hebben niet het gevoel wanneer zij op een vreemd lichaam, zoals bijvoorbeeld een splinter stappen, dan wel wanneer zij een eeltplek ontwikkelen door een schoen die niet past. Dientengevolge lopen zij het risico zweren en infecties aan de voeten en benen te ontwikkelen die tot amputatie kunnen leiden. Op vergelijkbare wijze kunnen deze patiënten een aantal fracturen van de knie, enkel of voet ontwikkelen en ontwikkelen een Charcot-gewricht. Verlies aan motorfunctie resulteert in dorsiflexiecontracturen van de tenen, de zogenoemde hamertenen. Deze contracturen treden niet slechts in de voet, maar tevens in de hand op.

Autonome neuropathie

Het autonome zenuwstelsel is samengesteld uit zenuwen die het hart, het maagdarmkanaal en het urinaire systeem bedienen. Autonome neuropathie kan één of meer van deze orgaansystemen aantasten. De meest erkende autonome dysfunctie in diabetici is de orthostatische hypotensie dan wel de onplezierige sensatie van flauwvallen wanneer een patiënt opstaat. In het geval van de diabetische autonome neuropathie is deze te danken aan het hartfalen en het falen van de bloedvaten bij het op geschikte wijze instellen van het hartritme en vasculaire spanning om het bloed continu te laten stromen en het volledig naar de hersenen te laten stromen. Dit symptoom is gewoonlijk vergezeld met een verlies van sinusademhalingsvariatie, dat is de gebruikelijke verandering in hartritme gezien met een abnormaal ademen. Wanneer deze twee vindingen aanwezig zijn is een cardiale autonome neuropathie aanwezig.

Maagdarmkanaalverschijnselen omvatten een vertraagd leegmaken van de maag, gastroparesis, nausea, opgeblazen gevoel en diarree. Omdat vele diabetici orale medicatie voor hun diabetes innemen is de absorptie van deze geneesmiddelen sterk beïnvloed door het vertraagd leegmaken ofwel leeg worden van de maag. Dit kan leiden tot hypoglycemie wanneer een oraal diabetisch middel voorafgaande aan de maal-

tijd wordt ingenomen en tot uren hierna of soms dagen hierna niet geabsorbeerd raakt, wanneer er reeds een normale of lage bloedsuikerspiegel heerst. Trage beweging van de dunne darm kan een overproductie van bacteriën veroorzaken die verergerd wordt door de aanwezigheid van hyperglycemie. Dit leidt tot een gevoel van opgeblazen zijn, gas en diarree.

Urinaire symptomen omvatten urinaire frequentie, urgentie, incontinentie en retentie. Wederom omdat de retentie van zoete urine, zijn urinaire stelselinfecties zeer frequent. Urinaire retentie kan leiden tot blaasdiverticula, stenen en refluxnephropathie.

Craniale neuropathie

Wanneer craniale zenuwen aangetast zijn, zijn oculomotor (3^{de})-neuropathieën zeer gebruikelijk. De oculomotorische zenuw beheerst alle spieren die het oog in beweging brengen met uitzondering van de laterale rectus en de bovenste dwarsspieren.

Het dient tevens tot de constrictie van de pupil en het openen van het ooglid. Het begin van een diabetische derde zenuwpalsie is gewoonlijk abrupt, beginnende met een frontale of periorbitale pijn en vervolgens diplopia. Al deze oculomotorische spieren die gestimuleerd worden door de derde zenuw kunnen worden aangetast, behalve die welke de grootte van de pupil beheersen. De zesde zenuw, de abducenszenuw, die de laterale rectusspier van het oog stimuleert (het oog lateraal in beweging brengt) is tevens gewoonlijk aangetast, maar de vierde zenuw, de trochlea-zenuw- (stimuleert de bovenste dwarsspier die het oog naar beneden toe in beweging brengt) betrokkenheid is ongebruikelijk. Mononeuropathieën van de thorax of lumbale ruggenmergzenuwen kunnen optreden en leiden tot pijnlijke syndromen die het myocardiale infarct, cholecystitis of appendicitis nabootsen. Diabetici hebben een hogere incidentie van vang-neuropathieën, zoals het carpaaltunnelsyndroom.

Diabetische ledemaatschemie en diabetische voetzweren

Diabetes en druk kunnen de microvasculaire circulatie nadelig beïnvloeden en leiden tot veranderingen in de huid op de lagere extremiteiten die op hun beurt tot zweervorming en hierop aansluitende infectie kunnen leiden. Microvasculaire veranderingen leiden tot ledemaatspiermicroangiopathie alsmede een predispositie tot de ontwikkeling van perifere ischemie en een verminderde angiogenesecompensatoire respons op ischemische gebeurtenissen. Microvasculaire pathologie verergert de perifere vasculaire ziekte (PVD), ofwel perifere arteriële ziekte (PAD) dan wel lagere extremitatarteriële ziekte (LEAD)- een MACRO-vasculaire complicatie - vernauwing van de vaten in de benen die te wijten is aan artherosclerosis. PVD treedt eerder op in diabetici, is meer ernstig en is breed verspreid en omvat tevens bijkomende microcirculatorische problemen die de benen, ogen en nieren beschadigen.

Voetzweren en gangreen zijn vaak comorbide ziekte-toestanden van PAD. Hiermee gepaard gaande perifere neuropathie met een verminderd gevoel maakt de voet vatbaar voor traumata, zweervorming en infectie. De progressie van PAD in diabetes is samengesteld uit een dergelijke comorbiditeit als perifere neuropathie en ongevoeligheid van de voet en lager gelegen extremiteiten voor pijn en traumata. Met een verminderde circulatie en een verminderd gevoel treden zweervorming en infectie op. Progressie tot osteomyelitis en gangreen kunnen een amputatie noodzakelijk maken.

Personen met diabetes zijn tot 25 maal meer vatbaar dan niet-diabetische personen voor het ondergaan van een amputatie van een lager ledemaat, hetgeen de noodzaak onderstreept van de preventie van voetzweren en een hierop aansluitend verlies van een ledemaat.

Diabetische voetzweren kunnen niet slechts optreden in samenhang met PAD, maar kunnen tevens geassocieerd zijn met neuropathie, vaatinsufficiëntie (varicose vaten), traumata en infectie. PAD draagt bij tot deze andere ziekte-toestanden bij het produceren of versnellen van het voorkomen van voetzweren. Voetzweren vertegenwoordigen niet noodzakelijk een progressie van de PAD aangezien zij kunnen optreden bij aanwezigheid van adequate klinische perifere arteriële perfusie. Op patiënten gebaseerde onderzoeken geven een verhoogd risico van voetzweren in diabetische patiënten aan, die een perifere neuropathie en een hoge voetbeddruk aan. De prevalentie van een geschiedenis van zweren of wonden aan de voet of enkels was 15% van alle diabetische patiënten in het op populatie gebaseerde onderzoek in zuidelijk Wisconsin. De preva-

lentie was hoger voor diabetische patiënten die op een leeftijd lager dan 30 jaar gediagnosticeerd waren, was enigszins hoger in mannen (16%) dan in vrouwen (13%) en was groter in met insuline behandelde diabetische patiënten (17%) dan in patiënten die geen insuline innemen (10%). De prevalentie nam met de leeftijd toe, in het bijzonder in

5 diabetische patiënten die op een leeftijd beneden de 30 jaar gediagnosticeerd waren. In patiëntenonderzoekingen uit Europa was de prevalentie van voetzweren in diabetische patiënten 3% in patiënten die minder dan 50 jaar oud waren, 7% in patiënten die jonger waren dan 60 jaar en 14% in de patiënten die jonger waren dan 80 jaar. Prevalentie was groter in mannen dan in vrouwen in de leeftijd van 70 jaar.

10 In diabetische patiënten waren voetschemie en -infectie ernstige en zelfs levensbedreigende gebeurtenissen; echter is neuropathie de meest moeilijk te behandelen ziekte-toestand. De medische en chirurgische literatuur met betrekking tot alle aspecten van de klinische en pathologische manifestaties van de diabetische voet is overweldigend. Neuropathie, angiopathie, retinopathie en nefropathie alleen of in combinatie

15 tie en in verschillende graden van ernst kunnen de behandeling van de diabetische voet beïnvloeden.

Elk jaar worden 82.000 amputaties van de ledematen uitgevoerd in patiënten met diabetes mellitus. De meerderheid van deze amputaties worden in de oudere populatie uitgevoerd. Amputaties resulterende van diabetes kunnen optreden afkomstig

20 van een groot aantal etiologieën waaronder voetzweren, ischemie, aderzweren van het been (ofwel de zweren die als bijwerking optreden van veneus reflux) en hielzweren (ofwel die welke resulteren van onbehandelde drukzweren in de hiel). De meerderheid van deze amputaties zijn afkomstig van zweren. De prevalentie van voetzweren onder patiënten met diabetes is 12%. Bovendien, de gedurende 20 jaar cumulerende incidentie van zweren van de lagere extremiteiten in patiënten met Type I diabetes is 9,9%.

25 Door diabetes geïnduceerde ledemaatamputaties resulteren in een 5-jaar mortaliteitspercentage van 39% tot 68% en zijn geassocieerd met een verhoogd risico van additionele amputaties. De duur van het verblijf in een ziekenhuis is ca. 60% langer om de patiënten met diabetische voetzweren vergeleken met die zonder zweren.

30 Diabetische neuropathie vermindert de zenuwasreflex die afhankelijk is van gezonde C-vezelnociceptorfunctie en veroorzaakt lokale vasodilatatie in respons op een pijnlijk stimulus. Deze ziekte-toestand compromitteert verder de vasodilatatoire respons aanwezig in ziekte-toestanden van stress, zoals letsel of ontsteking in de diabetische

neuropathische voet. Deze verslechtering kan tendele verklaren waarom enkele zweren in de diabetische neuropathische voet langzaam helen dan wel helemaal niet helen ondanks een succesvolle revascularisatie van de lagere uiteinden.

Het meest gebruikelijke causale pad tot diabetische voetzweervorming kan
5 dus worden geïdentificeerd als de combinatie van neuropathie (gevoelverlies), deformatie (bijvoorbeeld prominente metatarsale hoofden), en traumata (bijvoorbeeld slecht passend schoeisel).

De meeste chirurgen geven de voorkeur een popliteale of tibiale arteriële bypass uit te voeren vanwege lagere percentages redding van de ledemaat en duidelijk-
10 heid vergeleken met andere proximale procedures. Indien popliteale of tibiale arteriële bypass niet in staat is om een tastbare voetpuls te herstellen, is een pedale bypass gerapporteerd waarbij een meer duurzame en effectieve procedure voor het redden van de ledemaat verschaft wordt voor patiënten met diabetes en wonden van de ischemische voet. Zelfs een uitgebreide multisegment occlusieve ziekte in patiënten met diabetes
15 vertegenwoordigt niet een belemmering voor het redden van de voet. Hoewel ernstige wondcomplicaties desastreuze resultaten kunnen hebben zijn zij ongebruikelijk na een pedale bypasstransplantatie. Adequate controle van bestaande voetinfectie en een zorgvuldige transplantatietunneling zijn werkzaam gebleken bij het vermijden van verdere complicaties. Angioplastie in de lagere extremititeit wordt steeds meer progressief toe-
20 gepast. Echter dient onderstreept te worden dat voor het verkrijgen van een werkzame angioplastie een distaal vat of voedingvat open moet zijn indien men een succesvolle meer proximale angioplastie wenst te bereiken.

Terwijl diabetische zweren/ledemaatpathologieën in enkele patiënten beheerst kunnen worden (door uitsnijden voor verbranding, antibiotische behandeling,
25 toepassing van preparaten ter stimulering van granuleringsweefsel (nieuw collageen en angiogenese) en reductie van bacteriële belasting in de wond), zou het van voordeel kunnen zijn een farmaceutisch preparaat te hebben dat beter in staat zou zijn deze ziekte toestanden te behandelen en/of de symptomen te verlichten.

Voor verdere informatie zie American Journal of Surgery, band 187, nummer 5 Suppl I, 1 mei 2004, copyright © 2004 Elsevier.
30

Coronaire microvasculaire dysfunctie in diabetes

De correlatie tussen histopathologie en microcirculatorische dysfunctie in diabetes is bekend uit oude experimentele onderzoeken en uit de autopsie, waarbij verdikking van het basale membraan, perivasculaire fibrosis, vasculaire rareficatie en capillaire hemorrhagie vaak gevonden worden. Het blijft moeilijk deze data *in vivo* te bevestigen ofschoon een recente publicatie een correlatie demonstreerde tussen pathologie en oculaire microvasculaire dysfunctie (Am J Physiol 2003;285). Een groot aantal klinische onderzoeken indiceren echter dat niet slechts open diabetes, maar tevens een verslechterde metabolische controle de coronaire microcirculatie kan beïnvloeden (Hypert Res 2002;25:893). Werner verwees naar de belangrijke publicatie door Sambuceti et al. (Circulation 2001;104:1129) die de persistentie laat zien van de microvasculaire dysfunctie in patiënten na het succesvolle heropenen van het met het infarct geassocieerde bloedvat en dat de verhoogde cardiovasculaire morbiditeit en mortaliteit in deze patiënten verklaren kan. Er is toenemend bewijs uit grote acute reperfusie-onderzoeken dat morbiditeit en mortaliteit niet geassocieerd zijn met het heropenen zelf van het met het infarct gerelateerde vat, maar veel meer afhankelijk is van de TIMI-stroom +/- myocardiaal blush (Stone 2002; Feldmann Circulation 2003). Herrmann onder anderen gaf aan dat de integriteit van de coronaire microcirculatie waarschijnlijk de meest belangrijke klinische en voorspellende factor is in deze context (Circulation 2001). Het neutrale effect van beschermingsapparaten (geen relevante verandering voor TIMI-stroom, voor ST-resolutie of voor MACE) kan een indicatie zijn dat een functionele verslechtering van de microcirculatie de hoofdbepalende factor is van prognose. Er bestaat tevens een toenemend bewijs dat coronaire microvasculaire dysfunctie een hoofdrol speelt in niet-obstructieve CAD. Coronaire endotheliale dysfunctie blijft een sterke prognosevoorspeller in deze patiënten.

Diabetische nefropathie (renale dysfunctie in patiënten met diabetes)

Diabetische nefropathie omvat microalbuminuria (een microvasculair ziekte-effect), proteïnuria en ESRD. Diabetes is de meest gebruikelijke oorzaak van nierfalen, verantwoordelijk voor meer dan 40% van nieuwe gevallen. Zelfs wanneer geneesmiddelen en dieet in staat zijn tot het beheersen van diabetes kan de ziekte leiden tot nefropathie en nierfalen. De meeste mensen met diabetes ontwikkelen geen nefropathie die ernstig genoeg is om nierfalen te veroorzaken. Ongeveer 16 miljoen mensen

in de Verenigde Staten hebben diabetes en ongeveer 100.000 mensen lijden aan nierfalen ten gevolge van diabetes.

Diabetische retinopathie

5 In de diabetische toestand leidt hyperglycemie tot een verminderde retinale bloedstroom, retinale hyperpermeabiliteit, vertragingen in de fotoreceptorzenuwgeleiding en retinale neuronale celdood. In kortdurende diabetes is neuronale celdood geïdentificeerd binnen de inwendige kernlaag van de retina. Specifiek is apoptose gelokaliseerd aan gliale cellen, zoals Müller-cellen en astrocyten en bleek op te treden
10 binnen één maand van diabetes in het door STZ geïnduceerde diabetische ratmodel. De oorzaak van deze gebeurtenissen is multifactorieel waaronder activering van het diacylglycerol/PKC-pad, oxidatieve belasting en niet-enzymatische glycosylering. De combinatie van deze gebeurtenissen maakt de retina hypoxisch en leidt uiteindelijk tot de ontwikkeling van diabetische retinopathie. Eén mogelijk verband tussen retinale
15 ischemie en de vroege veranderingen in de diabetische retina is de door hypoxia geïnduceerde productie van groeifactoren, zoals VEGF. De hoofdregulator van de hypoxische respons is geïdentificeerd als hypoxia-induceerbare factor-1 (HIF-1) die genen controleert welke cellulaire proliferatie en angiogenese reguleren. Eerdere onderzoeken hebben gedemonstreerd dat inhibitie van HIF-1-ubiquitinatie leidt tot
20 binding met hypoxiaresponsafgevend elementen (HRE) en productie van VEGF-mRNA.

Diabetische retinopathie wordt gedefinieerd als de progressieve dysfunctie van de retinale vasculatuur die veroorzaakt is door chronische hyperglycemie. Sleutelkenmerken van diabetische retinopathie omvatten microaneurysmen, retinale hemorrhagieën, retinale lipide-exudaten, katoen-wol-vlekken, capillaire nonperfusie, maculair
25 oedeem en neovascularisatie. Geassocieerde kenmerken omvatten vitreuze hemorrhagie, retinaal losraken, neovasculaire glaucoma, prematuur cataract en craniale zenuwverlammingen.

Er zijn 16 miljoen mensen in de Verenigde Staten met Type 1 en Type 2 diabetes. Binnen 15 jaar hebben 80% van Type 1 patiënten diabetische retinopathie ontwikkeld, terwijl 84% van Type 2 diabetische patiënten binnen 19 jaar retinopathie ontwikkelen.
30 Deze aantallen vormen een significante markt voor therapeutische middelen die gericht zijn op oculaire ziekten van neovasculatuur. De ontwikkeling van diabetische retino-

pathie is tijdsafhankelijk. Ondanks een optimale bloedsuikercontrole wordt van patiënten die langdurig ziek zijn verwacht dat zij uiteindelijk enige vorm van retinopathie ontwikkelen. De National Society ter voorkoming van blindheid heeft geschat dat 4 tot 6 miljoen diabetici in de Verenigde Staten diabetische retinopathie hebben. De geschatte jaarlijkse incidentie van nieuwe gevallen van *proliferatieve diabetische retinopathie* en *diabetisch maculair oedeem* zijn 65.000 respectievelijk 75.000 met een prevalentie van 700.000 respectievelijk 500.000. Diabetische retinopathie veroorzaakt 12.000 tot 24.000 nieuwe gevallen van blindheid elk jaar in de Verenigde Staten. Retinopathie wordt behandeld door middel van chirurgische methoden die werkzaam zijn bij het reduceren van ernstig verlies aan gezichtsvermogen, maar de met laser behandelde gedeelten van de retina zijn onomkeerbaar vernietigd. Er zijn geen beschikbare behandelingen met een geneesmiddel.

Een microvasculaire ziekte die primair de capillairen beschadigt, diabetes mellitus beschadigt het oog door vernietiging van de vasculatuur in de conjunctiva, retina en het centrale zenuwstelsel. Patiënten kunnen met voorgeschiedenissen van langdurig geïnjecteerde conjunctivae van de oogbol tezamen met systemische klachten van gewichtsverlies ondanks een grotere dan normale eetlust (polyfasia), abnormale dorst (polydypsia) en abnormaal frequent urineren (polyuria) vertonen.

Een fluctuerende visuele scherpte die ondergeschikt is aan een niet-stabiele bloedsuikerspiegel is een gebruikelijk oculair teken. Een zwelling binnen de kristallijne lens resulteert in grote plotselinge verschuivingen in refractie alsmede een premature cataractvorming. Veranderingen in visuele scherpte zal van de ernst en het stadium van de ziekte afhankelijk zijn.

In de retina kan verzwakking van de arteriolen en capillairen resulteren in het kenmerkende verschijnen van een intraretinaal punt en blothemorrhagieën, exudaten, intraretinale microvasculaire abnormaliteiten (IRMA) microaneurysma, oedeem en katoen-wol-infarcten. Proliferatieve diabetische retinopathie is het resultaat van ernstige vasculaire deficiëntie en is zichtbaar als neovascularisatie van de schijf (NVD), neovascularisatie elders (NVE) en neovascularisatie van de iris (NVI of rubeosis irides). Neurologische complicaties omvatten verlammingen van de derde, vierde en zesde craniale zenuwen alsmede diabetische papillitis en gezichtszenuwverlamming.

Diabetes mellitus is een genetisch beïnvloede groep van ziekten die glucose-intolerantie delen. Deze wordt gekenmerkt als een stoornis van de metabolische regulering ten gevolge van een deficiënte of slecht functionerende insuline of deficiënte dan wel slecht functionerende cellulaire insulinereceptoren.

5 Biochemie die de vorming van sorbitol omvat, speelt een rol in de destructie van pericyten, die cellen zijn welke het vasculaire endothelium steunen. Naarmate de ondersteunende pericyten sterven wordt het capillaire endothelium beschadigd, hetgeen resulteert in het vasculair lekken van bloed, proteïne en lipide. Dit in combinatie met verdikt, glucose bevattend bloed, produceert een vasculaire
10 insufficiëntie, capillaire non-perfusie, retinale hypoxia, veranderde structuur en een verminderde functie. De vorming en afgifte van vasoproliferatieve factoren die een rol spelen in de genese van retinale neovascularisatie zijn in onvoldoende mate begrepen.

De meeste bedreigende gevolgen van diabetes die niet op het gezichtsvermogen betrekking hebben verdwijnen spontaan na verloop van weken tot
15 maanden na medische controle. In gevallen waarbij er grote refractieve veranderingen zijn kunnen patiënten een tijdelijk voorschrift voor een bril nodig hebben totdat de refractie stabiliseert. Wanneer retinopathie de macula bedreigt of wanneer nieuwe bloedvaten prolifereren kan de patiënt worden verwezen voor een fotocoagulatie met behulp van een laser. Het diabetische retinopathieonderzoek (DRS) heeft beslist bewezen dat
20 panretinale fotocoagulatie succesvol was in het reduceren van het risico van ernstig verlies aan gezichtsvermogen in hoog-risicopatiënten. Het definieerde de hoog-risico-kenmerken als: (1) neovascularisatie van de optische schijf (NVD) een vierde tot een derde van een schijfdiameter in afmeting en (2) neovascularisatie elders (NVE) met enige vitreuze hemorrhagie.

25

Diabetisch Maculair Oedeem (DME)

DME is een complicatie van diabetische retinopathie, een ziekte die de bloedvaten van de retina beschadigt. Diabetische retinopathie resulteert in een aantal afwijkingen in de retina waaronder retinale verdikking en oedeem, hemorrhagieën,
30 verminderde bloedstroom, overmatige lekkage van vloeistof uit bloedvaten en in de laatste stadia abnormale bloedvatgroei. Deze bloedvatgroei kan leiden tot grote hemorrhagieën en ernstige retinale beschadiging. Wanneer de bloedvatlekkage van diabetische retinopathie zwelling in de macula veroorzaakt wordt het aangeduid met DME.

Het hoofdsymptoom van DME is een verlies van centraal gezichtsvermogen. Risicofactoren geassocieerd met DME omvatten onvoldoende gecontroleerde bloedglucose-spiegels, een hoge bloeddruk, een abnormale nierfunctie, die vloeistofretentie, hoge cholesterolspiegels en andere algemene systemische factoren veroorzaken.

- 5 Volgens de wereldgezondheidsorganisatie is de diabetische retinopathie de hoofdoorzaak van blindheid in volwassenen die werkzaam zijn en een hoofdoorzaak van verlies aan gezichtsvermogen bij diabetici. De Amerikaanse diabetesassociatie rapporteert dat er ca. 18 miljoen diabetici in de Verenigde Staten zijn en ca. 1,3 miljoen recentelijk gediagnosticeerde gevallen van diabetes elk jaar in de Verenigde Staten. De
- 10 stichtingen Prevent Blindness America en het Nationale Ooginstituut schatten dat in de Verenigde Staten er meer dan 5,3 miljoen mensen van 18 jaar of ouder zijn met diabetische retinopathie waaronder ca. 500.000 met DME. Het CDC schat dat er ca. 75.000 nieuwe gevallen van DME elk jaar in de Verenigde Staten zijn.

15 **Additionele neuropathieën**

- Behalve diabetes zijn de gebruikelijke oorzaken van neuropathie herpes zoster-infectie, chronische of acute traumata (waaronder chirurgie) en verscheidene neurotoxinen. Neuropathische pijn is gebruikelijk bij kanker als een direct resultaat van kanker op perifere zenuwen (bijvoorbeeld compressie door een tumor) en als bijwerking van vele chemotherapiegeneesmiddelen.
- 20

- Microvasculaire ziekte* - Vasculaire en neurale ziekten zijn nauw verwant met elkaar en hangen met elkaar samen. Bloedvaten zijn afhankelijk van een normale zenuwfunctie en zenuwen zijn afhankelijk van een adequate bloedstroom. De eerste pathologische
- 25 verandering in de microvasculatuur is de vasoconstrictie. Naarmate de ziekte voortschrijdt, correleert neuronale dysfunctie nauw met de ontwikkeling van vasculaire afwijkingen, zoals bijvoorbeeld capillaire basismembraanverdikking en endotheliale hyperplasia die een bijdrage leveren tot een verminderde zuurstofspanning en hypoxia. Vasodilatormiddelen (bijvoorbeeld angiotensine-converterende enzyminhibitoren, α 1-antagonisten) kunnen leiden tot aanzienlijke verbeteringen in neuronale bloedstroom,
- 30 met overeenkomstige verbeteringen in zenuwgeleidingssnelheden.

Klinische verschijnselen

Neuropathie beïnvloedt alle perifere zenuwen: pijnvezels, motorische neuronen, autonome zenuwen. Noodzakelijkerwijze kan deze derhalve alle organen en systemen beïnvloeden aangezien zij alle zenuwen omvatten. Er zijn verscheidene af-
 5 zonderlijke syndromen gebaseerd op de orgaansystemen en leden die beïnvloed worden, maar deze zijn in geen geval uitsluitend. Een patiënt kan een sensorimotorische en autonome neuropathie of elke andere combinatie hebben.

Ondanks vooruitgang in het begrip van de metabolische oorzaken van neuropathie, zijn behandelingen gericht op het onderbreken van deze pathologische
 10 processen beperkt door bijwerkingen en gebrek aan doelmatigheid. Dus zijn behandelingen symptomatisch en zijn niet gericht tot de problemen die hieraan ten grondslag liggen. Middelen tegen pijn veroorzaakt door een sensorimotorische neuropathie omvatten tricyclische antidepressieve middelen (TCA's), serotonineheropname-inhibitoren (SSRI's) en anti-epileptische geneesmiddelen (AED's). Geen van deze middelen keren
 15 de pathologische processen om die tot diabetische neuropathie leiden en geen hiervan verandert het niet-stuïtbare verloop van de ziekte. Dus zou het nuttig zijn om een farmaceutische samenstelling te hebben die deze aandoeningen beter kan behandelen en/of die de symptomen verlicht.

20 **Additionele retinopathieën**

Retinale microvasculopathie (AIDS-retinopathie)

Retinale microvasculopathie wordt in 100% van AIDS-patiënten waargenomen. Het wordt gekenmerkt door intraretinale hemorrhagieën, microaneurysma, Roth-vlekken, katoen-wolvlekken, (micro-infarcten van de zenuwvezellaag) en perivascu-
 25 laire omhulling. De etiologie van de retinopathie is bekend ofschoon men gedacht heeft de deze te wijten was aan circulerende immune complexen, lokale afgifte van cytotoxische stoffen, abnormale hemorheologie en HIV-infectie van endotheliale cellen. AIDS-retinopathie is nu zo gebruikelijk dat katoen-wolvlekken in een patiënt zonder diabetes of hypertensie, maar die een risico lopen voor HIV snel de arts dient te overtuigen om
 30 een virale test in overweging te nemen. Er is geen specifieke behandeling voor AIDS-retinopathie, maar zijn voortdurende aanwezigheid kan een arts stimuleren om de doelmatigheid van de HIV-therapie en het volgen van de behandeling van de patiënt opnieuw te onderzoeken.

Beenmergtransplantatie (MBT) retinopathie

Beenmergtransplantatieretinopathie werd voor het eerst gerapporteerd in 1983. Deze treedt gewoonlijk op binnen zes maanden, maar kan zelfs na 62 maanden na BMT optreden. Risicofactoren, zoals diabetes en hypertensie kunnen de ontwikkeling van BMT - retinopathie door verhoging van de ischemische microvasculopathie bevorderen. Er is geen bekende leeftijds-, geslachts- of rasvoorspelling voor de ontwikkeling van BMT-retinopathie. Patiënten vertonen een verminderde nauwkeurigheid van het gezichtsvermogen en/of een gezichtsveldgebrek. Bevindingen aan het achterste segment zijn gewoonlijk bilateraal en symmetrisch. Klinische verschijnselen omvatten een groot aantal katoen-wolvlekken, telangiëctasia, microaneurysma, maculair oedeem, harde exudaten en retinale hemorrhagieën. Fluoresceïne angiografie demonstreert een capillaire niet-perfusie en afval, intraretinale microvasculaire afwijkingen, microaneurysma en maculair oedeem. Ofschoon de nauwkeurige etiologie van BMT-retinopathie niet ontdekt is, schijnt het beïnvloed te worden door verscheidene factoren: cyclosporinetoxiciteit, totaal-lichaamsbestraling (BTI) en chemotherapeutische middelen. Cyclosporine is een sterk immunomodulerend middel dat transplantaat-versus-gastheer-immune respons onderdrukt. Het kan leiden tot endotheliaal celletsel en neurologische bijwerkingen en ten gevolge hiervan werd gesuggereerd als de oorzaak van BMT-retinopathie. Echter kan BMT-retinopathie in afwezigheid van cyclosporinegebruik zich ontwikkelen en cyclosporine is niet aangetoond als de oorzaak van BMT-retinopathie in autologe of syngenische beenmergrecipiënten. Cyclosporine schijnt derhalve niet de enige oorzaak te zijn van BMT-retinopathie. Totale lichaamsbestraling (TBI) is tevens betrokken als de oorzaak van BMT-retinopathie. Bestraling beschadigt de retinale microvasculatuur en leidt tot ischemische vasculopathie. Variabelen, zoals de totale dosering van bestraling en tijdsinterval tussen bestraling en beenmergablatisatie schijnen belangrijk te zijn. Echter kan BMT-retinopathie in patiënten optreden die geen TBI ontvingen en BMT-retinopathie wordt niet waargenomen in vaste orgaantransplantaatrecipiënten die vergelijkbare doseringen van bestraling ontvingen. Dus is TBI niet de enige oorzaak, maar er is een andere factor die bijdraagt tot de ontwikkeling van BMT-retinopathie. Chemotherapeutische middelen zijn gesuggereerd als een potentiële bijdrageleverende factor in BMT-retinopathie. Geneesmiddelen, zoals cisplatine, carmustine en cyclofosfamide kunnen oculaire bijwerkingen veroorzaken waaronder

papilledema, optische neuritis, visueel veldgebrek en corticale blindheid. Gesuggereerd werd dat deze chemotherapeutische geneesmiddelen patiënten kunnen predisponeren tot door bestraling geïnduceerde retinale beschadigingen en bevorderen het nadelige effect van bestraling. In het algemeen hebben patiënten met BMT-retinopathie een goede prognose. De retinopathie verdwijnt gewoonlijk binnen twee tot vier maanden na het stoppen of verlaging van de dosering van cyclosporine. In één rapport ervoer 69 procent van de patiënten een volledige verdwijning van de retinale bevindingen en 46 procent van de patiënten herstelden volledig hun basislijn visuele scherpte. Vanwege de gunstige prognose en betrekkelijk niet progressieve aard van BMT-retinopathie is een agressieve interventie gewoonlijk niet noodzakelijk.

Ischemische omstandigheden

Ischemie kan worden verdeeld in twee categorieën: de eerste omvat de versnelde atherosclerose die gewoonlijk in patiënten met diabetes optreedt ofwel in de femorale, popliteale en posterieure tibiale aderen. Deze vaten die vaak slechts 1 of 2 cm in diameter zijn kunnen atherosclerotische plaque ontwikkelen die de bloedstroom in ernstige mate doet afnemen. Nadat grote vaten volledig dicht raken kunnen een beroerte, myocardiaal infarct, ischemie en niet-helende diabetische voetzweren optreden. Deze vorm van ischemie is hoofdzakelijk een ziekte van de grote vaten.

Post-beroertedementie

25 Procent van de mensen hebben dementie na een beroerte waarbij vele anderen dementie ontwikkelen na 5 tot 10 jaar. Bovendien ervaren vele personen meer subtiele veranderingen van hun hogere hersenfuncties (zoals het vermogen tot plannen en snelheid van het verwerken van informatie) en lopen een zeer hoog risico van een hierop aansluitende ontwikkeling van dementie. Zeer kleine beroerten in de diepe gedeelten van de hersenen in dit proces (genoemd microvasculaire ziekte) schijnt essentieel te zijn bij het proces dat leidt tot een geïdentificeerd patroon van hersenatrofie dat specifiek is voor post-beroertedementie.

Oculair ischemisch syndroom

Patiënten die lijden aan het oculair ischemische syndroom (OIS) zijn in het algemeen oudere mensen in de leeftijd van 50 tot 80 jaar. Mannelijke personen worden

tweemaal vaker beïnvloed dan vrouwelijke personen. De patiënt is slechts zelden asymptomatisch. Een afgenomen gezichtsvermogen treedt op in 90 procent van de gevallen en 40 procent van de patiënten hebben een hiermee gepaard gaande oogpijn. Er kunnen tevens een bijkomende of geschiedenis in het verleden van overgangsischemische aanvallen of amaurosis fugax bestaan. Patiënten hebben tevens een significante bekende of onbekende systemische ziekte ten tijde van de presentatie. De meest voorkomende systemische ziekten zijn hypertensie, diabetes, ischemische hartziekten, be-
 5 roerte en perifere vaatziekte. In mindere mate manifesteren patiënten OIS als resultaat van reuzencelartritis (GCA).

10 Unilaterale bevindingen zijn aanwezig in 80 procent van de gevallen. Gebruikelijke bevindingen kunnen vergevorderd unilateraal cataract, anterieure segmentontsteking, asymptomatische anterieure kamerreactie, maculair oedeem, gedilateerde, maar niet-kronkelende retinale aderen, middenperifere dot- en blothemorrhagieën, katoen-wolvlekken, exudaten en neovascularisatie van de schijf en retina om-
 15 vatten. Er kunnen ook spontane arteriële pulsatie, verhoogde intraoculaire druk en neovascularisatie van de iris en hoek met neovascuair glaucoma (NVG) bestaan. Hoewel de patiënt een anterieur segmentneovascularisatie kan vertonen, kan oculaire hypotonie optreden die te wijten is aan een lage arteriële perfusie na het ciliaire lichaam. Af en toe is er een retinale embolie (Hollenhorst-plaques) zichtbaar.

20 De bevindingen in OIS worden veroorzaakt door een interne carotide ader-
 artheromateuze zweervorming en stenosis bij de bifurcatie van de gebruikelijke carotide ader. Vijf procent van de patiënten met een inwendige arteriële stenosis ontwikkelen OIS. Echter treedt OIS slechts op indien de stenosisgraad 90 procent overstijgt. Stenosis van de carotide ader reduceert de perfusiedruk naar het oog hetgeen resulteert
 25 in de bovenvermelde ischemische verschijnselen. Wanneer de stenose de 90 procent bereikt valt de perfusiedruk in de centrale retinale ader (CRA) tot slechts 50 procent. Vaak manifesteert zich de gereduceerde arteriële druk als spontane pulsatie van het CRA. De bevindingen zijn variabel en kunnen één of meer van de bovenstaande bevindingen omvatten.

30 Patiënten met OIS hebben een significante systemische ziekte die beoordeeld dient te worden. Cardiale dood is de hoofdoorzaak van mortaliteit in patiënten met OIS - het percentage mortaliteit in vijf jaar is 40 procent. Om deze reden dienen

patiënten met OIS verwezen te worden naar een cardiologist ter uitvoering van een volledige serologie, EKG, ECG en carotide evaluatie.

Microvasculaire ziekten van de nier

De nier is betrokken in een aantal discrete clinicopathologische ziekten die de systemische en renale microvasculatuur beïnvloeden. Enkele van deze ziekte-toestanden zijn gekenmerkt door een primair letsel aan endotheliale cellen, zoals bijvoorbeeld:

- *Hemolytisch-uremisch syndroom (HUS)* en *trombotisch trombocytopenisch purpura (TTP)*. HUS en TTP zijn nauw verwante ziekten, gekenmerkt door microangiopathische hemolytische anemie en een variabele orgaanachteruitgang. Traditioneel wordt de diagnose van HUS gemaakt wanneer renaal falen een predominant kenmerk is van het syndroom zoals gebruikelijk is bij kinderen. In volwassenen komt overwegend neurologische beschadiging voor en het syndroom wordt dan aangeduid met TTP. Trombotische microangiopathie is de hieraan ten grondslag liggende pathologische beschadiging in beide syndromen en de klinische en laboratorium bevindingen bij patiënten met hetzij HUS hetzij TTP overlappen elkaar in sterke mate. Dit heeft verscheidene onderzoekers gestimuleerd tot het beschouwen van de twee syndromen als een continuüm van een enkele ziekte-entiteit.

Pathogenese: Experimentele data suggereren sterk dat endothelial celletsel de primaire gebeurtenis is bij de pathogenese van HUS/TTP. Endotheliale beschadiging zet een cascade gebeurtenissen op gang welke lokale intravasculaire coagulatie, fibrineafzetting en plateletactivering en aggregatie omvat. Het eindresultaat is de histopathologische bevinding van trombotische microangiopathie die gebruikelijk is voor de verschillende vormen van het HUS/TTP-syndroom. Indien HUS/TTP onbehandeld wordt gelaten benadert het mortaliteitspercentage 90%. Ondersteunende therapie waaronder dialyse, antihypertensieve medicaties, bloedtransfusies en beheersing van neurologische complicaties draagt bij tot de verbeterde overleving van patiënten met HUS/TTP. Adequate vloeistofbalans en ingewandennrust zijn belangrijk bij de behandeling van gebruikelijk HUS geassocieerd met diarree.

- *Bestralingsnephritis* - De consequenties op lange termijn van renale bestraling in een hoeveelheid die 2500 rad overstijgt kan in vijf klinische syndromen onderverdeeld worden:

- (i) Acute bestralingsnephritis treedt in ca. 40% van de patiënten op na een latentieperiode van 6 tot 13 maanden. Dit wordt klinisch gekenmerkt door een plotseling begin van hypertensie, proteïnuria, oedeem en een progressief renaal falen in de meeste gevallen leidend tot eindstadium nieren.
- (ii) Chronische bestralingsnephritis heeft omgekeerd een latentieperiode variërende van 18 maanden tot 14 jaar na de initiële belasting. Het is verraderlijk aan het begin en is gekenmerkt door hypertensie, proteïnuria en geleidelijk verlies aan renale functie.
- (iii) Het derde syndroom manifesteert zich 5 tot 19 jaar na blootstelling aan bestraling als een goedaardige proteïnuria met een normale nierfunctie.
- (iv) Een vierde groep patiënten vertoont slechts een goedaardige hypertensie 2 tot 5 jaar later en kan een variabele proteïnuria hebben. Een late kwaadaardige hypertensie treedt op 18 maanden tot 11 jaar na bestraling in patiënten met hetzij chronische bestralingsnephritis hetzij een goedaardige hypertensie. Verwijdering van de beschadigde nier keerde de hypertensie om. Door bestraling geïnduceerde schade aan de renale aderen met een hierop volgende renovasculaire hypertensie is gerapporteerd.
- (v) Een syndroom van renale insufficiëntie analoog aan acute bestralingsnephritis is waargenomen in beenmergtransplantatie- (BMT) patiënten die behandeld waren geweest met een totale lichaambestraling (TBI).

Gerapporteerd werd dat bestraling endotheliale dysfunctie veroorzaakt, maar de vasculaire gladde spiercellen in de vroege post-bestralingsfase ontziet. Bestraling zou rechtstreeks DNA kunnen beschadigen, hetgeen leidt tot een verminderde regeneratie van deze cellen en blootlegging van het basismembraan in de glomerulaire capillairen en tubules. Hoe deze initiële belasting tenslotte tot glomerulosclerosis, tubule atrofie en interstitiële fibrosis leidt is niet duidelijk. Gepostuleerd is dat degeneratie van de endotheliale cellaag resulteren kan in intravasculaire trombose in capillairen en kleinere arteriolen. Deze intrarenale angiopathie zou dan de progressieve renale fibrosis en de hypertensie die bestralingsnephritis kenmerken, verklaren. Een recente

onderzoeking van bestraalde muizennieren liet een dosisafhankelijke toename zien in leucocyten in de renale cortex hetgeen suggereert een rol voor ontstekingsprocessen in door bestraling geïnduceerde nefritis.

Bij andere nierziekten is de microvasculatuur van de nier betrokken in auto-immune aandoeningen, zoals systemische sclerose (scleroderma). Betrokkenheid van de nieren bij systemische sclerose manifesteert zich als een langzaam zich ontwikkelende chronische nierziekte of als een sclerodermaniercrisis (SRC) die gekenmerkt is door een kwaadaardige hypertensie en een acute azotemia. Gepostuleerd is dat SRC veroorzaakt is door een Raynaud-achtig verschijnsel in de nier. Een ernstig vasospasme leidt tot een corticale ischemie en een verhoogde productie van renine en angiotensine II, die op zijn beurt de renale vasoconstrictie perpetueert. Hormonale veranderingen (zwangerschap), fysieke en emotionele stress of een lage temperatuur kan het Raynaud-achtige arteriële vasospasme teweegbrengen. De rol van het renine-angiotensine-systeem bij het perpetueren van renale ischemie wordt onderstreept het significante voordeel van ACE-inhibitoren bij de behandeling van SRC. In patiënten met SRC die zich ontwikkelen tot een ernstige nierinsufficiëntie ondanks een antihypertensieve behandeling wordt dialyse een noodzaak. Zowel peritoneale dialyse als hemodialyse zijn toegepast. Het eindstadium renale-ziektenetwerk (End-Stage Renal Disease ESRD) rapport over 311 patiënten met een systemische door sclerose geïnduceerd ESRD die gedialyseerd waren tussen de jaren 1983 en 1985 bracht een overlevingspercentage van 33% na 3 jaar aan het licht.

De renale microcirculatie kan eveneens beïnvloed worden bij de sikkelcelziekte waarvoor de nier bijzonder vatbaar is vanwege de lage zuurstofspanning die bereikt wordt in de diepe vaten van de renale medulla ten gevolge van een tegenstroomoverdracht van zuurstof langs de vasa recta. De kleinere renale vaten en arteriolen kunnen eveneens de locatie zijn van trombo-embolisch letsel afkomstig van cholesterol bevattend materiaal dat verdrongen is uit de wanden van de grote vaten.

Wanneer zij als een groep worden beschouwd resulteren ziekten die een tijdelijke of permanente occlusie van renale microvasculatuur gelijkmatig in een onderbreking van glomerulaire perfusie en derhalve van de glomerulaire filtratiesnelheid, hetgeen een ernstige bedreiging voor systemische homeostasis inhoudt.

Acuut renaal falen (ARF)

ARF kan veroorzaakt zijn door microvasculaire of macrovasculaire ziekte (hoofdpiervatocclusie of ernstige abdominale aortaziekte). De klassieke microvasculaire ziekten die vaak aanwezig zijn met microangiopathische hemolyse en acuut nierfalen treden vanwege glomerulaire capillaire trombose of occlusie vaak met bijkomende trombocytopenia op. Gebruikelijke voorbeelden van deze ziekten omvatten:

a) Trombotische trombocytopenische purpura - De klassieke pentade in trombotische trombocytopenische purpura omvat koorts, neurologische veranderingen, nierfalen, microangiopathische hemolytische anemie en trombocytopenia.

b) Hemolytisch uremisch syndroom - Hemolytisch uremisch syndroom is vergelijkbaar met trombotische trombocytopenische purpura, maar manifesteert zich niet met neurologische veranderingen.

c) HELLP-syndroom (hemolyse, verhoogde leverenzymen en lage platelets). HELLP-syndroom is een type van hemolytisch uremisch syndroom dat in zwangere vrouwen met de bijkomende transaminaseverhogingen, optreedt.

Acuut nierfalen kan aanwezig zijn in alle medische instellingen, maar wordt hoofdzakelijk in ziekenhuizen opgelopen. De ziekte ontwikkelt zich in 5 procent van de opgenomen patiënten en ca. 0,5 procent van de opgenomen patiënten hebben een dialyse nodig. Over de laatste 40 jaar is het overlevingspercentage voor acuut nierfalen niet verbeterd, hoofdzakelijk omdat aangetaste patiënten nu ouder zijn en meer comorbide ziekte toestanden hebben. Infectie is verantwoordelijk voor 75 procent van de sterfgevallen in patiënten met een acuut renaal falen en cardio-respiratoire complicaties is de tweede meest gebruikelijke oorzaak van sterfgevallen. Afhankelijk van de ernst van het hartfalen kan het mortaliteitspercentage variëren van 7 procent tot zelfs 80 procent. Acuut nierfalen kan in drie categorieën worden onderverdeeld: prerenaal, intrinsiek en postrenaal ARF. Intrinsiek ARF is onderverdeeld in vier categorieën: tubulaire ziekte, glomerulaire ziekte, vasculaire ziekte (waaronder microvasculair) en interstitiële ziekte.

Progressieve nierziekte

Er is bewijs dat progressieve nierziekte gekenmerkt is door een progressief verlies aan microvasculatuur. Het verlies aan microvasculatuur correleert rechtstreeks

met de ontwikkeling van glomerulaire en tubulo-interstitiële littekenvorming. Het mechanisme wordt gemedieerd tendele door een reductie in de endotheliale proliferatieve respons en deze achteruitgang in capillair herstel is gemedieerd door de verandering in de lokale expressie van zowel angiogene (vasculaire endotheliale groeifactor) en anti-angiogene (trombospondine 1) factoren in de nier. De verandering in balans van angiogene groeifactoren wordt gemedieerd door beide met macrofaag geassocieerde cytokinen (interleukine-1 β) en vasoactieve mediators. Tenslotte is er een intrigerend bewijs dat stimulering van angiogenese en/of capillair herstel de renale functie en de langzame progressie kan stabiliseren en dit voordeel treedt op onafhankelijk van effecten op BP of proteïnuria.

Voor verdere informatie zie Brenner & Rector's The Kidney, 7^{de} druk, Copyright © 2004 Elsevier: hoofdstuk 33 - *Microvascular diseases of the kidney* en tevens Tiwari en Vikrant Journal of Indian Academy of Clinical Medicine, band 5, nr. 1 *Overzichtsartikel - Sepsis en de nier.*

Gehoorstoornissen

Chemisch geïnduceerde ototoxiciteit

De toxische effecten van verscheidene ototoxische therapeutische geneesmiddelen op gehoorcellen en spirale ganglionneuronen zijn vaak de beperkende factor voor hun therapeutische toepasbaarheid. Belangrijke ototoxische geneesmiddelen omvatten het breed toegepaste chemotherapeutische middel cisplatine en de analoga hiervan, gewoonlijk toegepaste aminoglycosideantibiotica, bijvoorbeeld gentamicine, voor de behandeling van infecties die veroorzaakt zijn door gramnegatieve bacteriën, kinine en de analoga hiervan, salicylaat en de analoga hiervan en omloopdiuretica.

Bijvoorbeeld is van antibacteriële aminoglycosiden, zoals gentamicinen, streptomycinen, kanamycinen, tobramycinen en dergelijke bekend dat zij een ernstige toxiciteit, in het bijzonder ototoxiciteit en nefrotoxiciteit bezitten die de toepasbaarheid van deze antimicrobiële middelen reduceren (zie Goodman en Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 6^{de} druk, A. Goodman Gilman et al., uitg.; MacMillan Publishing Co., Inc., New York, blz. 1169-71 (1980)). Het is duidelijk dat ototoxiciteit een dosislimiterende bijwerking van de toediening van antibiotica is. 4 Tot 15% van de patiënten die 1 gram per dag langer dan een week ontvangen ontwikkelen een meetbaar

gehoorverlies dat langzaam erger wordt en tot complete permanente doofheid kan leiden indien de behandeling voortgezet wordt.

Ototoxiciteit is tevens een ernstige dosislimiterende bijwerking voor cisplatine, een platinumcoördinatiecomplex dat doelmatig bleek te zijn op een verscheidenheid van humane kankersoorten waaronder testiculaire, eileider-, blaas- en hoofd- en nekkanker. Cisplatine (Platinol®) beschadigt gehoor en vestibulaire systemen. Salicylaten, zoals aspirine, zijn de meest gewoonlijk toegepaste therapeutische geneesmiddelen vanwege hun antiontstekings-, analgetische, antipyretische en antitrombose-effecten. Ongelukkigerwijze hebben zij tevens ototoxische bijwerkingen. Zij leiden vaak tot tinnitus (“gerinkel in de oren”) en tijdelijk gehoorverlies. Bovendien, indien het geneesmiddel bij hoge doseringen gedurende lange tijd wordt gebruikt, kan de gehoorbeschadiging persistent en onomkeerbaar worden.

Dientengevolge bestaat er een behoefte aan middelen ter preventie, reduceren of behandeling van de incidentie en/of ernst van inwendige ooraandoeningen en gehoorbeschadigingen, waarbij het inwendige oorweefsel, in het bijzonder inwendige oorhaarcellen, betrokken zijn. Van bijzonder belang zijn die ziekten welke optreden als een ongewenste bijwerking van ototoxische therapeutische middelen, waaronder cisplatine en de analoga hiervan, aminoglycosideantibiotica, salicylaat en de analoga hiervan of omloopdiuretica. Bovendien bestaat er een behoefte aan methoden die een hogere en dus meer effectieve dosering met deze ototoxiciteitsinducerende farmaceutische geneesmiddelen mogelijk maken terwijl door deze geneesmiddelen veroorzaakte ototoxische effecten simultaan verhinderd of gereduceerd worden. Wat nodig is is een methode welke een veilige, effectieve en duurzame werkwijze verschaft voor profylactische of curatieve behandeling van gehoorstoornissen die gerelateerd zijn aan schade aan weefsel van het inwendige oor, verlies of degeneratie, in het bijzonder door ototoxine geïnduceerd en in het bijzonder waarbij haarcellen van het inwendige oor betrokken zijn. Bovendien is een methode en een samenstelling vereist voor de behandeling van schade en doofheid resulterende van traumata van het inwendige oor (akoestische traumata).

Zonder aan enige theorie gebonden te willen zijn wordt gedacht dat cisplatinene geneesmiddelen en andere geneesmiddelen die ototoxiciteit induceren (zoals bijvoorbeeld aminoglycosideantibiotica) alsmede akoestische traumata, de ototoxische effecten via geprogrammeerde celdood of apoptose in weefsel van het inwendige oor,

in het bijzonder haarcellen van het inwendige oor, kunnen induceren (Zhang et al., Neuroscience 120 (2003) 191-205; Wang et al., J. Neuroscience 23((24):8596-8607). In zoogdieren worden haarcellen van het gehoororgaan slechts geproduceerd tijdens de embryonische ontwikkeling en regenereren niet indien zij verloren gaan tijdens het postnatale leven, derhalve een verlies aan haarcellen zou resulteren in een aanmerkelijke en onomkeerbare doofheid. Ongelukkigerwijze zijn er tegenwoordig geen effectieve therapieën ter behandeling van de cochlea en ter omkering van deze ziekte-toestand. Dus zou een effectieve therapie ter preventie van celdood van haarcellen van het gehoororgaan een grote therapeutische waarde hebben.

Drukzweren

Drukzweren zijn gebieden van beschadigde huid en weefsel die zich ontwikkelen wanneer een duurzame druk (gewoonlijk afkomstig van een bed of rolstoel) de circulatie naar kwetsbare delen van het lichaam, in het bijzonder de huid op de billen, heupen en hielen, afsnijdt. Het gebrek aan adequate bloedstroom leidt tot *ischemische necrosis en zweervorming* van het beschadigde weefsel. Drukzweren treden vaak op in patiënten met verminderd of afwezig gevoel of die invalide zijn, uitgemergeld zijn, verlamd zijn of gedurende lange tijd bedlegerig zijn. Weefsels over het sacrum, ischia, grotere trochanters, uitwendige malleolie en hielen zijn in het bijzonder vatbaar; andere locaties kunnen hierbij betrokken zijn afhankelijk van de positie van de patiënten.

Drukzweren zijn wonden die normaal gesproken slechts zeer langzaam helen en in het bijzonder in die gevallen is een verbeterd en meer snel helen vanzelfsprekend van groot belang voor de patiënt. Bovendien zijn de kosten betrokken bij de behandeling van patiënten die aan deze wonden lijden significant gereduceerd wanneer het helen verbeterd wordt en sneller plaatsvindt.

Ischemische ziekte-toestanden

Ischemisch letsel is de meest gebruikelijke klinische expressie van celletsel door zuurstofgebrek. De meest nuttige modellen voor het bestuderen van ischemisch letsel omvatten een volledige occlusie van één van de eindslagaderen naar een orgaan (bijvoorbeeld een coronaire slagader) en onderzoek van het weefsel (bijvoorbeeld de hartspeer) in gebieden die door de slagader bediend worden. Complexe pathologische

- veranderingen treden op in diverse cellulaire systemen tijdens ischemie. Tot op zekere hoogte gedurende een tijd die varieert onder de verschillende typen cellen kan het letsel gerepareerd worden en de beschadigde cellen kunnen zich herstellen indien zuurstof en metabolische substraten wederom ter beschikking worden gesteld door herstel van de
- 5 bloedstroom. Met een verdere verlenging van de ischemische periode gaat de celstructuur verder met deterioreren vanwege de onstuitbare progressie van de lopende letselmechanismen. Met de tijd worden de energetische mechanismen van de cel - de mitochondriale oxidatieve elektrische centrale en het glycolytische pad - onherstelbaar beschadigd en herstel van bloedstroom (reperfusie) kan de beschadigde cel niet redden.
- 10 Zelfs indien de cellulaire energiemechanismen intact zouden blijven zou onherstelbare schade aan het genoom of aan de cellulaire membranen een letale uitkomst verzekeren ongeacht de reperfusie. Dit onomkeerbare letsel manifesteert zich gewoonlijk als necrosis, maar apoptose kan eveneens een rol spelen. Onder bepaalde omstandigheden wanneer de bloedstroom hersteld wordt naar cellen die eerder ischemisch gemaakt zijn,
- 15 maar niet doodgegaan zijn, is letsel vaak paradoxaal verergerd en zet zich voort met een verhoogd tempo - hierbij gaat het om reperfusieletsel.

- Reperfusieletsel kan onder een verscheidenheid van omstandigheden, in het bijzonder tijdens medische interventie waaronder, maar niet beperkt tot angioplastie, cardiale chirurgie of trombolysie; orgaantransplantatie; ten gevolge van plastische chirurgie; tijdens een ernstig gedragsyndroom; tijdens het opnieuw hechten van beschadigde ledematen; ten gevolge van een multi-orgaanfalensyndroom; in de hersenen ten
- 20 gevolg van een beroerte of hersentrauma; in samenhang met chronische wonden, zoals drukzweren, aderszweren en diabetische zweren; tijdens skeletspierischemie of ledemaattransplantatie; ten gevolge van mesenterische ischemie of acute ischemische ingewandenziekte; ademhalingsfalen ten gevolge van een lagere torso-ischemie, leidende tot pulmonaire hypertensie, hypoxemia en niet-cardiogeen pulmonair oedeem; acuut nierfalen, zoals waargenomen na een niertransplantatie, een belangrijke chirurgische
- 25 ingreep, traumata en septisch alsmede hemorrhagieshock; sepsis; retinale ischemie die optreedt ten gevolge van een acute vasculaire occlusie, welke leidt tot een verlies aan gezichtsvermogen in een aantal oculaire ziekten, zoals acute glaucoma, diabetische
- 30 retinopathie, hypertensieve retinopathie en retinale vasculaire occlusie; Cochlearischemie; klepfalen in microvasculaire chirurgie voor hoofd- en nekgebreken; het verschijnsel van Raynaud en de hiermee geassocieerde digitale ischemische letsels in scler-

roderma; ruggenmergletsel; vasculaire chirurgie; traumatische rhabdomyolyse (het crushsyndroom); en myoglobininurie, optreden.

Verder kan ischemie/reperfusie onder de volgende omstandigheden betrokken zijn: hypertensie, hypertensieve cerebrale vasculaire ziekte, breuk of aneurysma, een constructie of obstructie van een bloedvat, zoals deze optreedt in het geval van een trombus of embolus, angioma, bloeddyscrasias, elke vorm van een gebrekkige hartfunctie waaronder hartstilstand of -falen, systemische hypotensie, hartstilstand, cardiogene shock, septische shock, trauma van het ruggenmerg, hoofdtrauma, aanval, bloeden vanuit een tumor; en ziekten, zoals een beroerte, de ziekte van Parkinson, epilepsie, depressie, ALS, ziekte van Alzheimer, ziekte van Huntington en elke andere door ziekte geïnduceerde dementie (zoals bijvoorbeeld door HIV geïnduceerde dementie).

Bovendien kan een ischemische episode veroorzaakt zijn door een mechanisch letsel van het centrale zenuwstelsel, zoals deze resulteert van een klap op het hoofd of ruggenmerg. Traumata kunnen weefselletsel omvatten, zoals bijvoorbeeld een wrijving, incisie, contusie, punctuur, compressie enz., zoals deze kan optreden na een traumatisch aanraken van een vreemd object en een plek van of behorende tot het hoofd, de nek of de wervelkolom. Andere vormen van traumatisch letsel kunnen ontstaan uit een constrictie of compressie van het centrale zenuwstelselweefsel door een ongeschikte accumulatie van vloeistof (bijvoorbeeld een blokkade of dysfunctie van normaal cerebrospinaal vocht- of vitreus vochtproductie, omzet of volumeregeling of een subduraal of intracarniaal hematoom of oedeem). Op vergelijkbare wijze kan een traumatische constrictie of compressie ontstaan uit de aanwezigheid van een massa van abnormaal weefsel, zoals een metastatische of primaire tumor.

Tenslotte zijn hedendaagse methoden van therapie ter preventie en/of behandeling van COPD, maculaire degeneratie, microvasculaire ziekten en ototoxische toestanden onbevredigend en er is een behoefte aan het ontwikkelen van nieuwe verbindingen voor dit doel. Er bestaat tevens een behoefte aan het ontwikkelen van een therapie en een geneesmiddel, die ototoxische effecten kan bevatten die vandaag geassocieerd zijn met bepaalde geneesmiddelen en toestanden, in het bijzonder met cisplatinechemotherapeutica en bepaalde antibiotica zonder de effectiviteit van de geneesmiddelen op te offeren. Bovendien is er een behoefte aan het ontwikkelen van een therapie en geneesmiddel die de ototoxische effecten die geassocieerd zijn met akoestische traumata of mechanische traumata binnen het inwendige oor kunnen behandelen. Ver-

der is er een behoefte aan het ontwikkelen van een therapie en een geneesmiddel ter behandeling van drukzweren, ischemie en met ischemie-reperfusie geassocieerde toestanden. Alle ziekten en indicaties die in de beschrijving hierboven beschreven zijn alsmede andere ziekten en toestanden die in de beschrijving beschreven zijn, zoals MI, kunnen eveneens door middel van de nieuwe verbindingen van de onderhavige uitvinding worden behandeld.

RTP801

Gen RTP801 werd eerst gerapporteerd door een mederechthebbende van de onderhavige aanvraag. Amerikaanse octrooischriften 6.455.674, 6.555.667 en 6.740.738, die alle overgedragen zijn aan één van de mederechthebbenden van de onderhavige aanvraag, beschrijven en claimen *per se* de RTP801-polynucleotide en -polypeptide en antilichamen gericht tegen het polypeptide. RTP801 vertegenwoordigt een uniek gentarget voor hypoxia-induceerbare factor-1 (HIF-1) die door hypoxia geïnduceerde pathogenese onafhankelijk van groeifactoren, zoals VEGF, kan reguleren.

De volgende octrooiaanvragen en publicaties leveren aspecten van achtergrondinformatie op

WO 2001/070979 heeft betrekking op nucleïnezuurmarkers die tot overexpressie zijn gebracht in ovariakankercellen.

Amerikaans octrooischrift 6.673.549 beschrijft een combinatie die cDNA's omvat die verschillend tot expressie gebracht zijn in respons op een steroïdebehandeling.

Amerikaanse octrooiaanvraag 2003/165864 heeft betrekking op cDNA's die verschillend tot expressie gebracht zijn in cellen die met een DNA-demethyleringsmiddel behandeld zijn.

Amerikaanse octrooiaanvraag 2003/108871 heeft betrekking op een samenstelling die verscheidene cDNA's omvat, die verschillend tot expressie gebracht zijn in behandelde humane C3A-levercelcultures.

Amerikaanse octrooiaanvraag 2002/119463 beschrijft een nieuwe samenstelling die toepasbaar is voor de behandeling en de diagnose van prostaatkanker, waarbij deze verbinding humane cDNA's omvat die verschillend tot expressie gebracht zijn in prostaatkanker.

WO 2004/018999 beschrijft een methode voor de beoordeling, karakterisering, volgen, preventie en behandeling van cervicale kanker.

5 EP 1.394.274 heeft betrekking op een methode voor het testen op bronchiale astma of chronische obstructieve pulmonaire ziekte door vergelijking van het expressieniveau van een marker gen in een biologisch monster afkomstig van een patiënt met het expressieniveau van het gen in een monster afkomstig van een gezonde patiënt.

WO 2002/101075 heeft betrekking op een geïsoleerd nucleïnezuurmolecuul, toepasbaar voor het detecteren, karakteriseren, preventie en behandeling van humane cervicale kankers.

10 WO 2003/010205 heeft betrekking op het remmen van angiogenese voor de behandeling van wond helen, retinopathie, ischemie, ontsteking, microvasculopathie, beender helen en huidontsteking.

WO 2002/046465 heeft betrekking op het identificeren van een gen dat betrokken is bij een ziekte voor de behandeling van door hypoxia gereguleerde toestanden.

WO 2002/031111 heeft betrekking op polypeptiden en hun gecodeerde eiwitten en vele toepassingen hiertoe worden ter beschikking gesteld.

WO 2001/012659 heeft betrekking op nucleïnezuren die toepasbaar zijn in recombinant-DNA-methodologieën.

20 WO 2001/077289 beschrijft 623 polynucleotiden die afgeleid zijn van een verscheidenheid van humane weefselbronnen.

WO 2003/101283 heeft betrekking op een combinatie die vele cDNA's en eiwitten omvat.

JP 2003/259877 heeft betrekking op vele hepatische fibrosisziektemarkers.

25 Tzipora Shoshani et al., *Identification of a Novel Hypoxia-Inducible Factor 1-Responsive Gene, RTP801. Involved in Apoptosis. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, april 2002, blz. 2283-2293; deze publicatie, waarbij de uitvinders van de onderhavige uitvinding medeauteur zijn, beschrijven gedetailleerd de ontdekking van het RTP801-gen (een toen nieuw HIF-1-afhankelijk gen), Anat Brafman et al.,
30 Inhibition of Oxygen-Induced Retinopathy in RTP801-Deficient Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, oktober 2004; 45(10): 3796-805; tevens zijn hierbij de uitvinders van de onderhavige uitvinding medeauteurs, deze publicatie bewijst dat in RTP801-

knock-outmuizen hyperoxia geen degeneratie van het retinale capillaire netwerk veroorzaakt.

Leif W. Ellisen et al., *REDD1, a Developmentally Regulated Transcriptional Target* van pagina 63 en pagina 53, verbindt pagina 63 met *Regulation of Reactive Oxygen Species*. Molecular Cell, Band 10, 995-1005, november 2002; deze publicatie
5 bewijst dat overexpressie van RTP801 (hieraan gerefereerd daarin als REDD1) leidt tot een verhoogde productie van reactieve zuurstofspecies.

Richard D.R., Berra E. en Pouyssegur J., *Non-hypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha in vascular smooth muscle cells*. J.
10 Biol. Chem., 1 september 2000; 275(35): 26765-71. Deze publicatie bewijst dat HIF-1-afhankelijke transcriptie geïnduceerd kan worden door een overmatige productie van reactieve zuurstofspecies.

Rangasami T. et al., *Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice*. Ingediend bij het *Journal of Clinical*
15 *Investigation*. Dit werk heeft betrekking op muizen met een gebrekkige anti-oxidansafweer.

SAMENVATTING VAN DE UITVINDING

20 De onderhavige uitvinding verschaft nieuwe methoden en samenstellingen voor de behandeling van microvasculaire stoornissen, maculaire degeneratie, ademhalingsstoornissen en ruggenmergletsel of -ziekte.

In één uitvoeringsvorm worden nieuwe moleculen die RTP801 remmen en die gebruikt kunnen worden ter behandeling van verscheidene ziekten en indicaties,
25 verschaft

In een andere uitvoeringsvorm verschaft de onderhavige uitvinding een methode voor de behandeling van een patiënt die aan een microvasculaire aandoening, maculaire degeneratie of een ademhalingsstoornis lijdt, welke omvat het toedienen aan een patiënt van een farmaceutische samenstelling welke een RTP801-inhibitor omvat.

30 Een andere uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding heeft betrekking op een methode voor de behandeling van een patiënt die aan COPD lijdt, welke omvat het toedienen aan de patiënt van een farmaceutische samenstelling die een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een RTP801-inhibitor omvat. In één uitvoerings-

vorm is de inhibitor een siRNA-molecuul, een antisens molecuul, een antilichaam (zoals bijvoorbeeld een neutraliserend antilichaam), een dominant negatief peptide of een ribozyme.

Een andere uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding heeft betrekking op een methode voor de behandeling van een patiënt die aan maculaire degeneratie lijdt, welke omvat het toedienen aan de patiënt van een farmaceutische samenstelling die een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een RTP801-inhibitor omvat. In één uitvoeringsvorm is de inhibitor een siRNA-molecuul, een antisens molecuul, een antilichaam (zoals bijvoorbeeld een neutraliserend antilichaam), een dominant negatief peptide of een ribozyme.

Een andere uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding heeft betrekking op een methode ter behandeling van een patiënt die aan een microvasculaire aandoening lijdt welke omvat het toedienen aan een patiënt van een farmaceutische samenstelling die een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een RTP801-inhibitor omvat. In een uitvoeringsvorm is de inhibitor een siRNA-molecuul, een antisens molecuul, een antilichaam (zoals bijvoorbeeld een neutraliserend antilichaam), een dominant negatief peptide of een ribozyme.

Een additionele uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding verschaft de toepassing van een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een RTP801-inhibitor voor de bereiding van een geneesmiddel ter bevordering van het herstel in een patiënt die aan een ademhalingsstoornis lijdt. In één uitvoeringsvorm is de ademhalingsaandoening COPD en de inhibitor is bij voorkeur een siRNA.

Een verdere uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding verschaft de toepassing van een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een RTP801-inhibitor voor de bereiding van een geneesmiddel ter bevordering van het herstel in een patiënt die aan maculaire degeneratie lijdt. In één uitvoeringsvorm is de maculaire degeneratie AMD en de inhibitor is bij voorkeur een siRNA.

Een verdere uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding verschaft de toepassing van een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een RTP801-inhibitor ter bereiding van een geneesmiddel ter bevordering van het herstel in een patiënt die aan een microvasculaire aandoening lijdt. In één uitvoeringsvorm is de microvasculaire aandoening diabetische retinopathie en is de inhibitor bij voorkeur een siRNA.

De onderhavige uitvinding heeft in het algemeen betrekking op methoden en samenstellingen ter behandeling of ter preventie van de incidentie of ernst van gehoorbeschadiging (of balansachteruitgang), in het bijzonder gehoorverlies geassocieerd met celdood van de inwendige oorhaarcellen. De methoden en samenstellingen omvat-

5 ten het toedienen aan een zoogdier dat behoefte heeft aan een dergelijke behandeling van een profylactisch of therapeutisch werkzame hoeveelheid van één of meer verbindingen die de expressie van het RTP801-gen, down-reguleren (d.w.z. op zodanige wijze reguleren dat deze afneemt) in het bijzonder nieuwe kleine interfererende RNA's (siRNA's).

10 Meer specifiek verschaft de onderhavige uitvinding methoden en samenstellingen ter behandeling van een patiënt die aan een gehoorbeschadiging of andere otopathologieën geassocieerd met celdood van de inwendige oorhaarcellen lijdt. Deze otopathologieën kunnen resulteren van akoestische traumata, mechanische traumata of door ototoxine geïnduceerd gehoorverlies. De methoden volgens de uitvinding

15 omvatten het toedienen aan de patiënt van één of meer verbindingen die de expressie down-reguleren van het RTP801-gen, in het bijzonder siRNA's die RTP801 remmen, gewoonlijk als een farmaceutische samenstelling, in een therapeutisch werkzame dosis waardoor de patiënt behandeld wordt.

In één uitvoeringsvorm verschaft de onderhavige uitvinding verbeterde

20 samenstellingen en methoden voor behandelingen die de toediening vereisen van een farmaceutisch geneesmiddel met een ototoxische, gehoorbeschadigende bijwerking, in combinatie met een therapeutisch werkzame hoeveelheid van één of meer siRNA-moleculen die RTP801 remmen, ter behandeling of ter preventie van de ototoxiciteit die geïnduceerd is door het farmaceutische geneesmiddel. De samenstellingen van de uit-

25 vinding kunnen worden toegediend in één of meer geschikte intervallen hetzij voorafgaande aan, in aansluiting op, hetzij nagenoeg tegelijk met de toediening van het ototoxische, gehoorbeschadigende geneesmiddel dat een inwendig oor-apoptotische weefselbeschadiging induceert. Eveneens kan deze behandeling effectief zijn als profylactische behandeling voorafgaande aan of tezamen met omstandigheden die akoestische traumata veroorzaken.

30

Dientengevolge is het een doelstelling van de onderhavige uitvinding een verbeterde samenstelling te verschaffen die een therapeutisch werkzame hoeveelheid van één of meer siRNA-moleculen bevat welke RTP801 remmen in combinatie met een oto-

toxisch, gehoorbeschadigend farmaceutisch geneesmiddel voor de behandeling aan een
zoogdier. Deze combinatiegeneesmiddelen kunnen afzonderlijk worden toegediend; de
siRNA-moleculen die RTP801 remmen zouden dan lokaal worden toegediend terwijl
het ototoxische, gehoorbeschadigend farmaceutisch geneesmiddel systemisch wordt
5 toegediend. De siRNA-moleculen kunnen voorafgaand aan simultaan of in aansluiting
op het ototoxische geneesmiddel worden toegediend. Deze combinatiesamenstellingen
kunnen verder een farmaceutisch aanvaardbare drager bevatten. De farmaceutische
samenstelling zal een lagere ototoxiciteit hebben dan het ototoxische farmaceutische
middel alleen, en bij voorkeur zal deze een hogere dosering van de ototoxische farma-
10 ceutische stof dan gebruikelijk wordt toegepast, hebben. Voorbeelden van deze verbe-
terde samenstellingen omvatten cisplatine of andere ototoxische neoplastische midde-
len of een aminoglycoside antibioticum of antibiotica in combinatie met de therapeu-
tisch werkzame hoeveelheid van één of meer siRNA-moleculen die RTP801 remmen.

Nog verder heeft de uitvinding betrekking op de toepassing van de
15 samenstellingen volgens de uitvinding in gevallen waarbij diuretica nodig zijn. De
onderhavige uitvinding verschaft een oplossing voor het gebied dat een therapie en een
geneesmiddel die de ototoxische effecten kunnen behandelen die heden geassocieerd
zijn met bepaalde diuretica en in het bijzonder met de meer populaire en gewoonlijk
toegepaste omloopdiuretica zonder het opofferen van hun diuretische werkzaamheid,
20 kunnen behandelen.

Nog verder heeft de uitvinding betrekking op de toepassing van de
samenstellingen volgens de uitvinding in die gevallen waarbij kinine of kinineachtige
verbindingen nodig zijn. De onderhavige uitvinding verschaft een oplossing voor het
gebied dat lang een therapie en een geneesmiddel gezocht heeft die de ototoxische ef-
25 fecten die heden geassocieerd zijn met bepaalde kininen zonder het opofferen van hun
werkzaamheid, kunnen behandelen.

De onderhavige uitvinding heeft verder betrekking op methoden en samen-
stellingen voor de behandeling of preventie van de incidentie of ernst van drukzweren.
De methoden en samenstellingen omvatten het toedienen aan een zoogdier dat behoefte
30 heeft aan deze behandeling van een profylactisch of therapeutisch effectieve hoeveel-
heid van één of meer verbindingen die de expressie van het RTP801-gen down-
reguleren, in het bijzonder nieuwe kleine interfererende RNA's (siRNA's).

Verder heeft de onderhavige uitvinding betrekking op methoden en samenstellingen voor de behandeling van één of meer ischemische of ischemie-reperfusieletsels of -toestanden, zoals deze in de beschrijving beschreven zijn. Deze methoden en samenstellingen omvatten het toedienen aan een dier dat behoefte heeft aan een dergelijke be-

5 handeling van een profylactisch of therapeutisch werkzame hoeveelheid van één of meer verbindingen die de expressie van het RTP801-gen down-reguleren, in het bijzonder nieuwe kleine interfererende RNA's (siRNA's).

GEDETAILLEERDE BESCHRIJVING VAN DE UITVINDING

10

De onderhavige uitvinding heeft in enkele van haar uitvoeringsvormen betrekking op de inhibitie van het RTP801-gen of polypeptide voor de behandeling van onder andere oogziekten, ademhalingsaandoeningen, microvasculaire aandoeningen, gehoor-aandoeningen en ischemische toestanden. Zoals in de beschrijving zal worden

15 beschreven zijn de voorkeurnhibitoren die toegepast moeten worden in de onderhavige uitvinding biologische moleculen.

Zonder aan een bepaalde theorie gebonden te willen zijn hebben de uitvinders van de onderhavige uitvinding gevonden dat RTP801 betrokken is bij verscheidene ziekte-toestanden waaronder microvasculaire aandoeningen, oogziekten, ademha-

20 lingsziekten, gehoorziekten, drukzweren, ischemische toestanden en ruggenmergletsel en -ziekte en dat het van voordeel zou zijn RTP801 te remmen teneinde één of meer van deze ziekten of aandoeningen te behandelen. Methoden, moleculen en samenstellingen die RTP801 remmen worden in de beschrijving uitgebreid besproken en één of meer van deze moleculen en/of samenstellingen kunnen met voordeel worden toegepast

25 bij de behandeling van een patiënt die aan één of meer van deze ziekte-toestanden lijdt.

De onderhavige uitvinding verschaft methoden en samenstellingen voor het remmen van de expressie van het RTP801-gen *in vivo*. In het algemeen omvat de methode het toedienen van oligoribonucleotiden, zoals kleine interfererende RNA's (d.w.z. siRNA's) die gericht zijn op een bepaald mRNA en hiermee hybridiseren, dan

30 wel nucleïnezuurmateriaal dat siRNA's in een cel in een voldoende hoeveelheid voor het downreguleren van de expressie van een targetgen door middel van een RNA-interferentiemechanisme kan produceren. In het bijzonder kan de onderhavige methode worden gebruikt voor het remmen van de expressie van het RTP801-gen ter behande-

ling van ademhalingsstoornissen, microvasculaire stoornissen, oogstoornissen en gehoorbeschadigingen.

Derhalve verschaft in één uitvoeringsvorm de onderhavige uitvinding een methode voor de behandeling van een patiënt die aan een ziekte-toestand lijdt die geko-

5 zen is uit een microvasculaire aandoening, een oogziekte, een ademhalingsaandoening, een gehoorstoornis, drukzweren of een ruggenmergletsel of een andere wond, welke omvat het toedienen aan de patiënt van een farmaceutische samenstelling die een RTP801-inhibitor in een therapeutisch werkzame hoeveelheid omvat, één en ander zo-

10 danig dat de patiënt hierdoor behandeld wordt. De uitvinding verschaft verder een methode voor de behandeling van een patiënt die aan een microvasculaire ziekte, een oog-

ziekte, een ademhalingsziekte, een gehoorstoornis, drukzweren of een ruggenmergletsel of een andere wond lijdt, welke omvat het toedienen aan de patiënt van een farmaceuti-

15 sche samenstelling die een RTP801-inhibitor omvat, in een dosering en over een tijdsperiode die voldoende is om herstel te bevorderen. De oogziekte kan maculaire degeneratie zijn, zoals onder andere ouderdommaculaire degeneratie (AMD). De microvascu-

laire aandoening kan diabetische retinopathie of onder andere acuut nierfalen zijn. De ademhalingsstoornis kan chronisch obstructieve pulmonaire ziekte (COPD), emfyseem, chronische bronchitis, astma en onder andere longkanker zijn. De gehoorstoornis kan

20 een akoestisch trauma of onder andere cisplatinegeïnduceerde doofheid zijn. De RTP801-inhibitor kan gekozen zijn uit een grote verscheidenheid aan moleculen waar-

onder, maar niet beperkt tot, verbindingen, zoals polynucleotiden, antisens fragmenten, RNA-moleculen die het RTP801-gen mRNA, als target hebben, zoals ribozymen of siRNA's (bijvoorbeeld de siRNA's van de tabellen A-D en in het bijzonder siRNA nrs.

25 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 en 50 van tabel A of de siRNA nrs. 257, 260-262 en 264-268 van tabel D), of expressievectoren waarin deze opgenomen zijn; polypeptiden, zoals dominant negatieven, antilichamen (zoals bijvoorbeeld een antilichaam dat specifiek bindt aan een epitoom dat aanwezig is binnen een polypeptide dat achtereenvolgende aminozuren omvat, waarvan de sequentie in figuur 2 (SEQ ID NO:2) is weer-

gegeven), dan wel in sommige gevallen enzymen. Bovendien kan de RTP801-inhibitor

30 een chemische inhibitor zijn, zoals een klein molecuul, bijvoorbeeld chemische moleculen met een laag molecuulgewicht, bijvoorbeeld een molecuulgewicht beneden 2000 daltons. Specifiek RTP801-inhibitoren worden hieronder gegeven.

De onderhavige uitvinding verschaft verder een methode voor de behandeling van een patiënt die aan maculaire degeneratie, COPD, diabetische retinopathie, dan wel een akoestische door trauma geïnduceerde doofheid lijdt, welke het toedienen aan de patiënt omvat van een farmaceutische samenstelling die een therapeutisch werkzame dosering van een RTP801-inhibitor bevat, die een polynucleotide omvat dat specifiek hybridiseert met mRNA getranscribeerd vanuit het RTP801-gen en de expressie van het RTP801-gen down-reguleert, waardoor de patiënt wordt behandeld. Het polynucleotide kan een siRNA zijn dat achtereenvolgende nucleotiden omvat met een sequentie die identiek is aan één of meer sequenties die in de tabellen A-D zijn weergegeven (SEQ ID NOS:3-536) en in het bijzonder siRNA nrs. 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 en 50 van tabel A of siRNA nrs. 257, 260-262 en 264-268 van tabel D.

Verder heeft een additionele uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding betrekking op een methode voor de behandeling van een patiënt die lijdt aan een microvasculaire aandoening, een oogziekte, een ademhalingsziekte, een gehoorstoornis, drukzweren of een ruggenmergletsel of een andere wond, welke omvat het toedienen aan de patiënt van een farmaceutische samenstelling die een therapeutisch werkzame dosis van een RTP801-inhibitor die een siRNA-molecuul omvat, optioneel een siRNA-molecuul gespecificeerd in één of meer van de tabellen A-D in een dosering en over een tijdsperiode zodanig dat de patiënt hierdoor behandeld wordt.

Een additionele methode voor de behandeling van een patiënt die aan een microvasculaire aandoening, een oogaandoening, een ademhalingsstoornis, een gehoorstoornis, drukzweren of een ruggenmergletsel of een andere wond lijdt, wordt verschaft, welke omvat het toedienen aan de patiënt van een farmaceutische samenstelling die een therapeutisch werkzame dosering van een RNA-molecuul omvat dat het RTP801-gen mRNA als doel heeft, in een dosering en over een tijdsperiode zodanig dat hierdoor de patiënt behandeld wordt. Het RNA-molecuul kan een siRNA-molecuul zijn, zoals bijvoorbeeld een siRNA-molecuul, zoals gespecificeerd in de tabellen A-D en in het bijzonder siRNA nrs. 14, 22, 23, 25, 27, 39, 4, 42, 49 en 50 van tabel A of siRNA nrs. 257, 260-262, en 264-268 van tabel D, of een ribozyme.

De onderhavige uitvinding verschaft verder een methode voor de behandeling van een patiënt die aan een microvasculaire aandoening, een oogziekte, een ademhalingsstoornis, een gehoorstoornis, drukzweren of een ruggenmergletsel of een andere wond of één of meer van de in de beschrijving beschreven ziekte toestanden lijdt, welke

omvat toedienen aan een patiënt van een farmaceutische samenstelling die een therapeutisch werkzame dosis van een siRNA-molecuul omvat die het RTP801-gen mRNA, eventueel een siRNA-molecuul gespecificeerd in tabellen A-D omvat, in een dosering en over een tijdsperiode zodanig dat hierdoor de patiënt wordt behandeld. Verder kan
 5 de oogziekte maculaire degeneratie, zoals ouderdommaculaire degeneratie (AMD) zijn; de microvasculaire stoornis kan diabetische retinopathie of acuut renaal falen zijn; de ademhalingsstoornis kan COPD zijn en de aspecten van COPD die behandeld worden kunnen omvatten, maar zijn niet beperkt tot emfyseem, chronische bronchitis of beide; en de gehoorstoornis kan akoestische door trauma geïnduceerde doofheid zijn.

10 De onderhavige uitvinding heeft verder betrekking op de toepassing van de nieuwe siRNA's die in de beschrijving besproken worden bij de behandeling van gehoorbeschadiging, waarbij inhibitie van de RTP801-expressie van voordeel is. In één uitvoeringsvorm vormt de onderhavige uitvinding een methode voor de behandeling van een zoogdier dat een gehoor- (of balans-) beschadiging heeft of hiervoor vatbaar is,
 15 dan wel voor de profylactische behandeling van een zoogdier onder omstandigheden waarbij de inhibitie van de RTP801-expressie van voordeel is. De methode van deze uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding zou het optreden of de ernst van een gehoor- (of balans-) beschadiging die zou resulteren van een inwendig oorcelletsel, verlies of degeneratie, in het bijzonder veroorzaakt door een akoestisch trauma of een
 20 ototoxisch middel, voorkomen of reduceren. In deze uitvoeringsvorm omvat de methode volgens de uitvinding het toedienen van een therapeutisch werkzame hoeveelheid van één of meer verbindingen die de expressie van het RTP801-gen down-reguleren, in het bijzonder de nieuwe siRNA's van de onderhavige uitvinding.

In één uitvoeringsvorm is de doelstelling van de onderhavige uitvinding het
 25 verschaffen van een methode voor de behandeling van een zoogdier ter preventie, reduceren of behandelen van een gehoorbeschadiging, stoornis of onbalans, bij voorkeur een akoestisch trauma of een door ototoxine geïnduceerde gehooraandoening, door het toedienen aan een zoogdier dat behoefte heeft aan een dergelijke behandeling van een samenstelling volgens de uitvinding. Eén uitvoeringsvorm is een werkwijze voor de
 30 behandeling van een gehoorstoornis of -beschadiging waarbij het akoestische trauma resulteert van een éénmalige blootstelling aan een extreem hoog geluid of continue blootstelling aan een geluidsrijke omgeving die na verloop van tijd doofheid kan veroorzaken. De gehoorbeschadiging kan eveneens worden veroorzaakt door een fysiek

trauma aan het oor. Een andere uitvoeringsvorm is een methode voor de behandeling van een gehoorbeschadiging of -stoornis waarbij de ototoxiciteit resulteert van de toediening van een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een ototoxisch farmaceutisch geneesmiddel. Typische ototoxische geneesmiddelen zijn chemotherapeutische middelen, bijvoorbeeld antineoplastische middelen en antibiotica. Andere mogelijke kandidaten omvatten omloopdiuretica, kininen of een kinineachtige verbinding en een salicylaat of salicylaatachtige verbindingen. Deze methoden zijn bijzonder werkzaam wanneer de ototoxische verbinding een antibioticum, bij voorkeur een aminoglycoside-antibioticum is. Ototoxische aminoglycoside antibiotica omvatten, maar zijn niet beperkt tot neomycine, paromomycine, ribostamycine, lividonycine, kanamycine, amikacine, tobramycine, viomycine, gentamicine, sisomicine, netilmicine, streptomycine, dibekacine, fortimicine en dihydrostreptomycine of combinaties hiervan. Bijzondere antibiotica omvatten neomycine B, kanamycine A, kanamycine B, gentamicine C1, gentamicine C1a en gentamicine C2. De methoden volgens de uitvinding zijn tevens effectief wanneer de ototoxische verbinding een neoplastisch middel is, zoals bijvoorbeeld vincristine, vinblastine, cisplatine en cisplatineachtige verbindingen en taxol en taxolachtige verbindingen.

In enkele uitvoeringsvormen die gericht zijn op de behandeling of de preventie van een gehooraandoening, wordt de samenstelling volgens de uitvinding mede toegediend met een ototoxine. Bijvoorbeeld wordt een verbeterde methode verschaft voor de behandeling van een infectie van een zoogdier door toediening van een aminoglycosideantibioticum, waarbij de verbetering het toedienen omvat van een therapeutisch werkzame hoeveelheid van één of meer verbindingen die de expressie van het RTP801-gen down-reguleert, in het bijzonder nieuwe siRNA's, aan de patiënt die behoefte heeft aan deze behandeling ter reductie of preventie van door ototoxine geïnduceerde gehoorbeschadiging geassocieerd met het antibioticum. De verbindingen die de door ototoxine geïnduceerde gehoorbeschadiging reduceren of voorkomen, in het bijzonder de nieuwe siRNA's worden bij voorkeur lokaal binnen het inwendige oor toegediend.

In nog een andere uitvoeringsvorm wordt een verbeterde methode voor de behandeling van kanker in een zoogdier verschaft door toediening van een chemotherapeutische verbinding, waarbij de verbetering het toedienen omvat van een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een samenstelling volgens de uitvinding aan de patiënt die

behoefte heeft aan deze behandeling ter reductie of preventie van door ototoxine geïnduceerde gehoorbeschadiging geassocieerd met het chemotherapeutische geneesmiddel. In een andere uitvoeringsvorm worden de methoden van behandeling toegepast op gehoorbeschadigingen resulterende uit de toediening van een chemotherapeutisch middel

5 ter behandeling van zijn ototoxische bijwerking. Ototoxische chemotherapeutische middelen die geschikt zijn voor de methoden volgens de uitvinding omvatten, maar zijn niet beperkt tot een antineoplastisch middel, waaronder cisplatine of cisplatineachtige verbindingen, taxol of taxolachtige verbindingen en andere chemotherapeutische mid-

10 delen waarvan gedacht wordt dat zij door ototoxine geïnduceerde gehoorbeschadigingen veroorzaken, bijvoorbeeld vincristine, een antineoplastisch geneesmiddel die toegepast wordt ter behandeling van hematologische kwaadaardige tumoren en sarcomen. Cisplatineachtige verbindingen omvatten carboplatine (Paraplatin®), tetraplatine, oxaliplatine, aroplatine en onder andere transplatine. In een andere uitvoeringsvorm worden de methoden volgens de uitvinding toegepast op gehoorbeschadigingen resulterende van de toediening van kinine en zijn synthetische substituten, gewoonlijk ge-

15 bruikt bij de behandeling van malaria, ter behandeling van zijn ototoxische bijwerking. In een andere uitvoeringsvorm worden de methoden volgens de uitvinding toegepast op gehoorbeschadigingen resulterende uit de toepassing van een diureticum. Diuretica, in het bijzonder “omloop”diuretica, dat wil zeggen die welke hoofdzakelijk in de Loop van Henle inwerken, zijn kandidaatototoxinen. Illustratieve voorbeelden die de methode volgens de uitvinding niet beperken omvatten furosemide, ethacrylzuur en mercurials. Diuretica worden gewoonlijk gebruikt ter preventie of ter eliminering van oedeem. Diuretica worden tevens gebruikt in niet-oedeemachtige toestanden, bijvoorbeeld hypertensie, hypercalcemie, idiopatische hypercalciurie en nefrogene diabetes

20 insipidus.

In een andere uitvoeringsvorm worden de methoden volgens de uitvinding toegepast ter behandeling of preventie van de incidentie of ernst van drukzweren. De methoden en samenstellingen omvatten het toedienen aan een zoogdier dat behoefte heeft aan een dergelijke behandeling van een profylactisch of therapeutisch werkzame

30 hoeveelheid van één of meer verbindingen die de expressie van het RTP801-gen down-reguleren, in het bijzonder nieuwe kleine interfererende RNA's (siRNA's). De verbindingen die de incidentie of de ernst van drukzweren behandelen of verhinderen, in het bijzonder de nieuwe siRNA's, worden bij voorkeur lokaal binnen het beschadigde ge-

bied toegediend. De methoden en samenstellingen van de onderhavige uitvinding zijn werkzaam bij de behandeling en de preventie van drukzweren die zich ontwikkelen wanneer een duurzame druk (gewoonlijk afkomstig van een bed of rolstoel) de circulatie naar kwetsbare delen van het lichaam afsnijdt. De methoden en samenstellingen zijn
 5 werkzaam in patiënten met een verminderd of afwezig gevoel of die invalide zijn, uitgemergeld zijn, verlamd zijn of gedurende een lange periode bedlegerig zijn. De samenstellingen volgens de uitvinding zijn tevens werkzaam bij de verbetering van het helen van drukzweren onder toepassing van de samenstellingen. De samenstellingen kunnen in elk bijzonder stadium in het helingsproces worden toegepast, waaronder het
 10 stadium voordat één of meer genezingsprocessen begonnen is of zelfs voordat een specifieke zweer gevormd is (profylactische behandeling).

Andere volgens de uitvinding te behandelen wonden omvatten tevens i) algemene wonden, zoals bijvoorbeeld chirurgische, traumatische, ontstekings-, ischemische, thermische, chemische en grote wonden; ii) wonden specifiek voor de mond-
 15 holte, zoals bijvoorbeeld wonden na extractie, endodontische wonden, in het bijzonder in samenhang met de behandeling van cysten en abcessen, zweren en letsels van bacteriële, virale of auto-immunologische oorsprong, mechanische, chemische, thermische, ontstekings- en lichenoïde wonden; herpeszweren, stomatitis aftosa, acute necrotiserende ulceratieve gingivitis en het mondverbrandingssyndroom zijn specifieke voor-
 20 beelden; en iii) wonden op de huid, zoals bijvoorbeeld een neoplasme, verbrandingen (bijvoorbeeld chemische, thermische), letsels (bacteriële, virale, auto-immunologische), beten en chirurgische incisies.

De methoden en samenstellingen van de onderhavige uitvinding zijn tevens werkzaam bij de behandeling en preventie van één of meer chronische wonden, waar-
 25 onder drukzweren, aderszweren en diabetische zweren. In al deze chronische wondtypen is de hieraan ten grondslag liggende oorzaak van de gebeurtenis een periode van ischemie, gevolgd door een periode van reperfusie. Deze ischemie-reperfusiegebeurtenissen zijn gewoonlijk repetitief, dit betekent dat de nadelige effecten van ischemie-reperfusie gepotentieerd zijn en eventueel voldoende zijn om zweervorming te veroor-
 30 zaken. Voor zowel drukzweren als diabetische voetzweren is de ischemische gebeurtenis het resultaat van een geprolongeerde druk die voldoende is voor de verhindering van weefselperfusie en wanneer de druk tenslotte afneemt treedt het reperfusieletsel op.

De onderhavige samenstellingen zijn werkzaam bij het remmen van de schade die veroorzaakt wordt door ischemie-reperfusie in chronische wonden.

De onderhavige samenstellingen zijn tevens werkzaam in andere ziekte-toestanden die geassocieerd zijn met ischemie-reperfusie, zoals bijvoorbeeld, maar niet beperkt tot: orgaantransplantatie, darm- en colonanastomosen, chirurgische ingrepen op grote bloedvaten, het hechten van losgeraakte ledematen, ballonangioplastie of één of andere chirurgische ingreep op het hart, beroerte of hersentrauma, ledemaattransplantatie, longhypertensie, hypoxemie en niet-cardiogeen pulmonair oedeem, acuut renaal falen, acute glaucoma, diabetische retinopathie, hypertensieve retinopathie, retinale vasculaire occlusie, cochleaire ischemie, microvasculaire chirurgie en ischemische letsels in scleroderma.

De methoden en samenstellingen volgens de onderhavige uitvinding zijn tevens werkzaam bij de behandeling van akoestische traumata of mechanische traumata, bij voorkeur een akoestisch of mechanisch trauma die tot haarcelverlies in het inwendige oor leidt. Een akoestisch trauma die volgens de onderhavige uitvinding behandeld moet worden, kan worden veroorzaakt door één enkele blootstelling aan een extreem hard geluid of na een langdurige blootstelling aan dagelijkse harde geluiden boven ongeveer 85 decibel. Een volgens de onderhavige uitvinding te behandelen mechanisch trauma in het inwendige oor is bijvoorbeeld het trauma in het inwendige oor na een operatie met behulp van een elektronisch apparaat dat in het inwendige oor gebracht wordt. De samenstellingen volgens de onderhavige uitvinding verhinderen of minimaliseren de schade aan haarcellen in het inwendige oor die met de ingreep geassocieerd is. De verbindingen die de door ototoxine geïnduceerde gehoorbeschadiging reduceren dan wel verhinderen, in het bijzonder de nieuwe siRNA's, worden bij voorkeur lokaal in het inwendige oor toegediend.

Bovendien kan de verbinding volgens de uitvinding worden gebruikt ter behandeling van één of meer ziekte-toestanden, waarbij ischemie betrokken is, eventueel de ischemie-reperfusie. Deze ziekte-toestanden omvatten ischemie of ischemie-reperfusie resulterende van een angioplastie, chirurgische ingreep aan het hart of trombolyse; orgaantransplantatie; ten gevolge van plastische chirurgie; bij het ernstige compartimentsyndroom; bij het opnieuw hechten van losgeraakte ledematen; ten gevolge van het multiorgaanfalensyndroom; in de hersenen ten gevolge van een beroerte of hersentrauma; in samenhang met chronische wonden, zoals drukzweren, adierzweren en

diabetische zweren; bij skeletspierischemie of ledemaattransplantatie; ten gevolge van een mesenterische ischemie of acute ischemische darmziekte; ademhalingsfalen ten gevolge van een lagere torso-ischemie, die tot pulmonaire hypertensie, hypoxemie leidt en niet-cardiogeen pulmonair oedeem; acuut renaal falen, zoals waargenomen na een

5 renale transplantatie, een belangrijke chirurgische ingreep, trauma en septische alsmede hemorrhagieshock; sepsis; retinale ischemie die optreedt ten gevolge van een acute vasculaire occlusie, die tot verlies van het gezichtsvermogen in een aantal oculaire ziekten leidt, zoals bijvoorbeeld acute glaucoma, diabetische retinopathie, hypertensieve retinopathie en retinale vasculaire occlusie; cochleaire ischemie; klepfalen in

10 microvasculaire chirurgie voor hoofd- en nekgebreken; het verschijnsel van Raynaud en de geassocieerde digitale ischemische letsels in scleroderma; ruggenmergletsel; vasculaire chirurgische ingreep; traumatische rhabdomyolyse (het crushsyndroom); en myoglobininurie. Verder kan ischemie/reperfusie bij de volgende ziekte toestanden betrokken zijn: hypertensie, hypertensieve cerebrale vasculaire ziekte, breuk van aneurysme, een constrictie of obstructie van een bloedvat, zoals zij optreedt in het geval van

15 een trombus of embolus, angioma, bloeddyscrasias, één of andere vorm van gebrekkige hartfunctie waaronder hartstilstand of -falen, systemische hypotensie, hartstilstand, cardiogene shock, septische shock, ruggenmergtrauma, hoofdtrauma, aanval, bloeding uit een tumor; en ziekten zoals beroerte, ziekte van Parkinson, epilepsie, depressie,

20 ALS, ziekte van Alzheimer, ziekte van Huntington en één of meer andere door ziekte geïnduceerde dementie (zoals bijvoorbeeld door HIV geïnduceerde dementie). Bovendien kan een ischemische episode worden veroorzaakt door een mechanisch letsel aan het centrale zenuwstelsel, zoals deze resulteert uit een klap op het hoofd of op de wervelkolom. Een trauma kan letsel aan weefsel inhouden, zoals bijvoorbeeld een scheurwond, incisie, contusie, punctuur, compressie, etc., zoals zij kunnen ontstaan uit een

25 traumatisch contact van een vreemd voorwerp met een plek of in de nabijheid van het hoofd, de nek of de wervelkolom. Andere vormen van traumatisch letsel kunnen ontstaan uit constrictie of compressie van het centrale zenuwweefsel door middel van een ongeschikte accumulatie van vocht (bijvoorbeeld een blokkade of disfunctie van normaal cerebrospinaal vocht of vitreus lichaamsvloeistofproductie, omzet of volumeregeling of een subduraal of intracarniaal hematoom of oedeem). Op vergelijkbare wijze

30 kan traumatische constrictie of compressie ontstaan uit de aanwezigheid van een massa van abnormaal weefsel, zoals een metastatische of primaire tumor.

“Behandeling van een ziekte” heeft betrekking op het toedienen van een therapeutische stof die werkzaam is ter verlichting van symptomen die geassocieerd zijn met een ziekte, voor het verminderen van de ernst dan wel voor het genezen van de ziekte dan wel voor het verhinderen van het optreden van de ziekte. “Behandeling”
 5 heeft zowel betrekking op een therapeutische behandeling als op een profylactische behandeling dan wel voor preventieve maatregelen, waarbij de doelstelling is het voorkomen of vertragen (verzachten) van een ziekte dan wel aandoening.

Een “therapeutisch werkzame dosis” heeft betrekking op een hoeveelheid van een farmaceutische verbinding of samenstelling die werkzaam is voor het bereiken
 10 van een verbetering in een patiënt of zijn fysiologische systemen, waaronder, maar niet beperkt tot een verbeterd overlevingspercentage, een sneller herstel, of een verbetering of eliminering van symptomen en andere indicatoren, zoals zij door de deskundigen geselecteerd zijn als geschikte bepalende maatregelen.

De methoden voor de behandeling van de ziekten die in de beschrijving
 15 beschreven zijn en die in de onderhavige uitvinding opgenomen zijn kunnen het toedienen omvatten van een RTP801-inhibitor tezamen met een additionele RTP801-inhibitor, een stof die de farmacologische eigenschappen van de actieve ingrediënten, zoals hieronder wordt aangegeven, of van een additionele verbinding, waarvan bekend is dat zij werkzaam is in de behandeling van de ziekte van de te behandelen ziekte, zoals bij-
 20 voorbeeld maculaire degeneratie, COPD, ARF, DR, cisplatine of akoestische door trauma geïnduceerde doofheid, onder andere, verbetert. Met “tezamen met” wordt bedoeld voorafgaande aan, simultaan of in aansluiting op. Verder detail over voorbeelden van combinatietherapieën wordt hieronder gegeven.

In een andere uitvoeringsvorm verschaft de onderhavige uitvinding de
 25 toepassing van een therapeutisch werkzame dosis van een RTP801-inhibitor voor de bereiding van een geneesmiddel voor het bevorderen van het herstel bij een patiënt die aan maculaire degeneratie, COPD, ARF, DR, cisplatine of akoestische door trauma geïnduceerde doofheid of één of andere oogziekte, microvasculaire of ademhalingstoestand of gehoorstoornis, zoals hierboven gedetailleerd is lijdt, en de toepassing van een
 30 therapeutisch werkzame dosis van een RTP801-inhibitor voor de productie van een geneesmiddel voor de behandeling van deze ziekten en aandoeningen. In deze uitvoeringsvorm kan de RTP801-inhibitor een polynucleotide omvatten welke opeenvolgende nucleotiden omvat met een sequentie welke een antisens sequentie ten opzichte van de

sequentie weergegeven in figuur 1 (SEQ ID NO:1) omvat. Bovendien kan de RTP801-inhibitor een expressievector zijn die een polynucleotide omvat met een sequentie die een antisens sequentie is ten opzichte van de sequentie weergegeven in figuur 1 (SEQ ID NO:1). De RTP801-inhibitor volgens de vermelde toepassingen kan eveneens een antilichaam zijn, zoals bijvoorbeeld een neutraliserend antilichaam dat specifiek bindt aan een epitoom die aanwezig is binnen een polypeptide welke achtereenvolgende aminozuren omvat, waarvan de sequentie in figuur 2 is weergegeven (SEQ ID NO:2). Bovendien kan de RTP801-inhibitor een RNA-molecuul zijn dat het RTP801-gen mRNA als doel heeft, eventueel een siRNA, eventueel een siRNA dat opeenvolgende moleculen met een sequentie omvat die identiek is aan de sequentie weergegeven in de tabellen A-D (SEQ ID NOS:3-536) en in het bijzonder siRNA nrs.: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 en 50 van tabel A of siRNA nrs.: 257, 260-262, en 264-268 van tabel D, dan wel een ribozyme.

Dus volgens de hierin geopenbaarde informatie, kan de met één of meer van de hierin beschreven methoden te gebruiken RTP801-inhibitor in één of meer van de toepassingen die in de beschrijving geopenbaard zijn en in één van de farmaceutische samenstellingen die in de beschrijving geopenbaard zijn, uit de groep worden geselecteerd, bestaande uit een siRNA, een vector die een siRNA omvat, een vector die een siRNA tot expressie brengt en elk molecuul dat endogeen in siRNA omgezet wordt. Zoals hierin gedetailleerd beschreven wordt is het siRNA bij voorkeur een siRNA dat opeenvolgende nucleotiden met een sequentie die identiek is met één of meer sequenties weergegeven in de tabellen A-D (SEQ ID NOS:3-536) en in het bijzonder siRNA nrs. 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 en 50 van tabel A of siRNA nrs.: 257, 260-262, en 264-268 van tabel D, omvat.

“Ademhalingsstoornis” heeft betrekking op ziekte toestanden, ziekten of syndromen van het ademhalingssysteem waaronder, maar niet beperkt tot longaandoeningen van alle typen waaronder de chronische obstructieve longziekte (COPD), emfyseem, chronische bronchitis, astma en onder andere longkanker. Emfyseem en chronische bronchitis kunnen als onderdeel van COPD of onafhankelijk optreden.

“Microvasculaire aandoening” heeft betrekking op elke ziekte toestand die microscopische capillairen en lymfen aantast, in het bijzonder vasospastische ziekten, vasculitische ziekten en lymfatische occlusieve ziekten. Voorbeelden van microvasculaire aandoeningen omvatten onder andere: oogziekten, zoals Amaurosis Fugax (embo-

lisch of secundair ten opzichte van SLE), het aplasyndroom, Prot CS en ATIII-deficiëntie, microvasculaire pathologieën die veroorzaakt zijn door IV-geneesmiddelgebruik, dysproteïnemia, temporale arteritis, anterieure ischemische optische neuropathie, optische neuritis (primair of secundair ten opzichte van auto-immune ziekten),
 5 glaucoma, Von Hippel Lindau-syndroom, corneale ziekte, corneale transplantatieafstotingscataracten, ziekte van Eales, frosted-branch-angiïtis, encircling-buckling-operatie, uveïtis waaronder pars planitis, choroïdaal melanoom, choroïdaal hemangioom, optische zenuwaplasia; retinale ziekte-toestanden, zoals retinale slagaderocclusie, retinale aderocclusie, retinopathie van prematuriteit, HIV-retinopathie, Purtscher-retinopathie,
 10 retinopathie van systemische vasculitis en auto-immune ziekten, diabetische retinopathie, hypertensieve retinopathie, bestralingsretinopathie, vertakkingsretinale ader of aderocclusie, idiopathische retinale vasculitis, aneurysmen, neuroretinitis, retinale embolisering, acute retinale necros, vogelshotretinochoroïdopathie, duurzaam retinaal losraken; systemische toestanden, zoals diabetes mellitus, diabetische retinopathie (DR),
 15 met diabetes geassocieerde microvasculaire pathologieën (zoals hieronder gedetailleerd weergegeven wordt), hyperviscositeitssyndromen, aortaboogsyndromen en oculaire ischemische syndromen, carotide-caverneuze fistula, multiple sclerosis, systemische lupus erythematosus, arteriolitis met SS-A autoantilichaam, acute multifocale hemorrhagie vasculitis, vasculitis resulterende van infectie, vasculitis resulterende van de
 20 ziekte van Behçet, sarcoïdosis, coagulopathieën, neuropathieën, nefropathieën, microvasculaire ziekten van de nier, en onder andere ischemische microvasculaire ziekte-toestanden.

Microvasculaire aandoeningen kunnen een neovasculair element omvatten. De term “neovasculaire aandoening” heeft betrekking op de ziekte-toestanden, waarbij de vorming van bloedvaten (neovascularisatie) schadelijk is voor de patiënt. Voorbeelden van
 25 oculaire neovascularisatie omvatten: retinale ziekten (diabetische retinopathie, diabetisch maculair oedeem, chronische glaucoma, retinaal losraken en sikkcelretinopathie); rubeosis iritis; proliferatieve vitreo-retinopathie; inflammatoire ziekten; chronische uveïtis; neoplasmen (retinoblastomen, pseudo-gliomen en melanomen); Fuchs heterochromische iridocyclitis; neovasculaire glaucoma; corneale neovascularisatie (inflammatoire, transplantatie- en ontwikkelingshypoplasia van de iris); neovascularisatie na een gecombineerde vitrectomie en lensectomie; vasculaire ziekten (retinale ischemie, choroïdale vasculaire insufficiëntie, choroïdale trombose en carotide ader-
 30

ischemie); neovascularisatie van de optische zenuw; en neovascularisatie die te wijten is aan de penetratie van het oog of contusief oculair letsel. Al deze neovasculaire ziekte-toestanden kunnen onder toepassing van de verbindingen en farmaceutische samenstellingen van de onderhavige uitvinding worden behandeld.

5 “Oogziekte” heeft betrekking op ziekte-toestanden, ziekten of syndromen van het oog waaronder, maar niet beperkt tot één of meer ziekte-toestanden, waarbij choroïdale neovascularisatie (CNV), nat en droog AMD, oculair histoplasmosis-syndroom, angiodesrepen, breuken in Bruchsmembraan, myopische degeneratie, oculaire tumoren, retinale degeneratieve ziekten en retinale aderocclusie (RVO) betrokken
10 zijn. Enkele ziekte-toestanden die in de beschrijving geopenbaard worden, zoals DR, die volgens de methode van de onderhavige uitvinding kunnen worden behandeld, worden beschouwd als een microvasculaire aandoening en een oogaandoening of beide, onder de definities die in de beschrijving gegeven zijn.

Gehoordeschadigingen die relevant zijn voor de onderhavige uitvinding
15 kunnen te wijten zijn aan eindorgaanletsels die haarcellen van het inwendige oor omvatten, bijvoorbeeld akoestisch trauma, virale endolymfatische labyrinthitis, ziekte van Menière. Gehoordeschadigingen omvatten tinitis, die een perceptie van geluid is in afwezigheid van een akoestische stimulus, en intermitterend of continu kan zijn, waarbij een sensorineuraal verlies gediagnosticeerd is. Gehoorverlies kan te wijten zijn aan
20 bacteriële of virale infecties, zoals herpes zoster oticus, purulente labyrinthitis welke ontstaat uit acute otitis media, purulente meningitis, chronische otitis media, plotselinge doofheid waaronder die van virale oorsprong, bijvoorbeeld virale endolymfatische labyrinthitis veroorzaakt door virussen waaronder de bof, mazelen, influenza, waterpokken, mononucleose en adenovirussen. Het gehoorverlies kan congenitaal zijn, zoals
25 dat veroorzaakt door rubella, anoxia tijdens de geboorte, bloeden in het inwendige oor dat te wijten is aan een trauma tijdens de bevalling, ototoxische geneesmiddelen die aan de moeder toegediend zijn, erythroblastosis fetalis, en erfelijke ziekte-toestanden waaronder het syndroom van Waardenburg en het syndroom van Hurler. Het verlies aan gehoor kan door geluid geïnduceerd zijn, in het algemeen is dat te wijten aan een geluid
30 groter dan ongeveer 85 decibel (db) dat het inwendige oor beschadigt. Bij voorkeur wordt het verlies aan gehoorvermogen veroorzaakt door een akoestisch trauma dan wel een ototoxisch geneesmiddel dat het gehoorgedeelte van het inwendige oor, in het bijzonder haarcellen van het inwendige oor aantast. Opgenomen in de beschrijving als

referenties zijn hoofdstukken 196, 197, 198 en 199 van Het Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 14^e editie, (1982), Merck Sharp & Dome Research Laboratories, N.J. en de overeenkomstige hoofdstukken in de meest recente 16^{de} editie, waaronder hoofdstukken 207 en 210) die betrekking hebben op de beschrijving en diagnose van gehoor en balansbeschadigingen.

Gehoorstoorissen of -beschadigingen (ofwel balansbeschadiging) die behandeld moeten worden of die voorkomen moeten worden in de context van de onderhavige uitvinding zijn bij voorkeur zonder aan een bepaalde theorie gebonden te willen zijn, door ototoxine of trauma geïnduceerde apoptotische beschadiging aan de haarcellen van het inwendige oor. De patiënten die behoefte hebben aan een behandeling omvatte die personen die reeds een gehoorbeschadiging ervaren hebben, die welke vatbaar zijn voor deze beschadiging en die waarbij de beschadiging voorkomen moet worden. Zonder aan enige theorie gebonden te willen zijn kunnen de gehoorbeschadigingen te wijten zijn aan apoptotische haarcelbeschadiging of verlies in het inwendige oor, waarbij de beschadiging of verlies veroorzaakt is door infectie, mechanisch letsel, lawaai, veroudering of chemisch-geïnduceerde ototoxiciteit. Ototoxinen omvatten therapeutische geneesmiddelen, waaronder antineoplastische middelen, salicylaten, kinen en aminoglycoside antibiotica, contaminanten in voedingsmiddelen of medicijnen en milieu of industriële verontreinigingen. Gewoonlijk wordt de behandeling uitgevoerd ter preventie of ter reductie van ototoxiciteit of akoestisch trauma, in het bijzonder resulterende van of waarvan verwacht wordt dat zij resulteren van de toediening van therapeutische geneesmiddelen of blootstelling aan akoestisch trauma waaronder het milieu. Bij voorkeur wordt een therapeutisch werkzame samenstelling onmiddellijk gegeven na de blootstelling ter preventie of ter reductie van het ototoxische effect of het traumatische effect. Meer bij voorkeur wordt een behandeling profylactisch verschaft door toediening van de samenstelling voorafgaande aan of tegelijkertijd met het ototoxische farmaceutische middel dan wel door blootstelling aan de ototoxine dan wel aan de akoestisch trauma inducerende omgeving.

De gehoorbeschadiging kan door chemotherapie geïnduceerd zijn. Meer gedetailleerd, de gehoorbeschadiging kan veroorzaakt zijn door chemotherapeutische middelen, zoals etoposide, 5-FU (5-fluoruracil), cis-platina, doxorubicine, een vincaalkaloïde, vincristine, vinblastine, vinorelbine, taxol, cyclofosfamide, ifosfamide, chloorambucil, busulfan, mechloorethamine, mitomycine, dacarbazine, carboplatina,

thiotepa, daunorubicine, idarubicine, mitoxantron, bleomycine, esperamicine A1, dactinomycine, plicamycine, carmustine, lomustine, tauromustine, streptozocine, melfalan, dactinomycine, procarbazine, dexamethason, prednison, 2-chloordeoxyadenosine, cytarabine, docetaxel, fludarabine, gemcitabine, herceptine, hydroxyureum, irinotecan, methotrexaat, oxaliplatine, rituxine, semutine, epirubicine, etoposide, tomudex en topotecan, of een chemische analoge verbinding van één van deze chemotherapeutische middelen. De chemotherapeutische middelen die zeer waarschijnlijk een gehoorbeschadiging veroorzaken zijn cisplatinum(cisplatine) en cisplatineachtige verbindingen.

In de context van de onderhavige uitvinding wordt met “ototoxine” bedoeld een stof die vanwege zijn chemische werking de activiteit van de geluidsreceptoren van het zenuwstelsel dat geassocieerd is met het gehoor aantast, beschadigt of remt, hetgeen achtereenvolgens het gehoor (en/of de balans) benadeelt. In de context van de onderhavige uitvinding omvat ototoxiciteit een nadelig effect op de haarcellen van het inwendige oor. Ototoxische middelen die gehoorbeschadigingen veroorzaken omvatten, maar zijn niet beperkt tot neoplastische middelen, zoals vincristine, vinblastine, cisplatine en cisplatineachtige verbindingen, taxol en taxolachtige verbindingen, dideoxyverbindingen, bijvoorbeeld dideoxyinosine; alcohol; metalen; industriële toxinen die betrokken zijn bij de werkomgeving dan wel bij blootstelling aan het milieu; contaminanten van voedingsmiddelen of geneesmiddelen; en overdoseringen van vitaminen of therapeutische geneesmiddelen, bijvoorbeeld antibiotica, zoals penicilline of chlooramfenicol, en megadoses van vitaminen A, D of B6, salicylaten, kininen en loopdiuretica. Met “blootstelling aan een ototoxisch middel” wordt bedoeld dat het ototoxische middel beschikbaar gesteld wordt aan of in aanraking komt met een zoogdier. Blootstelling aan een ototoxisch middel kan optreden door rechtstreekse toediening, bijvoorbeeld door innemen of toediening van een voedingsmiddel, geneesmiddel of therapeutisch middel, bijvoorbeeld een chemotherapeutisch middel, door onwillekeurige contaminatie of door blootstelling aan het milieu, bijvoorbeeld blootstelling aan lucht of aan een waterig milieu.

“RTP801-gen” heeft betrekking op de RTP801-coderende sequentie open reading frame, zoals weergegeven in figuur 1 (SEQ ID NO:1) of een willekeurige homologe sequentie hiervan met bij voorkeur ten minste 70% identiciteit, meer bij voorkeur 80% identiciteit, zelfs nog meer bij voorkeur 90 of 95% identiciteit. Dit omvat één of meer sequenties afgeleid van SEQ ID NO:1 die mutaties, wijzigingen of

modificaties, zoals zij in de beschrijving beschreven zijn, ondergaan hebben. Dus wordt RTP801 in een voorkeursuitvoeringvorm gecodeerd door een nucleïnezuursequentie volgens SEQ ID NO:1. Het valt tevens binnen de onderhavige uitvinding dat de nucleïnezuren volgens de onderhavige uitvinding slechts complementair en respectievelijk identiek zijn met een deel van het nucleïnezuur coderende voor RTP801 aangezien het eerste stukje, bij voorkeur een eerste streng, gewoonlijk korter is dan het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding. Tevens dient erkend te worden dat gebaseerd op de aminozuursequentie van RTP801 elke nucleïnezuursequentie coderende voor een dergelijke aminozuursequentie door de deskundige als gebaseerd op de genetische code opgevat kan worden. Echter vanwege de veronderstelde wijze van inwerking van de nucleïnezuren volgens de uitvinding verdient het zeer de voorkeur dat het nucleïnezuur coderende voor RTP801, bij voorkeur het mRNA hiervan, er één is in het organisme, weefsel en/of respectievelijk cel, waarbij de expressie van RTP801 gereduceerd moet worden.

“RTP801-polypeptide” heeft betrekking op het polypeptide van het RTP801-gen en men vindt dat dit voor de doelstellingen van de onderhavige uitvinding de termen “RTP779”, “REDD1”, “Ddit4”, “FLJ20500”, “Dig2”, en “PRF1” omvat, afgeleid van welk organisme dan ook, eventueel een mens, splitsingsvarianten en fragmenten hiervan die de biologische activiteit behouden en homologen hiervan, bij voorkeur met ten minste 70%, nog meer bij voorkeur met ten minste 80%, of zelfs nog meer bij voorkeur met ten minste 90% of 95% homologie hiermee. Bovendien vindt men dat de term tevens polypeptiden omvat welke resulteren van ondergeschikte wijzigingen in de RTP801-coderende sequentie, zoals onder andere puntmutaties, substituties, deleties en inserties die een verschil in enkele aminozuren tussen het resulterende polypeptide en het in de natuur voorkomende RTP801 kunnen veroorzaken. Polypeptiden gecodeerd door nucleïnezuursequenties die aan de RTP801-coderende sequentie of genome sequentie onder omstandigheden van zeer strikte hybridisatie die uit de stand der techniek bekend zijn, gebonden worden (zie bijvoorbeeld Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988), herzien in 1995 en 1998) vallen eveneens onder deze term. Chemisch gemodificeerd RTP801 of chemisch gemodificeerde fragmenten van RTP801 zijn eveneens in deze term opgenomen zolang de biologische activiteit behouden blijft. RTP801 heeft bij voorkeur of omvat een aminozuursequentie volgens SEQ ID NO:2. Erkend wordt dat er verschillen

kunnen zijn in de aminozuursequentie onder verschillende weefsels van een organisme en onder verschillende organismen van één species of onder verschillende species waarop het nucleïnezuur volgens de uitvinding in verscheidene uitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding toegepast kunnen worden. Echter gebaseerd op de technische leer die in de beschrijving verschaft wordt kan de respectievelijke sequentie dienstovereenkomstig in aanmerking worden genomen wanneer één of meer van de nucleïne-
 5 zuren volgens de onderhavige uitvinding ontworpen worden. Bepaalde fragmenten van RTP801 omvatten aminozuren 1-50, 51-100, 101-150, 151-200 en 201-232 van de sequentie weergegeven in figuur 2. Verder omvatten bepaalde fragmenten van RTP801
 10 aminozuren 25-74, 75-124, 125-174, 175-224 en 225-232 van de in figuur 2 weergegeven sequentie.

RTP801, zoals hierin wordt gebruikt, is een eiwit dat onder andere beschreven is in WO 99/09046. RTP801 dat tevens als RTP801 wordt aangeduid, is beschreven als een transcriptionele target van HIF-1 α door Shoshani T. et al. (Shoshani et al., 2002, Mol
 15 Cell Biol, 22, 2283-93). Verder heeft het onderzoek door Ellisen et al. (Ellisen et al., Mol Cell, 10, 995-1005) RTP801 geïdentificeerd als een p53-afhankelijke DNA-beschadigingresponsgen en als een p63-afhankelijk gen betrokken bij epitheliale differentiatie. Tevens reflecteert RTP801 het weefsel-specifieke patroon van het p53-familielid p63, is effectief vergelijkbaar met of behalve TP 63 is deze een inhibitor voor
 20 de *in vitro* differentiatie en is betrokken bij de regulering van reactieve zuurstofspecies. Behalve dat is RTP801 gevoelig voor hypoxia-reagerende transcriptiefactorhypoxia-induceerbare factor 1 (HIF-1) en wordt gewoonlijk bovenwaarts gereguleerd gedurende hypoxia zowel *in vitro* als *in vivo* in een diermodel van de ischemische beroerte. RTP801 schijnt te werken bij de regulering van reactieve zuurstofspecies (ROS) en
 25 ROS-niveaus en gereduceerde gevoeligheid voor oxidatieve stress worden beide verhoogd na een ectopische expressie RTP801 (Ellisen et al., 2002, supra; Shoshani et al., 2002, supra). Bij voorkeur is RTP801 een biologisch actief RTP801-eiwit dat bij voorkeur ten minste één van deze kenmerken, bij voorkeur twee of meer en het meest bij voorkeur elk van deze kenmerken.

30 Zonder aan enige theorie gebonden te willen zijn, is RTP801, zijnde een stressinduceerbaar eiwit (reagerend op hypoxia, oxidatieve stress, thermische stress, ER-stress), een factor die betrokken is bij het nuanceren van de celreactie op een energieonbalans. Als zodanig is het een target die geschikt is voor de behandeling van elke

ziekte, waarbij cellen gered moeten worden van apoptose te wijten aan stressvolle omstandigheden (bijvoorbeeld ziekten die vergezeld gaan met de dood van normale cellen) of waarbij cellen die aangepast zijn aan stressvolle omstandigheden die te wijten zijn aan veranderingen in de RTP801-expressie (bijvoorbeeld kankercellen) gedood moeten worden. In het laatstgenoemde geval kan RTP801 beschouwd worden als een overlevingsfactor voor kankercellen en zijn inhibitoren kunnen kanker behandelen als een monotherapie of als sensibiliserende geneesmiddelen in combinatie met chemotherapie of radiotherapie.

De term “polynucleotide” heeft betrekking op elk molecuul dat samengesteld is uit DNA-nucleotiden, RNA-nucleotiden of een combinatie van beide typen, dat wil zeggen een molecuul dat twee of meer van de basen guanidine, cytosine, thymidine, adenine, uracil of inosine onder andere omvat. Een polynucleotide kan natuurlijke nucleotiden, chemisch gemodificeerde nucleotiden en synthetische nucleotiden dan wel chemische analoga hiervan omvatten. De term omvat “oligonucleotiden” en omvat tevens “nucleïnezuren”.

De term “aminozuur” heeft betrekking op een molecuul dat uit één of meer van de 20 in de natuur voorkomende aminozuren, aminozuren die chemisch gemodificeerd zijn (zie hieronder) of synthetische aminozuren bestaat.

De term “polypeptide” heeft betrekking op een molecuul samengesteld uit twee of meer aminozuurresten. De term omvat peptiden, polypeptiden, eiwitten en peptidomimetica.

Een “peptidomimetische verbinding” is een verbinding die niet-peptide-structurele elementen bevat welke in staat is tot het nabootsen van één of meer biologische werking(en) van een natuurlijk ouderpeptide. Enkele van de klassieke peptidekenmerken, zoals enzymatisch splitsbare peptidebindingen zijn gewoonlijk in een peptidomimetische verbinding niet aanwezig.

Onder de term “dominant negatief peptide” wordt bedoeld een polypeptide gecodeerd door een cDNA-fragment dat voor een deel van een eiwit codeert (zie Herskowitz I.: *Functional inactivation of genes by dominant negative mutations*. *Nature*. 17-23 september 1987; 329(6136):219-22. Review; Roninson E.B. et al., *Genetic suppressor elements: new tools for molecular oncology* - 13th Cornelius P. Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 15 september 1995; 55(18):4023). Dit peptide kan een functie hebben die verschilt van die van het eiwit waaruit het afgeleid

was. Het kan in wisselwerking treden met het volledige eiwit en zijn activiteit remmen dan wel kan dit in wisselwerking treden met andere eiwitten en hun activiteit remmen als reactie op de proteïne met een volledige lengte (een ouderproteïne). Dominant negatief betekent dat het peptide in staat is tot het domineren van de natuurlijke ouderproteïne en zijn activiteit remmen waarbij de cel een verschillend kenmerk wordt gegeven, zoals bijvoorbeeld resistentie of sensibilisering voor de dood of elk cellulair fenotype van belang. Voor een therapeutische interventie kan het peptide zelf worden afgegeven als actief ingrediënt van een farmaceutische samenstelling dan wel kan het cDNA aan de cel worden afgegeven, onder toepassing van bekende methoden.

Bereiding van peptiden en polypeptiden

Polypeptiden kunnen via verscheidene methoden worden geproduceerd, bijvoorbeeld:

1) Synthetisch:

Synthetische polypeptiden kunnen onder toepassing van een in de handel verkrijgbare inrichting, onder toepassing van een bekende sequentie van RTP801 of een deel hiervan, worden geproduceerd.

2) Recombinantmethoden:

Een voorkeursmethode voor de bereiding van RTP801-polypeptiden of fragmenten hiervan is het kloneren van een polynucleotide dat het cDNA van het RTP801-gen omvat, in een expressievector en het kweken van de cel waarin de vector is opgenomen, zodanig dat het gecodeerde polypeptide tot expressie wordt gebracht en vervolgens zuiveren van het resulterende peptide, waarbij al deze maatregelen uitgevoerd worden onder toepassing van methoden die uit de stand der techniek bekend zijn, zoals bijvoorbeeld beschreven is in Marshak et al., "*Strategies for Protein Purification and Characterization. A laboratory course manual.*" CSHL Press (1996) (als aanvulling, zie *Bibl Haematol.* 1965:23:1165-74 *Appl Microbiol.* juli 1967; 15(4):851-6; *Can J Biochem.* mei 1968; 46(5):441-4; *Biochemistry.* juli 1968; 7(7):2574-80; *Arch Biochem Biophys.* 10 september 1968; 126(3):746-72; *Biochem Biophys Res Commun.* 20 februari 1970; 38(4):825-30)).

De expressievector kan een promotor voor het beheersen van de transcriptie van het heterologe materiaal omvatten en kan een constitutieve of een induceerbare promotor zijn teneinde een selectieve transcriptie mogelijk te maken. Promotoren die vereist kunnen zijn voor het verkrijgen van noodzakelijke transcriptieniveaus kunnen
 5 eventueel worden opgenomen. De expressedrager kan tevens een selectiegeen omvatten.

Vectoren kunnen in cellen of weefsels onder toepassing van één of meer van een verscheidenheid van uit de stand der techniek bekende methoden worden geïntroduceerd. Deze methoden kunnen worden gevonden en zijn in het algemeen beschreven in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), in Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor, MI (1995), *Vectors: A survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston MA (1988) en Gilboa et al.
 10 (1986).
 15

3) Zuivering uit natuurlijke bronnen:

RTP801-polypeptide of in de natuur voorkomende fragmenten hiervan kunnen uit natuurlijke bronnen, zoals weefsels worden gezuiverd onder toepassing van vele
 20 uit de stand der techniek bekende methoden, zoals bijvoorbeeld: immunoprecipitatie met anti-RTP801-antilichaam of aan een matrix gebonden affiniteitchromatografie met een willekeurig molecuul waarvan bekend is dat het RTP801 bindt.

Eiwitzuivering wordt uitgevoerd zoals uit de stand der techniek bekend is en beschreven is in bijvoorbeeld Marshak et al., *"Strategies for Protein Purification and Characterization. A laboratory course manual"*. CSHL Press (1996).
 25

Onder "biologisch effect van RTP801" of "RTP801-biologische activiteit" wordt bedoeld het effect van RTP801-ademhalingsziekten, dat rechtstreeks of indirect kan zijn en omvat, zonder door enige theorie gebonden te willen zijn, het effect van RTP801 op apoptose van alveolaire cellen geïnduceerd door hypoxische of hyperoxische omstandigheden. Het indirecte omvat, maar is niet beperkt tot het binden van
 30 RTP801 aan of het hebben van een effect op één van verscheidene moleculen die betrokken zijn bij een signaaltransductiecascade resulterende in apoptose.

“Apoptose” heeft betrekking op een fysiologisch type van celdood resulterende uit de activering van enkele cellulaire mechanismen, dat wil zeggen dood die beheerst wordt door het mechanisme van de cel. Apoptose kan bijvoorbeeld het resultaat zijn van activering van het celapparaat door middel van een uitwendige trigger, bijvoorbeeld een cytokine of anti-FAS-antilichaam, leidende tot de celdood dan wel door middel van een inwendig signaal. De term “geprogrammeerde celdood” kan eveneens worden gebruikt en is met “apoptose” uitwisselbaar.

“Met apoptose geassocieerde ziekte” heeft betrekking op een ziekte waarvan de etiologie gerelateerd is geheel of gedeeltelijk aan het proces van apoptose. De ziekte kan veroorzaakt zijn door een slecht functioneren van het apoptotische proces (zoals in kanker of in een auto-immune ziekte) dan wel door een overactiviteit van het apoptotische proces (zoals in bepaalde neurodegeneratieve ziekten). Vele ziekten, waarbij RTP801 betrokken is zijn met apoptose geassocieerde ziekten. Bijvoorbeeld is apoptose een significant mechanisme in droog AMD, waarbij langzame atrofie van een fotoreceptor en pigmentepitheliumcellen hoofdzakelijk in het centrale (maculaire) gebied van de retina plaatsvindt. Neuroretinale apoptose is tevens een significant mechanisme in diabetische retinopathie.

Een “inhibitor” is een verbinding die in staat is de activiteit te remmen van een gen of het product van een dergelijk gen in een mate die voldoende is om een gewenst biologisch of fysiologisch effect te bereiken. Een “RTP801-inhibitor” is een verbinding die in staat is tot het remmen van de activiteit van het RTP801-gen of RTP801-genproduct, in het bijzonder het humane RTP801-gen of -genproduct. Deze inhibitoren omvatten stoffen die de transcriptie of translatie van het gen beïnvloeden, alsmede stoffen die de activiteit van het genproduct beïnvloeden. Een RTP801-inhibitor kan tevens een inhibitor van de RTP801-promotor zijn. Voorbeelden van deze inhibitoren kunnen onder andere omvatten: polynucleotiden, zoals AS-fragmenten, siRNA of vectoren waarin deze opgenomen zijn; polypeptiden, zoals dominantnegatieven, antilichamen en enzymen; katalytische RNA’s, zoals ribozymen en chemische moleculen met een klein molecuulgewicht, bijvoorbeeld een molecuulgewicht onder 2000 daltons. Specifieke RTP801-inhibitoren zijn hieronder gegeven.

“Expressievector” heeft betrekking op een vector die het vermogen heeft om heterologe DNA-fragmenten in een vreemde cel op te nemen en tot uitdrukking te brengen. Vele prokaryotische en eukaryotische expressievectoren zijn bekend en/of in

de handel verkrijgbaar. Een selectie van geschikte expressievectoren ligt binnen de kennis van de deskundige.

De term “antilichaam” heeft betrekking op onder andere IgG-, IgM-, IgD-, IgA- en IgE-antilichaam. De definitie omvat polyklonale antilichamen of monoklonale antilichamen. Deze term heeft betrekking op hele antilichamen of fragmenten van antilichamen welke een antigenbindingdomein omvatten, bijvoorbeeld antilichamen zonder het Fc-gedeelte, antilichamen met één enkele keten, miniantilichamen, fragmenten bestaande uit hoofdzakelijk slechts het variabele, antigen bindend gebied van het antilichaam etc. De term “antilichaam” kan tevens betrekking hebben op antilichamen tegen polynucleotidesequenties verkregen door cDNA-vaccinatie. De term omvat tevens antilichaamfragmenten die het vermogen behouden tot selectief binden met hun antigen of receptor en zijn onder andere als volgt geïllustreerd:

- (1) Fab, het fragment dat een monovalent antigen bindend fragment van een antilichaammolecuul bevat dat door digeren van een geheel antilichaam met het enzym papain geproduceerd kan worden, waarbij een lichte keten en een deel van de hevige keten verkregen worden;
- (2) Fab'_2 , het fragment van het antilichaam dat verkregen kan worden door behandeling van het gehele antilichaam met het enzym pepsine zonder een hierop aansluitende reductie; $\text{F(ab}'_2)$ is een dimeer van twee Fab-fragmenten die door twee disulfidebindingen bij elkaar gehouden worden;
- (3) Fv wordt gedefinieerd als een door genetische manipulatie verkregen fragment dat het variabele gebied bevat van de lichte keten en het variabele gebied van de zware keten tot expressie gebracht als twee ketens; en
- (4) Een antilichaam met één enkele keten (SCA), gedefinieerd als een genetisch gemanipuleerd molecuul dat het variabele gebied van de lichte keten en het variabele gebied van de zware keten bevat, die verbonden is met behulp van een geschikte polypeptidelinker als een genetisch gefuseerd molecuul met één enkele keten.

Minilichamen en microlichamen vallen eveneens onder deze term. Microlichamen zijn zeer kleine proteïnen (gewoonlijk met 28-45 aminozuren) met pseudo-kluwen structuren, die zeer selectief en stabiel zijn. Eén of meer van deze toepassingen en nieuwe verbindingen die in de beschrijving geopenbaard zijn en welke antilichamen omvatten kunnen derhalve worden

opgenomen in plaats van een minilichaam of microlichaam als het antilichaamgedeelte van het molecuul.

Onder de term “epitoot”, zoals deze in de uitvinding wordt gebruikt, wordt verstaan een antigeen determinant op een antigen waaraan het antilichaam bindt. Epitoot-
 5 determinanten bestaan gewoonlijk uit chemisch actieve oppervlaktegroepen van moleculen, zoals aminozuren of suikerzijketens en hebben gewoonlijk specifieke driedimensionale structurele kenmerken alsmede specifieke ladingskenmerken.

Bereiding van anti-RTP801-antilichamen

10 Antilichamen die aan RTP801 binden of een fragment afgeleid hiervan kunnen worden bereid onder toepassing van een intact polypeptide of fragmenten die kleinere polypeptiden als het immuniserende antigen bevatten. Bijvoorbeeld kan het wenselijk zijn antilichamen te produceren die specifiek aan het N- of C-terminale of elk
 15 ander geschikt domein van het RTP801 binden. Het polypeptide dat gebruikt wordt voor het immuniseren van een dier kan afgeleid zijn uit getranslateerd cDNA of chemische synthese en kan desgewenst met een dragerproteïne geconjugeerd worden. Deze gewoonlijk gebruikte dragers die chemisch gekoppeld zijn aan een polypeptide omvatten een sleutelgatkleefhemocyanine (KLH), thyroglobuline, runderserumalbumine (BSA) en tetanus toxoïde. Het gekoppelde polypeptide wordt vervolgens ter immunise-
 20 ring van het dier toegepast.

Desgewenst kunnen polyklonale of monoklonale antilichamen verder worden gezuiverd, bijvoorbeeld door binden aan en elutie vanuit een matrix waaraan het polypeptide of een peptide waartegen de antilichamen waren gevormd, gebonden is. De deskundigen op dit gebied kennen verscheidene technieken die gebruikelijk zijn op het
 25 gebied van de immunologie voor de zuivering en/of het concentreren van polyklonale alsmede monoklonale antilichamen (Coligan et al., Unit 9, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1994).

Methoden voor de bereiding van antilichamen van allerlei typen, waaronder fragmenten, zijn uit de stand der techniek bekend (zie bijvoorbeeld Harlow en Lane,
 30 *Antibodies: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)). Methoden voor het immuniseren, waaronder alle noodzakelijke stappen voor de bereiding van het immunogen in een geschikt adjuvans, het bepalen van de antilichaambinding, isolatie van antilichamen, methoden voor het verkrijgen van monoklonale

antilichamen en humanisering van monoklonale antilichamen zijn alle de deskundige bekend.

De antilichamen kunnen gehumaniseerde antilichamen of humane antilichamen zijn. Antilichamen kunnen worden gehumaniseerd onder toepassing van een verscheidenheid van technieken die op dit gebied bekend zijn, zoals bijvoorbeeld CDR-transplanteren (EP 239.400: PCT-publicatie WO 91/09967; Amerikaans octrooischrift 5.225.539; 5.530.101; en 5.585.089, het bekleden of van een nieuw oppervlak voorzien (EP-592.106; EP-519.596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 10 91:969-973 (1994)) en ketenverwisseling (Amerikaans octrooischrift 5.565.332).

De monoklonale antilichamen, zoals gedefinieerd omvatten antilichamen afgeleid van één species (zoals de muis, het konijn, de geit, de rat, de mens, enz.) alsmede antilichamen afgeleid van twee (of meer) species, zoals chimere en gehumaniseerde antilichamen.

Volledig humane antilichamen zijn bijzonder wenselijk voor de therapeutische behandeling van humane patiënten. Humane antilichamen kunnen worden bereid door een verscheidenheid aan methoden die uit de stand der techniek bekend zijn, waaronder faagdisplaymethoden onder toepassing van antilichaambibliotheken afgeleid van humane immunoglobulinesequenties. Zie tevens Amerikaanse octrooischriften 20 4.444.887 en 4.716.111; en PCT-publicaties WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 en WO 91/10741, waarvan elke in de beschrijving in zijn geheel als referentie wordt opgenomen.

Additionele informatie met betrekking tot alle typen antilichamen waaronder gehumaniseerde antilichamen, humane antilichamen en antilichaamfragmenten 25 kunnen in WO 01/05998 worden gevonden, die in zijn geheel als referentie in de beschrijving wordt opgenomen.

Neutraliserende antilichamen kunnen worden bereid onder toepassing van de hierboven beschreven methoden, mogelijkterwijs met een additionele stap van screenen op neutraliserende activiteit door bijvoorbeeld een overlevingstest.

De termen “chemische verbinding” en “klein molecuul”, “chemisch molecuul”, “klein chemisch molecuul” en “kleine chemische verbinding”, zoals zij in de beschrijving door elkaar worden gebruikt, betekenen chemische groepen van elk bijzonder type die synthetisch worden kunnen worden geproduceerd dan wel uit natuur- 30

lijke bronnen kunnen worden verkregen en die gewoonlijk een molecuulgewicht hebben van minder dan 2000 daltons, minder dan 1000 daltons of zelfs minder dan 600 daltons.

De onderhavige uitvinding heeft tevens betrekking op functionele nucleïne-
 5 zuren die een structuur met een dubbele streng omvatten, hun toepassing voor de productie van een geneesmiddel, een farmaceutische samenstelling die deze functionele nucleïne-
 zuren omvatten en een werkwijze ter behandeling van een patiënt.

Hypoxia is erkend als een sleutelement in het pathomechanisme van een groot aantal ziekten, zoals beroerte, emfyseem en infarct die geassocieerd zijn met een
 10 suboptimale zuurstofbeschikbaarheid en weefselbeschadigingsreacties op de hypoxia-omstandigheden. In snel groeiende weefsels waaronder tumor, wordt een suboptimale zuurstofbeschikbaarheid gecompenseerd door een ongewenste neoangiogenese. Derhalve is de groei van vasculatuur tenminste in het geval van kankerziekten, ongewenst.

Met het oog hierop is de inhibitie van de angiogenese en vasculaire groei
 15 afhankelijk van intensief onderzoek. Reeds vandaag zijn enkele verbindingen beschikbaar die een ongewenste angiogenese en vasculaire groei remmen. Enkele van de meer prominente verbindingen zijn die welke VEGF en de VEGF-receptor remmen. In beide gevallen wordt het effect van VEGF vermeden door het blokkeren van VEGF als zodanig, bijvoorbeeld onder toepassing van een antilichaam gericht tegen VEGF, zoals uit-
 20 gevoerd door Genentech AVASTIN (monoklonaal AB specifiek voor VEGF) (Ferrara N.; Endocr Rev. 2004 augustus; 25(4):581-611) dan wel door het blokkeren van de corresponderende receptor ofwel de VEGF-receptor Traxler P.; Cancer Res. 15 juli 2004; 64(14):4931-41; of Stadler W.M. et al., Clin Cancer Res. 15 mei 2004; 10(10):3365-70).

Aangezien angiogenese en de groei van vasculatuur echter een zeer basis-
 25 ontwerp en vitaal proces is in een willekeurig dier en bij de mens dient het effect van deze soort verbinding geconcentreerd te zijn op de bijzondere plaats waar angiogenese en vasculaire groei daadwerkelijk ongewenst is hetgeen het als target gebruiken of het afgeven een kritische zaak maakt in samenhang met deze soort therapeutische benade-
 30 ring.

Het is derhalve een doelstelling van de onderhavige uitvinding verdere mid-
 delen te verschaffen voor de behandeling van ziekten, waarbij ongewenste groei van vasculatuur en respectievelijk angiogenese betrokken zijn.

Met “klein interfererend DNA” (siRNA) wordt bedoeld een RNA-molecuul dat reduceert of verhindert de expressie van een gen/mRNA van zijn endogene cellulaire tegenpool. De term dient “RNA-interferentie” (RNAi) mede te omvatten. RNA-interferentie (RNAi) heeft betrekking op het proces van sequentiespecifieke posttranscriptionele genblokkering in zoogdieren, gemedieerd door kleine interfererende RNA’s (siRNA’s) (Fire et al., 1998. *Nature* **391**, 806). Het overeenkomstige proces in planten wordt tevens aangeduid als specifieke posttranscriptionele genblokkering of RNA-blokkering en wordt tevens aangeduid met onderdrukking in fungi. De RNA-interferentie respons kan een endonucleascomplex omvatten dat een siRNA bevat, gewoonlijk aangeduid met een RNA-geïnduceerd blokkerend complex (RISC), dat splitsing van een RNA met één enkele streng met een sequentie complementair aan de antisens streng van het siRNA-duplex, medieert. Splitsing van het target-RNA kan in het midden van het gebied complementair aan de antisens streng van het siRNA-duplex plaatsvinden (Elbashir et al., 2001, *Genes Dev.*, **15**, 188). Voor recente informatie op deze termen en voorgestelde mechanismen zie Bernstein E., Denli A.M., Hannon G.J.: *The rest is silence. RNA*. november 2001; 7(11):1509-21; en Nishikura K.: *A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. Cell.*, 16 november 2001; 107(4):415-8. Voorbeelden van siRNA-moleculen die in de onderhavige uitvinding gebruikt kunnen worden zijn in de tabellen A-D gegeven.

Gedurende recente jaren is RNAi gebleken één van de meest efficiënte methoden voor inactivering van genen (*Nature Reviews*, 2002, v.3, blz. 737-47; *Nature*, 2002, v.418, blz. 244-51). Als methode is deze gebaseerd op het vermogen van dsRNA-species om een specifiek proteïnecomplex binnen te dringen waar deze dan getarget wordt op het complementaire cellulaire RNA en dit specifiek afbreekt. Meer gedetailleerd, dsRNA’s worden gedigereerd in korte (17-29 basenparen) remmende RNA’s (siRNA’s) door middel van type III RNAsen (DICER, Drosha, enz.) (*Nature*, 2001, v.409, blz. 363-6; *Nature*, 2003, v.425, blz. 415-9). Deze fragmenten en complementair mRNA worden herkend door het specifieke RISC-proteïnecomplex. Het gehele proces is geculmineerd door endonucleasesplitsing van target-mRNA (*Nature Reviews*, 2002, v.3, blz. 737-47; *Curr Opin Mol Ther.* juni 2003; 5(3):217-24).

Voor de beschrijving van op welke wijze siRNA te ontwerpen en te bereiden voor bekende genen, zie bijvoorbeeld Pei & Tuschl *On the Art of Identifying Effective and Specific siRNAs* *Nature Methods* 3 nr. 9, september 2006; Chalk A.M.,

Wahlestedt C., Sonnhhammer E.L., *Improved and automated prediction of effective siRNA* Biochem. Biophys. Res. Commun., 18 juni 2004; 319(1):264-74; Sioud M., Leirdal M., *Potential design rules and enzymatic synthesis of siRNAs*, Methods Mol Biol. 2004; 252:457-69; Levenkova N., Gu Q., Rux J.J.: Gene specific siRNA selector
 5 Bioinformatics, 12 februari 2004; 20(3):430-2, en Ui-Tei K., Naito Y., Takahashi F., Haraguchi T., Ohki-Hamazaki H., Juni A., Ueda R., Saigo K., *Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference* Nucleic Acids Res., 9 februari 2004; 32(3):936-48. Zie tevens Liu Y., Braasch D.A., Nulf C.J., Corey D.R., *Efficient and isoform-selective inhibition of cellular gene
 10 expression by peptide nucleic acids* Biochemistry, 24 februari 2004; 43(7):1921-7. Zie tevens PCT-publicaties WO 2004/015107 (Atugen) en WO 02/44321 (Tuschl et al.) en tevens Chiu Y.L., Rana T.M., siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis, RNA september 2003; 9(9):1034-48 en Amerikaanse octrooischriften 5.898.031 en 6.107.094 (Crooke) voor de productie van gemodificeerde/meer stabiele
 15 siRNA's.

Op DNA gebaseerde vectoren die in staat zijn tot genereren van siRNA binnen cellen zijn ontwikkeld. De methode omvat in het algemeen transcriptie van korte naaldvormige RNA's die op efficiënte wijze verwerkt worden, waarbij siRNA's binnen cellen gevormd worden. Paddison et al., *PNAS* 2002, 99:1443-1448; Paddison et
 20 al., *Genes & Dev* 2002, 16:948-958; Sui et al., *PNAS* 2002, 8:5515-5520; en Brummelkamp et al., *Science* 2002, 296:550-553. Deze rapporten beschrijven methoden voor het genereren van siRNA's die in staat zijn tot specifiek targetten van talrijke endogene en exogene tot expressie gebrachte genen.

Voor afgifte van siRNA's, zie bijvoorbeeld Shen et al. (FEBS letters 539: 111-114 (2003)), Xia et al., *Nature Biotechnology* 20: 1006-1010 (2002), Reich et al., *Molecular Vision* 9: 210-216 (2003), Sorensen et al. (*J.Mol.Biol.* 327: 761-766 (2003), Lewis et al., *Nature Genetics* 32: 107-108 (2002) en Simeoni et al., *Nucleic Acids Research* 31, 11: 2717-2724 (2003). siRNA is recentelijk met succes toegepast voor de
 25 inhibitie in primaten; voor verdere details zie Tolentino et al., *Retina* 24(1), februari
 30 2004, blz. 132-138.

siRNA's van de onderhavige uitvinding

Algemene specificaties van siRNA's van de onderhavige uitvinding

In het algemeen omvatten de siRNA's die toegepast zijn in de onderhavige uitvinding een ribonucleïnezuur dat een structuur met een dubbele streng omvat waarbij
5 de structuur met een dubbele streng een eerste streng en een tweede streng omvat waarbij de eerste streng een eerste stukje van aan elkaar grenzende nucleotiden omvat en waarbij het eerste stukje ten minste tendele complementair is met een targetnucleïnezuur en de tweede streng een tweede stukje omvat van aan elkaar grenzende nucleotiden en waarbij het tweede stukje ten minste tendele identiek is aan een targetnucleïnezuur, waarbij de eerste streng en/of de tweede streng een aantal groepen van gemodificeerde nucleotiden met een modificatie op de 2'-positie omvat, waarbij binnen de
10 streng elke groep van gemodificeerde nucleotiden aan één of aan beide zijden grenst aan een aangrenzende groep van nucleotiden, waarbij de aangrenzende nucleotide die de aangrenzende groep van nucleotiden vormt hetzij een niet gemodificeerd nucleotide is, hetzij een nucleotide is met een modificatie die verschilt van de modificatie van de gemodificeerde nucleotiden. Verder kan de eerste streng en/of de tweede streng het
15 aantal gemodificeerde nucleotiden omvatten en kan het aantal groepen van gemodificeerde nucleotiden omvatten.

De groep van gemodificeerde nucleotiden en/of de groep van aangrenzende
20 nucleotiden kunnen een aantal nucleotiden omvatten, waarbij het aantal gekozen is uit de groep bestaande uit één tot tien nucleotiden. In samenhang met een willekeurig gebied dat in de beschrijving gespecificeerd is dient men te begrijpen dat elk gebied elk afzonderlijk geheel getal openbaart tussen de respectievelijke getallen die gebruikt worden voor het definiëren van het gebied met inbegrip van twee getallen die het gebied definiëren. In het onderhavige geval omvat dus de groep één nucleotide, twee nucleotiden, drie nucleotiden, vier nucleotiden, vijf nucleotiden, zes nucleotiden, zeven
25 nucleotiden, acht nucleotiden, negen nucleotiden en tien nucleotiden.

Het patroon van gemodificeerde nucleotiden van de eerste streng kan dezelfde zijn als het patroon van gemodificeerde nucleotiden van de tweede streng en kan
30 passen bij het patroon van de tweede streng. Bovendien kan het patroon van de eerste streng verschoven worden door één of meer nucleotiden geassocieerd met het patroon van de tweede streng.

De hierboven besproken modificaties kunnen gekozen worden uit de groep bestaande uit amino, fluor, methoxy, alkoxy en alkyl.

5 De structuur met twee strengen van het siRNA kan aan één of aan beide zijden bot zijn. Meer specifiek kan de structuur met een dubbele streng aan het einde bot zijn op de structuurzijde met de dubbele streng die gedefinieerd is door het 5'-uiteinde van de eerste streng en het 3'-uiteinde van de tweede streng dan wel kan de structuur met een dubbele streng aan het einde bot zijn op de zijde van de structuur met een dubbele streng die gedefinieerd is aan het 3'-uiteinde van de eerste streng en de 5'-uiteinde van de tweede streng.

10 Bovendien kan ten minste één van de twee strengen een overhang/uitstekend stuk hebben van ten minste één nucleotide aan het 5'-uiteinde; het overhangende stuk kan bestaan uit ten minste één deoxyribonucleotide. Ten minste één van de strengen kan tevens eventueel een overhangend stuk van ten minste één nucleotide aan het 3'-uiteinde hebben.

15 De lengte van de structuur met een dubbele streng van het siRNA is gewoonlijk van ongeveer 17 tot 21 en meer bij voorkeur 18 of 19 basen. Verder kan de lengte van de eerste streng en/of de lengte van de tweede streng onafhankelijk van elkaar gekozen zijn uit de groep bestaande uit de gebieden van ongeveer 15 tot ongeveer 23 basen, 17 tot 21 basen en 18 of 19 basen.

20 Bovendien kan de complementariteit tussen de eerste streng en het target-nucleïnezuur perfect zijn of kan het duplex gevormd tussen de eerste streng en het targetnucleïnezuur ten minste 15 nucleotiden omvatten waarbij er één of twee niet-passende stukken zijn tussen de eerste streng en het targetnucleïnezuur die de structuur met een dubbele streng vormen.

25 In enkele gevallen omvatten zowel de eerste streng als de tweede streng ten minste één groep van gemodificeerde nucleotiden en ten minste één aangrenzende groep van nucleotiden, waarbij elke groep van gemodificeerde nucleotiden ten minste één nucleotide omvat en waarbij elke aangrenzende groep van nucleotiden ten minste één nucleotide omvat, waarbij elke groep van gemodificeerde nucleotiden van de eerste
30 streng op één lijn ligt met een aangrenzende groep van nucleotiden van de tweede streng, waarbij het meest terminale 5'-nucleotide van de eerste streng een nucleotide-groep van gemodificeerde nucleotiden is en het meest terminale 3'-nucleotide van de tweede streng een nucleotide van de aangrenzende groep van nucleotiden is. Elke groep

van gemodificeerde nucleotiden kan uit één enkel nucleotide bestaan en/of kan elke aangrenzende groep van nucleotiden uit één enkel nucleotide bestaan.

Bovendien is het mogelijk dat op de eerste streng het nucleotide dat de aangrenzende groep van nucleotiden vormt een niet-gemodificeerd nucleotide is dat opgesteld is in een 3'-richting ten opzichte van het nucleotide dat de groep van gemodificeerde nucleotiden vormt en op de tweede streng het nucleotide dat de groep van gemodificeerde nucleotiden vormt een gemodificeerd nucleotide is dat in de 5'-richting ten opzichte van het nucleotide dat de aangrenzende groep van nucleotiden vormt, is opgesteld.

Verder kan de eerste streng van het siRNA acht tot twaalf, bij voorkeur negen tot elf groepen van gemodificeerde nucleotiden omvatten en de tweede streng kan zeven tot elf, bij voorkeur acht tot tien groepen van gemodificeerde nucleotiden omvatten.

De eerste streng en de tweede streng kunnen verbonden zijn via een loopstructuur die een niet-nucleïnezuurpolymeer, zoals onder andere polyethyleenglycol, kan omvatten. Op een andere wijze kan de loopstructuur een nucleïnezuur omvatten.

Verder kan het 5'-terminus van de eerste streng van het siRNA verbonden zijn met het 3'-terminus van de tweede streng dan wel kan het 3'-uiteinde van de eerste streng verbonden zijn met het 5'-terminus van de tweede streng, waarbij de verbinding loopt via een "nucleïnezuurlinker" die gewoonlijk een lengte heeft tussen 10-2000 nucleobasen.

Bijzondere specificaties van siRNA's van de onderhavige uitvinding

De uitvinding verschaft een verbinding met de structuur (structuur A):

5' (N)_x - Z 3' (antisens streng)

3' Z'-(N')_y5' (sens streng)

waarbij elke N en N' een ribonucleotide is die al dan niet gemodificeerd kan zijn in zijn suikerrest en (N)_x en (N')_y een oligomeer is waarbij elke achtereenvolgende N of N' verbonden is met de volgende N of N' via een covalente binding;

waarbij elke x en y een geheel getal tussen 19 en 40 is;

waarbij elke van de groepen Z en Z' aanwezig of afwezig kan zijn, maar indien aanwezig dTdT kan zijn en covalent verbonden kan zijn aan het 3'-terminus van de streng, waarin deze aanwezig is;

5

en waarbij de sequentie van (N)_x een complementaire sequentie met betrekking tot cDNA van het RTP801-gen omvat.

In het bijzonder verschaft de onderhavige uitvinding de bovenstaande
10 verbinding, waarbij de sequentie van (N)_x één of meer van de antisens sequenties aanwezig in de tabellen A, B, C en D, in het bijzonder tabel D omvat.

In het bijzonder verschaft de uitvinding de bovenstaande verbinding, waarbij de covalente binding een fosfodiesterbinding is, waarbij $x = y$, bij voorkeur waarin $x = y = 19$, waarbij Z en Z' beide afwezig zijn, waarbij ten minste één ribonucleotide
15 gemodificeerd is in zijn suikergroep op de 2'-positie, waarbij de groep op de 2'-positie methoxy (2'-O-methyl) is, waarin alternerende ribonucleotiden gemodificeerd zijn in zowel de antisens als de sens strengen en waarbij de ribonucleotiden op de 5'- en 3'-termini van de antisens streng gemodificeerd zijn in hun suikergroepen, en de ribonucleotiden op de 5'- en 3'-termini van de sens streng gemodificeerd zijn in hun suikergroepen.
20

In het bijzonder is het siRNA, gebruikt in de onderhavige uitvinding een oligoribonucleotide, waarbij één streng achtereenvolgende nucleotiden omvat met, van 5' naar 3' de sequentie weergegeven in SEQ ID NOS: 3-52 of in SEQ ID NOS: 103-174 of in SEQ ID NOS: 247-295 of in SEQ ID NOS: 345-440 (welke sens strengen
25 zijn) heeft, waarbij een aantal van de basen gemodificeerd kan zijn, bij voorkeur door een 2-O-methylmodificatie, dan wel een homoloog hiervan, waarin ten hoogste 2 van de nucleotiden in elk terminaal gebied een base veranderd is.

Verder verschaft de onderhavige uitvinding een methode voor de behandeling van een patiënt die aan een ademhalingsziekte, een oogziekte, een microvasculaire
30 ziekte, een gehoorziekte, drukzweren of andere met bedlegerigheid geassocieerde huidwonden of een ruggenmergletsel of ziekte die het toedienen aan de patiënt van een farmaceutische samenstelling die een verbinding van bovenstaande structuur (A) (met één van de hierboven vermelde specifieke kenmerken) in een therapeutisch werkzame

hoeveelheid omvat, waardoor de patiënt hiermee behandeld wordt. Bovendien verschaft de uitvinding de toepassing van een therapeutisch werkzame hoeveelheid van bovenstaande structuur (A) (die één of meer van de bovenstaande specifieke kenmerken heeft) voor de bereiding van een geneesmiddel voor het bevorderen van het herstel in een patiënt die aan een ademhalingsstoornis, een oogziekte, een microvasculaire stoornis, een gehoorstoornis, drukzweren of andere met bedlegerigheid geassocieerde huidwonden of ruggenmergletsels of ziekte.

Een additioneel aspect van de onderhavige uitvinding verschaft een farmaceutische samenstelling die een verbinding van bovenstaande structuur (A) omvat voor de behandeling van één of meer van de ziekten en ziekte toestanden die in de beschrijving vermeld zijn.

Verder verschaft dit aspect een farmaceutische samenstelling die twee of meer verbindingen van bovenstaande structuur (A) omvat voor de behandeling van één of meer van de ziekten en ziekte toestanden die in de beschrijving vermeld zijn, waarbij de twee verbindingen fysisch met elkaar in de farmaceutische samenstelling gemengd zijn in hoeveelheden die gelijke activiteiten genereren dan wel op een andere wijze een voordelige activiteit vertonen of al dan niet covalent gebonden kunnen zijn dan wel met elkaar verbonden zijn via een nucleïnezuurlinker met een lengte variërende van 2-100, bij voorkeur 2-50 of 2-30 nucleotiden. Deze siRNA-moleculen omvatten derhalve een nucleïnezuurstructuur met een dubbele streng, zoals in de beschrijving beschreven is, waarbij twee siRNA-sequenties gekozen zijn uit de tabellen A-D en bij voorkeur uit de tabel A, ID nrs.: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 en 50 of siRNA nrs.: 257, 260-262 en 264-268 van tabel D zijn al dan niet covalent gebonden dan wel verbonden met een linker, waarbij een tandem-siRNA-molecuul wordt gevormd. Deze tandem-siRNA-moleculen die twee siRNA-sequenties omvatten zouden typisch 38-150 nucleotiden in lengte, meer bij voorkeur 38 of 40-60 nucleotiden in lengte, en dienovereenkomstig langer zijn indien meer dan twee siRNA-sequenties in het tandemmolecuul opgenomen zijn. Een langer tandemmolecuul die twee of meer langere sequenties omvat welke siRNA coderen, geproduceerd via inwendig cellulair processing, bijvoorbeeld lange dsRNA's, komt eveneens in aanmerking, evenals een tandemmolecuul coderende voor twee of meer shRNA's. Dergelijke tandemmoleculen worden eveneens beschouwd als onderdeel van de onderhavige uitvinding en verdere informatie daarover wordt hieronder gegeven.

De gecombineerde of tandemstructuren hebben het voordeel dat toxiciteit en/of off-targeteffecten van elke siRNA geminimaliseerd zijn, terwijl de doeltreffendheid verhoogd wordt.

In het bijzonder is het in de voorbeelden toegepaste siRNA zodanig gemodificeerd dat een 2'-O-Me-groep aanwezig was op de eerste, derde, vijfde, zevende, negende, elfde, dertiende, vijftiende, zeventiende en negentiende nucleotide van de antisens streng, waarbij dezelfde modificatie ofwel een 2'-O-Me-groep aanwezig was in de tweede, vierde, zesde, achtste, tiende, twaalfde, veertiende, zestiende en achttiende nucleotide van de sens streng. Bovendien dient opgemerkt te worden dat in het geval van deze bijzondere nucleïnezuuren volgens de uitvinding het eerste stuk identiek is met de eerste streng en het tweede stuk identiek is met de tweede streng en deze nucleïnezuuren zijn aan de uiteinden afgestompt. Het gebruikte siRNA was gefosforyleerd, maar beschouwd wordt dat een niet-gefosforyleerde versie eenvoudiger kan zijn om te bereiden op grote schaal en het niet-gefosforyleerde REDD-14, genoemd REDD-14NP, werd bevonden als even biologisch actief als REDD-14 in een CNV-model (zie voorbeeld 6). De sequentie van dit in de experimenten in de voorbeelden 6-8 toegepaste siRNA is dat van REDD-14, ofwel de sequentie met een inwendig referentienr. 14 (zie tabel A). De in de experimenten in voorbeeld 14 toegepaste siRNA's worden 801_1 en 801_4 genoemd; 801_1 heeft een intern referentienummer 257 in tabel D (SEQ ID NO: 429 [sens] en 525 [antisens]) en 801_4 heeft een intern referentienummer 260 in tabel D (SEQ ID NO: 432 [sens] en 528 [antisens]) (zie tabel D).

Deze sRNA's kunnen eveneens al dan niet gefosforyleerd zijn.

Het terminale gebied van het oligonucleotide heeft betrekking op basen 1-4 en/of 16-19 in de 19-mer-sequenties (tabellen A, B en D hieronder) en op basen 1-4 en/of 18-21 in de 21-mer-sequenties (tabel C hieronder).

Bovendien zijn de in de onderhavige uitvinding toegepaste siRNA's oligoribonucleotiden, waarbij één streng achtereenvolgende nucleotiden omvat met, van 5' naar 3', de sequenties weergegeven in SEQ ID NOS: 53-102 of SEQ ID NOS: 175-246 of SEQ ID NOS: 296-344 of SEQ ID NOS: 441-536 (antisens strengen) of een homoloog hiervan hebben, waarin ten hoogste 2 van de nucleotiden in elk terminaal gebied een base veranderd is.

Dus in bepaalde aspecten omvat het oligonucleotide een structuur met een dubbele streng, waarbij deze structuur met een dubbele streng een eerste streng en een tweede

streng omvat, waarbij de eerste streng een eerste stukje van achtereenvolgende nucleotiden omvat en de tweede streng een tweede stuk van aangrenzende nucleotiden omvat, waarbij het eerste stukje hetzij complementair, hetzij identiek is met een nucleïnezuursequentie coderende voor het RTP801-gen en waarbij het tweede stuk identiek is of complementair met een nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801. Het eerste stuk omvat ten minste 14 nucleotiden, bij voorkeur ten minste 18 nucleotiden en zelfs meer bij voorkeur 19 nucleotiden of zelfs ten minste 21 nucleotiden. In een uitvoeringsvorm omvat het eerste stuk van ongeveer 14 tot 40 nucleotiden bij voorkeur ongeveer 18 tot 30 nucleotiden, meer bij voorkeur van ongeveer 19 tot 27 nucleotiden en het meest bij voorkeur van ongeveer 19 tot 23 nucleotiden. In een uitvoeringsvorm omvat het tweede stuk van ongeveer 14 tot 40 nucleotiden bij voorkeur ongeveer 18 tot 30 nucleotiden, meer bij voorkeur van ongeveer 19 tot 27 nucleotiden en het meest bij voorkeur van ongeveer 19 tot 23 nucleotiden of zelfs ongeveer 19 tot 21 nucleotiden. In een uitvoeringsvorm correspondeert het eerste nucleotide van het eerste stuk met een nucleotide van de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801, waarbij het laatste nucleotide van het eerste stuk correspondeert met een nucleotide van de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801. In een uitvoeringsvorm omvat het eerste stuk een sequentie van ten minste 14 aangrenzende nucleotiden van een oligonucleotide, waarbij dit oligonucleotide gekozen is uit de groep bestaande uit SEQ ID NOS: 3-536, bij voorkeur uit de groep bestaande uit de oligoribonucleotiden met de sequentie van één of meer van de serienummers 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 en 50 in tabel A of 260-262 en 264-268 in tabel D. Verdere specificaties van de siRNA-moleculen die in de onderhavige uitvinding worden gebruikt kunnen een oligonucleotide verschaffen, waarbij het dinucleotide dTdT covalent verbonden is met het 3'-terminus, en/of in ten minste één nucleotide een suikergroep gemodificeerd is, mogelijkerwijze met een modificatie die een 2'-O-methylmodificatie omvat. Verder kan de 2'-OH-groep vervangen zijn door een groep of rest gekozen uit de groep bestaande uit -H-OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂CH₃, -NH₂ en F. Verder kunnen de voorkeurverbindingen van de onderhavige uitvinding, zoals zij hierboven beschreven zijn al dan niet gefosforyleerd zijn.

Bovendien kan het in de onderhavige uitvinding gebruikte siRNA een oligonucleotide zijn, waarin in de alternerende nucleotiden gemodificeerde suikers op beide strengen gelokaliseerd zijn. In het bijzonder kan het oligoribonucleotide één van de sens strengen omvatten, waarin het suiker gemodificeerd is in de terminale 5'- en 3'-

nucleotiden of één van de antisens strengen, waarin het suiker in de terminale 5'- en 3'-nucleotiden gemodificeerd is.

Verder omvatten verdere in de uitvinding toe te passen nucleïnezuuren ten minste 14 aangrenzende nucleotiden van één van de SEQ ID NOS: 3 tot 536 en meer
 5 bij voorkeur 14 aangrenzende nucleotidebasenparen aan elk willekeurig uiteinde van de structuur met een dubbele streng die het eerste stuk en het tweede stuk, zoals hierboven beschreven omvat. De deskundige zal duidelijk zijn dat gegeven de potentiële lengte van het nucleïnezuur volgens de uitvinding en in het bijzonder van de afzonderlijke stukken die dit nucleïnezuur volgens de uitvinding vormen, enige verschuivingen met
 10 betrekking tot de coderende sequentie van het RTP801-gen, zoals gedetailleerd in SEQ ID NO: 1 aan elke zijde mogelijk is, waarbij deze verschuivingen ten hoogste 1, 2, 3, 4, 5 en 6 nucleotiden in beide richtingen kunnen zijn en waarbij de aldus gegenereerde nucleïnezuurmoleculen als dubbele streng eveneens binnen de onderhavige uitvinding zullen vallen.

15 Een additioneel aspect van de onderhavige uitvinding heeft betrekking op een functioneel nucleïnezuur dat een structuur met een dubbele streng omvat, waarbij deze structuur met een dubbele streng omvat:

een eerste streng en een tweede streng, waarbij
 20 de eerste streng een eerste stuk van aangrenzende nucleotiden omvat en de tweede streng een tweede stuk van aangrenzende nucleotiden omvat, waarbij
 25 het eerste stuk hetzij complementair, hetzij identiek is met een nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801 en waarbij het tweede stuk hetzij identiek, hetzij complementair is met een nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801.

30 In een uitvoeringsvorm downreguleert het nucleïnezuur RTP801, waarbij het downreguleren van RTP801 gekozen is uit de groep bestaande uit het downreguleren van de RTP801-functie, het downreguleren van de RTP801-proteïne en het downreguleren van de RTP801-mRNA-expressie.

In een uitvoeringsvorm omvat het eerste stuk ten minste 14 nucleotiden, bij voorkeur ten minste 18 nucleotiden en zelfs nog meer bij voorkeur 19 nucleotiden.

In een uitvoeringsvorm omvat het eerste stuk van ongeveer 14 tot 40 nucleotiden, bij voorkeur ongeveer 18 tot 30 nucleotiden, meer bij voorkeur van ongeveer 19 tot 27 nucleotiden en het meest bij voorkeur van ongeveer 19 tot 23 nucleotiden.

In een uitvoeringsvorm omvat het tweede stuk van ongeveer 14 tot 40 nucleotiden, bij voorkeur ongeveer 18 tot 30 nucleotiden, nog meer bij voorkeur van ongeveer 19 tot 27 nucleotiden en het meest bij voorkeur van ongeveer 19 tot 23 nucleotiden.

In een uitvoeringsvorm correspondeert het eerste nucleotide van het eerste stuk met een nucleotide van de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801, waarbij het laatste nucleotide van het eerste stuk correspondeert met een nucleotide van de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801.

In een uitvoeringsvorm omvat één stuk een sequentie van ten minste 14 aangrenzende nucleotiden met een nucleïnezuursequentie, waarbij deze nucleïnezuursequentie gekozen is uit de sequenties beschreven in tabellen A-D, bij voorkeur uit de groep omvattende SEQ ID NOS: 53, 66, 6, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 91, 92, 93, 94, 96, 101, 102, 525, 529, 530, 532, 533, 534, 535 en 536, meer bij voorkeur gekozen uit de groep omvattende SEQ ID NOS: 66, 75, 79, 91, 94, 101, 102, 525 en 528, en het meest bij voorkeur gekozen uit de groep omvattende SEQ ID NOS: 66, 74, 75, 79, 525 en 528.

In een uitvoeringsvorm omvat het andere stuk een sequentie van ten minste 14 aangrenzende nucleotiden van een nucleïnezuursequentie, waarbij deze nucleïnezuursequentie gekozen is uit de sequenties weergegeven in tabellen A-D, bij voorkeur uit de groep omvattende SEQ ID NOS: 3, 16, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 51, 52, 429, 432, 433, 434, 436, 437, 438, 439 en 440, meer bij voorkeur gekozen uit de groep omvattende SEQ ID NOS: 16, 24, 25, 29, 41, 44, 51 en 52 en het meest bij voorkeur gekozen uit de groep omvattende SEQ ID NOS: 16, 24, 25 en 29.

In een uitvoeringsvorm

heeft het eerste stuk een sequentie volgens SEQ ID NO: 53 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 3;

- het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 66 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 16;
- het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 67 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 17;
- 5 het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 72 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 22;
- het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 73 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 23;
- 10 het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 74 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 24;
- het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 75 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 25;
- het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 76 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 26;
- 15 het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 77 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 27;
- het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 79 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 29;
- het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 91 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 41;
- 20 het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 92 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 42;
- het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 93 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 43;
- 25 het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 94 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 44;
- het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 95 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 45;
- het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 96 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 46;
- 30 het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 101 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 51; en

het eerste stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 102 en het tweede stuk heeft een sequentie volgens SEQ ID NO: 52.

In een uitvoeringsvorm heeft het eerste stuk ene nucleïnezuursequentie die
 5 gekozen is uit de groep omvattende SEQ ID NO: 53, 66, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 101, 102, 525, 528, 529, 530, 532, 533, 534, 535 en 536.

Begrepen dient te worden dat hoewel de termen “eerste” en “tweede” stuk gebruikt worden in samenhang met de nucleïnezuren volgens de uitvinding, worden zij gebruikt slechts voor het gemak en elk willekeurig nucleïnezuurmolecuul volgens de
 10 uitvinding dat beschreven is als hebbende een eerste stuk met de sequentie X en een tweede stuk met de sequentie Y eveneens beschreven zou kunnen worden als hebbende een eerste stuk met de sequentie Y en een tweede stuk met de sequentie X, vooropgesteld dat begrepen wordt dat één stuk opgenomen in de antisens streng, die antisens dient te zijn ten opzichte van een deel van de coderende sequentie van het RTP801-gen,
 15 en het andere stuk opgenomen is in de sens streng die complementair moet zijn (of-schoon niet voor 100% complementair) met de antisens streng, alles volgens de definities en specificaties die in de beschrijving voorgesteld zijn.

In een eerste uitvoeringsvorm omvat de eerste en/of de tweede streng ten minste één overlapnucleotide aan het 3'-uiteinde dat complementair is met of identiek
 20 is aan het corresponderende nucleotide van een nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801.

In een eerste uitvoeringsvorm omvat de eerste en/of de tweede streng 1 tot 15 overlapnucleotiden aan het 3'-uiteinde, bij voorkeur omvat de eerste en/of de tweede streng 1 tot 10 overlapnucleotiden aan het 3'-uiteinde en meer bij voorkeur omvat de
 25 eerste en/of de tweede streng 1 tot 5 overlapnucleotiden aan het 3'-uiteinde, en het meest bij voorkeur omvat de eerste en/of de tweede streng 1 tot 2 overlap (overhang) nucleotiden aan het 3'-uiteinde.

In een uitvoeringsvorm omvat de eerste streng en/of de tweede streng ten minste één overhangnucleotide dat verschilt van het corresponderende nucleotide van
 30 de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801.

In een eerste uitvoeringsvorm omvat de eerste streng twee overhangnucleotiden die verschillen van het corresponderende nucleotide van een nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801.

In een eerste uitvoeringsvorm bestaat de eerste streng uit slechts het eerste stuk.

In een uitvoeringsvorm bestaat de tweede streng uit slechts het tweede stuk.

In een uitvoeringsvorm omvat(ten) het eerste stuk en/of de eerste streng
5 ribonucleotiden.

In een uitvoeringsvorm omvat(ten) het tweede stuk en/of de tweede streng ribonucleotiden.

In een uitvoeringsvorm bestaat het eerste stuk en/of de tweede streng uit ribonucleotiden.

10 In een uitvoeringsvorm worden enkele of alle nucleotiden gemodificeerd.

In een geprefereerde uitvoeringsvorm is deze modificatie gerelateerd aan de nucleobasegroep van het nucleotide, aan de suikergroep van het nucleotide en/of de fosfaatgroep van het nucleotide.

In een meer geprefereerde uitvoeringsvorm is de modificatie een modifica-
15 tie van een suikergroep en de modificatie is een modificatie aan de 2'-positie, waarbij de 2'-OH-groep vervangen is door een groep of rest die gekozen is uit de groep bestaande uit -H-OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂CH₃, -NH₂ en -F.

In een uitvoeringsvorm van de modificatie is een modificatie van de nucleobasegroep en de modificatie of de gemodificeerde nucleobase gekozen uit de
20 groep omvattende inosine, xanthine, hypoxanthine, 2-aminoadenine, 6-methyl, 2-propyl en andere alkyladeninen, 5-halogeenuuracil, 5-halogeencytosine, 5-halogeencytosine, 6-azacytosine, 6-azethymine, pseudo-uracil, 4-thiouracil, 8-halogeenuadenine, 8-aminodenine, 8-thioladenine, 8-thiolalkyladeninen, 8-hydroxyladenine en andere 8-gesubstitueerde adeninen, 8-halogeenguaninen, 8-aminoguanine, 8-thiolguanine, 8-
25 thioalkylguanine, 8-hydroxylguanine en andere gesubstitueerde guaninen, andere aza- en deaza-adeninen, andere aza- en deazaguaninen, 5-trifluormethyluracil en 5-trifluorcytosine.

In een uitvoeringsvorm is de modificatie een modificatie van de fosfaat-
groep, waarbij de gemodificeerde fosfaatgroep gekozen is uit de groep die fosfothioaat
30 omvat.

In een uitvoeringsvorm omvat het eerste stuk en/of het tweede stuk een aantal groepen van gemodificeerde nucleotiden met een modificatie op de 2'-positie, waarbij binnen het stuk elke groep van gemodificeerde nucleotiden geflankeerd is aan

één of aan beide zijden door een aangrenzende groep van nucleotiden, waarbij de aangrenzende nucleotiden die de aangrenzende groep van nucleotiden vormt hetzij een niet-gemodificeerd nucleotide, hetzij een nucleotide met een modificatie die verschilt van de modificatie van de gemodificeerde nucleotiden zijn.

5 In een geprefereerde uitvoeringsvorm bestaat het eerste stuk en/of het tweede stuk uit ribonucleotiden.

 In een meer geprefereerde uitvoeringsvorm omvat het eerste en het tweede stuk een aantal groepen van gemodificeerde nucleotiden.

10 In een uitvoeringsvorm omvat het eerste stuk een aantal groepen van gemodificeerde nucleotiden.

 In een uitvoeringsvorm omvat het tweede stuk de veelheid groepen van gemodificeerde nucleotiden.

15 In een uitvoeringsvorm omvat elke groep van gemodificeerde nucleotiden en/of elke groep van aangrenzende nucleotiden een aantal nucleotiden, waarbij het aantal gekozen is uit de groep die één nucleotide tot tien nucleotiden omvat.

 In een uitvoeringsvorm omvat het eerste stuk een eerste patroon van gemodificeerde nucleotiden en het tweede stuk omvat een tweede patroon van gemodificeerde nucleotiden.

20 In een uitvoeringsvorm is het eerste patroon hetzelfde patroon als het tweede patroon.

 In een andere uitvoeringsvorm ligt het eerste patroon in dezelfde richting als het tweede patroon.

 In een voorkeursuitvoeringsvorm is het eerste patroon verschoven door één of meer nucleotiden ten opzichte van het tweede patroon.

25 In een uitvoeringsvorm bestaat elke van de groepen gemodificeerde nucleotiden uit één gemodificeerd nucleotide en elke van de groep van aangrenzende nucleotiden bestaat uit één niet-gemodificeerd nucleotide of een nucleotide met een modificatie die verschilt van de modificatie van de gemodificeerde nucleotiden.

30 In een voorkeursuitvoeringsvorm heeft het gemodificeerde nucleotide een - OMe-groep aan de 2'-positie.

 In een voorkeursuitvoeringsvorm is het aangrenzende nucleotide een ribonucleotide dat een 2'-OH-groep heeft.

In een uitvoeringsvorm begint het eerste stuk met een gemodificeerd nucleotide aan het 5'-uiteinde en elk ander nucleotide van het stuk is tevens een gemodificeerd nucleotide, terwijl een tweede nucleotide beginnende met het 5'-uiteinde en elk ander nucleotide een niet-gemodificeerd nucleotide is of een nucleotide met een
5 modificatie die verschilt van de modificatie van één of meer gemodificeerde nucleotiden.

In een uitvoeringsvorm is het eerste stuk een antisens oriëntering ten opzichte van de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801.

Een ander aspect van de onderhavige uitvinding gerelateerd aan een farmaceutische samenstelling die een nucleïnezuur volgens het eerste aspect van de onderhavige uitvinding en/of een vector volgens het tweede aspect van de onderhavige uitvinding en bij voorkeur een farmaceutisch aanvaardbare drager omvat; deze samenstelling is eventueel bestemd voor systemische of voor lokale toediening.

In een uitvoeringsvorm is de samenstelling voor de behandeling van een
15 ziekte, waarbij de ziekte gekozen is uit de groep die tumorziekten omvat.

In een ander aspect wordt het aan de onderhavige uitvinding ten grondslag liggende probleem opgelost door een methode voor de preventie en/of behandeling van een patiënt die behoefte heeft aan deze preventie en/of behandeling, welke omvat de toediening van een nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding en/of een vector
20 volgens de onderhavige uitvinding en/of een farmaceutische samenstelling volgens de onderhavige uitvinding.

In een verdere uitvoeringsvorm worden een nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding en/of een vector volgens de onderhavige uitvinding gebruikt voor de productie van een geneesmiddel. Het geneesmiddel kan zijn voor de preventie
25 en/of de behandeling van een ziekte, waarbij deze ziekte gekozen is uit de groep die tumorziekten omvat. De tumorziekte kan gekozen zijn uit de groep die vaste tumoren, metastatische tumoren, waaronder PTEN-negatieve tumoren, tumoren die geneesmiddelresistent zijn en tumoren waarbij RTP801-inhibitie kan worden gebruikt voor het sensibiliseren. Verder kan de tumorziekte een tumorziekte in een laat stadium zijn dan
30 wel kan deze cellen omvatten die tumorsuppressornegatief zijn; waarbij de tumorsuppressor PTEN kan zijn.

Een verder aspect van de onderhavige uitvinding wordt opgelost door middel van een methode voor het ontwerpen of screenen van een nucleïnezuur dat geschikt is voor het downreguleren van RTP801, welke methode de volgende stappen omvat:

- 5 a) het ontwerpen of screenen van een nucleïnezuur dat geschikt is voor het downreguleren van RTP801;
- b) het beoordelen van een defect van een nucleïnezuur volgens één of meer van de bovenstaande aspecten van de onderhavige uitvinding;
- 10 en
- c) het vergelijken van het effect van het nucleïnezuur van trap a) met het effect van het nucleïnezuur van trap b).

15 In een uitvoeringsvorm is het effect het downreguleren van RTP801.

Een additioneel aspect van de onderhavige uitvinding is de toepassing van een nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding als sensibiliseermiddel, in het bijzonder als sensibiliseermiddel bij de behandeling van een ziekte waarbij deze ziekte bij voorkeur gekozen is uit de groep die tumor en meer bijzonder tumoren die resistent zijn tegen een behandeling onder toepassing van chemotherapeutica en/of radiotherapeutica, omvat. Additionele ziekten waarvoor een nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding als sensibiliseermiddel kan dienen, zijn in de beschrijving geopenbaard.

De onderhavige aanvraag openbaart dat een nucleïnezuur dat een structuur met een dubbele streng omvat die specifiek is voor RTP801 een geschikt middel is voor het remmen van angiogenese/groei van vasculatuur en vasculair lekken (zowel uit de bestaande vasculatuur als vanuit groeiende vasculatuur). Verder beschrijft de onderhavige aanvraag (zonder aan enige theorie gebonden te willen zijn) dat RTP801 aangezien dit gen een stressinduceerbare proteïne is (geïnduceerd door hypoxia, oxidatieve stress, thermische stress, ER-stress) een factor is die als functie heeft het nuanceren van de celrespons op een energieonbalans. Deze inhibitie van RTP801 door middel van dit nucleïnezuur met een dubbele streng is geschikt voor de behandeling van elke ziekte waarbij cellen gered moeten worden van apoptose te wijten aan stressvolle omstandigheden bijvoorbeeld ziekten die vergezeld gaan met de dood van normale cellen) dan

wel waarbij cellen aangepast aan stressvolle omstandigheden te wijten aan veranderingen in RTP801-expressie gedood dienen te worden (bijvoorbeeld tumorcellen). In het laatste geval wordt na remmen van RTP801 via dit nucleïnezuur met een dubbele streng, deze overlevingsfactor met anti-apoptotische functie in hypoxische cellen, meer in het bijzonder in hypoxische kankercellen, onwerkzaam gemaakt waardoor de cellen vrij van door RTP801 gemedieerde bescherming tot apoptose gebracht kunnen worden. Dit kan bovendien optreden wanneer andere apoptose bevorderende factoren aanwezig zijn. Deze andere apoptose bevorderende factoren omvatten onder andere chemotherapie en radiotherapie. Met andere woorden, kan het nucleïnezuur met een dubbele streng volgens de onderhavige uitvinding werkzaam zijn alleen in kankerbehandeling (monotherapie) en tevens als supplementaire therapie.

Deze structuur met een dubbele streng omvat een eerste streng en een tweede streng, waarbij de eerste streng een eerste stuk van aangrenzende nucleotiden omvat en de tweede streng een tweede stuk van aangrenzende nucleotiden omvat, waarbij het eerste stuk hetzij complementair is, hetzij identiek aan een nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801 en waarbij het tweede stuk hetzij identiek, hetzij complementair is aan een nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801. Door in het bijzonder RTP801 als target te gebruiken voor dit soort nucleïnezuur met een dubbele streng is het dus tevens mogelijk om onmiddellijk een target in de betrokken cascade in de groei en ontwikkeling van vasculatuur en respectievelijk angiogenese te behandelen en dus geschiedt dit op een wijze die verschillend is vergeleken met het door VEGF-inhibitoren, zoals VEGF-antilichamen, gebruikte pad. Zonder aan enige theorie gebonden te willen zijn veronderstellen de uitvinders van de onderhavige uitvinding dat het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding zijn functie kan uitoefenen in die cellen welke een achtergrond verschaffen die betrokken is bij of waargenomen is in samenhang met één of andere ziekte, waarbij ongewenste, in het bijzonder door hypoxie geïnduceerde angiogenese en/of groei of ontwikkeling van vasculatuur optreedt. Dit begrip wordt ondersteund door de bevinding dat RTP801-knock-outmuizen geen fenotype vertonen dat verschilt van wilde typen muizen onder niet-hypoxische omstandigheden. Na inductie van hypoxie, zoals waargenomen in een ziekte-toestand, zoals bijvoorbeeld tumorgroei, resulteert de RTP801-geassocieerde knock-out in een pathologie die vergelijkbaar is met die van één waargenomen bij de mens die aan dit soort ziekte lijdt.

Men dient te begrijpen dat het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding bij voorkeur een functioneel nucleïnezuur is. Zoals in de beschrijving wordt gebruikt betekent de term functioneel nucleïnezuur bij voorkeur een nucleïnezuur waarvan de functie verschilt van activiteit als template in de cel voor de transcriptie van één of ander hnRNA, mRNA of elk ander transcriptieproduct, waarbij hetzij het hnRNA, mRNA of elk ander transcriptieproduct dan wel het nucleïnezuur volgens de uitvinding onderworpen wordt aan een translatieproces, bij voorkeur een cellulair translatieproces resulterende in een biologisch actief RTP801-proteïne. Erkend dient te worden dat een functioneel nucleïnezuur, zoals hier toegepast wordt, in staat is tot het reduceren van de expressie van een targetnucleïnezuur. Meer bij voorkeur is de reductie gebaseerd op een posttranscriptioneel gen-inactiveringsproces van het targetnucleïnezuur. Zelfs meer bij voorkeur is deze reductie gebaseerd op RNA-interferentie. Een zeer geprefereerde vorm van het functionele nucleïnezuur is een siRNA-molecuul of elk ander molecuul met hetzelfde effect als een siRNA-molecuul. Dit andere molecuul wordt gekozen uit de groep omvattende siRNA's, synthetische siRNA's, shRNA's en synthetische shRNA's. Zoals in de beschrijving wordt toegepast kunnen siRNA's verder een expressievector omvatten die afgeleid is van siRNA's, waarbij de expressievector in een voorkeursuitvoeringsvorm een virus is, zoals bijvoorbeeld adenovirussen, adenogeassocieerde virussen, herpesvirussen en lentivirussen. Zoals gebezigd wordt in de beschrijving betekent shRNA bij voorkeur korte haarspeld-RNA's. Dit shRNA kan synthetisch geproduceerd worden dan wel worden gegenereerd onder toepassing van vectorgecodeerde expressiesystemen, bij voorkeur onder toepassing van RNA-polymerase III-promotoren. In samenhang hiermee dient erkend te worden dat het functionele zuur volgens de onderhavige uitvinding gericht is op RTP801 waarnaar in de beschrijving verwezen wordt als de target en het nucleïnezuur coderende voor de target als het targetnucleïnezuur.

Zoals bij voorkeur in de beschrijving wordt gebezigd omvat de structuur met een dubbele streng van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding elke structuur met een dubbele streng waarbij deze structuur met een dubbele streng bij voorkeur gegenereerd wordt door het eerste stuk en het tweede stuk verschaft door het nucleïnezuur dat het basisontwerp heeft. De dubbelstrengstructuur kan één of verscheidene niet-passende stukken hebben. Deze structuur met een dubbele streng wordt gevormd door Watson-Crick-basenparen en/of Hoogsteen-basenparen en/of vergelijkbare

basenparenmechanismen. Gebaseerd op het basisonwerp van het nucleïnezuur volgens de uitvinding verdient het de voorkeur dat één stuk in antisens oriëntering is ten opzichte van een nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801 of een deel hiervan, terwijl het andere stuk is in de sens oriëntering ten opzichte van een nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801 of een onderdeel hiervan. Daardoor is één stuk complementair met een nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801 of een onderdeel hiervan en het andere stuk is identiek aan de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801 dan wel een onderdeel hiervan. In samenhang hiermee dient erkend te worden dat de term identiek vanzelfsprekend betekent tevens tendele identiek, waarbij de identiciteit uitgedrukt als homologie is ten minste 80%, bij voorkeur 90%, nog meer bij voorkeur 95, 96, 97, 98, 99 of 100%. Evenals de definitie van identiciteit, kan complementariteit worden gedefinieerd in termen van homologie, waarbij deze homologie van dezelfde orde van grootte is als de identiciteit indien de complementaire streng getranslateerd zou worden in de identieke streng volgens de Watson-Crick-basenparenregels. In een alternatieve uitvoeringsvorm is één stuk identiek met een nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801 of een onderdeel hiervan en het andere stuk is complementair met een nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801 of een onderdeel hiervan.

In een geprefereerde uitvoeringsvorm downreguleert het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding de RTP801-functie. Het downreguleren van de RTP801-functie geschiedt bij voorkeur door reductie in het niveau van expressie op het proteïneniveau en/of het mRNA-niveau, waarbij dit gereduceerde niveau van expressie bij voorkeur op het niveau van de proteïne heel laag kan zijn en zelfs 5% kan bedragen en hoog kan zijn tot een waarde van 100%, met verwijzing naar een expressie onder omstandigheden waarbij het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding niet wordt toegediend of niet functioneel actief is. Deze omstandigheden zijn bij voorkeur de omstandigheden van, dan wel als aanwezig in een expressiesysteem, bij voorkeur een expressiesysteem voor RTP801. Dit expressiesysteem is bij voorkeur een translatiesysteem dat een *in vitro* translatiesysteem, meer bij voorkeur een cel, orgaan en/of een organisme kan zijn. Het verdient meer de voorkeur dat het organisme een multicellulair organisme is, meer bij voorkeur een zoogdier, waarbij dit zoogdier bij voorkeur gekozen is uit de groep omvattende mens, aap, muis, rat, cavia, konijn, kat, hond, schaap, koe, paard, vee en varken. In samenhang met het downreguleren dient erkend te wor-

den dat het downreguleren een functie van tijd kan zijn, dat wil zeggen het downregulerende effect wordt niet noodzakelijkerwijze onmiddellijk waargenomen na toediening of functionele activering van de nucleïnezuren volgens de onderhavige uitvinding, maar kan zowel in tijd als in ruimte uitgesteld zijn, dat wil zeggen in verschillende cellen, weefsels en/of organen. Deze verschuiving kan variëren van 5 tot 100%, bij voorkeur 10 tot 50%. Erkend zal worden door de deskundigen op dit gebied dat een 5% reductie voor een langere tijdsperiode even effectief kan zijn als een 100% reductie over een korte tijdsperiode. Het zal ook door de deskundigen op dit gebied erkend worden dat deze verschuiving sterk afhankelijk is van het bijzondere functionele nucleïnezuur dat daadwerkelijk wordt gebruikt alsmede van de targetcelpopulatie en dus uiteindelijk van de te behandelen ziekte en/of de te voorkomen ziekte volgens de technische leer van de onderhavige uitvinding. Voorzover een 5% reductie over een langere tijdsperiode even effectief kan zijn als een 100% reductie over een kortere tijdsperiode zal het door de deskundigen op dit gebied erkend worden dat de verschuiving kan optreden op elk niveau zoals hierboven beschreven, dat wil zeggen een verschuiving in functie, waarbij deze functie elke functie kan zijn die door RTP801 vertoond wordt, een verschuiving in proteïne-expressie of een verschuiving op het mRNA-expressieniveau.

In een voorkeursuitvoeringsvorm omvat het eerste stuk ten minste 14 nucleotiden, bij voorkeur 14 aangrenzende nucleotiden. Door de deskundige op dit gebied zal erkend worden dat het eerste stuk een lengte dient te hebben die specifiek gericht is op een nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801 en meer specifiek het nucleïnezuur coderende voor RTP801, zoals aanwezig in het translatiesysteem, waarbij de expressie van RTP801 gereduceerd moet worden, mogelijk te maken. Wederom zonder aan enige theorie of enige werkingswijze van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding gebonden te willen zijn schijnt het zo te zijn dat er een interactie bestaat tussen het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding en de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801, bij voorkeur op het transcriptieniveau, dat wil zeggen na het produceren van een mRNA uitgaande van de respectievelijke nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801. Vanwege de waarschijnlijkheid dat elke sequentie van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding identiek is aan of complementair is met een sequentie aanwezig in het genoom of transcriptoom van het translatiesysteem, dient de lengte van het eerste stuk zodanig lang te zijn dat gewaarborgd wordt, dat in de veronderstelling dat één of ander soort basenparen tussen het nucleïnezuur

coderende voor RTP801 en één van de strengen van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding daadwerkelijk optreedt, slechts de sequentie coderende voor RTP801, maar geen andere coderende sequentie, zeker geen andere essentiële coderende sequentie van het genoom of het transcriptoom in aanmerking komt voor of door
 5 een dergelijk basenparen. Door deze lengte kan het optreden van off-targeteffecten gereduceerd en bij voorkeur geëlimineerd worden. Ter verhoging van dit specifieke gericht zijn op RTP801 en de nucleïnezuursequentie coderende hiervoor heeft het eerste stuk bij voorkeur een lengte van ten minste 18 of 19 nucleotiden. De bovengrens voor de lengte van het eerste stuk is bij voorkeur minder dan 50 nucleotiden, echter kan de
 10 lengte significant langer zijn en kan 100, 200 of zelfs 500 nucleotiden van elke lengte daartussen omvatten. Afgezien daarvan zou de deskundige de voorkeur geven aan een tamelijk kort eerste stuk, in het bijzonder in het geval van het nucleïnezuur volgens de uitvinding chemisch gesynthetiseerd wordt naarmate de sequentie korter is, hoe korter de tijd is en minder materiaal consumerende de synthese daarvan zal zijn en des te lager
 15 de snelheid zal zijn waarbij onjuiste nucleotiden in de respectievelijke sequentie er ingevoegd worden. Een andere factor die in aanmerking dient te worden genomen in samenhang met het vaststellen van de lengte van het eerste stuk is het feit dat gewoonlijk bij een lengte onder de 50 of meer nucleotiden een niet-specifieke interferonrespons waargenomen kan worden. Het hangt af van de bijzondere te behandelen ziekte-toestand
 20 of deze soort niet-specifieke interferonrespons al dan niet getolereerd moet worden. Bijvoorbeeld zou een interferonrespons getolereerd worden indien de interferonrespons en/of de expressie van de interferongenen tot de pathogene cellen beperkt kunnen worden.

Met het oog hierop zijn lengten van het eerste stuk die meer de voorkeur verdienen van ongeveer 14 tot 40 nucleotiden, 18 tot 30 nucleotiden, 19 tot 27 nucleotiden, 21 tot 25 nucleotiden en 19 tot 23 nucleotiden.

Dezelfde overwegingen als hierboven beschreven voor het eerste stuk zijn van toepassing op het tweede stuk die dus elke lengte kan omvatten, zoals in de beschrijving beschreven is, in samenhang met het eerste stuk. Het valt tevens binnen de
 30 onderhavige uitvinding dat de lengte van het eerste stuk verschilt van de lengte van het tweede stuk, echter verdient het de voorkeur dat beide stukken dezelfde lengte hebben.

Volgens het basisontwerp van het nucleïnezuur zijn het eerste en het tweede stuk onderdelen van de eerste streng en de tweede streng respectievelijk van het nucleï-

nezuur volgens de onderhavige uitvinding. Erkend zal worden dat aan beide uiteinden, dat wil zeggen aan het 5'-uiteinde en aan het 3'-uiteinde de eerste streng en/of de tweede streng één of verscheidene nucleotiden, bij voorkeur additionele nucleotiden, in elke combinatie kunnen omvatten.

5 In samenhang hiermee dient erkend te worden dat die nucleotiden van de afzonderlijke streng die verder gaat dan de uiteinden van het stuk corresponderende met de respectievelijke streng gebruikt kan worden om een verdere bijdrage te leveren tot de complementariteit en identiciteit respectievelijk van het stuk en dus tot het specifiek adresseren van de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801.

10 Erkend zal worden dat in principe, gebaseerd op de technische leer die in de beschrijving beschreven is, het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding gericht kan zijn op elk deel van de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801, bij voorkeur coderende voor RTP801 in het translatiesysteem waar de expressie van RTP801 gereduceerd dient te worden. Tot dusver omvat de onderhavige uitvinding elk nucleïne-
 15 nezuur met de kenmerken zoals gedefinieerd in de beschrijving, waarbij de complementariteit en identieke strengen en stukken van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding in principe kan beginnen uitgaande van elk nucleotide van de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801. Dientengevolge, onder de voorwaarde dat het eerste stuk van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding complementair is
 20 met de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801, dat wil zeggen is de antisens streng daarvan of is in antisens oriëntering ten opzichte daarvan, correspondeert het eerste nucleotide van dit stuk, dat wil zeggen het meest 5'-terminale nucleotide correspondeert, dat wil zeggen ligt in dezelfde richting als het laatste nucleotide van de sequentie coderende voor RTP801 aan het 3'-uiteinde. In een andere uitvoeringsvorm
 25 correspondeert dit meest 5'-terminale nucleotide met het op één na laatste nucleotide van het nucleïnezuur coderende voor RTP801 enz. totdat de laatste positie bereikt is die gegeven de lengte van het antisens stuk nog steeds het mogelijk maakt dat de antisens streng van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding complementair is met de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801. In zoverre elk nucleïnezuur volgens
 30 de onderhavige uitvinding binnen de onderhavige uitvinding valt, dat gegenereerd kan worden door het scannen van de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801 uitgaande van het meest 5'-terminale nucleotide hiervan en liggende op het basisontwerp van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding en het realiseren van de ken-

merken van dit nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding. Dezelfde overwegingen zijn van toepassing op de uitvoeringsvormen die in de beschrijving beschreven zijn, waarbij de complementariteit en de identiciteit van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding niet slechts verschaft is door het eerste stuk en het tweede stuk
 5 respectievelijk, maar deze complementariteit en identiciteit omvatten tevens één of meer nucleotiden verder dan het eerste en het tweede stuk respectievelijk, zijnde dan een onderdeel van de eerste streng respectievelijk de tweede streng.

Van de verscheidene nucleïnezuren volgens de onderhavige uitvinding, zoals deze in de beschrijving beschreven zijn verdienen die met de interne referentie-
 10 nummers 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 en 50 (zie tabel A) en 257, 260-262 en 264-268 (zie tabel D) in het bijzonder de voorkeur. In samenhang hiermee dient opgemerkt te worden dat die nucleïnezuren volgens de onderhavige uitvinding die gebruikt kunnen worden in zowel de mens als het diermodel, zoals bijvoorbeeld een rat en/of een muis bijzonder nuttig zijn. Het verrassende voordeel van deze bijzondere nucleïnezuren vol-
 15 gens de onderhavige uitvinding berust op het feit dat zij effectief zijn in zowel de mens als in het diermodel, hetgeen betekent dat de testresultaten verkregen uit het diermodel onmiddellijk overgebracht kunnen worden vanuit het diermodel naar de mens en meer in het bijzonder zonder de noodzaak voor het maken van veranderingen aan de humane sequentie die anders noodzakelijk worden in het geval dat het nucleïnezuur volgens de
 20 onderhavige uitvinding ontworpen was zodanig dat zij (a) één of meer sequenties die verschillen tussen de species, meer in het bijzonder de species gebruikt voor het diermodeltesten en de mens als de uiteindelijk geprefereerde organismen of patiënt. Het verdient verder de voorkeur dat deze nucleïnezuren een modificatiepatroon hebben, zoals tevens in de voorbeelden is beschreven.

Echter valt het eveneens binnen de onderhavige uitvinding dat elke van de sequenties volgens SEQ ID NOS: 3, 16-17, 22-27, 29, 41-46, 51-53, 66-67, 72-77, 79, 91-96, 101-102, 525, 528-530, 532-536 en respectievelijke combinaties resulterende van de nucleïnezuurmoleculen volgens de onderhavige uitvinding met interne referen-
 25 tiennummers 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 en 50 (van tabel A) en 257, 260-262 en 264-268 (van tabel D) slechts tendele opgenomen is in een verder nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding. Bij voorkeur omvatten de andere nucleïnezuren volgens de uitvinding ten minste 14 aangrenzende nucleotiden van de SEQ ID NOS: 3, 16-17, 22-
 30 27, 29, 41-46, 51-53, 66-67, 72-77, 79, 91-96, 101-102, 525, 528-530, 532-536 en meer

bij voorkeur 14 aangrenzende nucleotidebasenparen aan elk uiteinde van de structuur met een dubbele streng samengesteld uit het eerste stuk en het tweede stuk, zoals in de voorafgaande tabel is weergegeven. De deskundigen op dit gebied zullen begrijpen dat, gegeven de potentiële lengte van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding en in het bijzonder van de afzonderlijke stukken die dit nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding vormen, zullen enkele verschuivingen met betrekking tot de coderende sequentie van RTP801 aan elke zijde mogelijk zijn, waarbij deze verschuivingen tot 1, 2, 3, 4, 5 en 6 nucleotiden in beide richtingen kunnen zijn en waarbij de aldus gegenereerde nucleïnezuurmoleculen met een dubbele streng tevens binnen de onderhavige uitvinding vallen.

In een geprefereerde uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding hebben het eerste stuk en de eerste streng dezelfde lengte. Op dezelfde wijze verdient het de voorkeur dat de tweede streng dezelfde lengte heeft als het tweede stuk, waarbij het nog meer de voorkeur verdient dat het eerste stuk en de tweede streng dezelfde lengte hebben. In een nog meer geprefereerde uitvoeringsvorm omvat slechts de eerste streng het eerste stuk en de tweede streng omvat slechts het tweede stuk. In een zelfs nog meer geprefereerde uitvoeringsvorm omvatten noch het eerste stuk en dus de eerste streng noch het tweede stuk en dus de tweede streng een overhang. Met andere woorden, het valt tevens binnen de onderhavige uitvinding dat de nucleïnezuren met een dubbele streng volgens de onderhavige uitvinding bot zijn aan het uiteinde, bij voorkeur aan elk uiteinde van de structuur met een dubbele streng van de nucleïnezuren volgens de onderhavige uitvinding. Een dergelijke structuur met een afgestompt uiteinde kan gerealiseerd worden in samenhang met alle andere uitvoeringsvormen van de nucleïnezuren volgens de onderhavige uitvinding, in het bijzonder die uitvoeringsvormen waarbij de nucleïnezuren volgens de onderhavige uitvinding een modificatiepatroon hebben, meer bij voorkeur een modificatiepatroon zoals in de beschrijving beschreven is.

In een verder aspect heeft het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding dus ene basisontwerp dat afgestompte uiteinden aan beide uiteinden van de structuur met een dubbele streng van het nucleïnezuur volgens de uitvinding verschaft. Echter valt het eveneens binnen de onderhavige uitvinding dat er een overhang bestaat, dat wil zeggen een stuk van één of meer nucleotiden dat uit de structuur met een dubbele streng uitsteekt. Deze overhang kan in principe aan het 5'-uiteinde van de antisens streng, aan het 3'-uiteinde van de antisens streng, aan het 5'-uiteinde van de sens streng

en/of het 3'-uiteinde van de sens streng zijn. Opgemerkt dient te worden dat het realiseren van één van deze opties alsmede elke combinatie hiervan binnen de onderhavige uitvinding valt. Meer geprefereerd is een combinatie waarbij de overhang gelokaliseerd is aan het 3'-uiteinde van de antisens streng en aan het 3'-uiteinde van de sens streng.

5 Het valt tevens binnen de onderhavige uitvinding dat de overhang aan het 5'-uiteinde van de antisens streng is en aan het 5'-uiteinde van de sens streng. Verder ligt binnen de onderhavige uitvinding dat de overhang slechts gelokaliseerd is aan de antisens streng van de structuur met een dubbele streng, meer bij voorkeur aan het 3'-uiteinde van de antisens streng van de dubbele strengstructuur.

10 In samenhang met de overhangs dient opgemerkt te worden dat de overhang plus het stuk bij voorkeur de streng vormen en de lengten die verschaft worden voor de stukken tevens van toepassing zijn op deze uitvoeringsvormen. De afzonderlijke overhang kan onafhankelijk van zijn locatie bestaan uit ten minste één nucleotide. Echter kan de afzonderlijke overhang zelfs 10 nucleotiden omvatten en heeft bij voor-
 15 keur een lengte van twee nucleotiden. Het valt binnen de onderhavige uitvinding dat de respectievelijke nucleotiden die één of meer overhangs vormen, is/zijn tevens complementair met de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801 in het geval dat de eerste streng complementair is met de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801 en waarbij de overhang aan het 3'- of 5'-uiteinde van de antisens streng is dan wel dat één
 20 of meer overhangs identiek is/zijn met de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801 in het geval dat de eerste streng identiek is met de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801. Hetzelfde is van toepassing op elke overhang gelokaliseerd op het tweede stukje van het basisontwerp van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding, waarbij erkend dient te worden dat het overhangontwerp aan het tweede stuk
 25 onafhankelijk kan zijn van het overhangontwerp van het eerste stuk.

Het valt tevens binnen de onderhavige uitvinding dat de overhangvormende nucleotiden noch complementair noch identiek zijn met de corresponderende nucleotiden van de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801. Zoals in de beschrijving wordt gebruikt en bij voorkeur in deze uitvoeringsvorm wordt gebruikt betekent "corresponderende met" de respectievelijke nucleotiden die volgen aan het 5'-uiteinde en/of
 30 het 3'-uiteinde van het stuk met een nucleotidetegenhanger op het nucleïnezuur coderende voor RTP801.

Bij voorkeur omvat de eerste streng aan zijn 3'-uiteinde twee nucleotiden, bij voorkeur deoxynucleotiden en meer bij voorkeur twee TT en/of dit soort nucleotiden tevens aan het 3'-uiteinde van de tweede streng, waarbij meer bij voorkeur de lengte van het eerste stuk en het tweede stuk uit 19 nucleotiden bestaat. De strengen zijn dus samengesteld uit het stuk en de overhang. In deze uitvoeringsvorm bestaat de dubbele-strengstructuur uit 19 basenparen en een overhang van twee nucleotiden aan elk uiteinde van het 3'-uiteinde van het afzonderlijke stuk.

In een voorkeursuitvoeringsvorm omvat het eerste stuk en/of de eerste streng ribonucleotiden, waarbij het in het bijzonder de voorkeur verdient dat het eerste stuk in zijn geheel bestaat uit ribonucleotiden. Hetzelfde is van toepassing op het tweede stuk en de tweede streng respectievelijk. In samenhang hiermee echter wordt één of meer van de nucleotiden van het eerste stuk en het tweede stuk in een voorkeursuitvoeringsvorm gemodificeerd. Hetzelfde is van toepassing op de eerste streng respectievelijk de tweede streng. In het bijzonder kunnen de terminale nucleotiden ongeacht of zij ribonucleotiden of deoxyribonucleotiden zijn een OH-groep hebben die als zodanig gemodificeerd kan zijn. Deze OH-groep kan afkomstig zijn van elke suikergroep van het nucleotide, meer bij voorkeur vanuit de 5'-positie in het geval van de 5'-OH-groep en ook vanuit de 3'-positie in het geval van de 3'-OH-groep, dan wel van een fosfaatgroep verbonden met de suikergroep van het respectievelijke terminale nucleotide. De fosfaatgroep kan in principe verbonden zijn met elke OH-groep van de suikergroep van het nucleotide. Bij voorkeur is de fosfaatgroep verbonden met de 5'-OH-groep van de suikergroep in het geval van de vrije 5'-OH-groep en/of de 3'-OH-groep van de suikergroep in het geval van de vrije 3'-OH-groep nog steeds wat in de beschrijving genoemd wordt, de vrije 5'- of de 3'-OH-groep verschaft.

Zoals in de beschrijving wordt gebruikt met betrekking tot een strategie voor het ontwerpen van RNAi of elke uitvoeringsvorm van het RNAi beschreven in de beschrijving betekent de term eindmodificatie een chemische entiteit die toegevoegd wordt het meest 5'- of het 3'-nucleotide van de eerste en/of de tweede streng. Voorbeelden van deze eindmodificaties omvatten, maar zijn niet beperkt tot 3'- of 5'-fosfaat, geïnverteerde (deoxy)abasische, amino, fluor, chloor, broom, CN, CF, methoxy, imidazool, carboxylaat, thioaat, C₁ tot C₁₀ klein alkyl, gesubstitueerd klein alkyl, alkaryl of aralkyl, OCF₃, OCN, O-, S- of N-alkyl; O-, S- of N-alkenyl; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂, N₃; heterocycloalkyl; heterocycloalkaryl; aminoalkylamino; polyalkyl-

amino of gesubstitueerd silyl, zoals onder andere beschreven in Europese octrooi-aanvragen EP-0.586.520 B1 of EP-0.618.925 B1.

Zoals gebruikt wordt in de beschrijving betekent “alkyl” of elke term die alkyl omvat bij voorkeur één of andere koolstofketen die 1 tot 12, bij voorkeur 1 tot 6 en meer bij voorkeur 1 tot 2 C-atomen omvat.

Een verdere eindmodificatie is een biotinegroep. Deze biotinegroep kan bij voorkeur verbonden zijn met één of beide van de meeste 5'- of de meeste 3'-nucleotide van de eerste en/of de tweede streng of met beide uiteinden. In een meer geprefereerde uitvoeringsvorm is de biotinegroep gekoppeld aan een polypeptide of een proteïne. Het valt tevens binnen de beschermingsomvang van de onderhavige uitvinding dat het polypeptide of proteïne verbonden is via één of meer van de bovenvermelde eindmodificaties. Het polypeptide of proteïne kan verdere kenmerken aan de nucleïnezuurmoleculen volgens de onderhavige uitvinding verlenen. Onder andere kan het polypeptide of proteïne fungeren als een ligand ten opzichte van een ander molecuul. Indien het andere molecuul een receptor is kunnen de receptorfunctie en -activiteit door het bindingsligand geactiveerd worden. De receptor kan een internaliseringsactiviteit vertonen die een effectieve transfectie van het aan het ligand gebonden nucleïnezuurmolecuul volgens de onderhavige uitvinding mogelijk maakt. Een voorbeeld van het te koppelen ligand met het inventieve nucleïnezuurmolecuul is VEGF en de corresponderende receptor is de VEGF-receptor.

Verschillende mogelijke uitvoeringsvormen van het RNAi van de onderhavige uitvinding met verschillende soorten eindmodificaties zijn in de volgende tabel 1 weergegeven.

TABEL 1

VERSCHILLENDE UITVOERINGSVORMEN VAN HET INTERFERERENDE RIBONUCLEÏNEZUUR VOLGENS DE ONDERHAVIGE UITVINDING		
	1^{ste} streng/1^{ste} stuk	2^{de} streng/2^{de} stuk
1.) 5'-uiteinde 3'-uiteinde	vrije OH vrije OH	vrije OH vrije OH
2.) 5'-uiteinde 3'-uiteinde	vrije OH eindmodificatie	vrije OH eindmodificatie
3.) 5'-uiteinde 3'-uiteinde	vrije OH vrije OH	vrije OH eindmodificatie
4.) 5'-uiteinde 3'-uiteinde	vrije OH eindmodificatie	vrije OH vrije OH
5.) 5'-uiteinde 3'-uiteinde	vrije OH vrije OH	eindmodificatie vrije OH
6.) 5'-uiteinde 3'-uiteinde	vrije OH eindmodificatie	eindmodificatie vrije OH
7.) 5'-uiteinde 3'-uiteinde	vrije OH vrije OH	eindmodificatie eindmodificatie
8.) 5'-uiteinde 3'-uiteinde	vrije OH eindmodificatie	eindmodificatie eindmodificatie

- De verschillende eindmodificaties zoals hierin beschreven, zijn bij voorkeur gelokaliseerd aan de ribosegroep van een nucleotide van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding. Meer in het bijzonder kan de eindmodificatie verbonden zijn met of één van de OH-groepen van de ribosegroep vervangen, met inbegrip van, maar niet beperkt tot de 2'OH-, 3'OH- en 5'OH-positie, met dien verstande dat het nucleotide dat aldus gemodificeerd is een terminaal nucleotide is. Geïnverteerde abasische eenheden zijn nucleotiden hetzij deoxyribonucleotiden, hetzij ribonucleotiden die geen nucleobasegroep hebben. Dit soort verbinding is onder andere beschreven in Sternberger, M., Schmiedeknechts, A., Kretschmer, A., Gebhardt, F., Leenders, F., Czauderna, F., Von Carlowitz, I., Engle, M., Giese, K., Beigelman, L. & Klippel, A. (2002), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 12, 131-43.
- Elke van de bovenvermelde eindmodificaties kunnen worden gebruikt in samenhang met de verschillende uitvoeringsvormen van RNAi weergegeven in tabel 1; opgemerkt

dient te worden dat de 5'-eindmodificaties die hierboven vermeld zijn gewoonlijk slechts aanwezig zijn in de sens streng van het siRNA-molecuul.

Verdere modificaties kunnen in verband worden gebracht met de nucleobasegroep, de suikergroep of de fosfaatgroep van het afzonderlijke nucleotide.

5 Deze modificatie van de nucleobasegroep kan zodanig zijn dat de derivaten van adenine, guanine, cytosine en thymidine en uracil, respectievelijk gemodificeerd zijn. Bijzonder geprefereerde gemodificeerde nucleobasen zijn gekozen uit de groep bestaande uit inosine, xanthine, hypoxanthine, 2-aminoadenine, 6-methyl, 2-propyl en
10 andere alkyladeninen, 5-halogeenuuracil, 5-halogeencytosine, 5-halogeencytosine, 6-azacytosine, 6-azathymine, pseudo-uracil, 4-thiouracil, 8-halogeenuadenine, 8-amino-adenine, 8-thioladenine, 8-thiolalkyladeninen, 8-hydroxyladenine en andere 8-gesubstitueerde adeninen, 8-halogeenguaninen, 8-aminoguanine, 8-thiolguanine, 8-thioalkyl-
15 guanine, 8-hydroxylguanine en andere gesubstitueerde guaninen, andere aza- en deazaadeninen, andere aza- en deazaguaninen, 5-trifluormethyluracil en 5-trifluorcyto-
sine.

In een andere uitvoeringsvorm wordt de suikergroep van het nucleotide gemodificeerd, waarbij deze modificatie bij voorkeur zich op de 2'-positie van de ribose en deoxyribosegroep van het nucleotide bevindt. Meer bij voorkeur is de 2'-OH-groep vervangen door een groep of rest die gekozen is uit de groep bestaande uit
20 amino, fluor, alkoxy en alkyl. Bij voorkeur is alkoxy hetzij methoxy, hetzij ethoxy. Tevens betekent alkyl bij voorkeur methyl, ethyl, propyl, isobutyl, butyl en isobutyl. Het verdient zelfs nog meer de voorkeur dat ongeacht het type modificatie het nucleotide bij voorkeur een ribonucleotide is.

De modificatie van de fosfaatgroep is bij voorkeur gekozen uit de groep
25 bestaande uit fosfothioaten.

Het zal door de deskundige op dit gebied erkend worden dat het nucleïne-
zuur van de onderhavige uitvinding dat uit een groot aantal nucleotiden bestaat dus gevormd kan worden door nucleotiden die via een fosfodiesterbrug of via een fosfo-
thioaatbrug, dan wel een combinatie van beide over de lengte van de nucleotidesequen-
30 tie van de afzonderlijke streng en respectievelijk stuk met elkaar verbonden zijn.

Een andere vorm van nucleotiden die gebruikt zijn kan daadwerkelijk siRNA zijn die onder andere in de Internationale octrooiaanvraag WO 03/070918 be-
schreven is.

De nucleotiden die het eerste stuk en de eerste streng vormen van het nucleïnezuur volgens de uitvinding kan één of meer gemodificeerde nucleotiden omvatten, waarbij het afzonderlijk gemodificeerde nucleotide een modificatie heeft die bij voorkeur een modificatie is zoals in de beschrijving beschreven is. Behalve de bijzondere modificatie kan de modificatie zijn of omvatten één of andere soort label, waarbij de label gekozen is uit de groep bestaande uit chemiluminescente labels, fluorescerende labels en radioactieve labels. Deze soort labels zijn de deskundige bekend en zijn bijvoorbeeld beschreven in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland, 1998. Het aldus gelabelde nucleïnezuur volgens de uitvinding kan tevens worden toegepast voor diagnostische doeleinden dan wel voor het volgen van de werkingsplaats alsmede voor het in trappen uitvoeren van één of andere behandeling, bij voorkeur gerelateerd aan één of andere van de in de beschrijving beschreven ziekte.

In een voorkeursuitvoeringsvorm wordt het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding zodanig gemodificeerd dat de pyrimidinenucleotiden in de sens streng of stuk 2'-O-methylpyrimidinenucleotiden zijn en hetzij additioneel, hetzij alternerend de purinenucleotiden in het sens stukje of streng 2'-deoxypurinenucleotiden zijn. In een verdere uitvoeringsvorm zijn de pyrimidinenucleotiden aanwezig in het sens stukje of de sens streng 2'-deoxy-2'-fluorpyrimidinenucleotiden.

In een alternatieve uitvoeringsvorm is de modificatie niet gebaseerd op de chemie van het nucleotide, dat wil zeggen hangt de modificatie af van het feit of het te modificeren nucleotide hetzij een purinenucleotide, hetzij een pyrimidinenucleotide is, maar is hoofdzakelijk gebaseerd op de afzonderlijke nucleotide ruimtelijke ordening in de gehele dubbelestrengstructuur van het basisontwerp van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding.

Meer in het bijzonder vertonen hetzij de eerste streng en het eerste stuk, hetzij de tweede streng en het tweede stuk een ruimtelijk patroon van modificatie van de nucleotiden die de stukken respectievelijk strengen vormen.

Focusserend eerst op het eerste stuk is er een patroon van groepen van gemodificeerde nucleotiden en groepen van niet-gemodificeerde nucleotiden. Deze groepen van niet-gemodificeerde nucleotiden verdienen tevens de voorkeur als aangrenzende groepen van nucleotiden. Meer bij voorkeur bestaat het patroon uit groepen van gemodificeerde nucleotiden en niet-gemodificeerde nucleotiden. Zelfs nog meer bij

voorkeur is het patroon een regelmatig patroon en zelfs nog meer bij voorkeur een alternerend patroon langs de lengte van het eerste stuk van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding. De groep van gemodificeerde nucleotiden kan hetzij bestaan uit één of uit verscheidene nucleotiden die gemodificeerd zijn en die bij voorkeur nucleotiden zijn die op de 2'-positie gemodificeerd zijn, dat wil zeggen een modificatie op de suikergroep hebben. Meer bij voorkeur is deze modificatie een 2'-O-Me-modificatie.

De groep van niet-gemodificeerde nucleotiden kan hetzij bestaan uit één of uit verscheidene nucleotiden die hetzij niet gemodificeerd zijn, waarbij de niet-gemodificeerde nucleotiden bij voorkeur ribonucleotiden zijn, dan wel zijn de niet-gemodificeerde nucleotiden nucleotiden met een modificatie, waarbij de modificatie verschillend is van de modificatie getoond door de nucleotiden die de groep van gemodificeerde nucleotiden vormen. Zelfs nog meer bij voorkeur zijn de niet-gemodificeerde nucleotiden ribonucleotiden. Opgemerkt dient te worden dat de term niet-gemodificeerd en niet-gemodificeerd nucleotide uitwisselbaar zijn tenzij anders wordt aangegeven. Het eerste stuk van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding kan hetzij beginnen met de groep van gemodificeerde nucleotiden dan wel beginnen met een groep van niet-gemodificeerde nucleotiden, zoals in de beschrijving gedefinieerd is. Echter verdient het de voorkeur dat het eerste stuk begint met een groep van gemodificeerde nucleotiden. Het meest bij voorkeur bestaat de groep van gemodificeerde nucleotiden uit één enkel nucleotide. In samenhang met deze uitvoeringsvorm is het eerste stuk bij voorkeur in een antisens oriëntering ten opzichte van het nucleïnezuur coderende voor RTP801. Het ligt binnen de onderhavige uitvinding dat de modificatie, zoals vertoond door de nucleotiden die de groep van gemodificeerde nucleotiden vormen dezelfde is voor alle groepen van gemodificeerde nucleotiden aanwezig in het eerste stuk. Echter valt het eveneens binnen de onderhavige uitvinding dat enkele groepen van gemodificeerde nucleotiden een andere modificatie hebben dan één of verscheidene groepen van de gemodificeerde nucleotiden die in het eerste stuk aanwezig zijn.

Op de tweede streng van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding kan een patroon zoals beschreven in het eerste stuk eveneens gerealiseerd worden. Dezelfde kenmerken als beschreven in samenhang met het eerste stuk kunnen gerealiseerd worden in een uitvoeringsvorm van het tweede stuk ook, waarbij het de voorkeur verdient dat onder voorwaarde dat het tweede stuk in sens oriëntering is met betrekking

tot de nucleïnezuursequentie coderende voor RTP801, de tweede streng van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding met een groep van niet-gemodificeerde nucleotiden begint.

5 Het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding dat een dubbelestrengstructuur omvat kan een eerste stuk omvatten met het modificatiepatroon zoals het in de beschrijving beschreven is. Op een andere wijze kan het dubbele-strengnucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding een tweede stukje omvatten met een modificatiepatroon zoals hierboven beschreven. Het verdient echter het meest de voorkeur dat het dubbelestrengnucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding uit een eerste stuk en een
10 tweede stuk bestaat, waarbij zowel het eerste stuk als het tweede stuk een ruimtelijk modificatiepatroon, zoals in de beschrijving beschreven is, hebben.

Het valt binnen de onderhavige uitvinding dat de kenmerken van het ruimtelijke modificatiepatroon hetzelfde zijn op beide stukken in termen van afmeting van de groepen van gemodificeerde nucleotiden en groepen van niet-gemodificeerde
15 nucleotiden en de soort van daadwerkelijke toegepaste modificaties. Bij voorkeur wordt het ruimtelijke patroon van modificatie van het eerste stuk zodanig verschoven dat een groep van gemodificeerde nucleotiden op het eerste stuk tegenover een groep van niet-gemodificeerde nucleotiden op het tweede stuk en vice versa aanwezig is. Echter valt het eveneens binnen de onderhavige uitvinding dat de patronen nauwkeurig gelijk lopen, dat wil zeggen dat een groep van gemodificeerde nucleotiden op het eerste stuk
20 tegenover een groep van niet-gemodificeerde nucleotiden op het tweede stuk staat en een groep van niet-gemodificeerde nucleotiden op het eerste stuk aanwezig is tegenover een groep van niet-gemodificeerde nucleotiden op het tweede stuk. Het ligt nog steeds binnen de onderhavige uitvinding dat het ruimtelijke patroon van modificatie op het
25 eerste stuk en het tweede stuk verschoven wordt ten opzichte van elkaar, zodanig dat slechts één eerste gedeelte van een groep van gemodificeerde nucleotiden op één stuk tegenover een deel van een groep van niet-gemodificeerde nucleotiden op het andere stuk staat, terwijl het tweede gedeelte van de groep van gemodificeerde moleculen tegenover een andere groep van gemodificeerde nucleotiden staat. Het ligt binnen de
30 onderhavige uitvinding dat de hierin verschafte beschrijving over het ruimtelijke modificatiepatroon van de stukken van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding tevens van toepassing is op één of meer strengen van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding. Het verdient echter de voorkeur dat de stukken van het nucleïne-

zuur het ruimtelijke modificatiepatroon omvatten en de strengen deze stukken en één of meer overhangs, zoals in de beschrijving beschreven zijn, omvatten. Het verdient in het bijzonder de voorkeur dat de overhang een fosfaatgroep is aan het 3'-uiteinde van elke van de antisens strengen dan wel de sens streng dan wel beide strengen, waarbij het
 5 meer de voorkeur verdient dat de fosfaatgroep aan het 3'-uiteinde is van zowel de antisens streng als de sens streng. In een zelfs meer geprefereerde uitvoeringsvorm is de fosfaatgroep een fosfaatgroep, zoals in de beschrijving gedefinieerd is.

Het valt tevens binnen de onderhavige uitvinding dat het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding een brug die het eerste en het tweede stuk verbindt kan
 10 vertonen. Een dergelijke brug is bij voorkeur een polymeer. Het polymeer kan elk synthetisch of natuurlijk polymeer zijn. Mogelijke synthetische linkers (brugvormers) zijn onder andere PEG of een polynucleotide. Een dergelijke linker wordt bij voorkeur zodanig ontworpen dat het hetzij tendele, hetzij volledig terugvouwen van het eerste stuk op het tweede stuk en vice versa mogelijk is.

15 Tenslotte valt het binnen de onderhavige uitvinding dat het nucleïnezuur volgens de uitvinding een synthetisch nucleïnezuur, een chemisch gesynthetiseerd nucleïnezuur, een geïsoleerd nucleïnezuur of een nucleïnezuur afgeleid van één of meer natuurlijke bronnen, zoals bijvoorbeeld bereid door middel van recombinant-technologie is. In samenhang met de bereiding van één of ander nucleïnezuur volgens de onder-
 20 havige uitvinding kan elke modificatie zoals zij beschreven is in de beschrijving geïntroduceerd worden hetzij voorafgaande aan, gedurende of na de bereiding van het respectievelijke nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding, zoals de deskundigen bekend is.

De vector volgens de onderhavige uitvinding omvat een nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding. Bovendien kan de vector elementen omvatten ter beheersing van het targetten, expressie en transcriptie van het nucleïnezuur in een cel-selectieve wijze, zoals uit de stand der techniek bekend is. Het plasmide kan een promotor voor het beheersen van de transcriptie van het heterologe materiaal omvatten, dat wil zeggen het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding en kan hetzij een constitutieve, hetzij een induceerbare promotor zijn teneinde een selectieve transcriptie
 30 mogelijk te maken. Versnellers die vereist kunnen zijn ter verkrijging van noodzakelijke transcriptieniveaus kunnen eventueel worden opgenomen. Versnellers zijn in het algemeen willekeurige niet-getranslateerde DNA-sequenties die aangrenzend aan de

coderende sequentie werken, dus in cis, ter verandering van het basale transcriptie-niveau dat door de promotor gedicteerd wordt. De expressie van deze constructen is de deskundige op dit gebied bekend en kan worden uitgevoerd bijvoorbeeld door het verschaffen van een respectievelijk tandemconstruct dan wel door het hebben van verschillende promotoren die voor de eerste streng en het eerste en tweede stuk respectie-

5 verschillende promotoren die voor de eerste streng en het eerste en tweede stuk respectievelijk van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding, transcriberen.

Wanneer het nucleïnezuur volgens de uitvinding geproduceerd dan wel tot expressie gebracht wordt, bij voorkeur *in vivo* tot expressie gebracht wordt, meer bij voorkeur in een patiënt die behoefte heeft aan het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding, maakt deze productie of tot expressie brengen bij voorkeur gebruik van een

10 expressievector, bij voorkeur een zoogdierexpressievector. Expressievectoren zijn op dit gebied bekend en omvatten bij voorkeur plasmiden, cosmiden, virale expressiesystemen. Voorkeurvirale expressiesystemen omvatten, maar zijn niet beperkt tot, adenovirus, retrovirus en lentivirus.

Methoden zijn uit de stand der techniek bekend voor het introduceren van de vectoren in cellen of weefsels. Deze methoden kunnen gevonden worden in een algemene beschrijving in Sambrook et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbour Laboratory, New York (1983, 1992) of in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland, 1998.

15

Geschikte methoden omvatten onder andere transfectie, lipofectie, elektroporatie en infectie met recombinante virale vectoren. In samenhang met de onderhavige uitvinding is een additioneel kenmerk van de vector in één uitvoeringsvorm een expressielimiterend kenmerk, zoals een promotor en een regulerend element, respectievelijk, die specifiek zijn voor het gewenste celtype, waardoor de expressie van de nucleïne-

20 zuursequentie volgens de onderhavige uitvinding mogelijk gemaakt wordt, slechts pas nadat de achtergrond verschaft is die de gewenste expressie mogelijk maakt.

In een verder aspect heeft de onderhavige uitvinding betrekking op een farmaceutische samenstelling die een nucleïnezuur volgens de uitvinding en/of een vector volgens de onderhavige uitvinding en eventueel een farmaceutisch aanvaardbare drager, verdunningsmiddel of hulpmiddel of andere dragers omvat. Bij voorkeur zijn

30 deze dragers, verdunningsmiddelen, hulpmiddelen inert en niet-toxisch. De farmaceutische samenstelling is in zijn verscheidene uitvoeringsvormen aangepast voor toediening op verschillende wijzen. Deze toediening omvat een systemische en een lokale

toediening alsmede een orale, subcutane, parenterale, intraveneuze, intra-arteriële, intramusculaire, intraperitoneale, intranasale en intrategrale toediening.

Door de deskundigen op dit gebied zal worden erkend dat de hoeveelheid van de farmaceutische samenstelling en het respectievelijke nucleïnezuur en vector
 5 afhangt van de klinische toestand van de individuele patiënt, de locatie en methode van toediening, het plannen van de toediening, de leeftijd van de patiënt, het geslacht, het lichaamsgewicht en andere factoren die de dokters bekend zijn. De farmaceutisch werkzame hoeveelheid voor doeleinden van preventie en/of behandeling is dus bepaald door deze overwegingen, zoals zij in de geneeskunde bekend zijn. Bij voorkeur is de
 10 hoeveelheid werkzaam om een verbetering tot stand te brengen, waaronder, maar niet beperkt tot het verbeteren van de ziekte-toestand of het verschaffen van een sneller herstel, verbetering of eliminering van symptomen en andere indicatoren die gekozen zijn als geschikte maatregelen door de deskundigen op het gebied van de geneeskunde.

In een voorkeursuitvoeringsvorm kan de farmaceutische samenstelling vol-
 15 gens de onderhavige uitvinding andere farmaceutisch actieve verbindingen omvatten. Bij voorkeur zijn deze andere farmaceutisch actieve verbindingen gekozen uit de groep bestaande uit verbindingen die een opname intracellulaire celafgifte mogelijk maken, verbindingen die endosomale afgifte mogelijk maken, verbindingen die een langer circulatietijd mogelijk maken en verbindingen die het targetten van endotheliale cellen of
 20 pathogene cellen mogelijk maken. Voorkeurverbindingen voor endosomale afgifte zijn chloroquine en inhibitoren van ATP-afhankelijke H^+ -pompen.

De farmaceutische samenstelling wordt bij voorkeur geformuleerd zodanig dat één enkele doseringstoediening of een multidoseringstoediening mogelijk gemaakt worden.

Erkend zal worden dat de farmaceutische samenstelling volgens de
 25 onderhavige uitvinding gebruikt kan worden voor elke ziekte die een ongewenste ontwikkeling van groei van vasculatuur waaronder angiogenese, alsmede elke andere van de ziekten en ziekte-toestanden die in beschrijving beschreven zijn omvatten. Bij voorkeur zijn deze soorten ziekten tumorziekten. Onder tumorziekten verdienen de vol-
 30 gende tumoren de voorkeur: endometriaal kanker, colorectaal carcinoma's, glioma's, endometriaal kanker, adenocarcinoma's, endometriale hyperplasia's, syndroom van Cowden, erfelijke niet-polyposis colorectal carcinoma, syndroom van Li-Fraumene, borst-eierstokkanker, prostaatkanker (Ali, I.U., Journal of the National Cancer Institute,

Vol. 92, nr. 11, 07 juni 2000, blz. 861-863), Bannayan-Zonanasyndroom, LDD (Lhermitte-Duklos-syndroom) (Macleod, K., supra) hamatoma-macrocephale ziekten waaronder koeienziekte (CD) en Bannayan-Ruvalcaba/Riley-syndroom (BRR), mucocutane letsels (bijvoorbeeld trichilemmoma's), macrocephalie, mentale retardatie, 5 maag darm hamatoma's, lipoma's, thyroïde adenoma's, fibrocystische ziekte van de borst, cerebellaire dysplastische gangliocytoma en borst- en thyroïde kwaadaardige tumoren (Vazquez, F., Sellers, W.R., supra).

Erkend dient te worden dat elke van de tumorziekten die behandeld moeten worden met de samenstelling volgens de onderhavige uitvinding bij voorkeur een tumorziekte is in een laat stadium. In een andere uitvoeringsvorm omvat de tumorziekte 10 cellen die tumorsuppressornegatief zijn, waarbij nog meer bij voorkeur PTEN de tumorsuppressor is.

De farmaceutische samenstelling volgens de onderhavige uitvinding kan tevens worden toegepast bij een werkwijze voor het voorkomen en/of behandelen van 15 een ziekte, zoals zij in de beschrijving beschreven is, waarbij de methode de toediening omvat van een nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding, een vector volgens de onderhavige uitvinding of een farmaceutische samenstelling dan wel een geneesmiddel volgens de onderhavige uitvinding voor elke van de in de beschrijving beschreven ziekten.

20 In een verder aspect heeft de onderhavige uitvinding betrekking op een methode voor het ontwerpen of screenen van een nucleïnezuur dat geschikt is voor het downreguleren van RTP801, meer in het bijzonder voor het downreguleren van de RTP801-functie. Deze methode omvat de toepassing van een nucleïnezuursequentie, zoals beschreven in de beschrijving en het bepalen van dit nucleïnezuur in een geschikte test. Een dergelijke test is uit de stand der techniek bekend en is bijvoorbeeld 25 beschreven in het voorbeeldgedeelte van de onderhavige aanvraag. In een verdere trap wordt een dubbelestrengnucleïnezuur ontworpen, bij voorkeur volgens de ontwerp-principes zoals zij in de beschrijving zijn neergelegd, dat geschikt is voor het downreguleren van RTP801, bij voorkeur in samenhang met een posttranscriptioneel genremmend mechanisme, zoals RNA-interferentie. Tevens wordt het aldus verkregen 30 oftewel ontworpen of gescreend aminozuur bepaald in de test en het resultaat ofwel het effect van zowel het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding als het pas ontworpen of gescreende nucleïnezuur in deze test vergeleken. Bij voorkeur is het ontwor-

pen of gescreende nucleïnezuur meer geschikt in het geval dat het meer stabiel dan wel meer effectief of beide is. Erkend zal worden dat de methode bijzonder doelmatig zal zijn indien één van de nucleïnezuren volgens de uitvinding als uitgangspunt wordt toegepast. Het valt dus binnen de onderhavige uitvinding dat nieuwe nucleïnezuurmoleculen ontworpen zullen worden, gebaseerd op de in de beschrijving beschreven principes, waarbij de targetsequentie op het RTP801-mRNA enigszins verschoven zal zijn ten opzichte van de targetsequentie op het RTP801-mRNA voor het overeenkomstige nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding. Bij voorkeur zou het nieuwe nucleïnezuur verschoven zijn met ten minste één of meer nucleotiden ten opzichte van het stuk op de target-mRNA in de 5'- dan wel de 3'-richting van het mRNA coderende voor RTP801. Het ligt echter binnen de onderhavige uitvinding dat de verschuiving optreedt in beide richtingen simultaan hetgeen betekent dat het nieuwe nucleïnezuur het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding gebruikt als uitgangspunt, bevat. Het ligt eveneens binnen de onderhavige uitvinding dat de verlenging van het nucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding en gebruikt als uitgangspunt verschoven is naar het 3'-uiteinde dan wel het 5'-uiteinde. In het geval van een dergelijke verschuiving is het 3'-uiteinde of het 5'-uiteinde van het nieuwe nucleïnezuur langer ofwel meer uitgestrekt dan het andere uiteinde. Wanneer het nieuwe nucleïnezuurmolecuul geproduceerd wordt door de verlenging van het 3'-uiteinde dan wel het 5'-uiteinde van de antisens streng en/of de sens streng wordt de volgende sequentie van trappen gewoonlijk toegepast. Indien de verschuiving is naar het 5'-uiteinde van het mRNA van RTP801 dient het 3'-uiteinde van de antisens streng verlengd te worden met het aantal nucleotiden waarmee het 5'-uiteinde van het mRNA van RTP801 verschoven is. Eén of meer nucleotiden die aldus worden toegevoegd aan het 3'-uiteinde van de antisens streng van het nieuwe nucleïnezuur is/zijn complementair met de nucleotiden volgende op het 5'-uiteinde van de targetsequentie op het gebruikte RTP801-mRNA voor het nucleïnezuurmolecuul volgens de onderhavige uitvinding dat als uitgangspunt wordt gebruikt. Hetzelfde dient te worden gedaan met de sens streng. Echter de aan de sens streng toe te voegen nucleotiden dienen te corresponderen ofwel complementair te zijn met de pas toegevoegde nucleotiden aan het 3'-uiteinde van de antisens streng, hetgeen betekent dat ze toegevoegd moeten worden aan het 5'-uiteinde van de sens streng. Laatstgenoemde trap op de sens streng echter dient uitgevoerd te worden slechts in zoverre dat behalve de antisens streng tevens de sens streng verschoven wordt hetgeen het geval is

in voorkeursuitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding. Ofschoon deze verschuiving uitgevoerd kan worden in een graad gedefinieerd door de deskundigen op dit gebied zal de verschuiving meer bij voorkeur zodanig worden uitgevoerd dat tevens het nucleïnezuur nog steeds een stuk bevat van ten minste 14 nucleotiden, bij voorkeur 14 aangrenzende nucleotiden, zoals vertoond door één of meer van de nucleïnezuurmoleculen die in de beschrijving beschreven zijn.

De synthese van één of meer van de in de beschrijving beschreven nucleïnezuren ligt binnen het vermogen van de deskundige op dit gebied. Deze synthese is onder andere beschreven in Beaucage S.L. en Iyer R.P., *Tetrahedron* 1992; 48: 2223-2311. Beaucage S.L. en Iyer R.P., *Tetrahedron* 1993; 49: 6123-6194 en Caruthers M.H. et al., *Methods Enzymol.* 1987; 154: 287-313, de synthese van thioaten is onder andere beschreven in Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 1985; 54: 367-402, de synthese van RNA-moleculen is beschreven in Sproat B., in *Humana Press* 2005, uitgegeven door Herdewijn P.; hoofdstuk 2: 17-31 en respectievelijke downstreamprocessen zijn onder andere beschreven in Pingoud A. et al., in *IRL Press* 1989, uitgegeven door Oliver R.W.A.; hoofdstuk 7: 183-208 en Sproat B., in *Humana Press* 2005, uitgegeven door Herdewijn P.; hoofdstuk 2: 17-31 (supra).

siRNA voor RTP801 kan geproduceerd worden onder toepassing van methoden die uit de stand der techniek bekend zijn, zoals ze hierboven beschreven zijn, gebaseerd op de bekende sequentie van RTP801 (SEQ ID NO: 1) en kan stabiel worden gemaakt door toepassing van verschillende modificaties zoals zij hierboven beschreven zijn. Voor verdere informatie zie voorbeeld 9.

Verder met betrekking tot de methoden van de onderhavige uitvinding zoals zij hierin in de beschrijving beschreven zijn, kunnen additionele RNA-moleculen worden toegepast met deze methoden, bijvoorbeeld omvatten remmende RNA-moleculen van de onderhavige uitvinding oligoribonucleotiden met één enkele streng die bij voorkeur stukken omvatten van ten minste 7-10 achtereenvolgende nucleotiden aanwezig in de sequenties gedetailleerd in de tabellen A-D, waarbij de oligoribonucleotiden in staat zijn tot vorming (en/of omvattende) dubbelstrenggebieden in bepaalde conformaties die erkend worden door intracellulaire complexen, hetgeen leidt tot de degradatie van de oligoribonucleotiden tot kleinere RNA-moleculen die in staat zijn tot het uitoefenen van een remming van hun corresponderende endogene gen en DNA-moleculen coderende voor deze RNA-moleculen. Het corresponderende endogene gen

is bij voorkeur het 801-gen en kan bovendien het VEGF-gen en/of het VEGF-R1-gen zijn. De uitvinding verschaft tevens een samenstelling die het bovenbeschreven eenvoudige-strengoligoribonucleotide in een drager, bij voorkeur een farmaceutisch aanvaardbare drager, omvat.

5 Bovendien verschaft de onderhavige uitvinding een combinatietherapie voor alle ziekte toestanden die in de beschrijving beschreven zijn en in bijzondere ziekte toestanden die de choroïdale neovascularisatie omvat. In deze combinatietherapie worden zowel de RTP801- als de VEGFR-genen geremd ter verbetering van de symptomen van de onder behandeling zijnde ziekten. Deze genen kunnen geremd zijn met
10 een combinatie van één of meer siRNA's of antilichamen of aptameren. De onderhavige uitvinding verschaft tevens een nieuwe farmaceutische samenstelling die een RTP801-inhibitor en een VEGF- of VEGFR-1-inhibitor omvat, waarbij de RTP801-inhibitor bij voorkeur een siRNA is, bij voorkeur een siRNA-molecuul is dat weergegeven is in de tabellen A-D en in het bijzonder siRNA nrs. 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41,
15 42, 49 en 50 van tabel A of siRNA nrs.: 257, 260-262 en 264-268 van tabel D en de VEGF/VEGFR-1-inhibitor is eventueel een antilichaam of aptameer. Het gecombineerde gebruik van deze verbindingen (ofwel RTP801-siRNA- en VEGF-antilichaam of elk ander gecombineerd voorbeeld dat in de beschrijving beschreven is) bij de bereiding van een geneesmiddel is tevens een onderdeel van de onderhavige uitvinding.

20 Dus RTP801-siRNA, zoals een siRNA-molecuul weergegeven in tabellen A-D en in het bijzonder siRNA nrs.: 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 en 50 van tabel A of siRNA nrs.: 257, 260-262 en 264-268 van tabel D kunnen worden toegediend tezamen met middelen die als target hebben VEGF of VEGF-receptor 1 (VEGFR1). Deze middelen bestaan heden op de markt of verkeren in verschillende stadia van de toelatingsprocedure en werken via verschillende mechanismen. Antilichamen en antilichaamfragmenten, zoals ranibizumab (Lucentis, Genentech) binden zich aan afgegeven VEGF voor het remmen van de binding van VEGF aan actieve receptoren. Een aptameer dat kan fungeren als een ligand/antilichaam (Macugen, Eyetech/Pfizer, recentelijk door de FDA toegelaten voor nat AMD) is tevens een mogelijkheid. Macugen
25 bindt zich met extracellulair VEGF voor het blokkeren van zijn activiteit. Deze geneesmiddelen worden lokaal toegediend door middel van een intravitreale injectie. Op anti-VEGF-siRNA gebaseerde verbindingen (zoals Acuity's Cand5-inhibitor van VEGF of siRNA's 027-inhibitor van VEGFR-1) zijn tevens beschikbaar. Bovendien
30

wordt gerapporteerd dat het kleine molecuul aminosterol Squalamine (Genaera) dat systemisch wordt toegediend in vele facetten van het angiogene proces, waaronder het remmen van VEGF en andere groeifactor-signalerings in endotheliale cellen, interfereert.

De simultane toediening van een RTP801-inhibitor, bij voorkeur een siRNA en één of meer van de bovenstaande VEGF/VEGFR-1-remmers kunnen een synergistisch effect hebben, waarbij de gecombineerde behandeling meer effectief is dan behandeling door één of meer van deze afzonderlijke samenstellingen ongeacht de dosering in de enkelvoudige therapieoptie. Dit synergistische effect wordt tevens ondersteund door de eerste resultaten, zoals gedetailleerd in voorbeeld 6.

RTP801i heeft een verschillend mechanisme van werking en is potentieel synergistisch met VEGF-VEGFR-inhibitoren. Een onderzoek in RTP801-KO-muizen geeft aan dat een beschermend fenotype in de KO-muizen blijft bestaan ondanks het feit dat expressie van VEGF-mRNA in het oog even hoog is als in de WT-muizen. Onze additionele eerste data geven aan dat inhibitie van RTP801 synergistisch kan zijn met de inhibitie van de VEGF-VEGFR-regulerende as bij de behandeling van retinale pathologie. De uitvinders van de onderhavige uitvinding hebben in geschikte experimenten gevonden dat toediening van siRNA tegen RTP801 in een model van AMD (zie onderstaand voorbeeld 6) niet slechts tot downregulering van RTP801 zelf, maar tevens ten gevolge hiervan tot het upreguleren van de antiangiogene en neurobeschermende factor PEDF alsmede het downreguleren van de expressie van MCP1, een macrofaag chemobindende proteïne, leidt. Dus inhibitie van RTP801 verleent simultaan antiangiogenen, neurobeschermende en anti-ontstekings-effecten.

Zoals beschreven in de beschrijving kunnen aptameren ook in de onderhavige uitvinding in combinatie met de nieuwe siRNA's die in de beschrijving beschreven zijn worden toegepast. Bijvoorbeeld kan een aptameer worden toegepast met één of meer van de siRNA's die in de beschrijving beschreven zijn in een combinatietherapie voor de behandeling van één of meer van de in de beschrijving beschreven ziekte-toestanden. De nieuwe farmaceutische samenstelling die toegepast wordt voor deze combinatietherapie, die tevens onderdeel van de onderhavige uitvinding is, kan een siRNA van de onderhavige uitvinding al dan niet covalent aan een aptameer omvatten. Aptameren zijn RNA of DNA enkelvoudige streng of dubbele streng oligonucleïne-zuren die aan een targetproteïne binden en in het algemeen geen niet-specifieke effecten vertonen. Aptameren kunnen voor stabiliteit of andere gewenste eigenschappen gemodifi-

ceerd zijn volgens één of meer nucleïnezuurmodificaties die in de beschrijving beschreven zijn en/of die welke de deskundige bekend zijn. Modificaties aan aptameren kunnen op elke plek in het molecuul worden geïntroduceerd, zoals de 5'- of 3'-termini, of op elk intern gedefinieerde modificatielocatie. Bijvoorbeeld kunnen RNA-aptameren gestabiliseerd worden met 2'-fluor- of 2'-aminogemodificeerde pyrimidinen. Aptameren kunnen eveneens verbonden zijn met reportermoleculen of linker/brugvormende verbindingen en kunnen zonodig gehecht zijn aan parels of andere vaste drager (bijvoorbeeld 5'- of 3'-amino-, thiolester- of biotinegroepen). Thioaptameren zijn aptameren die zwavelmodificaties bevatten op specifieke internucleosidefosforyllocaties en kunnen een verhoogde stabiliteit, nucleasebestendigheid, targetaffiniteit en/of selectiviteit bezitten. Voorbeelden van thioaptameren omvatten fosformonothioaat (S-ODN) en fosfordithioaat (S2-ODN) oligodeoxythioaptameren. Voor verdere informatie op aptameren en thioaptameren zie de Amerikaanse octrooischriften 5.218.088 en 6.423.493.

Begrepen dient te worden dat in de context van de onderhavige uitvinding één of meer van de siRNA-moleculen die in de beschrijving beschreven zijn of één of meer lange dubbelstreng-RNA-moleculen (gewoonlijk 25-500 nucleotiden in lengte) die geprocessed worden door endogene cellulaire complexen (zoals DICER - zie hierboven) ter vorming van de siRNA-moleculen die in de beschrijving beschreven zijn dan wel moleculen die de siRNA-moleculen die in de beschrijving beschreven zijn omvatten, toegepast kunnen worden bij de behandeling van die ziekten of aandoeningen die in de beschrijving beschreven zijn.

Additionele aandoeningen die behandeld kunnen worden door middel van de moleculen en samenstellingen van de onderhavige uitvinding omvatten alle typen choroïdale neovascularisatie (CNV), welke optreden niet slechts in nat AMD, maar tevens in andere oculaire pathologieën, zoals oculaire histoplasmose, zoals het oculaire histoplasmosesyndroom, angiodesrepen, breuken in Bruch's membraan, myopische degeneratie, oculaire tumoren en enige retinale degeneratieve ziekten.

Een additioneel aspect van de onderhavige uitvinding verschaft methoden voor de behandeling van met apoptose geassocieerde ziekten. Methoden voor de therapie van ziekten of aandoeningen die geassocieerd zijn met een ongecontroleerde, pathologische celgroei, bijvoorbeeld kanker, psoriasis, autoimmune ziekten onder andere, en methoden voor de therapie van ziekten die geassocieerd zijn met ischemie en gebrek

aan een adequate bloedstroom, bijvoorbeeld myocardiaal infarct en beroerte worden verschaft. De term “kanker” of “tumor” heeft betrekking op een ongecontroleerde groeiende massa van abnormale cellen. Deze termen omvatten beide *primaire tumoren* die goedaardig of kwaadaardig kunnen zijn, alsmede *secundaire tumoren* of *metastasen* die zich naar andere plekken in het lichaam verspreid hebben. Voorbeelden van kankerachtige ziekten omvatten onder andere carcinoma (bijvoorbeeld borst, colon en long), leukemie zoals B-celleukemie, lymfoma zoals B-cellymfoma, blastoma zoals neuroblastoma en melanoma.

De uitvinding verschaft tevens een samenstelling die één of meer van de verbindingen volgens de uitvinding in een drager, bij voorkeur een farmaceutisch aanvaardbare drager omvat. Deze samenstelling kan een mengsel omvatten van twee of meer siRNA's voor verschillende genen of verschillende siRNA's voor hetzelfde gen. Een samenstelling die siRNA voor het RTP801-gen en siRNA voor het VEGF-gen en/of het VEGF-R1-gen omvat, komt in aanmerking.

Een andere verbinding volgens de uitvinding omvat de bovenstaande verbinding volgens de uitvinding (structuur A) al dan niet covalent gebonden aan één of meer verbindingen volgens de uitvinding (structuur A). Deze verbinding kan in een drager worden afgegeven, bij voorkeur een farmaceutisch aanvaardbare drager en kan intracellulair geprocessed worden door middel van endogene cellulaire complexen voor het produceren van één of meer siRNA's volgens de uitvinding. Een andere verbinding volgens de uitvinding omvat de bovenstaande verbinding volgens de uitvinding (structuur A) die al dan niet covalent gebonden is aan een siRNA voor een ander gen, in het bijzonder het VEGF-gen en/of het VEGF-R1-gen.

De onderhavige uitvinding omvat tevens een nieuwe chemische entiteit die een RTP801-inhibitor, bij voorkeur een siRNA, is die chemisch gebonden is, al dan niet covalent met één van de bovenstaande VEGF/VEGF-R1-remmers. Een bijzondere chemische entiteit die in aanmerking komt is een siRNA-RTP801-inhibitor die covalent gebonden is aan een antilichaam tegen VEGF of de VEGF-receptor-1. Een additionele chemische entiteit die in aanmerking komt is een al dan niet gemodificeerd DNA-aptameer dat VEGF-receptor-1 als target heeft dat covalent gebonden is aan RTP801-siRNA dat in de beschrijving beschreven is. Zonder aan enige theorie gebonden te willen zijn zou het aptameer onderdeel van deze farmaceutische samenstelling aan de VEGF-receptor-1 binden en in de cel worden opgenomen, waarna het siRNA-gedeelte

van het molecuul de RTP801-expressie in de cel zal remmen. Een dergelijke farmaceutische stof zou dus het voordeel hebben van een verhoogde selectiviteit en targeting alsmede de additionele voordelen van een combinatietherapie zoals zij in de beschrijving beschreven is. Productiemethoden voor deze nieuwe chemische entiteiten zijn de
5 deskundigen bekend.

De onderhavige uitvinding omvat tevens een tandemdubbelstrengstructuur welke twee of meer siRNA-sequenties omvat, die intracellulair geprocessed wordt ter vorming van twee of meer verschillende siRNA's, één dat 801 remt en een tweede dat VEGF/VEGFR-1 remt. In een aanverwant aspect omvat de onderhavige uitvinding
10 tevens een tandemdubbelstrengstructuur die twee of meer siRNA-sequenties omvat, die intracellulair ontleed wordt ter vorming van twee of meer verschillende siRNA's die beide 801 remmen.

In het bijzonder wordt gedacht dat een lang oligonucleotide (gewoonlijk ongeveer 80-500 nucleotiden in lengte) die één of meer hoofd- en lusstructuren bezit, waarbij hoofdgebieden de sequenties omvatten van de oligonucleotiden volgens de uitvinding in een drager, bij voorkeur een farmaceutisch aanvaardbare drager, afgegeven kan worden en intracellulair geprocessed kan worden door middel van endogene cellulaire complexen (bijvoorbeeld door DROSHA en DICER zoals hierboven beschreven) ter productie van één of meer kleinere dubbelstrengoligonucleotiden (siRNA's) die oligonucleotiden volgens de uitvinding zijn. Dit oligonucleotide kan een
20 tandem-shRNA-construct worden genoemd. Gedacht wordt dat dit lange oligonucleotide een enkelvoudige streng oligonucleotide is dat één of meer hoofd- en loopstructuren omvat, waarbij elk hoofdgebied een sens en een corresponderende antisens siRNA-sequentie van een 801-gen omvat. In het bijzonder wordt gedacht dat dit oligonucleotide sens en antisens siRNA-sequenties, zoals weergegeven in één van de tabellen A-D, omvat. Op een andere wijze kan het tandem-shRNA-construct sens en corresponderende antisens siRNA-sequentie van een 801-gen en bovendien een sens en een corresponderende antisens siRNA-sequentie van een verschillend gen, zoals VEGF of VEGFR1 omvatten.
25

30 Zoals vermeld in de beschrijving kan siRNA tegen RTP801 de hoofd actieve component zijn in een farmaceutische samenstelling dan wel kan een actieve component zijn van een farmaceutische samenstelling die twee of meer siRNA's bevat (of moleculen die voor twee of meer siRNA's coderen of endogeen produceren, of een

mengsel van moleculen of één of meer tandemmolecuul dat voor twee of meer siRNA's codeert), waarbij de farmaceutische samenstelling verder bestaat uit één of meer additioneel siRNA-molecuul dat één of meer additionele genen als target heeft. Simultane inhibitie van RTP801 en één of meer additionele genen zullen waarschijnlijk een additief of synergistisch effect hebben voor de behandeling van de ziekten die in de beschrijving beschreven zijn, als volgt:

Acuut renaal falen (ARF) en andere microvasculaire aandoeningen, alsmede gehoorbeschadigingen en drukzweren: de farmaceutische samenstelling voor de behandeling van ARF kan samengesteld zijn uit de volgende combinaties van verbindingen: 1) RTP801-siRNA en p53-siRNA-dimeren; 2) RTP801 en Fas-siRNA-dimeren; 3) RTP801 en Bax-siRNA-dimeren; 4) RTP801 en Fas-siRNA-dimeren; 5) RTP801 en Bax-siRNA-dimeren; 6) RTP801 en Noxa-siRNA-dimeren; 7) RTP801 en Puma-siRNA-dimeren; 8) RTP801 (REDD1) en RTP801L (REDD2) siRNA-dimeren; 9) RTP801-siRNA, Fas-siRNA en elk van de RTP801L-siRNA-p53-siRNA, Bax-siRNA, Noxa-siRNA of Puma-siRNA ter vorming van trimeren of polymeren (ofwel tandemmoleculen die voor drie of meer siRNA's coderen).

Verdere additionele farmaceutische samenstellingen voor combinatietherapieën voor ARF, gehoorbeschadigingen, drukzweren en elke andere ziekte of ziekte-toestand beschreven in de beschrijving kunnen twee siRNA's omvatten, waarbij het eerste siRNA een RTP801-siRNA is dat bij voorkeur gekozen is uit de tabellen A-D en het tweede siRNA dat al dan niet covalent gebonden is aan het eerste siRNA of gemengd is met het eerste siRNA, een siRNA is dat een gen als target heeft, dat gekozen is uit de volgende groep: tumorproteïne p53-bindingproteïne, 2 (TP53BP2); leucinerijke zich herhalende eenheden en dood gebied dat (LRDD) bevat; cytochroom b-245, alfapolypeptide (CYBA); activerende transcriptiefactor 3 (ATF3); caspase 2, met apoptose geassocieerde cysteinepeptidase (neurale precursorcel tot expressie gebracht, met betrekking tot ontwikkeling gedownreguleerd 2) (CASP2); NADPH-oxidase 3 (NOX3); harakiri, BCL2 in wisselwerking tredende proteïne (HRK); complement component 1, q subcomponentbindingproteïne (C1QBP); BCL2/adenovirus E1B 19kDa in wisselwerking tredende proteïne 3 (BNIP3); mitogeneactiveerde proteïnekinase 8 (MAPK8); mitogeneactiveerde proteïnekinase 14 (MAPK14); rasgerelateerde C3-botulinumtoxinesubstraat 1 (rho-familie, kleine GTP-bindingproteïne Rac1); glycogeen-synthasekinase 3 bèta (GSK3B); purinerigische receptor P2X, met een ligand afgesloten

ionkanaal, 7 (P2RX7); overgangsreceptorpotentiaalkationkanaal, subfamilie M, lid 2 (TRPM2); poly (ADP-ribose) blycohydrolase (PARG); CD38-molecuul (CD38); STEAP-familie lid 4 (STEAP4); beendermorfogenetische proteïne 2 - BMP2; gap junction proteïne, alfa 1, 43kDa (connexine 43) (GJA1); TYRO-proteïne-tyrosine-kinasebindingsproteïne (TYROBP); bindweefselgroeifactor (CTGF); afgescheiden fosfoproteïne 1 (osteopontine, beendersialoproteïne I, vroege T-lymfocyteactivering 1) (SPP1); reticulon 4-receptor (RTN4R); annexine A2 (ANXA2); rashomologe genfamilie, lid A (RHOA); en dual oxidase 1 (DUOX1);

Maculaire degeneratie (MD), diabetische retinopathie (DR), ruggenmergletsel: farmaceutische samenstelling voor de behandeling van MD, DR en ruggenmergletsel kunnen samengesteld zijn uit de volgende combinatieverbindingen: 1) RTP801-siRNA gecombineerd met hetzij VEGF-siRNA, VEGF-R1-siRNA, VEGF-R2-siRNA, PKC-bèta-siRNA, MCP1-siRNA, eNOS-siRNA, KLF2-siRNA, RTP801L-siRNA (hetzij fysisch gemengd of in een tandemmolecuul); 2) RTP801-siRNA in combinatie met twee of meer siRNA's van bovenstaande lijst (fysisch gemengd of in een tandemmolecuul coderende voor drie siRNA's of een combinatie hiervan).

COPD en ademhalingsstoornissen: de farmaceutische samenstelling voor de behandeling van ademhalingsaandoeningen kunnen samengesteld zijn uit de volgende combinaties van verbindingen: RTP801-siRNA gecombineerd met siRNA tegen één of meer van de volgende genen: elastasen, matrixmetalloproteasen, fosfolipasen, caspasen, sfingomyelinase en ceramidesynthase.

Bovendien kunnen RTP801-siRNA of elk nucleïnezuurmolecuul dat RTP801-siRNA omvat of hiervoor codeert, al dan niet covalent gebonden zijn aan een antilichaam of aptameer, teneinde een verhoogde targetting te bereiken voor de behandeling van de ziekten die in de beschrijving beschreven zijn, als volgt:

ARF: anti-Fas-antilichaam (bij voorkeur neutraliserende antilichamen).

Maculaire degeneratie, diabetische retinopathie, ruggenmergletsel: anti-Fas-antilichaam of -aptameer, anti-MCP1-antilichaam of -aptameer, anti-FEGFR1 en anti-VEGFR1-antilichaam of -aptameer. De antilichamen dienen bij voorkeur neutraliserende antilichamen te zijn.

Alle moleculen, zoals bijvoorbeeld antisens DNA-moleculen die de siRNA-sequenties die in de beschrijving beschreven zijn omvatten (met de adequate nucleïnezuurmodificaties) zijn bijzonder wenselijk en kunnen worden gebruikt in dezelfde capaciteit als hun corresponderende siRNA's voor alle toepassingen en methoden die in de beschrijving beschreven zijn.

De uitvinding omvat tevens een methode voor de behandeling van een patiënt die lijdt aan een aandoening, zoals de aandoeningen die in de beschrijving beschreven zijn, welke het toedienen aan een patiënt omvat van de bovenstaande samenstelling of verbinding in een therapeutisch werkzame dosering, waardoor de patiënt hiermee behandeld wordt.

Onder "antisens" (AS) of "antisens fragment" wordt bedoeld een polynucleotidefragment (dat deoxyribonucleotiden, ribonucleotiden of een mengsel van beide omvat) dat een remmende antisens activiteit heeft, waarbij de activiteit een afname veroorzaakt in de expressie van de endogene genomische kopie van het overeenkomstige gen (in dit geval RTP801). Een RTP801-AS-polynucleotide is een polynucleotide dat achtereenvolgende nucleotiden omvat die een sequentie van voldoende lengte en homologie ten opzichte van een sequentie aanwezig binnen de sequentie van het RTP801-gen weergegeven in SEQ ID NO: 1, heeft, om hybridisatie van het AS met het gen mogelijk te maken. De sequentie van AS wordt ontworpen om een target-mRNA van belang te complementeren en een RNA:AS-duplex te vormen. Deze duplexvorming kan processing, splitsing, transport of translatie van het relevante mRNA verhinderen. Bovendien kunnen bepaalde AS-nucleotidensequenties een cellulaire RNase-H-activiteit veroorzaken wanneer zij gehybridiseerd worden met hun target-mRNA, hetgeen resulteert in mRNA-degradatie (Calabretta et al., 1996: *Antisense strategies in the treatment of leukemias. Semin Oncol.* 23(1):78-87). In dat geval zal RNase-H de RNA-component van de duplex splitsen en kan het AS potentieel afgeven ter verdere hybridisatie met additionele moleculen van het target-RNA. Een additionele wijze van werking resulteert uit de interactie van AS met genoom DNA ter vorming van een driedvoudige helix die transcriptioneel inactief kan zijn. Bijzondere AS-fragmenten zijn de AS van het DNA coderende voor de bijzondere fragmenten van RTP801, zoals zij in de beschrijving beschreven zijn.

Vele overzichtartikelen hebben de hoofdaspecten van antisens (AS) technologie en zijn therapeutisch potentiaal behandeld (Wright & Anazodo, 1995.

Antisense Molecules and Their Potential For The Treatment Of Cancer and AIDS. Cancer J. 8:185-189). Er zijn overzichten over de chemische (Crooke, 1995. *Progress in antisense therapeutics, Hematol. Pathol. 2:59*; Uhlmann en Peyman, 1990. *Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle. Chem Rev 90(4):543-584*), cellulaire (Wagner, 1994. *Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. Nature 372:333*) en therapeutische (Hanania et al. 1995. *Recent advances in the application of gene therapy to human disease. Am. J. Med. 99:537*; Scanlon et al., 1995. *Oligonucleotides-mediated modulation of mammalian gene expression. FASEB J. 9:1288*; Gewirtz, 1993. *Oligodeoxynucleotide-based therapeutics for human leukemias, Stem Cells Dayt. 11:96*) aspecten van deze technologie.

Antisens interventie in de expressie an specifieke genen kan tot stand worden gebracht door de toepassing van synthetische AS-oligonucleotidesequenties (zie Lefebvre-d'Hellencourt et al., 1995. *Immunomodulation by cytokine antisense oligonucleotides. Eur. Cytokine Netw. 6:7*; Agrawal, 1996. *Antisense oligonucleotides: towards clinical trials, TIBTECH, 14:376*; Lev-Lehman et al., 1997. *Antisense Oligomers in vitro and in vivo. In Antisense Therapeutics, A. Cohen and S. Smicek, uitgevers (Plenum Press, New York)*). AS-oligonucleotidesequenties zijn ontworpen om een target-mRNA van belang te complementeren en een RNA:AS-duplex te vormen. Deze duplexvorming kan processing, splitsing, transport of translatie van het relevante mRNA verhinderen. Bovendien kunnen bepaalde AS-nucleotidesequenties cellulaire RNase-H-activiteit veroorzaken wanneer zij gehybridiseerd worden met hun target-mRNA, hetgeen resulteert in mRNA-ontleding (Calabretta et al., 1996. *Antisense strategies in the treatment of leukemias. Semin. Oncol. 23:78*). In dit geval zal RNase-H de RNA-component van het duplex splitsen en kan het AS potentieel afgeven ter verdere hybridisering met additionele moleculen van het target-RNA. Een additionele wijze van werking resulteert uit de interactie van AS met genomische DNA ter vorming van een drievoudige helix die transcriptioneel inactief kan zijn.

Het sequentietargetsegment voor het antisens oligonucleotide wordt zodanig gekozen dat de sequentie een geschikte energie vertoont die gerelateerd is met kenmerken die belangrijk zijn voor de oligonucleotideduplexvorming met hun complementaire templates en vertoont een laag potentieel voor zelfdimerisatie of zelfcomplementering (Anazodo et al., 1996). Bijvoorbeeld kan het computerprogramma OLIGO (primer Analysis Software, versie 3.4) worden gebruikt ter bepaling van anti-

sens sequentiesmeltemtemperatuur, vrije energie-eigenschappen en ter beoordeling van de potentiaal zelfdimeervorming en zelfcomplementaire eigenschappen. Het programma maakt de bepaling mogelijk van een kwantitatieve beoordeling van deze twee parameters (potentieel zelfdimeervorming en zelfcomplementariteit) en verschaft een indicatie van “geen potentieel” of “enig potentieel” of “wezenlijk volledig potentieel”. Onder toepassing van dit programma worden targetsegmenten in het algemeen gekozen die beoordeeld zijn als geen potentieel in deze parameters. Echter kunnen segmenten worden gebruikt die “enig potentieel” hebben in één van de categorieën. Een balance van de parameters wordt gebruikt in de selectie zoals uit de stand der techniek bekend is. Verder worden de oligonucleotiden tevens geselecteerd naar behoefte zodat een analoge substitutie de functie nagenoeg niet beïnvloedt.

Fosforthioaatantisens oligonucleotiden vertonen gewoonlijk geen significante toxiciteit bij concentraties die werkzaam zijn en vertonen voldoende farmacodynamische halfwaardetijden in dieren (Agrawal, 1996. *Antisense oligonucleotides: towards clinical trials*, TIBTECH, 14:376) en zijn nucleaseresistent. Antisens geïnduceerde verlies-aan-functie-fenotypen gerelateerd met cellulaire ontwikkeling zijn aangetoond voor de gliale fibrillaire zure proteïne (GFAP), voor het tot stand komen van een tectale plaatvorming bij een kuikentje (Calileo et al., 1991, J. Cell. Biol., 112:1285) and voor de N-myc-proteïne die verantwoordelijk is voor het instandhouden van de cellulaire heterogeniteit in neuro-ectodermale cultures (epitheliaal versus neuroblastische cellen die verschillen in hun kolonievormend vermogen, tumorigeniciteit en hechting) (Rosolen et al., 1990, Cancer Res. 50:6316; Whitesell et al., 1991. *Episome-generated N-myc antisense RNA restricts the differentiation potential of primitive neuroectodermal cell lines*. Mol. Cell. Biol. 11:1360). Antisens oligonucleotide-inhibitie van basisfibroblastgroeifactor (bFgF), met mitogene en angiogene eigenschappen remde 80% van de groei in gliomacellen (Morrison, 1991. *Suppression of basic fibroblast growth factor expression by antisense oligonucleotides inhibits the growth of transformed human astrocytes*. J. Bio. Chem. 266:728) op een bevredigende en specifieke wijze. Antisens oligonucleotiden zullen aangezien zij hydrofoob zijn, goed in wisselwerking treden met fosfolipide membranen (Akhter et al., 1991. *Interactions of antisense DNA oligonucleotide analogs with phospholipid membranes (liposomes)* Nuc. Res. 19:5551-5559). Na hun interactie met het cellulaire plasmamembraan worden zij actief (of passief) getransporteerd in levende cellen (Loke et al., 1989.

Characterization of oligonucleotide transport into living cells. PNAS USA 86:3474), in een verzadigbaar mechanisme waarvan voorspeld wordt specifieke receptoren te omvatten (Yakubov et al., 1989, PNAS USA 86:6454).

Een “ribozyme” is een RNA-molecuul dat een RNA-katalytisch vermogen bezit (zie Cech voor een overzicht) en splitst een specifieke locatie in een target-RNA.

Volgens de onderhavige uitvinding kunnen ribozymen die RTP801-mRNA splitsen als RTP801-inhibitoren worden gebruikt. Dit kan noodzakelijk zijn in gevallen waarbij antisens therapie beperkt is door stoichiometrische overwegingen (Sarver et al., 1990, *Gene Regulation and Aids*, blz. 305-325). Ribozymen kunnen vervolgens worden gebruikt die de RTP801-sequentie als target zullen hebben. Het aantal RNA-moleculen die door een ribozyme gesplitst worden is groter dan het aantal voorspeld door de stoichiometrie (Hampel en Tritz, 1989; Uhlenbeck, 1987).

Ribozymen katalyseren de fosfodiesterbindingsplitsing van RNA. Verscheidene ribozyme structurele families zijn geïdentificeerd waaronder Groep I introns, RNase P, de hepatitis delta virus ribozyme, hamerhoofdribozymen en de haarpinribozyme oorspronkelijk afgeleid van de negatieve streng van de tabakringspotvirussatelliet RNA (sTRSV) (Sullivan, 1994; Amerikaanse octrooiaanvraag 5.225.347, kolommen 4-5). De laatstgenoemde twee families zijn afgeleid van viroïden en virusoïden, waarin de ribozyme waarschijnlijk monomeren van oligomeren produceert tijdens de rollende cirkelrepliatie (Symons, 1989 en 1992) scheidt. Hamerhoofd- en haarpinribozymepatronen zijn gewoonlijk aangepast voor transsplitsing van mRNA's voor gentherapie (Sullivan, 1994). Het volgens de uitvinding toegepaste ribozymetype wordt op bekende wijze geselecteerd. Haarpinribozymen verkeren nu in een klinische test en verdienen de voorkeur. In het algemeen bevat het ribozyme 30-100 nucleotiden. Afgifte van ribozymen is vergelijkbaar met die van AS-fragmenten en/of siRNA-moleculen.

Opgemerkt zal worden dat alle te gebruiken polynucleotiden in de onderhavige uitvinding modificaties kunnen ondergaan zodat zij verbeterde therapeutische eigenschappen zullen hebben. Modificaties of analoga van nucleotiden kunnen geïntroduceerd worden ter verbetering van de therapeutische eigenschappen van deze polynucleotiden. Verbeterde eigenschappen omvatten een verhoogde nucleaseresistentie en/of een verhoogd vermogen tot het doordringen van celmembranen. Nucleaseresistentie wordt zo nodig verschaft door elke op zichzelf bekende methode die niet interfereert met de biologische activiteit van het AS-polynucleotide, siRNA, cDNA en/of

Alle analoga van of modificaties aan een polynucleotide kunnen in de onderhavige uitvinding worden toegepast vooropgesteld dat het analoog of de modificatie de functie van het polynucleotide niet wezenlijk beïnvloedt. De nucleotiden kunnen worden gekozen uit de in de natuur voorkomende of synthetisch gemodificeerde basen. In de natuur voorkomende basen omvatten adenine, guanine, cytosine, thymine en uracil. Gemodificeerde basen van nucleotiden omvatten inosine, xanthine, hypoxanthine, 2-aminoadenine, 6-methyl, 2-propyl en andere alkyladeninen, 5-halogeenuuracil, 5-halogeencytosine, 6-azacytosine en 6-azathymine, pseudo-uracil, 4-thiuracil, 8-halogeenuadenine, 8-aminoadenine, 8-thioladenine, 8-thiolalkyladeninen, 8-hydroxyladenine en andere 8-gesubstitueerde adeninen, 8-halogeenguaninen, 8-amino-guanine, 8-thiolguanine, 8-thioalkylguaninen, 8-hydroxylguanine en andere gesubstitueerde guaninen, andere aza- en deaza-adeninen, andere aza- en deazaguaninen, 5-trifluormethyluracil en 5-trifluorcytosine.

Bovendien kunnen analoga van polynucleotiden worden bereid waarbij de structuur van het nucleotide fundamenteel gewijzigd is en zijn beter aangepast aan therapeutische of experimentele reagentia. Een voorbeeld van een nucleotideanalogon is een peptide-nucleïnezuur (PNA), waarbij het deoxyribose (of ribose) fosfaatskelet in DNA (of RNA) vervangen is door een polyamideskelet dat vergelijkbaar is met dat welke in peptiden wordt gevonden. PNA-analoga bleken resistent te zijn tegen ontleding door enzymen en een verlengde levensduur *in vivo* en *in vitro* te hebben. Verder bleken PNA's sterker te binden aan een complementaire DNA-sequentie dan een DNA-molecuul. Deze waarneming wordt toegeschreven aan het gebrek van ladingsafstoting tussen

de PNA-streng en de DNA-streng. Andere modificaties die geïntroduceerd kunnen worden in oligonucleotiden omvatten polymere skeletten, cyclische skeletten of acyclische skeletten.

De in de onderhavige uitvinding toegepaste polypeptiden kunnen eveneens gemodificeerd zijn, eventueel chemisch gemodificeerd zijn, ter verbetering van hun therapeutische activiteit. “Chemisch gemodificeerd” - wanneer deze term betrekking heeft op de polypeptiden, betekent een polypeptide waar ten minste één van de aminozuurgroepen gemodificeerd is door natuurlijke processen, zoals het processen of andere posttranslationele modificaties dan wel door chemische modificatietechnieken die uit de stand der techniek bekend zijn. Onder talrijke bekende modificaties omvatten gebruikelijke modificaties de volgende niet-uitsluitende voorbeelden: acetylering, acylering, amidering, ADP-ribosylering, glycosylering, GPI-ankervorming, covalente binding van een lipide of lipidederivaat, methylering, myristylering, pegylering, prenyletering, fosforylering, ubiquitinatie of soortgelijke processen.

Additionele mogelijke peptidemodificaties (zoals die resulterende van nucleïnezuursequentiewijziging) omvatten de volgende:

“Conservatieve substitutie” - heeft betrekking op de substitutie van een aminozuur in één klasse door een aminozuur van dezelfde klasse, waarbij een klasse gedefinieerd wordt door gebruikelijke fysicochemische aminozuurzijketeneigenschappen en hoge substitutiefrequenties in homologe polypeptiden die in de natuur worden gevonden, zoals bijvoorbeeld bepaald door een standaard Dayhoff-frequentie-uitwisselingsmatrix of BLOSUM-matrix. Zes algemene klassen van aminozuurzijketens zijn in categorieën onderverdeeld en omvatten: Klasse I (Cys); Klasse II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Klasse III (Asn, Asp, Gln, Glu); Klasse IV (His, Arg, Lys); Klasse V (Ile, Leu, Val, Met); en Klasse VI (Phe, Tyr, Trp). Bijvoorbeeld, het vervangen van een Asp door een andere Klasse III-groep, zoals Asn, Gln of Glu, is een conservatieve vervanging/substitutie.

“Niet-conservatieve substitutie” - heeft betrekking op de vervanging van een aminozuur in één klasse door een aminozuur van een andere klasse; bijvoorbeeld, vervanging van een Ala, een klasse II-groep, met een klasse III-groep, zoals Asp, Asn, Glu of Gln.

“Deletie” - is een verandering in een nucleotide- of aminozuursequentie, waarin één of meer nucleotiden of aminozuurgroepen, respectievelijk, afwezig is.

“Insertie” of “additie” - is de verandering in een nucleotide- of aminozuursequentie, die geresulteerd heeft in de additie van één of meer nucleotiden of aminozuurgroepen, respectievelijk, vergeleken met de in de natuur voorkomende sequentie.

5 “Substitutie” - vervanging van één of meer nucleotiden of aminozuren door verschillende nucleotiden of aminozuren, respectievelijk. Met betrekking tot aminozuursequenties kan de substitutie al dan niet conservatief zijn.

In een additionele uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding kan het RTP801-polypeptide of polynucleotide worden gebruikt voor het diagnostiseren of detecteren van maculaire degeneratie in een patiënt. Een detectiemethode zou gewoon-
10 lijk omvatten het testen op RTP801-mRNA of RTP801-polypeptide in een van een patiënt afkomstig monster.

“Detectie” - heeft betrekking op een methode voor het detecteren van een ziekte. Deze term kan betrekking hebben op de detectie van een predispositie op een ziekte of op de detectie van de ernst van de aandoening.

15 Met “homoloog/homologie”, zoals deze term in de uitvinding wordt gebruikt wordt bedoeld ten minste ongeveer 70%, bij voorkeur ten minste ongeveer 75% homologie, met voordeel ongeveer ten minste 80% homologie, meer met voordeel ten minste ongeveer 90% homologie, zelfs nog meer met voordeel ten minste ongeveer 95%, bijvoorbeeld ten minste ongeveer 97%, ongeveer 98%, ongeveer 99% of zelfs
20 ongeveer 100% homologie. De uitvinding omvat tevens het feit dat deze polynucleotiden en polypeptiden gebruikt kunnen worden op dezelfde wijze als de eerder vermelde in de beschrijving beschreven polynucleotiden en polypeptiden.

Op een andere wijze of bovendien kan “homologie” met betrekking tot sequenties betrekking hebben op het aantal posities met identieke nucleotiden of aminozuurgroepen, gedeeld door het aantal nucleotiden of aminozuurgroepen in de kortere van de twee sequenties, waarbij de mate van gelijk lopen van de twee sequenties bepaald kan worden volgens de Wilbur en Lipman algoritme ((1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726); bijvoorbeeld, onder toepassing van een raamwerk van 20 nucleotiden, een woordlengte van 4 nucleotiden en een gappenalty of 4, kan een analyse met behulp van een compu-
25 ter en interpretatie van de sequentiedata waaronder de mate van gerichtheid met voordeel worden uitgevoerd onder toepassing van in de handel verkrijgbare programma's (bijvoorbeeld Intelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc., CA). Wanneer RNA-sequenties gerapporteerd worden als zijnde vergelijkbaar of als hebbende een graad van se-
30

quantie die identiek is of homoloog is met DNA-sequenties, thymidine (T) in de DNA-sequentie wordt beschouwd gelijk aan uracil (U) in de RNA-sequentie. RNA-sequenties die binnen de beschermingsomvang van de onderhavige uitvinding vallen kunnen van DNA-sequenties of hun complementen worden afgeleid door vervanging van thymidine (T) in de DNA-sequentie door uracil (U).

Additioneel of op andere wijze kan aminozuursequentiegelijkenis of homologie worden bepaald, bijvoorbeeld onder toepassing van het BlastP-programma (Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402) en beschikbaar bij NCBI. De volgende referenties verschaffen algoritmen voor het vergelijken van de relatieve identiciteit of homologie van aminozuurgroepen van twee polypeptiden en additioneel of anders met betrekking tot het bovenstaande, kan de leer in deze referenties worden gebruikt ter bepaling van het percentage homologie: Smith et al., (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith et al., (1983) Nucl. Acids Res. 11:2205-2220; Devereux et al., (1984) Nucl. Acids Res. 12:387-395; Feng et al., (1987) J. Molec. Evol. 25:351-360; Higgins et al., (1989) CABIOS 5:151-153; en Thompson et al., (1994) Nucl. Acids Res. 22:4673-4680.

“Met ten minste X% homologie” - met betrekking tot twee aminozuur- of nucleotide-sequenties heeft betrekking op het percentage groepen die identiek zijn in de twee sequenties wanneer de sequenties optimaal ten opzichte van elkaar gericht zijn. Dus 90% aminozuursequentie-identiciteit betekent dat 90% van de aminozuren in twee of meer optimaal opgestelde/gerichte polypeptidesequenties identiek zijn.

Een additionele uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding heeft betrekking op een farmaceutische samenstelling die een RTP801-inhibitor in een therapeutisch werkzame hoeveelheid als een actief ingrediënt en een farmaceutisch aanvaardbare drager omvat. De inhibitor kan een biologische inhibitor, een organisch molecuul, een chemisch molecuul enz. zijn, waarbij de farmaceutische samenstelling een RTP801-inhibitor kan omvatten, dat een polynucleotide is dat achtereenvolgende nucleotiden omvat die een sequentie hebben die een antisens sequentie is ten opzichte van de sequentie weergegeven in figuur 1 (SEQ ID NO: 1). Verder kan de RTP801-inhibitor een vector zijn die deze polynucleotiden omvat. Bovendien kan de RTP801-inhibitor een monoklonaal antilichaam zijn die specifiek bindt aan een epitoom die 4-25 aminozuren weergegeven in figuur 2 (SEQ ID NO: 2) omvat, of een RNA-molecuul dat het RTP801-gen-mRNA als target heeft, zoals bijvoorbeeld een siRNA-molecuul (eventu-

eel weergegeven in de tabellen A-D en in het bijzonder siRNA nrs: 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 en 50 van tabel A of siRNA nrs: 257, 260-262 en 264-268 van tabel D) dan wel een ribozyme.

De actieve ingrediënten van de farmaceutische samenstelling kunnen oligonucleotiden
 5 omvatten die nucleaseresistent zijn en die nodig zijn voor de uitvoering van de uitvinding dan wel een fragment daarvan, waarvan bewezen is dat het hetzelfde effect gericht tegen één of meer geschikte sequenties en/of ribozymen heeft. Combinaties van actieve ingrediënten, zoals beschreven in de onderhavige uitvinding kunnen worden gebruikt, waaronder combinaties van antisens sequenties.

10 Een additionele uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding verschaft de toepassing van een therapeutisch werkzame dosering van een RTP801-inhibitor voor de bereiding van een geneesmiddel voor het bevorderen van het herstel van een patiënt die lijdt aan een ruggenmergziekte of -letsel. In één uitvoeringsvorm is de inhibitor bij voorkeur een siRNA. In een andere uitvoeringsvorm is de inhibitor bij voorkeur struc-
 15 tuur A die in de beschrijving weergegeven is.

De uitvinding is beschreven op een illustratieve wijze en begrepen dient te worden dat de terminologie die gebruikt is bedoeld is als een beschrijvende terminologie die niet beperkend dient te worden uitgelegd.

Vanzelfsprekend zijn vele modificaties en variaties van de onderhavige
 20 uitvinding in het licht van de bovenstaande leer mogelijk. Men dient derhalve te begrijpen dat binnen de beschermingsomvang van de aangehechte conclusies de uitvinding op een andere wijze dan die welke specifiek beschreven is uitgevoerd kan worden.

Door de hele aanvraag heen zijn verschillende publicaties, waaronder Amerikaanse octrooischriften, genoemd met auteur en jaar en de octrooischriften aan
 25 de hand van een nummer. De openbaringen uit deze publicaties en octrooischriften en octrooiaanvragen zijn geheel bij wijze van referentie in de onderhavige aanvraag opgenomen teneinde de stand der techniek waartoe deze uitvinding behoort op volledige wijze te beschrijven.

KORTE BESCHRIJVING VAN DE FIGUREN

- Fig. 1** geeft de coderende sequentie van het RTP801-gen (SEQ ID NO: 1) gedetailleerd weer;
- 5 **Fig. 2** geeft de aminozuursequentie van het RTP801-polypeptide (SEQ ID NO: 2) gedetailleerd weer;
- Fig. 3** is een diagram dat de exons, CDS, humane SNP's en de positie van de verschillende nucleïnezuurmoleculen die humaanspecifiek of specifiek voor de mens, muis en rat in parallel weergeeft;
- 10 **Fig. 4A-H** geeft een panel van Western-blot-analyseresultaten weer, die verkregen zijn na toepassing van verscheidene dubbelstrengnucleïnezuren volgens de onderhavige uitvinding op een eerste humane cellijn, waarbij het experiment tweemaal was uitgevoerd, aangeduid met experiment 1 en experiment 2, en waarbij het expressieniveau van p110a en p85 weergegeven is als beladingscontroles en de intensiteit (dichtheid) van de RTP801-band is een mate voor de remmende activiteit van het bepaalde toegepaste dubbelstrengnucleïnezuur;
- 15 **Fig. 5A-F** geeft een panel van Western-blot-analyseresultaten weer, die verkregen zijn na toepassing van verscheidene dubbelstrengnucleïnezuren volgens de onderhavige uitvinding op een tweede humane cellijn, waarbij het experiment tweemaal werd uitgevoerd, aangeduid met experiment 1 en experiment 2 en waarbij het expressieniveau van p110a en p85 weergegeven is als beladingscontroles en de dichtheid van de RTP801-band is een mate voor de remmende activiteit van het bepaalde toegepaste dubbelstrengnucleïnezuur;
- 20 **Fig. 6A-C** geeft een panel van Western-blot-analyseresultaten weer, die verkregen zijn na toepassing van verscheidene dubbelstrengnucleïnezuren volgens de onderhavige uitvinding op de eerste humane cellijn bij verschillende concentraties, namelijk 10 nM (5A), 5 nM (5B) en 1 nM (5C), waarbij het experiment tweemaal was uitgevoerd, aangeduid met experiment 1 en experiment 2 en waarbij het expressieniveau van p110a en p85 is weergegeven als beladingscontroles en de dichtheid van de RTP801-
- 25
- 30

band is een mate voor de remmende activiteit van het bepaalde toegepaste dubbelstrengnucleïnezuur;

Fig. 7 geeft een panel van Western-blot-analyseresultaten weer, die verkregen zijn door toepassing van verscheidene dubbelstrengnucleïnezuuren volgens de onderhavige uitvinding op een muizencellijn, waarbij het experiment tweemaal was uitgevoerd, aangeduid met experiment 1 en experiment 2, en waarbij het expressieniveau van p110a en p85 is weergegeven als beladingscontroles en de dichtheid van de RTP801-band is een mate voor de remmende activiteit van het bepaalde toegepaste dubbelstrengnucleïnezuur;

Fig. 8 geeft de resultaten van experimenten in een muizen-AMD-modelsysteem weer;

Fig. 9 geeft de resultaten van additionele experimenten in een muizen-AMD-modelsysteem weer;

Fig. 10 geeft de resultaten van experimenten in een niet-humaan primate-AMD-modelsysteem weer;

Fig. 11A-B geeft de resultaten van additionele experimenten in een niet-humaan primate-AMD-modelsysteem weer;

Fig. 12A-B geeft de resultaten van verdere additionele experimenten in een niet-humaan primate-AMD-modelsysteem weer;

Fig. 13A-B stelt een analyse van de experimentele resultaten die bereikt zijn in een niet-humaan primate-AMD-model voor;

Fig. 14 stelt een additionele analyse van de experimentele resultaten die bereikt zijn in een niet-humaan primate-AMD-model voor;

Fig. 15A-C laat de resultaten van een experiment waarbij de intratracheale instillatie van een RTP801 dat plasmide in muizen tot expressie brengt betrokken is, zien;

Fig. 16A-C laat de resultaten zien van een korte termijn (7 dagen) sigarettenrokenmodel in RTP801-KO- en -WT-muizen zien;

Fig. 17A-C laat de resultaten van een korte termijn sigarettenrokenmodel in WT-muizen geïnstilleerd met actief anti-RTP801 (REDD14) en controle (REDD8) siRNA zien;

- Fig. 18** laat de resultaten van experimenten met RTP801-KO-muizen in een lange termijn CS-model zien;
- Fig. 19** laat de resultaten van experimenten in een muizen-ARF-modelsysteem zien;
- 5 **Fig. 20** laat de resultaten van experimenten in een muizendiabetisch retinopathiemodelsysteem zien;
- Fig. 21** laat de resultaten van additionele experimenten in een muizendiabetisch retinopathiemodelsysteem zien;
- Fig. 22** laat de resultaten van verdere additionele experimenten in een
10 muizendiabetisch retinopathiemodelsysteem zien;
- Fig. 23** laat de resultaten van gecombineerde RTP801/VEGF-inhibitie-experimenten in een muizen-CNV-modelsysteem zien;
- Fig. 24** laat de resultaten van additionele gecombineerde RTP801/VEGF-inhibitie-experimenten in een muizen-CNV-modelsysteem zien;
- 15 **Fig. 25** laat de resultaten van experimenten die het effect onderzoeken van RTP801-siRNA op genexpressie in RPE en neuraal retina zien;
- Fig. 26A-B** laat additionele resultaten van experimenten die het effect bestuderen van RTP801-siRNA op de genexpressie in RPE en neuraal retina zien;
en
- 20 **Fig. 27** laat de resultaten van experimenten die bewijzen dat RTP801NP even actief is als RTP801 zien;
- Fig. 28** laat de efficiëntieresultaten zien met betrekking tot 801_1 (SEQ ID NOS: 430 en 527) en 801_4 (SEQ ID NOS: 433 en 530);
- Fig. 29** laat verdere efficiëntieresultaten zien met betrekking tot 801_1 (SEQ ID
25 NOS: 430 en 527) en 801_4 (SEQ ID NOS: 433 en 530);
- Fig. 30** laat verdere efficiëntieresultaten zien met betrekking tot 801_1 (SEQ ID NOS: 430 en 527) en 801_4 (SEQ ID NOS: 433 en 530).

VOORBEELDEN

Zonder verder te willen uitwijden wordt gemeend dat een deskundige op dit gebied kan, gebruikmakend van de bovenstaande beschrijving, de onderhavige uitvinding volledig gebruiken. De volgende geprefereerde specifieke uitvoeringsvormen zijn 5 derhalve als slechts illustratief op te vatten zonder dat zij op enigerlei wijze de geclaimde uitvinding beperken.

Standaardmoleculaire biologieprotocollen die uit de stand der techniek bekend zijn en die niet specifiek in de beschrijving beschreven zijn kunnen in het algemeen hoofdzakelijk worden gevonden in Sambrook et al., *Molecular cloning: A* 10 *laboratory manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992) en in Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988).

Standaardorganische syntheseprotocollen die uit de stand der techniek bekend zijn en die niet specifiek in de beschrijving beschreven zijn worden in het algemeen en hoofdzakelijk gevonden in *Organic syntheses: Band 1-79*, verschillende uitgevers, J. Wiley, New York, (1941-2003); Gewert et al., *Organic synthesis workbook*, Wiley-VCH, Weinheim (2000); Smith & March, *Advanced Organic Chemistry*, Wiley-Interscience; 5^{de} druk (2001). 15

Standaardmedische chemiemethoden die uit de stand der techniek bekend zijn en die niet specifiek in de beschrijving beschreven zijn worden in het algemeen en hoofdzakelijk gevonden in de serie "Comprehensive Medicinal Chemistry", door verschillende auteurs en uitgevers, gepubliceerd door Pergamon Press. 20

De kenmerken van de uitvinding die in de beschrijving, de conclusies en/of de tekeningen beschreven zijn kunnen zowel afzonderlijk als in combinatie daarvan 25 materiaal zijn voor het tot stand brengen van de uitvinding in verscheidene vormen hiervan.

Voorbeeld 1

30 Algemene materialen en methoden

Indien niet anders wordt aangegeven werden de volgende materialen en methoden in de voorbeelden 1-5 gebruikt:

Celculture

De eerste humane cellijn, namelijk HeLa-cellen (American Type Culture Collection) werden als volgt gekweekt: HeLa-cellen (American Type Culture Collection) werden gekweekt zoals beschreven in Czauderna F. et al. (Czauderna, F.,
 5 Fechtner, M., Aygu, H., Arnold, W., Klippel, A., Giese, K. & Kaufmann, J (2003). Nucleic Acids Res. 31, 670-82).

De tweede humane cellijn was een humane keratinozytcellijn die als volgt gekweekt was:

Humane keratinocyten werden bij 37°C in Dulbecco's gemodificeerd Eagle-medium
 10 (DMEM) dat 10% FCS bevatte, gekweekt.

De muizencellijn was B16V (American Type Culture Collection) gekweekt bij 37°C in Dulbecco's gemodificeerd Eagle-medium (DMEM) dat 10% FCS bevatte. Kweekomstandigheden waren zoals beschreven in Methods Find Exp Clin Pharmacol. 1997 mei; 19(4):231-9:

15 In elk geval werden de cellen onderworpen aan de experimenten zoals in de beschrijving beschreven bij een dichtheid van ongeveer 50.000 cellen per putje en het dubbelstrengnucleïnezuur volgens de onderhavige uitvinding werd toegevoegd in een concentratie van 20 nM, waarbij het dubbelstrengnucleïnezuur gecomplexeerd was, gebruikmakend van 1 µg/ml van een gedeponeerde lipide.

20

Inductie van hypoxia-achtige conditie

De cellen werden met CoCl₂ behandeld ter inductie van een hypoxiaachtige toestand, als volgt: siRNA-transfecties werden uitgevoerd in 10 cm platen (30-50% confluentie), zoals beschreven door (Czauderna et al., 2003; Kretschmer et al., 2003).

25 In het kort werden siRNA getransfecteerd door toevoeging van een vooraf gevormd 10x geconcentreerd complex van GB en lipide in serumvrij medium aan cellen in een compleet medium. Het totale transfectievolume was 10 ml. De uiteindelijke lipideconcentratie was 1,0 µg/ml; de uiteindelijke siRNA-concentratie was 20 nM tenzij anders wordt aangegeven. Inductie van de hypoxische responsen werd uitgevoerd door
 30 toevoeging van CoCl₂ (100 µM) rechtstreeks aan het weefselculturemedium 24 uur voorafgaande aan lyse.

Bereiding van celextracten en immunoblotting

De bereiding van celextracten en immunoblot-analyse werd uitgevoerd hoofdzakelijk zoals beschreven door Klippel et al. (Klippel, A., Escobedo, M.A., Wachowicz, M.S., Apell, G., Brown, T.W., Giedlin, M.A., Kavanaugh, W.M. & Williams, L.T. (1998). Mol Cell Biol, 18, 5699-711; Klippel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, W.M., Apell, G., Escobedo, M.A. & Williams, L.T. (1996). Mol Cell Biol, 16, 4117-27). Polyklonale antilichamen tegen RTP801 volledige lengte werden gegenereerd door immuniserende konijnen met recombinant RTP801-proteïne producerende bacteriën afkomstig van de pET19-b-expressievector (Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Duitsland). De muizenmonoklonale anti-p110a- en anti-p85-antilichamen zijn door Klippel et al. beschreven (supra).

Voorbeeld 2**Reductie van de RTP801-expressie in een eerste humane cellijn**

Verscheidene dubbelstrengnucleïnezuren werden bereid. Hun locatie ten opzichte van het mRNA en CDS alsmede humane SNP's in het nucleïnezuur coderende voor humaan RTP801 (databanktoegang nummer NM019058) is in figuur 3 weergegeven. De eerste humane cellijn werd in aanraking gebracht met de dubbelstrengnucleïnezuren zoals beschreven in voorbeeld 1. Na inductie van een hypoxiaachtige toestand en behandeling met dubbelstrengnucleïnezuren werden de cellen gelyseerd en de cellysaten werden onderworpen aan immunoblotting. p110a die een katalytische eenheid is van de PI3-kinase en p85 werden als beladingscontroles toegepast. De intensiteit van de RTP801-band zoals zichtbaar gemaakt gebruikmakend van de RTP801-polyklonale antilichamen is een mate van de activiteit van de afzonderlijke dubbelstrengnucleïnezuren in termen van het reduceren van het expressieniveau van RTP801.

Elke van de dubbelstrengnucleïnezuren is zodanig gemodificeerd dat een 2'-O-Me-groep aanwezig was op het eerste, derde, vijfde, zevende, negende, elfde, dertiende, vijftiende, zeventiende en negentiende nucleotide van de antisens streng, waarbij dezelfde modificatie ofwel een 2'-O-Me-groep aanwezig was op het tweede, vierde, zesde, achtste, tiende, twaalfde, veertiende, zestiende en achttiende nucleotide van de sens streng. Bovendien dient opgemerkt te worden dat in het geval van deze bepaalde nucleïnezuren volgens de onderhavige uitvinding het eerste stuk

identiek is aan de eerste streng en het tweede stuk is identiek aan de eerste streng en deze nucleïnezuuren hebben een afgestompt uiteinde.

De experimenten werden tweemaal uitgevoerd en de afzonderlijke resultaten zijn in de figuren 4A tot H weergegeven, waar zij aangeduid zijn als experiment 1 en respectievelijk experiment 2.

De weergaven h, hr en hmr in de figuren 4A tot H geven aan dat het dubbelstrengnucleïnezuur zodanig was aangegeven dat een sectie van het RTP801-mRNA beschouwd werd dat specifiek is voor humaan RTP801-mRNA (h) om een sectie van het RTP801-mRNA te beschouwen dat specifiek is voor humaan en ratten-RTP801-mRNA (hr) en om een sectie van het RTP801-mRNA te beschouwen dat specifiek is voor humaan, muizen en ratten-RTP801-mRNA (hmr). Het dubbelstrengnucleïnezuur, aangeduid met nr. 40.1, werd gebruikt als positieve controle en onbehandelde cellen (UT+) werden als negatieve controle gebruikt.

Volgens de resultaten bleken de volgende dubbelstrengnucleïnezuuren bijzonder nuttig te zijn in het downreguleren van de expressie van RTP801 nrs.: 14, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 49 en 50 (zie tabel A).

Voorbeeld 3

Reductie van de RTP801-expressie in een tweede humane cellijn

De experimenten, zoals beschreven in samenhang met voorbeeld 2 werden herhaald onder toepassing van de tweede humane cellijn, zoals gespecificeerd in voorbeeld 1 en de resultaten zijn in de figuren 5A tot F weergegeven.

Zoals uit deze figuren kan worden afgeleid werden de resultaten zoals verkregen in samenhang met de in voorbeeld 2 beschreven experimenten, gebruikmakend van deze tweede humane cellijn, bevestigd.

Voorbeeld 4

Doserings-effect van RTP801-specifieke dubbelstrengnucleïnezuuren

In dit experiment werd het doseereffect van RTP801-specifieke dubbelstrengnucleïnezuuren onderzocht.

Voor dit doel werden HeLa-cellen behandeld, evenals in samenhang met de voorbeelden 2 en 3, waarbij de concentratie van dubbelstrengnucleïnezuur in het kweekbouillon 10 nM, 5 nM en 1 nM was. Als positieve controle werd dubbelstreng-

nucleïnezuur nr. 40.1 toegepast, als negatieve controle werden onbehandelde cellen (UT+) toegepast. Het aflezen was hetzelfde als beschreven in samenhang met de voorbeelden 2 en 3. De bepaalde dubbelstrengnucleïnezuren die gebruikt waren, waren die met interne referentienummers 14, 22, 23 en 27 die gericht zijn op stukken op het RTP801-mRNA die gedeeld worden door mensen, muizen en ratten en dubbelstrengnucleïnezuur met interne referentienummers 39 en 42 die gericht zijn op stukken van het RTP801-mRNA die specifiek zijn voor humaan RTP801.

De resultaten zijn in de figuren 6A tot C weergegeven. Uit deze figuren kan worden afgeleid dat er een duidelijke concentratieafhankelijkheid van het effect van de dubbelstrengnucleïnezuren specifiek voor RTP801 is, waarbij de nucleïnezuurmoleculen met interne referentienummers 1, 15, 20, 21, 24, 40, 41, 43, 44, 22, 23, 27, 39, 42, 40,1, 44,1 en 14, bij voorkeur 22, 23, 27, 39, 42, 40,1 en 44, 1 en meer bij voorkeur 14, 23 en 27 en bij voorkeur elk van de nucleïnezuurmoleculen met het bepaalde modificatiepatroon zoals beschreven hiertoe in het voorbeeldgedeelte van de beschrijving bijzonder werkzaam zijn.

Voorbeeld 5

Speciesspecificiteit van het RTP801-specifiek dubbelstrengnucleïnezuur

De dubbelstrengnucleïnezuren volgens de uitvinding zijn ontworpen tegen stukken van het RTP801-mRNA die gelijk of verschillend zijn in verschillende species. Om te testen of er een speciesspecificiteit bestaat van een RTP801-specifiek dubbelstrengnucleïnezuur, de dubbelstrengnucleïnezuren met interne referentienummers 14, 22, 23 en 27 die gericht zijn op een stuk van het RTP801-mRNA dat geconserveerd is onder de mens, muis en rat RTP801-mRNA en de dubbelstrengnucleïnezuren met interne referentienummers 39 en 42 die gericht zijn op een stuk van het RTP801-mRNA dat specifiek is voor humaan RTP801-mRNA ofwel dat gericht is op een stuk dat op zichzelf niet aanwezig is in de muis of de rat, vergeleken in termen van downreguleren van RTP801 onder toepassing van dezelfde benadering en aflezen zoals gespecificeerd in de voorbeelden 1 en 2.

Ofschoon alle dubbelstrengnucleïnezuren die toegepast zijn in principe actief zijn tegen humaan mRNA en, zoals weergegeven in de voorafgaande voorbeelden, zijn tevens geschikt voor het downreguleren van de expressie van RTP801, na toepassing van een muizencellijn hebben slechts die dubbelstrengnucleïnezuren die

tevens specifiek zijn voor muizen-RTP801-mRNA de RTP801-expressie effectief gereduceerd, namelijk de dubbelstrengnucleïnezuren nrs. 14, 22, 23 en 27.

Uit dit resultaat kan worden geconcludeerd dat het mogelijk is om een RTP801 te ontwerpen dat gericht is op dubbelstrengnucleïnezuren die specifiek zijn voor één of verscheidene species. Dit maakt het gebruik mogelijk van hetzelfde molecuul in diermodellen en bij de mens.

Voorbeeld 6

Experimentele modellen, methoden en resultaten met betrekking tot de maculaire degeneratie

De verbindingen van de onderhavige uitvinding werden in het volgende diermodel van choroïdale neovascularisatie (CNV) getest. Dit kenmerk van nat AMD wordt geïnduceerd in modeldieren door middel van laserbehandeling.

15 A) MUIZENMODEL

Choroïdale neovascularisatie (CNV) inductie

Choroïdeneovascularisatie (CNV), een kenmerk van nat AMD, werd getriggerd door laserfotocoagulatie (532 nm, 200 mW, 100 ms, 75 µm) (OcuLight GL, Iridex, Mountain View, CA) op beide ogen van elke muis op dag 0 door middel van één enkele individu die gemaskeerd was voor geneesmiddelgroep toekenning. Laser-
vlekken werden toegepast op gestandaardiseerde wijze rond de optische zenuw, gebruikmakend van een spleetlampafgiftesysteem en een afdeklaag als contactlens.

Behandelingsgroepen

25 CNV werd geïnduceerd in de volgende groepen van muizen (mannelijke 6-8 weken oud):

- (1) 12 WT-muizen;
- (2) 12 RTP801-knock-outmuizen;
- 30 (3) 12 WT-muizen werden geïnjecteerd met 0,25 µg synthetische gestabiliseerde actieve anti-RTP801-siRNA (REDD14) in één oog en inactieve anti-RTP801-siRNA (REDD8 - negatieve controle) in het andere oog op dagen 0 en 7;

- (4) 12 WT-muizen werden geïnjecteerd met 0,25 µg van synthetisch gestabiliseerde actieve anti-RTP801-siRNA (REDD14) in één oog en inactieve anti-GFP-siRNA (negatieve controle) in het andere oog op dagen 0 en 7;
- (5) 12 WT-muizen werden geïnjecteerd met hetzij 0,1 µg synthetisch gestabiliseerde actieve anti-RTP801-siRNA (REDD14) in één oog en PBS (negatieve controle) in het andere oog op dagen 0 en 7;
- (6) 12 WT-muizen werden geïnjecteerd met hetzij 0,05 µg synthetisch gestabiliseerde actieve anti-RTP801-siRNA (REDD14) in één oog en PBS (negatieve controle) in het andere oog op dagen 0 en 7.

Beide ogen van elke muis werden met een laser behandeld. Het geïnjecteerde volume was 2 µl.

Beoordeling

1. Het experiment werd beëindigd op dag 14. Voor de evaluatie werden de ogen kernvrij gemaakt en werden gefixeerd met 4% paraformaldehyd gedurende 30 min bij 4°C. De neurosensorische retina werd losgemaakt en van de optische zenuw gescheiden. Het overgebleven RPE-choroïde-scleracomplex werd vlak gemonteerd in Immu-Mount (Vectashield Mounting Medium, Vector) en werd bedekt. Vlakke monsters werden onderzocht met behulp van een scanninglaser confocale microscoop (TCS SP, Leica, Duitsland). Vaten werden zichtbaar gemaakt door excitatie met een blauwe argonlaser. Horizontale optische secties (1 µm stap) werden verkregen vanuit het oppervlak van het RPE-choroïde-scleracomplex. Het diepste vocale vlak waarin het omgevende choroïdale vasculaire netwerk dat in verbinding staat met het letsel kon worden geïdentificeerd, werd beoordeeld als zijnde de bodem van het letsel. Elk vat in het door laser behandelde gebied en oppervlakkig ten opzichte van dit referentievlak werd als CNV beoordeeld. Beelden van elke sectie werden digitaal opgeslagen. Het gebied van met CNV gerelateerde fluorescentie werd gemeten door een gecomputeriseerde beeldanalyse, gebruikmakend van de Leica TCS SP software. De som van het gehele fluorescentiegebied in elke horizontale sectie werd gebruikt als een index voor het volume CNV.

2. Afzonderlijke WT-muizen (5 ogen per groep) werden gebruikt voor het evalueren van RTP801-mRNA-expressie in CNV (alsmede de expressie van andere genen die relevant zijn voor AMD) (onbehandeld en behandeld met siRNA) gebruikmakend van real-time PCR op RNA dat geëxtraheerd was uit RPE/choroïden of uit neurale retina.

Resultaten

1. RTP801-KO-muizen vertoonden 30% minder bloedvatlekkage vergeleken met WT-muizen na de CNV-inductie; zie figuur 8.
2. Synthetisch gestabiliseerde siRNA tegen RTP801, REDD14, veroorzaakte een dosisafhankelijke reductie van het CNV-volume. Een maximum van ~70% inhibitie vergeleken met PBS-geïnjecteerde ogen werd tot stand gebracht met een REDD14 (sequentie nr. 14 in tabel A, SEQ ID NOS: 16 (sens) en 66 (antisens)) dosering van 0,25 µg per oog. Bij dezelfde dosering vertoonde zowel negatieve controle siRNA's, REDD8 en anti-GFP-siRNA slechts 27% en 33% CNV-volumereductie, hetgeen zowel de superieure doeltreffendheid van REDD14 als de specificiteit van dit effect ondersteunde.

B) NIET-HUMAAN PRIMAATMODEL

25 CNV-inductie

Acht mannelijke cynomolgus-aper (*Macaca fascicularis*), 2-6 jaar oud, werden gebruikt voor dit onderzoek. Choroïdale neovascularisatie (CNV) werd geïnduceerd door perimaculaire laserbehandeling van beide ogen voorafgaande aan de toediening van de dosis. Negen letsels werden geplaatst in de macula met een laser [OcuLight GL (532 nm) laser fotocoagulator met een IRIS Medical® portable spleetlampadapter] en laserspots in het rechteroog waren het spiegelbeeld van de ligging in het linkeroog. De laserparameters waren bij benadering als volgt: spotafmeting: 50-100 µm diameter; laservermogen: 300-700 milliwatt; blootstellingstijd: 0,1 sec.

Behandeling

Onmiddellijk in aansluiting op de laserbehandeling werden beide ogen van alle dieren onderworpen aan één enkele intravitreale injectie. Het linkeroog werd gedoseerd met 350 µg synthetisch gestabiliseerd siRNA tegen RTP801 (hetzelfde dat in het muizenonderzoek was gebruikt) in het uiteindelijke volume van 50 µl, terwijl het contralaterale oog 50 µl PBS (drager) ontving.

Beoordeling

1. Alle dieren werden onderworpen aan een dagelijks onderzoek van voedingsmiddelconsumptie en lichaamsgewichtmetingen.
2. Twee apen werden opgeofferd op dag 6 na de CNV-inductie. Hun ogen werden eruit gehaald (kernvrij gemaakt) en de achterste pool werd vlak gemaakt. Vervolgens werd het foveagebied eruit geprepareerd en gescheiden in choroïden en neuroretina die gescheiden (voor elk dier) bevroren werden in vloeibare stikstof teneinde hierna gebruikt te worden voor RNA-extractie en real-time-PCR-evaluatie van de RTP801-expressie.
3. Fluoresceïneangiogrammen werden uitgevoerd voorafgaande aan het onderzoek en aan het einde van week 1, 2 en 3 na de CNV-inductie. Foto's werden genomen, gebruikmakend van een funduscamera (TRC-50EX Retina-camera). Beelden werden vastgelegd, gebruikmakend van het TOPCON IMAGENet™-systeem. Fluoresceïnekleurstof (10% fluoresceïnenatrium, ca. 0,1 ml/kg) werd geïnjecteerd via vasculaire toegangspoorten. Foto's werden genomen op verschillende tijdstippen na het injecteren van de kleurstof teneinde de arteriële fase, de vroege arterioveneuze fase en enkele late arterioveneuze fasen op te nemen, teneinde de neovascularisatie te evalueren en lekkage van fluoresceïne geassocieerd met CNV-letsels te volgen. Interpretatie en analyse van de fluoresceïneangiogrammen werd onafhankelijk uitgevoerd door middel van twee oogartsen.

Neovascularisatie (NV) werd beoordeeld in vroege angiogrammen en elke spot werd volgens het volgende schema beoordeeld:

- 0 - geen tekenen van NV

- 0,5 - verdachte spot
- 1 - “hot” spot
- 2 - NV in de laserverbranding
- 3 - evidente NV

5

Lekkage werd volgens het volgende schema beoordeeld:

- 0 - geen lekkage
- 0,5 - verdachte spot
- 1 - evidente spotlekkage
- 2 - lekkage die met de tijd toenam
- 3 - lekkage groter dan eerdere grensgebieden (evident)

10

Bovendien werd de afmeting van elke spot vergeleken tussen de vroege en de late angiogrammen gebruikmakend van morfometrische metingen en de toename in de afmeting van de spot resulterende uit de lekkage werd berekend.

15

4. Elektroretinogrammen (ERG's) werden geregistreerd gebruikmakend van een Epic 2000 elektroretinograaf volgens Sierra's SOP's en het onderzoek-specifieke SOP, met inbegrip van de toepassing van het Ganzfield-apparaat bij het vooronderzoek en aan het einde van week 3. De in de tabel opgenomen ERG-data werden geëvalueerd door een veterinaire oogarts.

20

Het onderzoek werd beëindigd op dag 21 na CNV-inductie. Algemene necropsie en histologisch onderzoek werden uitgevoerd op organen en weefsels, waaronder de ogen.

25

Resultaten

1. siRNA tegen RTP801 gereduceerde RTP801-expressie in de RPE/choroïden van met laser behandelde dieren, zoals gemeten op dag 6 na CNV-inductie door middel van real-time-PCR (zie figuur 10).
2. Vergelijking van de spotbeoordeling voor lekkage en neovascularisatie tussen de gelijke ogen in elke afzonderlijke aap bracht aan het licht dat beide pathologische

30

kenmerken verminderd waren in de ogen die geïnjecteerd waren met RTP801-siRNA vergeleken met de controle (voor lekkageresultaten, zie figuur 11; voor neovascularisatieresultaten, zie figuur 12).

- 5 3. Berekening van het algemene aantal spots met hogere klinisch relevante beoordelingen (2 en 3) van lekkage of neovascularisatie in alle met siRNA geïnjecteerde ogen vergeleken met alle met PBS geïnjecteerde ogen wederom bracht aan het licht dat met siRNA geïnjecteerde ogen minder aangetast waren (zie figuur 13, a+b).

10

4. De algemene beoordelingsdata voor lekkage van spots en neovascularisatie werden onderworpen aan statistische beoordeling. Het bestaan van verschillen tussen de siRNA- en controlebehandelingen werd geanalyseerd door berekening van de delta tussen de gemiddelde spotbeoordelingen van het controlerechteroog (R) en het met siRNA geïnjecteerde linkeroog (L) ($\text{delta} = R - L$). De significantie van het verschil werd berekend onder toepassing van een niet-parametrische statistische methode, Wilcoxon Signed Beoordelingstest - een zogenoemde “one tail test”. Verschillende fasen van angiogrammen (vroeg arterieel, arterio-veneus en laat veneus) werden afzonderlijk voor elke week (1, 2 en 3) geanalyseerd.

20

Tabel 2 laat de significantie zien (“one tail test”) van lekkagebeoordelingsverschil van 0 voor elke groep (p-waarden <0,05 zijn onderstreept). Een significante lekkagebeoordelingsreductie werd gevonden in de linkerogen (met siRNA behandeld) met betrekking tot het rechteroog (met placebo behandeld) in de weken 2 en 3 in de late angiogrammen.

25

TABEL 2

Lekkage		P-waarde
Angiogrammen	Week	Wilcoxon Signed Beoordelingstest
Vroeg	1	0,2500
	2	0,5000
	3	0,5000
Arterio-veneus	1	0,3438
	2	0,1250
	3	0,2344
Laat	1	0,1250
	2	<u>0,0313</u>
	3	<u>0,0156</u>

Opgemerkt dient te worden dat late angiogrammen gewoonlijk worden toegepast voor de evaluatie van lekkageparameters.

Tabel 3 laat de significantie zien ("one tail test") van neovascularisatie (NV) beoordelingsverschil van 0 voor elke groep (p-waarden <0,05 zijn onderstreept).

10

TABEL 3

NV		P-waarde
Angiogrammen	Week	Wilcoxon Signed Beoordelingstest
Vroeg	1	0,0781
	2	<u>0,0313</u>
	3	<u>0,0313</u>
Arterio-veneus	1	0,0625
	2	<u>0,0313</u>
	3	0,1563
Laat	1	0,2500
	2	0,3438
	3	0,2500

Een significante NV-beoordelingsreductie werd gevonden in de linkerogen ten opzichte van de rechterogen in de weken 2 en 3 in de vroege periode en in de arterio-veneusperiode in week 2.

Opgemerkt dient te worden dat vroege angiogrammen gewoonlijk worden
5 toegepast voor de evaluatie van neovascularisatieparameters.

5. Kwantitatieve morfometrische evaluatie van de toename in het gebied van de spots die optreden tussen de vroege (arteriële fase) en de late (veneuze fase) angiogrammen te wijten aan de lekkage, bracht aan het licht dat deze parameter
10 significant was gereduceerd in de laserspots binnen de met siRNA geïnjecteerde ogen (linkerogen, OS) vergeleken met de controle (rechterogen, OD). Twee voorbeelden zijn in figuur 14 weergegeven. De grafieken bewijzen de relatieve toename (in %) in het gebied van elke spot in het linker- en in het rechteroog van dieren #3315 en 3300.

15

Bovendien werd opgemerkt in alle bovenstaande onderzoeken dat anti-RTP801-siRNA geen nadelige effecten had op elektroretinogrammen (ERG), op ooghistologie of op structuur en functie van andere organen en systemen.

20 Ter samenvatting van de bovenstaande experimenten en resultaten

1. Beide genetische (RTP801 -/-) en therapeutische siRNA-inhibitie van RTP801-expressie in het door laser geïnduceerde CNV-model van de natte ouderdomsmaculaire degeneratie (nat AMD) resulteren in een significante
25 reductie van het CNV-volume.
2. Positieve resultaten werden in het muizen- en in het niet-humane primate model verkregen.
- 30 3. Pathologisch en ERG-onderzoek bij de aap bracht niet aan het licht enige door siRNA gemedieerde toxiciteit in ogen dan wel in één of ander orgaan of systeem.

C) DOELTREFFENDHEID VAN DE COMBINATIETHERAPIE VAN RTP801-siRNA (REDD14) EN ANTI-VEGF-ANTILICHAAM

De doeltreffendheid van combinatietherapie van RTP801-siRNA (REDD14) en anti-VEGF-antilichaam in de behandeling van ziekten waarbij CNV optreedt werd in het bovenstaande muizen-CNV-model beproefd.

A) CNV-volumeonderzoekingen

Het volume van choroïdale neovascularisatie (CNV) 3 weken na laserletsel werd gecomputeriseerd door middel van confocale fluorescentiemicroscopie, zoals eerder beschreven (Sakurai et al., *IOVS* 2003; 44:3578-85 & Sakurai et al., *IOVS* 2003; 44:2743-2749).

In eerdere onderzoekingen werd gevonden dat anti-VEGF-A-antilichaam (Ab) het CNV-volume in een dosisafhankelijke wijze reduceerde. Een dosis van 1 ng VEGF-A-Ab werd gekozen voor de REDD14+VEGF-A-Ab-combinatieonderzoekingen omdat deze dosering een intermediair remmend effect had: VEGF-A-Ab (1 ng) reduceerde de afmeting van CNV met $26 \pm 6\%$.

De hoofdbevindingen van het REDD14+VEGF-A-antilichaam (Ab) onderzoek zijn:

- De toevoeging van REDD14 bij de lagere 0,05 μg dosering reduceerde de afmeting van CNV met $27 \pm 4\%$ vergeleken met VEGF-A-Ab alleen.
- De toevoeging van REDD14 bij de hogere 0,25 μg dosering reduceerde de afmeting van CNV met $55 \pm 3\%$ vergeleken met VEGF-A-Ab alleen.

B) CNV-lekkageonderzoekingen

Experiment 1

Dit experiment werd ontworpen ter identificatie van een potentieel additief of synergistisch therapeutisch effect van inhibitie van VEGF en RTP801 in het model van de met laser geïnduceerde choroïdeneovascularisatie in muizen.

Materialen:

- REDD14 (RTP801-siRNA)
- REDD8 (negatieve controle)
- Anti-VEGF-antilichamen
- 5 • Niet-specifieke IgG (negatieve controle)

CNV werd geïnduceerd op dag nul zoals hierboven beschreven; het testmateriaal werd in de patiënten geïnjecteerd op dag 0 en op dag 7.

De resultaten werden geëvalueerd door fluoresceïneangiografie in de weken 1, 2, 3 en
10 door CNV-volumemeting in week 3. Elke testgroep bestond uit 10 ogen.

Experimentele groepen:

- VEGF-Ab 0,5 ng/oog
- VEGF-Ab 1 ng/oog
- 15 • VEGF-Ab 2 ng/oog
- VEGF-Ab 4 ng/oog
- REDD14 0,05 µg/oog
- REDD14 0,1 µg/oog
- REDD14 0,25 µg/oog
- 20 • REDD14 0,05 µg/oog + VEGF-Ab 1 ng/oog
- REDD14 0,1 µg/oog + VEGF-Ab 1 ng/oog
- REDD14 0,25 µg/oog + VEGF-Ab 1 ng/oog

Controle groepen:

- 25 • PBS
- Niet-specifiek IgG 2 ng/oog
- REDD8 0,1 µg/oog
- REDD8 0,1 µg/oog + VEGF-Ab 1 ng/oog

30 Resultaten:

De resultaten in de het bovenstaande experiment zijn in de figuren 23-24 weergegeven. Deze resultaten laten zien dat simultane intravitreale toediening van

VEGF-Ab en REDD14 leidt tot een verhoogde en dosisafhankelijke inhibitie van choroïdeneovascularisatie en choroïdebloedvatlekkage, zoals uitgedrukt in een gereduceerde incidentie van beoordeling 4-spots en een verhoogde incidentie van beoordeling 1-spots.

- 5 Angiogrammen werden beoordeeld onder toepassing van een modificatie van een semi-kwantitatieve beoordeling (1-4) schema dat eerder gepubliceerd was (Sakurai et al., *IOVS* 2003; 44:2743-2749). Beoordeling 1-lletsels worden beschouwd als nooit eerder gevormd ofwel equivalent aan een volledige preventie. Beoordeling 4-lletsels worden beschouwd als pathologisch significant ofwel equivalent aan letsels die behandeld zouden worden in patiënten. VEGF-A-Ab (1 ng) reduceerde de incidentie van beoordeling 4-lletsels per oog met $38 \pm 8\%$ en een verhoogde incidentie van beoordeling 1-lletsels per oog met $66 \pm 43\%$.

De hoofdbevindingen van de REDD14+VEGF-A-Ab-combinatielekkageonderzoek zijn:

- 15 • De toevoeging van REDD14 bij de lagere 0,05 μg dosering reduceerde de incidentie van beoordeling 4-lletsels met $66 \pm 12\%$ vergeleken met VEGF-A-Ab alleen.
- De toevoeging van REDD14 bij de hogere 0,25 μg dosering reduceerde de incidentie van beoordeling 4-lletsels met $60 \pm 12\%$ vergeleken met VEGF-A-Ab alleen.
- De toevoeging van REDD14 bij de hogere 0,25 μg dosering verdubbelde ($100 \pm 34\%$) de incidentie van beoordeling 1-lletsels vergeleken met VEGF-A-Ab alleen.
- 20

Experiment 2:

Dit experiment werd ontworpen ter bestudering van het effect van REDD14 op genexpressie in RPE en neuraal retina.

25

Experimenteel ontwerp:

Groepen:

- PBS
- REDD14 0,25 mg

30

De groepgrootte was 5 ogen. CNV werd geïnduceerd door laserbehandeling, zoals hierboven beschreven, op dag nul; het testmateriaal werd eveneens geïnjecteerd op dag

nul en het effect werd geëvalueerd door middel van qPCR-analyse van genexpressie in RPE en neuraal retina op dagen nul en 5.

Resultaten:

5 De resultaten van bovenstaand experiment zijn weergegeven in figuur 25. Deze resultaten laten zien dat de toediening van REDD14 veroorzaakt:

- ~40% downregulering van RET801-expressie onder de basislijn zowel in REP als in neuraal retina (zie tevens figuur 26);
- ~70% upregulering van PEDF-expressie op de basislijn in neuraal retina (opmerking: in met PBS geïnjecteerde ogen is expressie van PEDF 40% gedownreguleerd onder de basislijn)
- 10 • ~40% downregulering van VEGF164-expressie onder de basislijn in RPE (opmerking: in met PBS geïnjecteerde ogen is expressie van VEGF164 20% gedownreguleerd)
- 15 • ~50% reductie van MCP1-expressie in RPE/choroïden (figuur 26).

Algemene conclusies van beide experimenten:

- Simultane inhibitie van RTP801 en VEGF heeft een verhoogd remmend effect op de choroïdeneovascularisatie en neovasculaire lekkage.
- 20 • Inhibitie van RTP801-expressie door middel van REDD14 voorkomt niet alleen PEDF-downregulering in het CNV-model, maar verhoogt zijn expressie vergeleken met de basislijn.
- Inhibitie van RTP801-expressie leidt tot simultane downregulering van MCP1 dat een anti-ontstekings-effect zou moeten hebben.
- 25 • Zonder gebonden te willen zijn aan enige theorie kan de toename van PEDF-expressie door REDD14 ten grondslag liggen aan het waargenomen meewerkende effect van de simultane inhibitie van VEGF en RTP801 (PEDF is een bekende anti-angiogene en neurobeschermende factor).
- Zonder aan enige theorie gebonden te willen zijn kan de reductie van de MCP1-
30 expressie door REDD14 tevens ten grondslag liggen aan het waargenomen meewerkende effect van de simultane inhibitie van VEGF en RTP801 (MCP1 is een bekende pro-ontstekingschemokine betrokken in de pathogenese van AMD).

Additionele AMD-modellen die gebruikt kunnen worden voor het testen van de methode volgens de uitvinding:

- Ccl-2 of Ccr-2 deficiënte dieren - deficiëntie in één van deze proteïnen veroorzaakt de ontwikkeling van enkele van de hoofdkenmerken van AMD. Dieren die deficiënt zijn in deze proteïnen kunnen worden gebruikt voor het beproeven van de methoden van de onderhavige uitvinding.

Voor verdere informatie over AMD-diermodellen, zie: Chader, *Vision research* 42 (2002) 393-399; Ambati et al., *Nature Medicine* 9(11) (2003) 1390-1397; Tolentino et al., *Retina* 24 (2004) 132-138.

D) Vergelijking van de activiteit van REDD14 anti-RTP801-siRNA die een 3'-fosfaatgroep op elke streng bezitten met hetzelfde molecuul zonder 3'-fosfaten (REDD14NP) in het met laser geïnduceerde CNV-model.

Het experiment werd in het algemeen uitgevoerd en geëvalueerd zoals hierboven beschreven. Eén oog van elke muis (12 per groep) werd geïnjecteerd met 0,25 µg REDD14-siRNA, terwijl een ander oog geïnjecteerd werd met REDD14NP-siRNA.

Resultaten:

Beide siRNA's reduceerden het CNV-volume even efficiënt (figuur 27).

Voorbeeld 7

Modellen en resultaten met betrekking tot COPD en emfyseem

De verbindingen volgens de uitvinding werden op de volgende diermodellen beproefd:

- * Door sigarettenrook geïnduceerd emfyseemmodel: chronische blootstelling aan sigarettenrook veroorzaakt emfyseem in verschillende dieren, zoals onder andere de muis en de cavia.
- * Longproteaseactiviteit als een trigger van emfyseem.

- * VEGFR-inhibitiemodel van emfyseem.
- * Bronchiale instillatie met humane neutrofiele/pancreaselastase in knaagdieren.
- * Met MMP (matrixmetalloprotease) geïnduceerd emfyseem.
- * Door ontsteking geïnduceerd emfyseem.

5

Bovendien kunnen emfyseemmodellen gegenereerd worden door genetische middelen (bijvoorbeeld muizen die de *TSK*-mutatie dragen) en emfysemateuze dieren kunnen worden gegenereerd door bekende modificeermiddelen van vatbaarheid voor emfysemen, zoals onder andere longletsel, alveolaire hypoplasie, hyperoxia, glucocorticoïdebehandeling en -voeding.

10

A. Evaluatie van de invloed van het gebrek aan RTP801 op de ziekteontwikkeling in muizenmodellen van emfyseem (onder toepassing van RTP801-knock-out-muizen)

15

(1) Door sigaretten roken (CS) geïnduceerde ontsteking en apoptose wordt geïnitieerd in 5 RTP801-KO en 5 controle-wildtypen 4 maanden oude mannelijke muizen. De muizen worden onderworpen aan intens CS (zoals beschreven in Rangasamy et al., zie boven) gedurende 7 dagen. KO- en WT-niet-behandelde muizen afkomstig van het VEGFR-inhibitie-experiment van hierboven kunnen eveneens dienen als niet-behandelde controlegroepen voor dit experiment. De longen worden vervolgens met agarose gevuld, gefixeerd en in paraffine ingebed, en de ontwikkeling van oxidatieve stress in de KO-muizen wordt bepaald door:

20

- a) immunohistochemische lokalisatie en kwantitatieve evaluatie van 8-oxo-dG in de longsecties;
- b) immunohistochemische lokalisatie en kwantitatieve bepaling van actieve caspase-3 in de longsecties, gebruikmakend van specifieke antilichamen, dan wel kwantitatieve evaluatie van het aantal TUNEL-positieve cellen;
- c) meting van de ceramideconcentratie in de longextracten;
- d) meting van de caspaseactiviteit in de longextracten.

25

30

(2) Lange termijn sigaretten roken in de KO-muizen.

6 KO- en 6 wat leeftijd betreft bij elkaar passende WT-vrouwelijke muizen werden onderworpen aan intens sigaretten roken (5 uur gedurende een dag) tijdens een periode van 6 maanden. De muizen werden vervolgens opgeofferd en de gemiddelde interseptale diameter (een parameter van emfyseemontwikkeling) werd geëvalueerd onder toepassing van een morfometrische benadering.

B. Evaluatie van de invloed van het gebrek aan RTP801 op de ziekteprogressie in muizenmodellen van emfyseem door endogeen RTP801 te remmen onder toepassing van een intralongafgifte-RTP801-inactiverend siRNA.

Door CS geïnduceerde ontsteking werd geïnduceerd door 7 dagen roken in 2 groepen van C57BL6-muizen, 10 muizen per groep. Groep 1: CS + afgifte van controle-siRNA (REDD8) siRNA; groep 2: CS + RTP801-siRNA (REDD14). Controlegroepen van muizen kregen één van de typen siRNA toegediend, maar werden in kamerluchtomstandigheden instandgehouden. De dieren werden geëvalueerd zoals in bovenstaand experiment met de knock-outmuizen.

Methoden:

Blootstelling aan sigaretten roken (CS)

Blootstelling wordt uitgevoerd (7 uur/dag, 7 dagen/week) door verbranding van 2R4F-referentiesigaretten (2,45 mg nicotine per sigaret; gekocht van het Tobacco Research Institute, University of Kentucky, Lexington, KY, USA), gebruikmakend van een rookinrichting (Model TE-10, Teague Enterprises, Davis, CA, USA). Elke gloeiende sigaret werd gepuift gedurende 2 sec, éénmaal elke minuut voor een totaal van acht puffen, met een totale stroomsnelheid van 1,05 l/min, teneinde een standaardpuf van 35 cm³ te verschaffen. De rookinrichting wordt ingesteld ter productie van een mengsel van zijstroomrook (89%) en hoofdstroomrook (11%) door verbranding van 5 sigaretten tegelijkertijd. De kameratmosfeer wordt gevolgd met betrekking tot totaal gesuspenderde deeltjes en koolmonoxide met concentraties van 90 mg/m³ respectievelijk 350 ppm.

Morfologische en morfometrische analyses

Na blootstelling van de muizen aan CS of instillatie van RTP801 tot expressie gebrachte plasmide werden de muizen verdoofd met halothaan en de longen werden gevuld met 0,5% laagsmeltende agarose bij een constante druk van 25 cm, zoals eerder beschreven is. De gevulde longen worden gefixeerd in 10% gebufferde formaline en worden in paraffine ingebed. Secties van 5 μ m worden gekleurd met hematoxyline en eosine. De gemiddelde alveolaire diameter, alveolaire lengte en gemiddelde lineaire intercepten worden bepaald door middel van computergestuurde morfometrie met de Image Pro Plus-software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). De longsecties in elke groep worden gecodeerd en representatieve beelden (15 per longsectie) worden verkregen door een ten aanzien van de identiteit van de slides gemaskeerde onderzoeken, met behulp van een Nikon E800-microscoop, 20X lens.

Bronchoalveolaire wasbewerking (BAL) en fenotyperen

Na blootstelling aan CS of instillatie van RTP801 tot expressie gebrachte plasmide, worden de muizen verdoofd met natriumpentobarbital. De uit de longen van de muizen verzamelde BAL-vloeistof wordt gecentrifugeerd (500 x g bij 4°C) en de celpellet wordt opnieuw in fosfaatgebufferde zoutoplossing gesuspenderd. Het totale aantal cellen in de wasvloeistof wordt bepaald en 2 x 10⁴ cellen worden cytogecentrifugeerd (Shandon Southern Products, Pittsburgh, PA, USA) op glasschijfjes en worden gekleurd met Wright-Giemsa-kleurstof. Differentiële celtellingen worden op 300 cellen volgens standaardcytologische technieken uitgevoerd.

Identificatie van alveolaire apoptotische celpopulaties in de longen

Ter identificatie van de verschillende alveolaire celtypen die apoptose in de longen ondergaan, wordt een immunohistochemisch kleuren van actieve caspase-3 in de longsecties afkomstig van de kamerlucht (RA) alsmede aan CS blootgestelde muizen uitgevoerd. Ter identificatie van de apoptotische type II epitheliale cellen in de longen, worden na actieve caspase-3-labeling de longsecties geïncubeerd, eerst met antimuizenoppervlakte-actieve proteïne C (SpC) antilichaam en vervolgens met een antikijn-Texas-rood-antilichaam. Apoptotische endotheliale cellen worden geïdentificeerd door incuberen van de secties, eerst met het antimuis CD 31-antilichaam en vervolgens met het gebiotinyleerde konijnenantimuizensecundaire antilichaam. De

longsecties worden gespoeld in PBS en worden vervolgens geïncubeerd met het streptavidine-Texas-rood geconjugeerde complex. De apoptotische macrofagen in de longen worden geïdentificeerd door incuberen van de secties, eerst met het rattenantimuizen-Mac-3-antilichaam en vervolgens met het antirat-Texas-rood-antilichaam. Tenslotte wordt DAPI op alle longsecties toegepast, gedurende 5 minuten geïncubeerd, gewassen en gemonteerd met Vectashield HardSet-monteermiddel. DAPI en fluoresceïne worden zichtbaar gemaakt bij 330-380 nm respectievelijk 465-495 nm. Beelden van de longsecties worden verkregen met een Nikon E800-microscoop, 40X lens.

10 **Immunohistochemische lokalisatie van actieve caspase-3**

Immunohistochemisch kleuren van een actief caspase-3-proefmonster wordt uitgevoerd onder toepassing van antiactief caspase-3-antilichaam en de actieve caspase-3-positieve cellen worden geteld met behulp van een macro onder toepassing van een Image Pro Plus-programma. De tellingen worden genormaliseerd door de som van de alveolaire profielen die hierin genoemd worden als alveolaire lengte en worden in μm uitgedrukt. Alveolaire lengte correleert omgekeerd met het gemiddelde lineaire intercept, dat wil zeggen naarmate de alveolaire septa vernietigd worden, nemen de gemiddelde lineaire intercepten toe naarmate de totale alveolaire lengte ofwel de totale alveolaire septale lengte afneemt.

20

Caspase-3-activiteitstest

De caspase-3/7-activiteit wordt gemeten in longweefselextracten gebruikmakend van een fluorometrische test volgens de aanwijzingen van de fabrikant. Snel bevroren longweefsel ($n = 3$ per groep) werd met de testbuffer gehomogeniseerd, gevolgd door sonicatie en centrifugatie bij $800 \times g$. Na verwijdering van de kernen en cellulaire debris wordt de supernatant ($300 \mu\text{g}$ proteïne) vervolgens geïncubeerd met het profluorescerende substraat bij kamertemperatuur gedurende 1 uur en de fluorescentie-intensiteit werd gemeten, gebruikmakend van een Typhoon-fosfoimager (Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ, USA). De resultaten zijn uitgedrukt in de snelheid van specifieke caspase-3-substraatsplitsing uitgedrukt in eenheden van caspase-3-enzymatische activiteit, genormaliseerd door totale proteïneconcentratie. Actieve recombinant-caspase-3 werd gebruikt als de teststandaard (0-4 U). Weefsel-

30

lysaten zonder substraat, testbuffer alleen en lysaten met caspase-3-inhibitor werden als negatieve controles gebruikt.

Immunohistochemische lokalisatie van 8-oxo-dG

5 Voor de immunohistochemische lokalisatie en kwantificering van 8-oxo-dG worden longsecties afkomstig van de muizen die blootgesteld zijn aan CD of die met RTP801 tot expressie gebrachte plasmide geïnstilleerd waren, geïncubeerd met anti-8-oxo-dG-antilichaam en werden gekleurd, gebruikmakend van een InnoGenex™ Iso-IHC DAB-kit onder toepassing van muizenantilichamen. De 8-oxo-dG-positieve cellen
10 worden met behulp van een macro (gebruikmakend van Image Pro Plus) geteld en de tellingen werden door middel van de alveolaire lengte, zoals reeds beschreven, genormaliseerd.

Instillatie van plasmide-DNA in muizenlongen

15 Plasmide-DNA an RTP801 tot expressie brengen en controlevectoren werden bereid, gebruikmakend van een endotoxinevrije DNA-isolatiekit. Voor intratracheale instillatie wordt 50 µg plasmide-DNA afgegeven in 80 µl steriele perfluorkoolstof. De zuurstofdragende eigenschappen van perfluorkoolstof maken deze bij deze volumina goed getolereerd, terwijl zijn fysisch-chemische eigenschappen verantwoordelijk zijn voor een extreem efficiënte distale longafgifte wanneer intratracheaal geïnstilleerd. Muizen worden verdoofd door een korte inhalatiehalothaanblootstelling, de tong wordt zacht naar voren getrokken door middel van forceps en de trachea wordt geïnstilleerd met een perfluorkoolstofoplossing die toegepast werd aan de basis van de tong via een afgestompte angiokatheter.

25

Instillatie van siRNA in muizenlongen

 Muizen worden verdoofd met behulp van een intraperitoneale injectie van ketamine/xylazine (115/22 mg/kg). 50 µg siRNA wordt intranasaal geïnstilleerd in een volume van 50 µl 0,9%’s NaCl door afgifte van vijf achtereenvolgende porties van 10
30 µl. Aan het einde van de intranasale instillatie wordt het hoofd van de muizen gedurende 1 min rechtop gehouden om ervoor te zorgen dat de gehele geïnstilleerde oplossing binnen afgegeven wordt.

Voor verdere informatie, zie: Rangasamy T., Cho C.Y., Thimmulappa, R.K., Zhen L., Srisuma S.S., Kensler T.W., Yamamoto M., Petrache I., Tudor R.M., Biswal S., *Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Submitted to Journal of Clinical Investigation*; Yasunori Kasahara, Rubin M. Tudor, Carlyne D. Cool, David A. Lynch, Sonia C. Flores en Norbert F. Voelkel. *Indothelial Cell Death and Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Emphysema*. Am J Respir Crit Care Med, band 163, blz. 737-744, 2001; Yasunori Kasahara, Rubin M. Tudor, Laimute Taraseviciene-Stewart, Timothy D. Le Cras, Steven Abman, Peter K. Hirth, Johannes Waltenberger en Norbert F. Voelkel. *Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema*. J. Clin. Invest. 106:1311-1319 (2000); en een overzichtsartikel op dit gebied: Robin M. Tudor, Sharon McGrath en Enid Neptune, *The pathological mechanisms of emphysema models: what do they have in common?*, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2002.

15

Resultaten:

1. Instillatie van een plasmide die RTP801 tot expressie brengt resulteert in een emfyseemachtig fenotype in muizenlongen die evident is door (1) toename in bronchoalveolaire lavage celtellingen (fig. 15a); (2) apoptose van longseptale cellen (fig. 15b) en toename in de alveolaire diameter (fig. 15c).
2. Instillatie van RTP801-siRNA (REDD14) resulteert in een reductie van de RTP801-expressie in de longen (fig. 17b).
3. RTP801-KO-muizen worden beschermd tegen emfyseemontwikkeling na 6 maanden sigaretten roken, zoals blijkt door het uitblijven van een vergroting van de alveolaire diameter (fig. 18).
4. RTP801-KO-muizen worden beschermd tegen door sigaretten roken geïnduceerde ontsteking, zoals blijkt uit het verminderde aantal inflammatoire bronchoalveolagecellen na 1 week sigaretten roken (fig. 16, a-b).
5. RTP801-KO-muizen worden beschermd tegen door sigaretten roken geïnduceerde apoptose van longseptale cellen, zoals blijkt door het kleuren van een longsectie voor geactiveerde caspase (fig. 16c).
6. Met REDD14 geïnstilleerde muizen worden tendele beschermd tegen door sigaretten roken geïnduceerde ontsteking, zoals blijkt door het gereduceerde

20

25

30

aantal inflammatoire bronchoalveolagecellen na 1 week sigaretten roken (fig. 17a).

7. Met REDD14 geïnstilleerde muizen worden tendele beschermd tegen door sigaretten roken geïnduceerde apoptose van longseptale cellen, zoals blijkt door kleuring van een longsectie voor geactiveerde caspase en door immunoblotting van longextracten met antigeactiveerde caspase-3-antilichamen (fig. 17c).

Voorbeeld 8

10 **Modellen en resultaten met betrekking tot microvasculaire aandoeningen**

De verbindingen van de onderhavige uitvinding werden in diersmodellen getest op een reeks microvasculaire aandoeningen, zoals hieronder beschreven wordt.

1. Diabetische retinopathie

- 15 RTP801 bevordert neuronale celapoptose en het genereren van reactieve zuurstofspecies *in vitro*. De uitvinder van de onderhavige uitvinding vond tevens dat in RTP801-knock-out (KO) muizen die onderworpen waren aan het model van retinopathie van prematuriteit (ROP), pathologische neovascularisatie NV gereduceerd werd onder hypoxische omstandigheden ondanks verhogingen in VEGF, terwijl het gebrek aan dit gen het fysiologische neonatale retinale NV niet beïnvloedde. Bovendien was in
20 dit model het gebrek aan RTP801 tevens beschermend tegen hypoxische neuronale apoptose en hyperoxische vaso-obliteratie.

Experiment 1

- 25 Diabetes werd geïnduceerd in 8 weken oude RTP801-KO- en C57/129sv wilde type (WT) littermate-muizen door intraperitoneale injectie van STZ. Na 4 weken werd ERG (single white flash, $1,4 \times 10^4$ ftc, 5 ms) verkregen uit het linkeroog na 1 uur aanpassing aan donkere omstandigheden. RVP werd bepaald uit beide ogen, gebruikmakend van de Evans blue albuminepermeatietechniek

30

Resultaten

Bloedglucose was niet verschillend tussen diabetische (DM) WT en DM KO (495 ± 109 vs 513 ± 76 mg/dl), niet-diabetische (NDM) WT en KO (130 ± 10 vs

135±31 mg/dl respectievelijk). RVP in de DM WT-groep werd verhoogd met 138% (51,2 ± 37,9 µl/g/h, n=8) vergeleken met NDM WT (21,5 ± 18,8 µl/g/h, n=9, p=0,055). Daarentegen werd RVP gereduceerd met 80% in DM KO 9,5 ± 8,5 µl/g/h, n=6, p=0,023) vergeleken met de DM-WT-muizen, hetgeen resulteert in een 140% afname van door diabetes geïnduceerd RVP. In DM-WT-muizen was er een verlenging (p<0,05) van de oscillatoire potentiële impliciete tijden voor OP2 (11%), OP3 (12%) & OP4 (14%) en voor de B-golf (23%) vergeleken met NDM WT. De A-golf was niet significant veranderd. Deze veranderingen werden genormaliseerd ~100% in DM-KO-muizen voor OP3 & OP4 en 65% voor B-golf vergeleken met NDM KO.

Conclusie:

Knock-out van RTP801 verbetert door diabetes geïnduceerde RVP- en ERG-abnormaliteiten in muizen, hetgeen suggereert dat dit hypoxia induceerbare gen een belangrijke rol kan spelen in de pathogenese van een vroege diabetische retinale ziekte.

Experiment 2

Diabetes werd geïnduceerd in RTP801-knock-out en in controle wilde typen muizen met de gepaste genetische achtergrond. Bovendien werd deze geïnduceerd in C57B16-muizen die hierop aansluitend werden gebruikt voor intravitreale injectie van anti-RTP801 en controle-siRNA's. Voor diabetesinductie werden de muizen geïnjecteerd met streptozotocine (STZ 90 mg/kg/d gedurende 2 dagen na vasten gedurende een nacht). Dierfysiologie werd gevolgd door het gehele onderzoek heen op veranderingen in bloedglucose, lichaamsgewicht en hematocriet. Muizen geïnjecteerd met een drager dienden als controles. De geschikte dieren werden behandeld door middel van intravitreale injecties van 1 µg REDD14 anti-RTP801-siRNA of 1 µg anti-GFP-controle-siRNA. siRNA werd tweemaal tijdens het verloop van het onderzoek geïnjecteerd - op dag nu, wanneer de eerste STZ-injectie werd uitgevoerd en op dag 14 na de STZ-injectie.

Retinale vasculaire lekkage werd gemeten gebruikmakend van de Evans blue (EB) kleuringstechniek op de dieren na een 4 weken durende diabetes. Muizen hadden een katheter geïmplanteerd in de rechter halsslagader 24 uur voorafgaande aan

de Evans blue (EB) metingen. Retinale permeabiliteitsmetingen in beide ogen van elk dier volgden een standaard Evans blue protocol.

Resultaten

- 5 1. Retinaal bloedvatlekkage werd met 70% gereduceerd in RTP801-KO-diabetische muizen vergeleken met wilde typen diabetische muizen (zie fig. 20).
2. De knock-out van RTP801 normaliseert ERG-abnormaliteiten in muizen: In DM-WT-muizen was er een verlenging ($p < 0,05$) van de oscillatoire potentiële impliciete tijden voor OP2 (11%), OP3 (12%) & OP4 (14%) en voor de B-golf (23%) vergeleken met NDM WT. De A-golf was niet significant veranderd.
- 10 Deze veranderingen werden genormaliseerd ~100% in DM-RTP801-KO-muizen voor OP3 & OP4 en 65% voor B-golf vergeleken met NDM RTP801-KO (zie fig. 21).
3. Vergelijkbaar met de resultaten in KO-muizen werd retinaalbloedvatlekkage
- 15 gereduceerd met 50% in diabetische muizen, geïnjecteerd intravitreaal met REDD14-siRNA tegen RTP801 vergeleken met diabetische muizen die intravitreaal geïnjecteerd waren met controle-siRNA tegen GFP (zie fig. 22).

2. Retinopathie van prematuriteit

- 20 Retinopathie van prematuriteit werd geïnduceerd door blootstelling van de testdieren aan hypoxische en hyperoxische omstandigheden en hierna testen van de effecten op de retina. De resultaten lieten zien dat RTP801-KO-muizen beschermd waren tegen retinopathie van prematuriteit, waardoor het beschermende effect van RTP801-inhibitie gevalideerd werd.

25

3. Myocardiaal infarct

- Myocardiaal infarct werd geïnduceerd door linker anterieure afdalende aderligatie in muizen, zowel op korte als op lange termijn. Resultaten: reductie van TnT en CPK-MB-fractieniveaus 24 uur postinfarct in het bloed en beter echocardiogram (ejectiefractievolumen) 28 dagen postinfarct in RTP801-KO-muizen.
- 30

4. Microvasculaire ischemische ziekte toestanden

Diermodellen voor de bepaling van ischemische ziekte toestanden omvatten:

1. Gesloten hoofdletsel (CHI) - Experimenteel TBI produceert een reeks gebeurtenissen die bijdragen tot neurologische en neurometabolische cascaden die samenhangen met de mate en ernst van gedragsgebreken. CHI is geïnduceerd onder verdoving terwijl een gewicht vanaf een vooraf vastgestelde hoogte kan vrijvallen (Chen et al., *J. Neurotrauma* 13, 557, 1996) over het blootgestelde hoofdskelet dat de linker halve bol in het midcoronale vlak bedekt.
2. Overgangsmiddelcerebrale vaatocclusie (MCAO) - Een 90 tot 120 minuten durende overgangs/tijdelijke focale ischemie werd in volwassen, mannelijke Sprague Dawley-ratten met een gewicht van 300 tot 370 g uitgevoerd. De toegepaste methode is de intraluminale suture/hechting MCAO (Longa et al., *Stroke*, 30, 84, 1989 en Dogan et al., *J. Neurochem.* 72, 765, 1999). In het kort onder een halothaanverdoving wordt een 3-0-nylonhechtingsmateriaal bekleed met poly-L-lysine in de rechter interne carotideader (ICA) door een gat in de externe carotideader gebracht. De nyloodraad wordt in het ICA geduwd naar de rechter MCA-oorsprong (20-23 mm). 90-120 minuten later wordt de draad eruit getrokken en het dier wordt dichtgenaaid en men laat het dier herstellen.
3. Permanente middel-cerebrale vaatocclusie (MCAO) - Occlusie is permanent, unilateraal geïnduceerd door elektrocoagulatie van MCA. Beide methoden leiden tot focale breinischemie van de ipsilaterale zijde van de hersencortex die de contralaterale zijde intact (controle) achterlaat. Het linker-MCA wordt blootgesteld via een tijdelijke craniëctomie, zoals beschreven voor ratten door Tamura A. et al., *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981; 1:53-60. Het MCA en zijn lenticulostriatale tak zijn proximaal ten opzichte van de mediale grens van het olfactorische kanaal met microbipolaire coagulatie gesloten. De wond wordt gehecht en de dieren worden teruggebracht naar hun kooi in een ruimte die op 26 tot 28°C is verwarmd. De temperatuur van de dieren wordt de gehele tijd met een automatische thermostaat in standgehouden.

5. Acut nierfalen (ARF)

Het testen van actief siRNA voor de behandeling van ARF kan worden uitgevoerd onder toepassing van door sepsis geïnduceerd ARF of door ischemie-herperfusie geïnduceerd ARF.

5

1. Door sepsis geïnduceerd ARF

Twee voorspellende diermodellen van door sepsis geïnduceerd ARF zijn beschreven door Miyaji T., Hu X., Yuen P.S., Muramatsu Y., Iyer S., Hewitt S.M., Star R.A., 2003, *Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice*, Kidney Int. november; 64(5):1620-31.

10

Deze twee modellen zijn de lipopolysacharidetoediening en de cefale ligatiepunctuur in muizen, bij voorkeur in oude muizen.

2. Door ischemie-herperfusie geïnduceerd ARF

15

Dit voorspellende diermodel wordt beschreven door Kelly K.J. Plotkin Z., Vulgamott S.L., Dagher P.C., januari 2003, *P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor*, J Am Soc Nephrol.; 14(1):128-38.

20

Ischemie-herperfusieletsel werd geïnduceerd in ratten na 45 min bilateraal nierarterieel afklemmen en hierop aansluitend losmaken van de klem om herperfusie gedurende 24 uur mogelijk te maken. 250 µg REDD14 of GFP-siRNA (negatieve controle) werden geïnjecteerd in de halsslagader 2 uur voorafgaande aan en 30 min na het afklemmen. Een additionele hoeveelheid van 250 µg siRNA werd gegeven via de staartader 4 en 8 uur na het afklemmen. siRNA tegen GFP diende als een negatieve controle. ARF-progressie werd gevolgd door meting van de serumcreatinineniveaus voorafgaande aan en 24 uur na de chirurgische ingreep. Aan het einde van het experiment werden de ratten geperfuseerd via een interne femorale lijn met warm PBS, gevolgd door 4% paraformaldehyd. De linkernieren werden verwijderd en in 4% paraformaldehyd opgeslagen voor een hierop aansluitende histologische analyse. Acut

25

30

nierfalen is vaak gedefinieerd als een acute toename van het serumcreatinineniveau vanuit de basislijn. Een toename van ten minste 0,5 mg per dl of 44,2 µmol per liter serumcreatinine wordt beschouwd als een indicatie voor acut nierfalen. Serumcreati-

nine werd gemeten op tijdstip nul voorafgaande aan de chirurgische ingreep en 24 uur na ARF-chirurgie.

Ter bestudering van de verdeling van siRNA in de rattennier, werden Cy3-gelabelde 19-mer siRNA-moleculen met een afgestompt uiteinde (2/kg), met een alternerende O-methylmodificatie in de suikergroepen intraveneus toegediend gedurende 3-5 min, waarna *in vivo* beeldvorming werd uitgevoerd, gebruikmakend van tweefotonenconfocale microscopie. De confocale microscopieanalyse bracht aan het licht dat het grootste gedeelte van siRNA in de nieren geconcentreerd is in het endosomale compartiment van proximale tubulaire cellen. Zowel endosomale als cytoplasmische siRNA-fluorescentie waren relatief stabiel tijdens de eerste 2 uren na afgifte en verdwenen na 24 uur.

Zoals uit fig. 19 blijkt was er een tienvoudige toename in het niveau van serumcreatinine na een 45 min durende nierbilaterale arteriële afklembehandeling (PBS-behandeling). Vier injecties van 801-siRNA (REDD14, SEQ ID NOS: 16 en 66) (2 uur voorafgaande aan het afklemmen en 30 min, 4 uur en 8 uur na het afklemmen) reduceerde significant het creatinineniveau in serum met 40% ($P < 0,02$). Deze resultaten suggereren dat 801-siRNA nierweefsel tegen de effecten van ischemie-herperfusieletsel kan beschermen en dus de ernst van ARF reduceert.

20 Voorbeeld 9

Bereiding van siRNA's

Onder toepassing van beschermde algoritmen en de bekende sequentie van gen RTP801 (SEQ ID NO: 1), werden de sequenties van vele potentiële siRNA's geproduceerd. siRNA-moleculen volgens de bovenstaande specificaties werden hoofdzakelijk, zoals beschreven in de beschrijving, bereid.

De siRNA's van de onderhavige uitvinding kunnen worden gesynthetiseerd onder toepassing van één of meer van de methoden die uit de stand der techniek bekend zijn voor de synthese van ribonucleïne (of deoxyribonucleïne) oligonucleotiden. Bijvoorbeeld een in de handel verkrijgbare inrichting (onder andere verkrijgbaar van Applied Biosystems) kan worden gebruikt; de oligonucleotiden worden bereid volgens de in de beschrijving beschreven sequenties. Overlappende paren van chemisch gesynthetiseerde fragmenten kunnen worden geligeerd onder toepassing van methoden die uit de stand der techniek bekend zijn (bijvoorbeeld, zie Amerikaans octrooischrift 6.121.426).

De strengen worden afzonderlijk gesynthetiseerd en worden vervolgens in de buis aan elkaar geregen. Vervolgens worden de dubbelstreng-siRNA's gescheiden van de enkelstrengoligonucleotiden die niet aan elkaar geregen waren (bijvoorbeeld, omdat één daarvan in overmaat aanwezig is) door middel van HPLC. In samenhang met de siRNA's of siRNA-fragmenten van de onderhavige uitvinding kunnen twee of meer van deze sequenties gesynthetiseerd worden en met elkaar worden verbonden voor gebruik in de onderhavige uitvinding. De siRNA-moleculen van de uitvinding kunnen onder toepassing van uit de stand der techniek bekende procedures worden gesynthetiseerd, bijvoorbeeld de procedures zoals beschreven in Usman et al., 1987, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 7845; Scaringe et al., 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18, 5433; Wincott et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 2677-2684; en Wincott et al., 1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59, en kunnen gebruikmaken van gebruikelijke nucleïnezuurbeschermende en koppelingsgroepen, zoals dimethoxytrityl aan het 5'-uiteinde en fosforamiditen aan het 3'-uiteinde. De gemodificeerde (bijvoorbeeld 2'-O-gemethyleerde) nucleotiden en niet-gemodificeerde nucleotiden worden desgewenst opgenomen.

Op een andere wijze kunnen de nucleïnezuurmoleculen van de onderhavige uitvinding afzonderlijk worden gesynthetiseerd en na de synthese, bijvoorbeeld door ligatie, met elkaar worden verbonden (Moore et al., 1992, *Science* 256, 9923; Draper et al., Internationale PCT-publicatie nr. WO 93/23569; Shabarova et al., 1991, *Nucleic Acids Research* 19, 4247; Bellon et al., 1997, *Nucleosides & Nucleotides*, 16, 951; Bellon et al., 1997, *Bioconjugate Chem.* 8, 204), dan wel door hybridisatie na synthese en/of verwijdering van de beschermende groep.

De siRNA-moleculen volgens de uitvinding kunnen eveneens via een tandemsynthesemethodologie, zoals beschreven in Amerikaanse octrooipublicatie nr. US-2004/0019001 (McSwiggen) worden gesynthetiseerd, waarbij beide siRNA-strengen als een enkel aangrenzend oligonucleotidefragment of -streng gescheiden door een afsplitsbare linker/brugvormende groep, die hierna gesplitst wordt ter verkrijging van afzonderlijke siRNA-fragmenten of -strengen die hybridiseren en zuivering van het siRNA-duplex mogelijk maken, gesynthetiseerd worden. De brugvormende groep kan een polynucleotidelinker/brugvormende groep of een niet-nucleotidelinker zijn.

Voor verdere informatie, zie PCT-publicatie nr. WO 2004/015107 (ATUGEN).

Zoals hierboven beschreven is, waren de siRNA's van tabel A (hieronder) zodanig opgebouwd dat alternerende suikers een 2'-O-methylmodificatie hebben, dan

wel waren alternerende nucleotiden op deze wijze gemodificeerd. In deze voorkeurs-
 uitvoeringsvormen waren in één streng van het siRNA de gemodificeerde nucleotiden
 nummers 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 en 19 en in de tegenovergestelde streng waren de
 gemodificeerde nucleotiden nummers 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 en 18. Dus zijn deze
 5 siRNA's 19-mer RNA-moleculen die afgestompt zijn aan hun uiteinde, met alterne-
 rende 2'-O-methylmodificaties, zoals hierboven beschreven. De siRNA's van de tabel-
 len 2 en 3 (hieronder) zijn eveneens op deze wijze opgebouwd; de siRNA's van de ta-
 bellen B en D zijn 19-mer RNA-moleculen met een afgestompt uiteinde, met alterne-
 rende 2'-O-methylmodificaties; de siRNA's van tabel C zijn 21-mer RNA-moleculen
 10 met een afgestompt uiteinde, met alternerende 2'-O-methylmodificaties.

Tabel A geeft verscheidene nieuwe siRNA-moleculen weer die geprodu-
 ceerd werden en hierna voor gen-RTP801 gesynthetiseerd waren. De twee laatste ko-
 lommen geven de resultaten aan van twee experimenten die uitgevoerd zijn voor het
 onderzoeken van de activiteit van de nieuwe moleculen. In het kort waren HeLa- of
 15 HaCat-cellen getransfekteerd met een specifiek nieuw siRNA dat getest moet worden.
 Expressie van het RTP801-polyptide werd vervolgens bepaald door middel van
 Western blotting, gebruikmakend van een antilichaam tegen het RTP801-polyptide.
 Met betrekking tot de twee rechterkolommen van tabel A, betekent “-” een molecuul
 dat niet-actief is of een lage activiteit heeft (die de expressie van het RTP801-gen na-
 20 genoege niet remt); “+” betekent een siRNA-molecuul met enige remmende activiteit
 (van RTP801-genexpressie), “++” betekent een molecuul met een hogere remmende
 activiteit enz. Elk molecuul uit de siRNA-moleculen die in de beschrijving beschreven
 zijn en in het bijzonder de actieve moleculen die in tabel A zijn weergegeven zijn
 nieuw en worden beschouwd als een onderdeel van de onderhavige uitvinding.

TABEL A

Nr	ID Naam	ORG	Locatie	POS	AS (5'→3')	SS (5'→3')	HeLaB, 20nM	HaCat, 20nM
1	REDD1	h	5'UTR	128	UAGAAGCCGCGAGCUAGCGC	GCGCUAGCUGCGGCUUCUA	+	+
2	REDD2	hmr	CDS	337	UCCGAGCUCUCCAGGCUCG	CGAGCCUGGAGAGCUCGGA	-	-
3	REDD3	hmr	CDS	360	UGCUGCUGUCCAGGGACUC	GAGUCCCUGGACAGCAGCA	-	-
4	REDD4	hmr	CDS	478	AGCAGCUGCAUCAGGUUGG	CCAACCUGAUGCAGCUGCU	-	-
5	REDD5	h	CDS	728	UGAGUCCAGGCGCAGCACG	CGUGCUGCGCCUGGACUCA	-	-
6	Redd6	hmr	5'UTR	119	CAGCUAGCGCGGUCAGCGA	UCGUGACCGCGCUAGCUG	-	-
7	Redd7	hmr	5'UTR	122	CCGCAGCUAGCGCGGUCAG	CUGACCGCGCUAGCUGCGG	-	-
8	Redd8	hmr	5'UTR	125	AAGCCGCGAGCUAGCGCGGU	ACCGCGCUAGCUGCGGCUU	-	-
9	Redd9	hmr	CDS	339	AGUCCGAGCUCUCCAGGCU	AGCCUGGAGAGCUCGGACU	-	-
10	Redd10	hmr	CDS	341	GCAGUCCGAGCUCUCCAGG	CCUGGAGAGCUCGGACUGC	-	-
11	Redd11	hmr	CDS	363	UGUUGCUGCUGUCCAGGGA	UCCUGGACAGCAGCAACA	-	-
12	Redd12	hmr	CDS	369	AGCCACUGUUGCUGCUGUC	GACAGCAGCAACAGUGGCU	-	-
13	Redd13	hmr	CDS	370	AAGCCACUGUUGCUGCUGU	ACAGCAGCAACAGUGGCUU	-	-
14	Redd14	hmr	CDS	475	AGCUGCAUCAGGUUGGCAC	GUGCCAACCUGAUGCAGCU	+++	+++
15	Redd15	hmr	CDS	481	UGCAGCAGCUGCAUCAGGU	ACCUGAUGCAGCUGCUGCA	+	+
16	Redd16	hmr	CDS	486	UCUCCUGCAGCAGCUGCAU	AUGCAGCUGCUGCAGGAGA	-	-
17	Redd17	hmr	CDS	610	CCCCGCGAGGCCGACGGCU	AGCCGUGCGGCCUGCGGGG	-	-
18	Redd18	hmr	CDS	750	CCUGGAUCUUGGGCCAGAG	CUCUGGCCCAAGAUCAGG	-	-
19	Redd19	hmr	CDS	809	CAGCGUCAGGGACUGGCUG	CAGCCAGUCCUGACGCUG	-	-
20	Redd20	hmr	3'UTR	1097	AUGCUACAGUACUGAGGGG	CCCCUAGUACUGUAGCAU	+	+
21	Redd21	hmr	3'UTR	1419	GUCUGUAAGAUAGCUGCCU	AGGCAGCUAUCUACAGAC	+	+
22	Redd22	hmr	3'UTR	1617	UUCUAGAUGGAAGACCCAG	CUGGGUCUCCAUUCUAGAA	++	++
23	Redd23	hmr	3'UTR	1670	UUGAACAUCAAGUGUAUUC	GAAUACAUUGAUGUCAA	++	++
24	Redd24	hmr	3'UTR	1693	AAAUUAUGCAUAGGUCUUA	UAAGACCUAUGCAAUAUUU	+	+
25	Redd25	hmr	3'UTR	1695	AAAAUAUUGCAUAGGUCU	AGACCUAUGCAAUAUUUUU	++	++
26	Redd26	hmr	CDS	349	AGGGACUCGAGUCCGAGC	GCUCGGACUGCGAGUCCCU	-	-
27	Redd27	hmr	3'UTR	1673	UACUUGAACAUCAAGUGUA	UACACUUGAUGUUAAGUA	++	++
28	Redd28	hmr	3'UTR	1717	AAACAUGUUUAUAGAAAA	UUUUCUAAUAAACAUGUUU	-	-
29	Redd29	h	5'UTR	99	AACUGCUAAGACAAGUGCG	CGCACUUGUCUAGCAGUU	-	-
30	Redd30	h	CDS	213	ACGACGACGAGAAGCGGUC	GACCGCUUCUGCUGCUGU	-	-
31	Redd31	h	CDS	393	AAGCCGUGUCUCCUCCGG	CCGGAGGAAGACACGGCUU	-	-
32	Redd32	h	CDS	453	AGUGUUAUCCUCAGGGUC	GACCCUGAGGAUGAACACU	-	-
33	Redd33	h	CDS	521	AGGGCGUCGAGAGCCAGC	GCUGGGCUCUCGACGCCCU	-	-
34	Redd34	hr	CDS	535	AUCAGCAGGCGCGCAGGGC	GCCCUGCGGCCUGCUGAU	-	-
35	Redd35	h	CDS	571	AGUUCUUUGCCCACCUGGC	GCCAGGUGGGCAAAGAACU	-	-
36	Redd36	h	CDS	597	ACGGCUCGUGUAGGCCAG	CUGGCCUACAGCAGCCGU	-	-
37	Redd37	h	CDS	625	ACGUCCAGCAGCGCCCCC	GGGGGGCGCUGCUGGACGU	-	-
38	Redd38	h	CDS	829	AUGACUCGGAAGCCAGUGC	GCACUGGCUUCCGAGUCAU	-	-

39	Redd39	h	3' UTR	1046	AACUCAUGAGCUUCCUGG	CCAGGAAGCUAUUGAGUU	++	++
40	REDD40	h	3' UTR	1539	CUCAACUCUGCAGUACACG	CGUGUACUGCAGAGUUGAG	+	+
41	Redd41	h	3' UTR	1317	AGAUACACAAACCACCUCC	GGAGGUGGUUGUGUAUCU	+	+
42	Redd42	h	3' UTR	1350	ACAACAAACACACUUGGUC	GACCAAGUGUGUUGUUGU	++	++
43	Redd43	hmr	CDS	473	CUGCAUCAGGUUGGCACAC	GUGUGCCAACCUGAUGCAG	+	+
44	REDD44	h	3' UTR	955	UCCUGCCUCUAGUCUCCAC	GUGGAGACUAGAGGCAGGA	+	+
45	Redd45	hmr	CDS	476	CAGCUGCAUCAGGUUGGCA	UGCCAACCUGAUGCAGCUG	-	-
46	Redd46	hmr	CDS	479	CAGCAGCUGCAUCAGGUUG	CAACCUGAUGCAGCUGCUG	-	-
47	Redd47	hmr	CDS	483	CCUGCAGCAGCUGCAUCAG	CUGAUGCAGCUGCUGCAGG	-	-
48	Redd48	hmr	CDS	485	CUCCUGCAGCAGCUGCAUC	GAUGCAGCUGCUGCAGGAG	-	-
49	REDD40.1	h	3' UTR	1536	AACUCUGCAGUACACGAUG	CAUCGUGUACUGCAGAGUU	++	++
50	REDD44.1	h	3' UTR	954	CCUGCCUCUAGUCUCCACC	GGUGGAGACUAGAGGCAGG	++	++

Opgemerkt dient te worden dat in bovenstaande tabel A de sens strengen van siRNA's 1-50 de SEQ ID NOS: 3-52 hebben, en de antisens strengen van siRNA's 1-50 SEQ ID NOS: 53-102 hebben. Het molecuul aangeduid met REDD14 heeft SEQ ID NOS: 16 (sens streng) en 66 (antisens streng).

TABEL B

Nr.	Bron	Oligo- lengte	Sens siRNA	Antisens siRNA	gi9506686ref NM_019058.1 (Homo sapiens)	qi21312867re fNM_029083.1 (Muis)	gi18376838re fNM_080906.1 (Rat)	Overlap met pet-1 (antisens) *
51	Humaan	19	CUAGCCAGUUGGUAAGCCA	UGGCUUACCAACUGGCUGAG	[556-574]	-	-	-
52	Humaan	19	UGAUCCAGUGGUUGGAAA	UUUCCAAACCACUGGAAUCA	[984-1002]	-	-	-
53	Humaan	19	CCAGUGGUUGGAAACUGA	UCAGUUUCCCAACCACUGG	[989-1007]	-	-	-
54	Humaan	19	GCUCCGAGUCAUCAAGAA	UUCUUGAUGACUCGGAAGC	[835-853]	[763-781]	-	-
55	Humaan	19	GGAAGCUCAUUGAGUUGUG	CACAACUCAAUGAGCUUCC	[1049-1067]	-	-	-
56	Humaan, cynomolgus	19	CCAUCUGGGUUCUCCAUUCU	AGAUGGAAGACCCAGAUUG	[1613-1631]	[1569-1583]	[1610-1624]	+
57	Humaan, cynomolgus	19	GGAUGUGUGUAGCAUGU	ACAUGCUACACACACAUC	[1152-1170]	-	-	-
58	Humaan, cynomolgus	19	ACACAUACCCUCCAGUACU	AGUACUGAGGGUAUGUGU	[1090-1108]	-	[1081-1098]	-
59	Humaan, cynomolgus	19	ACAUACCCUCCAGUACUGU	ACAGUACUGAGGGUAUGU	[1092-1110]	-	[1082-1100]	-
60	Humaan, cynomolgus	19	CACUGUUCAUAGAAUACACU	AGUGUAUUCUAUGAACAGUG	[1660-1678]	[1612-1626]	[1652-1666]	+
61	Humaan, cynomolgus	19	CCAGCUGGAUGUGUGUGUA	UACACACACAUCACAGCUGG	[1146-1164]	[1099-1114]	[1139-1154]	-
62	Humaan, cynomolgus	19	CGGAACAGCUGCUCAUUGA	UCAAUGAGCAGCUGCUUCCG	[868-886]	[801-814]	[854-867]	-
63	Humaan, cynomolgus	19	GAAGCUCAUUGAGUUGUGU	ACACAACUCAAUGAGCUUC	[1050-1068]	-	-	-
64	Humaan, cynomolgus	19	GGACACAUAACCCUCCAGUA	UACUGAGGGUAUGUGUCC	[1088-1106]	-	-	-
65	Humaan, cynomolgus	19	GGAUCUUGACACUUGAAA	UUUCAAGUGUCAAGAUC	[1483-1501]	[1424-1442]	-	-
66	Humaan, cynomolgus	19	GUAGCAUGUACCUUAUUU	AUAUAAGGUACAUGCUAC	[1162-1180]	[1112-1128]	-	-
67	Humaan, cynomolgus	19	UCAGUACUGUAGCAUGGAA	UUCUUGCUACAGUACUGA	[1101-1119]	-	[1091-1106]	-
68	Humaan, cynomolgus	19	UGUGUAGCAUGUACCUUUU	AUAAGGUACAUGCUACACA	[1159-1177]	[1111-1127]	[1151-1167]	-
69	Humaan, cynomolgus	19	CUGGAUGUGUGUGUAGCAU	AUGCUACACACACAUCCAG	[1150-1168]	-	-	-
70	Humaan, cynomolgus, muis	19	ACACUUGAUGUUCUAGUAU	AUACUUGAACAUCUAGUGU	[1674-1692]	[1622-1640]	-	+
71	Humaan, cynomolgus, muis	19	GCAUGAUGUAAGUAGG	CCUACUCUACAUCUAGUG	[1438-1456]	[1379-1397]	-	-
72	Humaan, cynomolgus, muis	19	AGCAGCAACAGUGGCUUCG	CGAAGCCACUGUUGCUGCU	[372-390]	[300-318]	-	-
73	Humaan, cynomolgus, muis	19	AUGAUGUAAGAGUAGGAA	UUCUACUCUUAACAUCAU	[1440-1458]	[1381-1399]	-	-
74	Humaan, cynomolgus, muis	19	CAGCACAACAGUGGCUUC	GAAGCCACUGUUGCUGUG	[371-389]	[299-317]	-	-
75	Humaan, cynomolgus, muis	19	CAUGAAUGUAAGAGAGGA	UCCUACUCUUAACAUCUAG	[1439-1457]	[1380-1398]	-	-
76	Humaan, cynomolgus, muis	19	GAUGUACAAGUAUUAAGAC	GUCUUAUAACUUGAACAUC	[1680-1698]	[1628-1646]	-	+
77	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	UGAUGCAGCUGCUGCAGGA	UCCUGAGCAGCUGCAUCA	[484-502]	[412-430]	[465-483]	-

78	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	GAAUACACUUGAUGUUCAA	UUGAACAUCAAGUGUAUUC	[1670-1688]	[1618-1636]		+
79	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	UGAAUACACUUGAUGUUA	UGAACAUCAAGUGUAUUA	[1669-1687]	[1617-1635]	[1657-1675]	+
80	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	AUACACUUGAUGUUCAAAGU	ACUUGAACAUCAAGUGUAU	[1672-1690]	[1620-1638]	[1660-1678]	+
81	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	CAUGAAUACACUUGAUGUU	AACAUCAAGUGUAUUAUG	[1667-1685]	[1615-1633]	[1655-1673]	+
82	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	CUGGACAGCAGCAACAGUG	CACUGUUGCUGCUGUCCAG	[366-384]	[294-312]	[347-365]	-
83	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	GUUCAUGAAUACACUUGAU	AUCAAGUGUAUUAUGAAC	[1664-1682]	[1612-1630]	[1652-1670]	+
84	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	UCAUGAAUACACUUGAUGU	ACAUAAGUGUAUUAUGA	[1666-1684]	[1614-1632]	[1654-1672]	+
85	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	UGGACAGCAGCAACAGUGG	CCACUGUUGCUGCUGUCCA	[367-385]	[295-313]	[348-366]	-
86	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	UGUGGCCAACCUUGAUGCA	UGCAUCAGGUUGGCACACA	[472-490]	[400-418]	[453-471]	-
87	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	UUAUGAAUACACUUGAUG	CAUCAAGUGUAUUAUGAA	[1665-1683]	[1613-1631]	[1653-1671]	+
88	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	AACCUUGAUGCAGCUGCUGC	GCAGCAGCUGCAUCAGGUU	[480-498]	[408-426]	[461-479]	-
89	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	AGUCCUGGACAGCAGCAA	UUGCUGCUGCAGGAGACU	[361-379]	[289-307]	[342-360]	-
90	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	CCUCACUACUGUAGCAUG	CAUGCACAGUACUGAGGG	[1098-1116]	[1048-1066]	[1088-1106]	-
91	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	CCUGGACAGCAGCAACAGU	ACUGUUGCUGCUGUCCAGG	[365-383]	[293-311]	[346-364]	-
92	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	UGUGCCAACCUUGAUGCAGC	GCUGAUCAGGUUGGCACACA	[474-492]	[402-420]	[455-473]	-
93	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	AAUACACUUGAUGUUAAG	CUUGAACAUCAAGUGUAUU	[1671-1689]	[1619-1637]	[1659-1677]	+
94	Humaan, cynomolgus, muis, rat	19	AUGAAUACACUUGAUGUUC	GAACAUCACAGUGUAUUAU	[1668-1686]	[1616-1634]	[1656-1674]	-
95	Humaan, cynomolgus, rat	19	UGAUGCAGCUGCUGCAGGA	UCCUGCAGCAGCUGCAUCA	[484-502]		[465-483]	+
96	Humaan, cynomolgus, rat	19	AGAACUGUUUACAUGAAGA	UCUOCAUGUAAAACAGUUCU	[1632-1650]		[1625-1643]	+
97	Humaan, cynomolgus, rat	19	AUCUAGAACUGUUUACAUG	CAUGUAAAACAGUUCUAGAU	[1628-1646]		[1621-1639]	+
98	Humaan, cynomolgus, rat	19	CCAUGCCUAGCCUUUGGGA	UCCCAAGGCUAGGCAUGG	[196-214]		[186-204]	-
99	Humaan, cynomolgus, rat	19	CUAGAACUGUUUACAUGAA	UUCAUGUAAAACAGUUCUAG	[1630-1648]		[1623-1641]	+
100	Humaan, cynomolgus, rat	19	GAACUGUUUACAUGAGAU	AUCUOCAUGUAAAACAGUUC	[1633-1651]		[1626-1644]	+
101	Humaan, cynomolgus, rat	19	GGUCCUACUUCUAGACUG	CAGUUCUAGAUUGGAAGACC	[1620-1638]		[1613-1631]	+
102	Humaan, cynomolgus, rat	19	CCAUCUAGAACUGUUUACA	UGUAAAACAGUUCUAGAUUG	[1626-1644]		[1619-1637]	+
103	Humaan, cynomolgus, rat	19	CUUCCAUCUAGAACUGUUU	AAACAGUUCUAGAUUGAAG	[1623-1641]		[1616-1634]	+
104	Humaan, cynomolgus, rat	19	UAGAACUGUUUACAUGAAG	CUUCAUGUAAAACAGUUCUA	[1631-1649]		[1624-1642]	+
105	Humaan, cynomolgus, rat	19	UCUCCAUCUAGAACUGUU	AACAGUUCUAGAUUGAAGA	[1622-1640]		[1615-1633]	+
106	Humaan, cynomolgus, rat	19	CAUCUAGAACUGUUUACA	AUGUAAAACAGUUCUAGAU	[1627-1645]		[1620-1638]	+
107	Humaan, cynomolgus, rat	19	GGGUCUCCAUCUAGAACU	AGUUCUAGAUUGGAACCC	[1619-1637]		[1612-1630]	+
108	Humaan, cynomolgus, rat	19	UCCAUCUAGAACUGUUUAC	GUAAAACAGUUCUAGAUUGA	[1625-1643]		[1618-1636]	+

109	Humaan, cynomolgus, rat	19	UCUAGAACUGUUUACAUGA	UCAUGUAAACAGUUCUAGA	[1629-1647]		[1622-1640]	+
110	Humaan, cynomolgus, rat	19	UCCCAUCUAGAACUGUUUA	UAAACAGUUCUAGAUGGAA	[1624-1642]		[1617-1635]	+
111	Humaan, cynomolgus, rat	19	GUCUCCAUUCUAGAACUGU	ACAGUUCUAGAUGGAAGAC	[1621-1639]		[1614-1632]	+
112	Humaan, muis	19	CAAGUAUUUAGACCUAUGC	GCAUAGGUCUUAAUACUUG	[1686-1704]	[1634-1652]		+
113	Humaan, muis	19	GUUUUAAGACCUAUGCAAU	AUUGCAUAGGUCUUAAUAC	[1689-1707]	[1637-1655]		+
114	Humaan, muis	19	AGUAUUAAAGACCUAUGCAA	UUGCAUAGGUCUUAAUACU	[1688-1706]	[1636-1654]		+
115	Humaan, muis	19	AUGUUCUAAAGUAUUUAGACC	GGUCUUAAUACUUGAACAU	[1681-1699]	[1629-1647]		+
116	Humaan, muis	19	CACUUGAUGUUCUAGUAUU	AAUACUUGAACAUCAAGUG	[1675-1693]	[1623-1641]		+
117	Humaan, muis	19	CCAAGAUCUCCAGGGCUGUU	AACAGCCCCUGGAUCUUGG	[757-775]	[685-703]		-
118	Humaan, muis	19	GUUCAAGUAUUUAAAGACCUA	UAGGUCUUAAUACUUGAAC	[1683-1701]	[1631-1649]		+
119	Humaan, muis	19	UCAAGUAUUUAAAGACCUAUG	CAUAGGUCUUAAUACUUGA	[1685-1703]	[1633-1651]		+
120	Humaan, muis	19	AAGUAUUUAAAGACCUAUGCA	UGCAUAGGUCUUAAUACUU	[1687-1705]	[1635-1653]		+
121	Humaan, muis	19	UGUCCAAGUAUUUAAAGACCU	AGGUCUUAAUACUUGAACCA	[1682-1700]	[1630-1648]		+
122	Humaan, muis, rat	19	UGGUCUUCUCCAUUCUAGAAC	GUUCUAGAUGGAAGACCCCA	[1618-1636]	[1570-1588]	[1611-1629]	+

Opgemerkt dient te worden dat in bovenstaande tabel B de sens strengen van siRNA's 51-122 SEQ ID NOS: 103 tot respectievelijk 174 hebben, en de antisens strengen van siRNA's 51-122 SEQ ID NOS: 175 tot respectievelijk 246 hebben.

TABEL C

Nr.	Bron	Oligo- lengte	Sens sirna	Antisens sirna	gi950686ref NM_019058.1 (Homo sapiens)	gi21312867re FNM_029083.1 (Mus musculus)	gi18376838re FNM_080906.1 (Rattus norvegicus)	Overlap met pet-1 (antisens)
123	Humaan	21	CCAGGAAGCUCAUUGAGUUGU	ACAACUCAUGAGCUUCCUGG	[1046-1066]	-	-	-
124	Humaan	21	CCAUCUGGCUUCCAUUAG	CUAGAUGGAGACCAGAUUG	[1613-1633]	[1569-1585]	[1610-1626]	+
125	Humaan	21	GGAUGUGUGUAGCAUUGAC	GUACAUGCUACACACAUCC	[1152-1172]	[1102-1122]	[1142-1161]	-
126	Humaan	21	CAAGUGUGUUGUUGUUGUU	AACAAACAACAACACACUUG	[1353-1373]	-	-	-
127	Humaan	21	CCUCAGUACUGACAUUGAA	UCCAUUGCUACAGUACUGAGG	[1099-1119]	[1049-1066]	[1089-1106]	-
128	Humaan	21	GACCAAGUGUUGUUGUUGUU	AAACAACAACACACUUGGUC	[1350-1370]	-	-	-
129	Humaan	21	GCUCCGAGUCAUCAAGAAGA	UCUUCUUGAUGACUCGGAAGC	[835-855]	[763-783]	-	-
130	Humaan	21	GGAGUGGGGAAUAGUGUUU	AAACAUUUCCCCCACCUC	[1024-1044]	[976-986]	-	-
131	Humaan	21	CAGUACUGUAGCAUGGAACA	UUGUCCAUUGCUACAGUACUG	[1102-1122]	[1052-1072]	-	-
132	Humaan, cynomolgus	21	GAUAACACUUGAUGUUAAGU	ACUUGAACAUCAAGUGUAUUC	[1670-1690]	[1618-1638]	[1658-1678]	+
133	Humaan, cynomolgus	21	CAAGUAUAAGACCUAUGCAA	UUGCAUAGGUUUAAUACUUG	[1686-1706]	[1634-1654]	[1674-1694]	+
134	Humaan, cynomolgus	21	GAUUUUUGGGUGGAGACUA	UAGUCUCCACCCCAAAAGUUC	[944-964]	-	-	-
135	Humaan, cynomolgus	21	GGACACAUAACCCUCAGACU	AGUACUGAGGGUUAUGUGUCC	[1088-1108]	[1047-1058]	[1081-1098]	-
136	Humaan, cynomolgus	21	GGAGUGGUUUGUGUAUCUUA	UAAGAUAACAAACACCACUCC	[1317-1337]	[1256-1268]	-	-
137	Humaan, cynomolgus	21	GGAUUUUGACACUUGAAAAA	UUUUCAAGUGUCAAAAGAUCC	[1483-1503]	[1424-1442]	-	-
138	Humaan, cynomolgus	21	GGUCUCCAUUCUAGAACUGUU	AACAGUUCUAGAUGGAAGACC	[1620-1640]	[1572-1588]	[1613-1633]	+
139	Humaan, cynomolgus	21	UGUGUAGCAUGUACCUUAUA	UAUAAGGUACAUGCUACACA	[1159-1179]	[1111-1128]	[1151-1169]	-
140	Humaan, cynomolgus	21	CAACAAGGUUCCAGCUGGAU	AUCCAGCUGGAAGCCUUGUUG	[1135-1155]	-	-	-
141	Humaan, cynomolgus	21	CACUUGGAUCUUUGACACUU	AAGUGUCAAGAUAUCCCAAGUG	[1477-1497]	-	-	-
142	Humaan, cynomolgus	21	CAUCACUACUGACCUGUUGUA	UACACAGGUCAGUAGUGAUG	[1399-1419]	[1341-1356]	[1383-1398]	-
143	Humaan, cynomolgus	21	GUGUGUAGCAUGUACCUUA	UAAGGUACAUGCUACACACAC	[1156-1176]	[1106-1126]	[1146-1166]	-
144	Humaan, cynomolgus, muis	21	GCAUGAAUGUAAGAGUAGGAA	UUCUACUCUUACAUAUUGUCC	[1438-1458]	[1379-1399]	-	-
145	Humaan, cynomolgus, muis	21	GACACGACGAACAGUGGCUUC	GAAGCCACUUGUUGCUGUCC	[369-389]	[297-317]	-	-
146	Humaan, cynomolgus, muis, rat	21	UGAUGCAGCUGCUGCAGGAGA	UCUCCUGCAGCAGCUGCAUCA	[484-504]	[412-432]	[465-485]	-
147	Humaan, cynomolgus, muis, rat	21	UGAAUACACUUGAUGUUAAG	CUUGAACAUCAAGUGUAUUA	[1669-1689]	[1617-1637]	[1657-1677]	+
148	Humaan, cynomolgus, muis, rat	21	CAUGAAUACACUUGAUGUUA	UGAACAUCAAGUGUAUUAUG	[1667-1687]	[1615-1635]	[1655-1675]	+
149	Humaan, cynomolgus, muis, rat	21	GGACAGCAGCAACAGUGGCUU	AAGCACUCUUGUUGCUGUCC	[368-388]	[296-316]	[349-369]	-

150	Humaan, cynomolgus, muis, rat	21	GUUCAUGAAUACACUUGAUGU	ACAUCAAGUGUAUUCUAGAAC	[1664-1684]	[1612-1632]	[1652-1672]	+
151	Humaan, cynomolgus, muis, rat	21	UCAUGAAUACACUUGAUGUUC	GAACAUCAGUGUAUUCUAGA	[1666-1686]	[1614-1634]	[1654-1674]	+
152	Humaan, cynomolgus, muis, rat	21	UCCUGGACAGCAGCAACAGU	ACUGUUGCUGCUGUCCAGGGA	[363-383]	[291-311]	[344-364]	-
153	Humaan, cynomolgus, muis, rat	21	AGUCCUGGACAGCAGCAACA	UGUUGCUGCUGUCCAGGACU	[361-381]	[289-309]	[342-362]	-
154	Humaan, cynomolgus, rat	21	GAUACACUUGAUGUUCUAGU	ACUUGAACAUCAAGUGUAUUC	[1670-1690]		[1658-1678]	+
155	Humaan, cynomolgus, rat	21	CUAGAACUGUUUACAUGAAGA	UCUUCUUGUAACAGUUCUAG	[1630-1650]		[1623-1643]	+
156	Humaan, cynomolgus, rat	21	CCAUCUAGAACUGUUUACAUG	CAUGUAAACAGUUCUAGAUGG	[1626-1646]		[1619-1639]	+
157	Humaan, cynomolgus, rat	21	CUUCCAUCUAGAACUGUUUAC	GUAAACAGUUCUAGAUGGAAG	[1623-1643]		[1616-1636]	+
158	Humaan, cynomolgus, rat	21	UCUCCAUCUAGAACUGUUUA	UAAACAGUUCUAGAUGGAAGA	[1622-1642]		[1615-1635]	+
159	Humaan, cynomolgus, rat	21	CAUCUAGAACUGUUUACAUGA	UCAUGUAAACAGUUCUAGAUG	[1627-1647]		[1620-1640]	+
160	Humaan, cynomolgus, rat	21	GGGUCUUCUACUAGAACUGU	ACAGUUCUAGAUUGGAAGACCC	[1619-1639]		[1612-1632]	+
161	Humaan, cynomolgus, rat	21	UCCAUCUAGAACUGUUUACA	AUGUAAACAGUUCUAGAUGGA	[1625-1645]		[1618-1638]	+
162	Humaan, cynomolgus, rat	21	UCUAGAACUGUUUACAUGAAG	CUUCAUGUAAACAGUUCUAGA	[1629-1649]		[1622-1642]	+
163	Humaan, cynomolgus, rat	21	UUCCAUCUAGAACUGUUUACA	UGUAAACAGUUCUAGAUGGAA	[1624-1644]		[1617-1637]	+
164	Humaan, cynomolgus, rat	21	GUCUCCAUCUAGAACUGUUU	AAACAGUUCUAGAUGGAAGAC	[1621-1641]		[1614-1634]	+
165	Humaan, muis	21	UGAUGUUCUAGUAUUUAGACC	GGUCUUAAUACUUGAAACAUA	[1679-1699]	[1627-1647]		+
166	Humaan, muis	21	GUUCAAGUAUUUAGACCUAUG	CAUAGGUCUUAAUACUUGAAC	[1683-1703]	[1631-1651]		+
167	Humaan, muis	21	UCAAGUAUUUAGACCUAUGCA	UGCAUAGGUCUUAAUACUUGA	[1685-1705]	[1633-1653]		+
168	Humaan, muis	21	GAUGUUCUAGUAUUUAGACCU	AGGUCUUAAUACUUGAAACAUC	[1680-1700]	[1628-1648]		+
169	Humaan, muis	21	UUCAAGUAUUUAGACCUAUGC	GCAUAGGUCUUAAUACUUGAA	[1684-1704]	[1632-1652]		+
170	Humaan, rat	21	CUGGUCUCCAUCUAGAACU	AGUUCUAGAUGGAAGACCCAG	[1617-1637]		[1610-1630]	+
171	Humaan, rat	21	UGGGUCUCCAUCUAGAACUG	CAGUUCUAGAUGGAAGACCCA	[1618-1638]		[1611-1631]	+

Opgemerkt dient te worden dat in bovenstaande tabel C de sens strengen van siRNA's 123-171 SEQ ID NOS: 247 tot respectievelijk 295 hebben, en de antisens strengen van siRNA's 123-171 SEQ ID NOS: 296 tot respectievelijk 344 hebben.

TABEL D

ID Nr.	Bron	Sens siRNA	Antisens siRNA	Humaa 801 Gi-56676369	Muis 801 Gi-21312867	Rat 801 Gi-18376838	Chimpansee 801 Gi-55633976	Cynomolgus 801
172	Humaan	UGAAAAUUACACCCUGGCA	UGCCAGGUGUAUUUUUCA	[1502- 1520] (19/19)	[1444-1457] (14/14)	-	-	-
173	Humaan	GACACUUGAAAAUUACAC	GUGUAAUUUUUCAAAGUGUC	[1496- 1514] (19/19)	[1432-1442] (11/11)	-	-	[1329-1347] (18/19)
174	Humaan	CACUUGAAAAUUUACACCU	AGGUGUAAUUUUUCAAAGUG	[1498- 1516] (19/19)	[1444-1455] (12/12)	-	-	[1331-1349] (18/19)
175	Humaan	UUAGGGCCCAACAAGGCUU	AAGCCUUGUUGGCCCCUAA	[1132- 1150] (19/19)	-	-	-	[974-992] (18/19)
176	Humaan	ACACUUGAAAAUUACACC	GGUGUAAUUUUCAAAGUGU	[1497- 1515] (19/19)	[1444-1454] (11/11)	-	-	[1330-1348] (18/19)
177	Humaan	ACCCUGAGGAUGAACACUU	AAGUGUUAUCCUCCAGGGU	[459-477] (19/19)	-	-	[404-420] (17/17)	[301-317] (17/17)
178	Humaan	GUACUCGAGAGUUGAGCUG	CAGCUCAAUCUCUGCAGUAC	[1547- 1565] (19/19)	-	-	-	[1388-1398] (11/11)
179	Humaan	GUGUACUGCAGAGUUGAGC	GCUCAACUCUGCAGUACAC	[1545- 1563] (19/19)	-	-	-	-
180	Humaan	GUGUGUUUGUUUGUUUUU	AAACAACAACAACAACACAC	[1361- 1379] (19/19)	-	-	-	[1195-1206] (12/12)
181	Humaan	UUGUGUGCCCAACCUGAUGC	GCAUCAGGUUGGCACACAA	[476-494] (19/19)	[400-417] (18/18)	[453-470] (18/18)	[422-439] (18/18)	[319-336] (18/18)
182	Humaan	AUCGUGUACUGCAGAGUUG	CAACUGUGCAGUACACGAGU	[1542- 1560] (19/19)	-	-	-	-
183	Humaan	CCAUCGUGUACUGCAGAGU	ACUCUGCAGUACACGAGG	[1540- 1558] (19/19)	-	-	-	-
184	Humaan	ACUUGAAAAUUACACCUG	CAGGUGUAAUUUUUCAAGU	[1499- 1517] (19/19)	[1444-1456] (13/13)	-	-	-
185	Humaan	UGAGGAUGAACACUUUGUGU	ACACAAGUGUUAUCCUCA	[463-481] (19/19)	-	-	[408-426] (18/19)	[305-323] (18/19)
186	Humaan	ACCUGGCAGCUGCGUUUAA	UUAAAGCGCAGCGCCAGGU	[1513- 1531] (19/19)	-	-	-	-
187	Humaan	CAGAGACGACUGAACUUUU	AAAAGUUCAGUCGUCUCUG	[938-956] (19/19)	-	-	-	-
188	Humaan	AAGACAGAGACGACUGAAC	GUUCAGUCGUCUCUCUCUU	[934-952] (19/19)	-	-	-	-
189	Humaan	GCAGCUGCGUUUAAGCCUU	AAGGCUUUAACGCACGUCG	[1518- 1536] (19/19)	-	-	-	-
190	Humaan	AGGAACUCUAUUGAGUUGU	ACAACUCAUAGAGCUUCCU	[1053- 1071] (19/19)	-	-	-	[895-913] (18/19)
191	Humaan	GUGUUUCCAGGAAGCUCA	UGAGCUUCCUGGGAACAC	[1044- 1062] (19/19)	-	-	-	[886-900] (15/15)
192	Humaan	GACGACUGAACUUUUGGGG	CCCCAAAAGUUCAGUCGUC	[942-960] (19/19)	-	-	-	[789-802] (14/14)
193	Humaan	ACAGAGACGACUGAACUUU	AAAAGUUCAGUCGUCUCUGU	[937-955] (19/19)	-	-	-	-

194	Humaan	AGGAUGAACACUUGUGUGC	GCACACAAUGUUCAUCCU	[465-483] (19/19)	-	-	[410-428] (18/19)	[307-325] (18/19)
195	Humaan	CUGAGGAUGAACACUUGUG	CACAAUGUUCAUCCUCAG	[462-480] (19/19)	-	-	[407-425] (18/19)	[304-322] (18/19)
196	Humaan	UCUGGGUCUCCAUUCUAGA	UCUAGAUGGAAGACCCAGA	[1621-1639] (19/19)	[1569-1586] (18/18)	[1610-1627] (18/18)	-	[1456-1471] (16/16)
197	Humaan	AUCUGGGUCUCCAUUCUAG	CUAGAUGGAAGACCCAGAU	[1620-1638] (19/19)	[1569-1585] (17/17)	[1610-1626] (17/17)	-	[1456-1470] (15/15)
198	Humaan	GAAGGACCAAGUGUGUUU	AAACACACUUGGUCCUUC	[1350-1368] (19/19)	-	-	-	[1181-1198] (18/18)
199	Humaan	AAGGCUUAGGGGCCAACAA	UUGUUGGCCCUAAGCCUU	[1127-1145] (19/19)	-	-	-	[969-984] (16/16)
200	Humaan	UUCCAGGAAGCUCAUUGA	UCAUGAGCUUCCUGGGA	[1048-1066] (19/19)	-	-	-	[890-908] (18/19)
201	Chimpansee	UGGCAAGAACUACUGCG	CGCAGUAGUUCUUGCCCA	[582-600] (19/19)	-	-	[527-545] (19/19)	[424-439] (16/16)
202	Chimpansee	GGUGGCAAGAACUACUG	CAGUAGUUCUUGCCACC	[580-598] (19/19)	-	-	[525-543] (19/19)	[422-439] (18/18)
203	Humaan	GUGGCAAGAACUACUGC	GCAGUAGUUCUUGCCAC	[581-599] (19/19)	-	-	[526-544] (19/19)	[423-439] (17/17)
204	Chimpansee	UGCCUAGCCAGUUGGUAG	CUUACCAACUGGCUAGGCA	[558-576] (19/19)	-	-	[503-521] (19/19)	-
205	Humaan	AAGCCAGGUGGGCAAGAA	UUCUUUGCCACCUGGCUU	[574-592] (19/19)	[498-511] (14/14)	[551-564] (14/14)	[519-537] (19/19)	[417-434] (18/18)
206	Chimpansee	AUGCCUAGCCAGUUGGUAA	UUACCAACUGGCUAGGCAU	[557-575] (19/19)	-	-	[502-520] (19/19)	-
207	Humaan	UUCGAGUCAUCAAGAAGA	UCUUCUUGAUGACUGCGAA	[842-860] (19/19)	[769-783] (15/15)	-	[787-805] (19/19)	[687-702] (16/16)
208	Cynomolgus	GACGCAUGAUGUAGAGU	ACUCUACAUUCAUGCGUC	[1440-1458] (19/19)	[1379-1394] (16/16)	[1421-1434] (14/14)	-	[1273-1291] (19/19)
209	Cynomolgus	UACACACGCAUGAUGUAA	UUACAUUCAUGCGUCUGUA	[1436-1454] (19/19)	[1379-1390] (12/12)	[1421-1432] (12/12)	-	[1269-1287] (19/19)
210	Cynomolgus	GUGUAGCAUGUACCUUA	UAAGGUACAUGCUACACAC	[1163-1181] (19/19)	[1111-1126] (16/16)	[1151-1166] (15/16)	-	[1005-1023] (19/19)
211	Cynomolgus	ACGCAUGAUGUAGAGUA	UACUCUUACAUCUAGCGU	[1441-1459] (19/19)	[1379-1395] (17/17)	[1421-1434] (14/14)	-	[1274-1292] (19/19)
212	Humaan	AUCUACACAGCGCAUGAAU	AUUCAGCGCUGUGAAGAU	[1432-1450] (19/19)	[1367-1386] (19/20)	[1409-1428] (19/20)	-	[1265-1283] (19/19)
213	Cynomolgus	AGACGCAUGAUGUAGAG	CUCUACAUCUAGCGUCU	[1439-1457] (19/19)	[1379-1393] (15/15)	[1421-1434] (14/14)	-	[1272-1290] (19/19)
214	Cynomolgus	CUAUCUACACACGCAUGA	UCAUGCGUCUGUAGAUAG	[1430-1448] (19/19)	[1365-1377] (13/13)	[1407-1419] (13/13)	-	[1263-1281] (19/19)
215	Cynomolgus	GCAUCACUACUGACCUGUU	AACAGGUCAGUAGUGAUGC	[1403-1421] (19/19)	[1341-1356] (16/16)	[1383-1398] (16/16)	-	[1236-1254] (19/19)
216	Cynomolgus	GGAGCAUCACUACUGACCU	AGGUCAUGUAGUGAUGCCU	[1400-1418] (19/19)	[1341-1353] (13/13)	[1377-1395] (18/19)	-	[1233-1251] (19/19)

217	Humaan, Cynomolgus	AUGAAACAAGCCUAGGG	CCCUAAGCCUUUUUUAU	[1119- 1137] (19/19)	[1064-1081] (18/18)	[1104- 1118] (15/15)	-	[961-979] (19/19)
218	Humaan, Cynomolgus	AGUAUCUUUACAGACGCAU	AUGCGUCUGUAGAAGCU	[1428- 1446] (19/19)	[1363-1377] (15/15)	[1405- 1419] (15/15)	-	[1261-1279] (19/19)
219	Humaan, Cynomolgus	UAGGCACUUCUUACAGA	UCUGAAGAUAGCUGCCUA	[1423- 1441] (19/19)	[1359-1376] (18/18)	[1401- 1418] (18/18)	-	[1256-1274] (19/19)
220	Humaan, Cynomolgus	ACCUGUUGAGCAGCUAU	AUAGCUGCCUACAACAGGU	[1415- 1433] (19/19)	-	-	-	[1248-1266] (19/19)
221	Humaan, Cynomolgus	AGCAUCACUACUGACCUGU	ACAGGUCAGUAGUGAGCU	[1402- 1420] (19/19)	[1341-1355] (15/15)	[1383- 1397] (15/15)	-	[1235-1253] (19/19)
222	Humaan, Cynomolgus	UCUGAUCGGAGCAUCACUA	UAGUGAUGCUCGAGCAGA	[1393- 1411] (19/19)	-	-	-	[1226-1244] (19/19)
223	Humaan, Cynomolgus	UGACAGUUUACAGUGGUGU	ACACCACUGUUACUGUCA	[1195- 1213] (19/19)	-	-	-	[1037-1055] (19/19)
224	Humaan, Cynomolgus	CUGACAGUUUACAGUGGUG	CACCACUGUUUACUGUCAG	[1194- 1212] (19/19)	-	-	-	[1036-1054] (19/19)
225	Humaan, Cynomolgus	GUUACUGACAGUUUACAGU	ACUGUUUACUGUCAGUAAAC	[1190- 1208] (19/19)	-	-	-	[1032-1050] (19/19)
226	Humaan, Cynomolgus	UUGUUACUGACAGUUUACA	UGUUUACUGUCAGUAAACA	[1188- 1206] (19/19)	-	-	-	[1030-1048] (19/19)
227	Humaan, Cynomolgus	UACUCACUGUUCAGAAUA	UAUUCAUGAACAGUGAGUA	[1661- 1679] (19/19)	[1612-1622] (11/11)	[1644- 1662] (18/19)	-	[1493-1511] (19/19)
228	Humaan, Cynomolgus	UCACUUGGGAUCUUUGACA	UGUCAAGAUCUCCAGUGA	[1481- 1499] (19/19)	-	-	-	[1314-1332] (19/19)
229	Humaan, Cynomolgus	ACAGACGAUGAAUGUAAG	CUUACAUUUCUUGCGUCUGU	[1437- 1455] (19/19)	[1379-1391] (13/13)	[1421- 1433] (13/13)	-	[1270-1288] (19/19)
230	Humaan, Cynomolgus	CAGCUAUCUUACAGACGCA	UGCGUCUGUAAAGAUAGCUG	[1427- 1445] (19/19)	[1362-1377] (16/16)	[1404- 1419] (16/16)	-	[1260-1278] (19/19)
231	Humaan, Cynomolgus	UCACUACUGACCUGUUGUA	UACAACAGGUCAGUAGUGA	[1406- 1424] (19/19)	[1341-1356] (16/16)	[1383- 1398] (16/16)	-	[1239-1257] (19/19)
232	Humaan, Cynomolgus	GAGCAUCACUACUGACCUG	CAGGUCAGUAGUGAUCUC	[1401- 1419] (19/19)	[1341-1354] (14/14)	[1378- 1396] (18/19)	-	[1234-1252] (19/19)
233	Humaan, Cynomolgus	GUGUAUCUUACUGGUCUGA	UCAGACCAGUAGAUAACAC	[1333- 1351] (19/19)	-	-	-	[1164-1182] (19/19)
234	Humaan, Cynomolgus	GUGGUUUGUGUAUCUUAUCU	AGUAAGAUAACAAACAC	[1326- 1344] (19/19)	[1256-1268] (13/13)	-	-	[1157-1175] (19/19)
235	Humaan, Cynomolgus	ACAGUUAAACAGUGGUGUGA	UCACACCACUGUUUACUGU	[1197- 1215] (19/19)	-	-	-	[1039-1057] (19/19)
236	Humaan, Cynomolgus	AACUGAGGCAGCCACCUAA	UUAGGUGGUCUGCCUCAGUU	[1007- 1025] (19/19)	-	-	-	[849-867] (19/19)
237	Humaan, Cynomolgus	UGUUAUGAAUACACUUGA	UCAAGUGUAUUAUGAACA	[1668- 1686] (19/19)	[1612-1629] (18/18)	[1652- 1669] (18/18)	-	[1500-1518] (19/19)
238	Humaan, Cynomolgus	CUGUUAUGAAUACACUUG	CAAGUGUAUUAUGAACAAG	[1667- 1685] (19/19)	[1612-1628] (17/17)	[1652- 1668] (17/17)	-	[1499-1517] (19/19)

240	Humaan, Cynomolgus	AGAUACUCACUGUUAUGA	UCAUGAACAGUGAGUAUCU	[1658- 1676] (19/19)	-	-	-	[1490-1508] (19/19)
241	Humaan, Cynomolgus	CAGACGCAUGAAUGUAAGA	UCUUAACAUUGAUGGUCUG	[1438- 1456] (19/19)	[1438- 1434] (14/14)	[1421- 1434] (14/14)	-	[1271-1289] (19/19)
242	Humaan, Cynomolgus	GCAGCUAUCUUAACAGACGC	CGCUCUGUAAGAUAGCUGC	[1426- 1444] (19/19)	[1426- 1444] (19/19)	[1403- 1419] (17/17)	-	[1259-1277] (19/19)
243	Humaan, Cynomolgus	GGCAGCUAUCUUAACAGACG	CGUCUGUAAGAUAGCUGCC	[1425- 1443] (19/19)	[1425- 1443] (19/19)	[1402- 1419] (18/18)	-	[1258-1276] (19/19)
244	Humaan, Cynomolgus	GGUUDUGUAUCUUAACUGG	CCAGUAAGAUAACAAACC	[1328- 1346] (19/19)	[1328- 1346] (19/19)	-	-	[1159-1177] (19/19)
245	Humaan, Cynomolgus	GAGGUGGUUUGUGUAUCUU	AAGAUAACAAACCACCUC	[1323- 1341] (19/19)	[1323- 1341] (19/19)	-	-	[1154-1172] (19/19)
246	Humaan, Cynomolgus	GUGGAGGUGGUUGUGUAU	AUACAAACACCACCAC	[1320- 1338] (19/19)	[1320- 1338] (19/19)	-	-	[1151-1169] (19/19)
247	Humaan, Cynomolgus	UACUGACAGUUAACAGUGG	CCACUGUUAACUGUCAGUA	[1192- 1210] (19/19)	[1192- 1210] (19/19)	-	-	[1034-1052] (19/19)
248	Humaan, Cynomolgus	GUGUAGCAUGUACCUUAUU	AAUAAGGUACAUGCUACAC	[1165- 1183] (19/19)	[1165- 1183] (19/19)	[1151- 1168] (17/18)	-	[1007-1025] (19/19)
249	Humaan, Chimpansee	AGGUGGCAAAAGAACUACU	AGUAGUUCUUUGCCACCUC	[579-597] (19/19)	-	-	[524-542] (19/19)	[421-439] (19/19)
250	Humaan, Cynomolgus, Chimpansee	GUGACCCUGAGGAUGAACA	UGUUAUCCUCAGGGUCAC	[456-474] (19/19)	-	-	[401-419] (19/19)	[298-316] (19/19)
251	Humaan, Cynomolgus, Chimpansee	CAGGUGGCAAAAGAACUAC	GUAGUUCUUUGCCACCUC	[578-596] (19/19)	[501-517] (16/17)	[554-570] (16/17)	[523-541] (19/19)	[420-438] (19/19)
252	Humaan, Cynomolgus, Chimpansee	CCAGGUGGCAAAAGAACUA	UAGUUCUUUUGCCACCUGG	[577-595] (19/19)	[500-517] (17/18)	[553-570] (17/18)	[522-540] (19/19)	[419-437] (19/19)
253	Humaan, Cynomolgus, Chimpansee	AUCCAGGGGUGUUUAGCU	AGCUAAACAGCCCCUGGAU	[767-785] (19/19)	[690-703] (14/14)	-	[712-730] (19/19)	[609-627] (19/19)
254	Humaan, Cynomolgus, Chimpansee	AAGAUCCAGGGGUGUUUA	UAAACAGCCCCUGGAUCUU	[764-782] (19/19)	[687-703] (17/17)	[740-756] (16/17)	[709-727] (19/19)	[606-624] (19/19)
255	Humaan, Cynomolgus, Muis	GCAUGAAACAAAGGCUUAG	CUAAGCCUUUGUUUCAUGC	[1117- 1135] (19/19)	[1062-1080] (19/19)	[1102- 1118] (17/17)	-	[959-977] (19/19)
256	Humaan, Cynomolgus, Muis	AGCAUGAAACAAAGGCUUA	UAAGCCUUUGUUUCAUGC	[1116- 1134] (19/19)	[1061-1079] (19/19)	[1101- 1118] (18/18)	-	[958-976] (19/19)

257	Humaan, Cynomolgus, aka 801 1	UACUGUAGCAUGAACAAA	UUUGUUCAUGCUACAGUA	[1110- 1128] (19/19)	[1055-1073] (19/19)	[1095- 1113] (19/19)	-	[952-970] (19/19)
258	Humaan, Cynomolgus, Muis, Rat	UAGCAUGAAACAAAGGCUU	AAGCCUUUGUUCAUGCUA	[1115- 1133] (19/19)	[1060-1078] (19/19)	[1100- 1118] (19/19)	-	[957-975] (19/19)
259	Humaan, Cynomolgus, Muis, Rat	GUAGCAUGAAACAAAGGCU	AGCCUUUGUUCAUGCUAC	[1114- 1132] (19/19)	[1059-1077] (19/19)	[1099- 1117] (19/19)	-	[956-974] (19/19)
260	Humaan, Cynomolgus, aka 801 4	CAGUACUGUAGCAUGAAAC	GUUUCAGCUACAGUACUG	[1107- 1125] (19/19)	[1052-1070] (19/19)	[1092- 1110] (19/19)	-	[949-967] (19/19)
261	Humaan, Cynomolgus, Muis, Rat	GUACUGUAGCAUGAAACAA	UUUGUUCAUGCUACAGUAC	[1109- 1127] (19/19)	[1054-1072] (19/19)	[1094- 1112] (19/19)	-	[951-969] (19/19)
262	Humaan, Cynomolgus, Muis, Rat	UCAGUACUGUAGCAUGAAA	UUUCAUGCUACAGUACUGA	[1106- 1124] (19/19)	[1051-1069] (19/19)	[1091- 1109] (19/19)	-	[948-966] (19/19)
263	Humaan, Cynomolgus, Muis, Rat	UGUAGCAUGAAACAAAGGC	GCCUUUGUUCAUGCUACA	[1113- 1131] (19/19)	[1058-1076] (19/19)	[1098- 1116] (19/19)	-	[955-973] (19/19)
264	Humaan, Cynomolgus, Muis, Rat	ACUGUAGCAUGAAACAAAG	CUUUGUUCAUGCUACAGU	[1111- 1129] (19/19)	[1056-1074] (19/19)	[1096- 1114] (19/19)	-	[953-971] (19/19)
265	Humaan, Cynomolgus, Muis, Rat	CUGUAGCAUGAAACAAAGG	CCUUUGUUCAUGCUACAG	[1112- 1130] (19/19)	[1057-1075] (19/19)	[1097- 1115] (19/19)	-	[954-972] (19/19)
266	Humaan, Cynomolgus, Muis, Rat	AGUACUGUAGCAUGAAACA	UGUUUCAUGCUACAGUACU	[1108- 1126] (19/19)	[1053-1071] (19/19)	[1093- 1111] (19/19)	-	[950-968] (19/19)
267	Humaan, Cynomolgus, Muis, Rat	CCUCAGUACUGUAGCAUGA	UCAUGCUACAGUACUGAGG	[1104- 1122] (19/19)	[1049-1067] (19/19)	[1089- 1107] (19/19)	-	[946-964] (19/19)
268	Humaan, Cynomolgus, Muis, Rat	CUCAGUACUGUAGCAUGAA	UUCAUGCUACAGUACUGAG	[1105- 1123] (19/19)	[1050-1068] (19/19)	[1090- 1108] (19/19)	-	[947-965] (19/19)

Opgemerkt dient te worden dat in bovenstaande tabel D de sens strengen van siRNA's 172-232 en 234-268 SEQ ID NOS: 345 tot respectievelijk 440 hebben, en de antisens strengen van siRNA's 172-232 en 234-268 SEQ ID NOS: 441 tot respectievelijk 536 hebben.

Voorbeeld 10**Farmacologie en afgifte van het geneesmiddel**

De nucleotidesequenties van de onderhavige uitvinding kunnen rechtstreeks dan wel met virale of niet-virale vectoren worden afgegeven. Wanneer zij rechtstreeks worden afgegeven zijn de sequenties in het algemeen nucleaseresistent gemaakt. Op een andere wijze kunnen de sequenties worden opgenomen in expressiecassettes of -constructen, zodanig dat de sequentie tot expressie wordt gebracht in de cel, zoals in de beschrijving hieronder besproken wordt. In het algemeen bevat het construct de geschikte regulerende sequentie of promotor om de expressie van de sequentie in de als target dienende cel mogelijk te maken.

De verbindingen of farmaceutische samenstellingen van de onderhavige uitvinding worden toegediend en gedoseerd volgens goede medische praktijk rekeninghoudend met de klinische toestand van de individuele patiënt, de te behandelen ziekte, de locatie en de wijze van toediening, het plannen van de toediening, de leeftijd van de patiënt, het geslacht, het lichaamsgewicht en andere factoren die de artsen bekend zijn.

De farmaceutisch werkzame hoeveelheid voor de doeleinden van de uitvinding wordt dus bepaald door overwegingen die uit de stand der techniek bekend zijn. De hoeveelheid dient dus effectief te zijn voor het tot stand brengen van een verbetering waaronder, maar niet beperkt tot de verbetering van het overlevingspercentage of een sneller herstel, dan wel verbetering of eliminering van symptomen en andere indicatoren, zoals zij geselecteerd worden als geschikte maatregelen door diegenen die op dit gebied deskundig zijn.

De behandeling heeft in het algemeen een duur die evenredig is met de duur van het ziekteproces en geneesmiddelwerkzaamheid en de in behandeling zijnde patiëntspecies. Opgemerkt dient te worden dat mensen in het algemeen langer worden behandeld dan muizen of andere experimentele dieren die als voorbeelden in de beschrijving voorkomen.

De verbindingen van de onderhavige uitvinding kunnen onder toepassing van één of meer van de conventionele wijzen van toediening worden toegediend. Opgemerkt dient te worden dat de verbinding toegediend kan worden als de verbinding zelf of in de vorm van een farmaceutisch aanvaardbaar zout en kan alleen of als een actief ingrediënt in combinatie met farmaceutisch aanvaardbare dragers, oplosmiddelen, verdunningsmiddelen, hulpstoffen, adjuvans en transporthulpmiddelen worden

toegediend. De verbindingen kunnen oraal, subcutaan of parenteraal, waaronder intraveneus, intra-arterieel, intramusculair, intraperitoneaal en intranasaal alsmede intrathecaal worden toegediend en infusietechnieken kunnen worden toegepast. Implantaten van de verbindingen zijn eveneens nuttig. Vloeibare vormen kunnen voor injectie worden bereid, waarbij de term subcutaan, transdermaal, intraveneus, intramusculair, intrathecaal en andere parenterale wijzen van toediening omvat. De vloeibare samenstellingen omvatten waterige oplossingen, met en zonder organische hulpoplosmiddelen, waterige of olie bevattende suspensies, emulsies met eetbare oliën, alsmede vergelijkbare farmaceutische dragers. Bovendien kunnen de samenstellingen voor gebruik in de nieuwe behandelingen volgens de onderhavige uitvinding onder bepaalde omstandigheden als aerosols worden gevormd voor intranasale en een soortgelijke toediening. De onder behandeling zijnde patiënt is een warmbloedig dier en in het bijzonder zoogdieren waaronder de mens. De farmaceutisch aanvaardbare dragers, oplosmiddelen, verdunningsmiddelen, hulpstoffen, adjuvantia en transporthulpmiddelen alsmede implantaatdragere hebben in het algemeen betrekking op inerte, niet-toxische vaste of vloeibare vulmiddelen, verdunningsmiddelen of encapsuleringsmateriaal dat niet reageert met de actieve ingrediënten volgens de uitvinding.

Wanneer de verbinding volgens de onderhavige uitvinding parenteraal wordt toegediend wordt deze in het algemeen geformuleerd in een eenheidsdosering injecteerbare vorm (oplossing, suspensie, emulsie). De farmaceutische formuleringen die geschikt zijn voor injectie omvatten steriele waterige oplossingen of dispersies of steriele poeders voor reconstitutie in steriele injecteerbare oplossingen of dispersies. De drager kan een oplosmiddel zijn of een dispergeermedium zijn dat bijvoorbeeld water, ethanol, polyol (bijvoorbeeld glycerol, propyleenglycol, vloeibaar polyethyleenglycol en dergelijke), geschikte mengsels hiervan en plantaardige oliën bevat.

Adequate fluïditeit kan in stand worden gehouden, bijvoorbeeld door de toepassing van een coating, zoals lecithine, door het instandhouden van de vereiste deeltjesgrootte in het geval van een dispersie en door de toepassing van oppervlakte-actieve middelen. Niet-waterige dragers, zoals katoenzaadolie, sesamolie, olijfolie, sojaboonolie, maïsolie, zonnebloemolie of pindaolie en esters, zoals isopropylmyristaat, kunnen eveneens als oplosmiddelsystemen voor gemengde samenstellingen worden gebruikt. Bovendien kunnen verschillende additieven die de stabiliteit, steriliteit en isotonie van de samenstellingen bevorderen, waaronder antimicrobiële conserveer-

middelen, antioxidantia, chelaatvormers en buffers worden toegevoegd. Preventie van de werking van micro-organismen kan worden verzekerd door middel van verschillende antibacteriële middelen en antifungie, bijvoorbeeld parabens, chloorbutanol, fenol, sorbinezuur en dergelijke. In vele gevallen is het wenselijk om isotonische mid-
 5 delen, bijvoorbeeld suikers, natriumchloride en dergelijke op te nemen. Een verlengde absorptie van de injecteerbare farmaceutische vorm kan teweeg worden gebracht door de toepassing van middelen die de absorptie vertragen, bijvoorbeeld aluminium-monostearaat en gelatine. Volgens de onderhavige uitvinding dienen echter alle dragers, verdunningsmiddelen of additieven die gebruikt zijn, met de verbindingen com-
 10 patibel te zijn.

Steriele injecteerbare oplossingen kunnen worden bereid door het opnemen van de gebruikte verbindingen bij de uitvoering van de onderhavige uitvinding in de vereiste hoeveelheid van het geschikte oplosmiddel met desgewenst verschillende van de andere ingrediënten.

15 Een farmacologische formulering van de onderhavige uitvinding kan aan de patiënt worden toegediend in een injecteerbare formulering die elke verenigbare drager, zoals verscheidene dragers, adjuvantia, additieven en verdunningsmiddelen, bevat; dan wel kunnen de verbindingen die in de onderhavige uitvinding worden gebruikt parente-
 20 raal aan de patiënt worden toegediend in de vorm van subcutane implantaten met een langzame afgifte, dan wel met behulp van toegerichte afgiftesystemen, zoals monoklonale antilichamen, afgifte met behulp van een vector, iontoforetisch, polymeer-matrices, liposomen en microsferen. Voorbeelden van afgiftesystemen die nuttig zijn in de onderhavige uitvinding omvatten de Amerikaanse octrooischriften 5.225.182; 5.169.383; 5.167.616; 4.959.217; 4.925.678; 4.487.603; 4.486.194; 4.447.233;
 25 4.447.224; 4.439.196; en 4.475.196. Vele andere van dergelijke implantaten, afgiftesystemen en modules zijn de deskundigen op dit gebied bekend.

Een farmacologische formulering van de in de onderhavige uitvinding ge-
 bruikte verbinding kan oraal aan de patiënt worden toegediend. Conventionele metho-
 den, zoals het toedienen van de verbinding in tabletten, suspensies, oplossingen, emul-
 30 sies, capsules, poeders, siropen en dergelijke zijn toepasbaar. Bekende technieken die dit oraal of intraveneus afgeven en de biologische activiteit behouden, verdienen de voorkeur. In één uitvoeringsvorm kan de verbinding volgens de onderhavige uitvinding aanvankelijk worden toegediend door middel van een intraveneuze injectie teneinde de

bloedspiegels op een geschikt niveau te brengen. De niveaus van de patiënt worden vervolgens instandgehouden door middel van een orale doseringsvorm ofschoon andere vormen van toediening in afhankelijkheid van de conditie van de patiënt en zoals hierboven aangegeven is, kunnen worden gebruikt.

- 5 In het algemeen ligt de actieve dosering van de verbinding voor de mens binnen het gebied van 1ng/kg tot ongeveer 20-100 mg/kg lichaamsgewicht per dag, bij voorkeur ongeveer 0,01 mg tot ongeveer 2-10 mg/kg lichaamsgewicht per dag, in een regiem van één dosering per dag of twee of drie of meerdere malen per dag gedurende een periode van 1-2 weken of langer, bij voorkeur gedurende 24 tot 48 uur of door
10 middel van een continue infusie gedurende een periode van 1-2 weken of langer.

Toediening van verbindingen van de onderhavige uitvinding aan het oog

- De verbindingen van de onderhavige uitvinding kunnen topisch aan het oog worden toegediend, dan wel worden zij in de vorm van een injectie toegediend, zoals
15 bijvoorbeeld een intravitreale injectie, een subretinale injectie of een bilaterale injectie. Verdere informatie over de toediening van de verbinding van de onderhavige uitvinding kan in Tolentino et al., *Retina* 24 (2004) 132-138; Reich et al., *Molecular vision* 9 (2003) 210-216, worden gevonden.

Pulmonaire toediening van verbindingen van de onderhavige uitvinding

- De therapeutische samenstellingen van de onderhavige uitvinding worden bij voorkeur in de long toegediend door middel van inhalatie van een aërosol die deze samenstellingen/verbindingen bevatten, dan wel door middel van intranasale of intra-tracheale instillatie van deze samenstellingen. Formulering van de verbindingen in liposomen kan gunstig zijn voor de absorptie. Bovendien kunnen de samenstellingen een
25 PFC-vloeistof, zoals perfluorbron omvatten, en de samenstellingen kunnen als een complex van de verbindingen van de uitvinding met polyethyleenimine (PEI) worden geformuleerd.

- Voor verdere informatie over pulmonaire afgifte van farmaceutische
30 samenstellingen zie Weiss et al., *Human gene therapy* 10:2287-2293 (1999); Densmore et al., *Molecular therapy* 1:180-188 (1999); Gautam et al., *Molecular therapy* 3:551-556 (2001); en Shahiwala & Misra, *AAPS PharmSciTech* 5 (2004). Bovendien zijn

ademhalingsformuleringen voor siRNA in de Amerikaanse octrooiaanvraag nr. 2004/0063654 of naam van Davis et al. beschreven.

Verder kunnen de verbindingen van de onderhavige uitvinding topisch worden toegediend daar waar dit geschikt is (zoals bijvoorbeeld in het geval van diabetische voetzweren), eventueel in een lipide/liposoomformulering.

Een voorkeurstoedieningsvorm is de topische afgifte van de RTP801-inhibitoren op het ronde raammembraan van het cochlea, zoals beschreven, bijvoorbeeld in Tanaka et al., (Hear Res. maart 2003; 177(1-2):21-31).

Bij de behandeling van drukzweren of andere wonden is de toediening van de farmaceutische samenstelling bij voorkeur door middel van topische toepassing op de beschadigde gebieden, maar de samenstellingen kunnen tevens systemisch worden toegediend.

Verdere formuleringen voor een verbeterde afgifte van de verbindingen volgens de uitvinding kunnen niet-geformuleerde verbindingen, verbindingen die covalent aan cholesterol gebonden zijn en verbindingen die aan doelgerichte antilichamen gebonden zijn, omvatten (Song et al., Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors, Nat Biotechnol. juni 2005; 23(6):709-17).

Voorbeeld 11

Ex vivo model voor door cisplatine geïnduceerde ototoxiciteit en het beschermende effect van RTP801-siRNA

Door cisplatine geïnduceerde ototoxiciteit wordt geïnduceerd in cochleaire en vestibulaire organotypische cultures. Op de dag na de geboorte worden 3-4 rattenpups gebruikt ter bereiding van de cochleaire en vestibulaire organotypische cultures, zoals beschreven in Zhang et al., Neuroscience 120 (2003) 191-205. Cochleae worden zorgvuldig uitgeprepareerd en het cochleaire weefsel dat het spirale ganglion, orgaan van Corti en het middengedeelte bevat, wordt verwijderd ter bereiding van de organotypische cultures, zoals beschreven in Zhang et al. De cultures worden geplaatst in een CO₂-incubator gedurende 24 uur voor het conditioneren voorafgaande aan de behandeling. Na conditioneren worden de cultures behandeld met cisplatine alleen bij een concentratie van 1, 5 of 01 µg/ml gedurende 48 uur. Ter bestudering van het beschermende effect van RTP801-siRNA worden de cochleaire explanten (5 cochlea's per groep) gedurende 48 uur met 10 µg/ml cisplatine en variërende concentraties van RTP801-

siRNA met of zonder lipofectamine behandeld. Onbehandelde controlecultures en cultures behandeld met RTP801-siRNA gedurende 48 uur worden parallel behandeld. Aan het einde van de experimenten worden de cultures gefixeerd met 10% formaline en worden gekleurd met FITC-geconjugeerde falloïdine. De aantallen inwendige haarcellen en uitwendige haarcellen per 0,25 mm lengte van het cochleaan worden geteld en het gemiddelde aantal haarcellen voor elke behandeling wordt bepaald.

Voorbeeld 12

In vivo model voor door gentamicine geïnduceerde ototoxiciteit en het beschermende effect van RTP801-siRNA

Chinchilla's worden hetzij behandeld met gentamicinesulfaat alleen gedurende 5 dagen (125-300 mg/kg, intramusculair), hetzij in combinatie met RTP801-siRNA. De siRNA-moleculen worden topisch op het ronde raammembraan van het cochleaan twee dagen voorafgaande aan en gedurende de 5 daagse blootstelling aan gentamicine, toegediend. Aan het einde van de behandeling worden de dieren gedood door blootstelling aan kooldioxide en onthoofding. De cochleaan worden verwijderd en klaargemaakt voor kleuring met FITC-geconjugeerde falloïdine ter bepaling van het aantal inwendige haarcellen en uitwendige haarcellen in het cochleaire weefsel (zoals beschreven in Ding et al., Hearing Research 164 (2002) 115-126 en in Wang et al., The Journal of Neuroscience 23(24):8596-8607).

Voorbeeld 13

In vivo model voor akoestisch trauma en het beschermende effect van RTP801-siRNA

Gepigmenteerde cavia's worden gebruikt in het akoestische traumaonderzoek (beschreven in Wang et al., The Journal of Neuroscience 23(24):8596-8607). RTP801-siRNA-moleculen worden topisch op het ronde raammembraan van het cochleaan over een tijdsperiode van 7 dagen toegediend. Onbehandeld linkercochleaan diende als controle voor de effectiviteit van het akoestische trauma bij het veroorzaken van gehoorhaarcelverlies en verlies aan gehoorfunctie. Dieren worden aan akoestisch trauma blootgesteld [6 kHz., 120 dB geluidsdrukniveau (SPL), 30 min] en audiogrammen van beide oren worden afgeleid van de samengestelde werkingspotentialen (CAP's) die geregistreerd zijn vanuit de gehoorzenuwen via chronische ronde raam-

membraanelektroden. De CAP-audiogrammen van beide oren worden dagelijks geme-
ten in wakkere dieren. 30 Dagen na blootstelling aan geluid worden de dieren opgeof-
ferd en hun cochlea's worden klaargemaakt voor een kwantitatieve evaluatie van haar-
celverliezen, gebruikmakend van scanningelektromicroscopie teneinde alle haarcellen
5 te tellen voor de gehele lengte van de cochleaire buis.

Voorbeeld 14

Experimentele resultaten met betrekking tot 801 1 (ID NO. 257 in tabel D, SEQ ID
NO: 527 [antisens streng]) en 801 4 (ID NO. 260 in tabel D, SEQ ID NO: 530 [anti-
10 **sens streng])**

In vitro efficiëntie in HEK293-cellen

Drie verschillende concentraties aan siRNA's, 5, 10 en 20 nm werden in
HEK293-cellen getransfecteerd. Identieke concentraties van een irrelevante siRNA
15 (siTG) werden als negatieve controle gebruikt terwijl identieke concentraties van
REDD14 als positieve controle werden gebruikt. 72 Uur na transfectie werden de cellen
geogst; RNA werd gezuiverd en als template gebruikt in een qPCR-reactie voor de
kwantitatieve bepaling van de niveaus van endogeen RTP801-transcript.

Humaan cyclofiline A werd gebruikt als inwendige referentie voor qPCR.
20 Referentie genormaliseerde data werden verder aan biologische normalisatie onder-
worpen: voor elke siRNA-concentratie werden de gedetecteerde RTP801-niveaus uit-
gedrukt in procent RTP801 in het corresponderende negatieve controlemonster. De
resultaten zijn in figuur 28 weergegeven.

25 In vitro efficiëntie in BE2C-cellen

Terwijl basale RTP801-expressieniveaus in HEK293-cellen werden
geanalyseerd, voor de bepaling van het siRNA-vermogen tot verlaging van de geïndu-
ceerde RTP801-expressieniveaus, werden BE2C-cellen met CoCl_2 behandeld als in-
ductiemiddel voor RTP801 gebruikt. Het ontwerp en dataevaluatie waren in wezen zo-
als hierboven beschreven. 24 Uur na siRNA-transfectie, werden de BE2C-cellen met 10
30 μM CoCl_2 behandeld gedurende nog 24 uur en werden vervolgens aan extractie onder-
worpen. De resultaten zijn in figuur 29 weergegeven.

De resultaten geven aan dat 801_1 en 801_4 ten minste even effectief zijn als REDD14 tegen RTP801 in *in vitro* tests.

In vivo efficiëntie in het muizen-CNV-model

- 5 De experimenten werden met de volgende experimentele groepen zoals beschreven in voorbeeld 6, uitgevoerd,:

Tabel 4

Groep	Gemiddeld CNV-volume (μm^3)	SEM	Aantal laserplekjes
PBS	471698,3	26163,96	22
REDD14 (0,05 μg)	237326,9	24136,19	29
REDD14 (0,1 μg)	182997,0	29213,82	25
REDD14 (0,5 μg)	207235,7	20420,18	29
RTP801#1 siRNA (0,05 μg)	334196,8	32429,66	30
RTP801#1 siRNA (0,1 μg)	176091,1	37343,13	24
RTP801#1 siRNA 0,5 μg)	226063,0	17906,91	33
RTP801#1 siRNA (0,05 μg)	304325,6	30584,33	30
RTP801#1 siRNA (0,1 μg)	265668,5	20287,93	28
RTP801#1 siRNA (0,5 μg)	269164,4	24776,41	31

- 10 De resultaten zijn in figuur 30 weergegeven en laten zien dat 801_4 ten minste even effectief is als REDD14 in het *in vivo* model van muizen-CNV.

Voorbeeld 15**Modellen en resultaten met betrekking tot doofheid****Het effect van een als voorbeeld gegeven (p53) siRNA-behandeling op akoestisch geïnduceerde haarceldood in de cochlea van chinchilla**

5

De activiteit van een als voorbeeld gegeven siRNA (QM5-anti-p53) in een akoestisch traumamodel werd in chinchilla bestudeerd. Een groep van zeven dieren ondergingen een akoestisch trauma. Dieren werden aan een octaafband van geluid, gecentreerd op 4 kHz gedurende 3 uur bij 105 dB blootgesteld. Het linkeroor van de

10 aan geluid blootgestelde chinchilla's werd behandeld met 30 µg siRNA in ongeveer 20 µl; het rechteroor werd met een drager behandeld. De gemiddelde drempel van het werkingspotentiaal van de verbinding geregistreerd vanuit het ronde raampje werd bepaald 2,5 weken na het akoestische trauma teneinde te bepalen of de drempels in het

15 met siRNA behandelde oor lager waren (beter) dan het onbehandelde (drager) oor. De gemiddelde drempels waren lager in de met siRNA behandelde oren ten opzichte van de onbehandelde oren. Het verschil bij 4 kHz was statistisch significant ($p < 0,033$). Deze resultaten geven aan dat het als voorbeeld gegeven p53 siRNA toegediend aan het

ronde raampje van de cochlea in staat is de schade veroorzaakt door het akoestische trauma te verminderen.

20

Het effect van p53- of 801 siRNA-behandeling op door cisplatine geïnduceerde haarceldood in de cochlea van ratten

Mannelijke Wistar-ratten werden beproefd op basale

25 gehoorhersenstamresponsdrempels voor signalen van klikken 8, 16 en 32 kHz voorafgaande aan de cisplatinebehandeling. Na het testen van de basale gehoorhersenstamrespons werd cisplatine toegediend in de vorm van een intraperitoneale infusie van 13 mg/kg over een tijdsperiode van 30 minuten. Behandelde oren ontvingen hetzij 15 µg/4 microliter van het als voorbeeld gegeven

30 p53-siRNA (zoals hierboven), dan wel RTP801 siRNA REDD14 (sequentie nr. 14 in tabel A, SEQ ID Nos 16 (sens) en 66 (antisens)) rechtstreeks toegepast op het ronde raampjemembraan. Controleoren werden behandeld met hetzij niet-gerelateerd GFP siRNA, hetzij PBS. De siRNA-moleculen werden toegediend tussen 3-5 dagen

voorafgaande aan de cisplatinetoediening teneinde het beschermde effect op de cochlea te onderzoeken.

Het testen ten aanzien van de gehoorhersenstamrespons werd 3 dagen herhaald na cisplatinetoediening. De gehoorhersenstamresponsdrempels werden vergeleken tussen voorbehandeling en postbehandeling en de verschuiving in drempels is in tabel 5 aangegeven. Hogere verschuiving in drempels na de cisplatinebehandeling is een indicatie voor een meer ernstig haarcelverlies in de cochlea. Na de herhaling van het testen op gehoorhersenstamrespons werden de dieren opgeofferd en werden de cochlea verwijderd en verder verwerkt voor scanning electron microscopy (SEM) ter kwantificering van uitwendig haarcelverlies (OHS) in de hoekregio (hoogfrequentiegebied). Het percentage uitwendig haarverlies werd berekend door het aantal ontbrekende of ernstig beschadigde cellen te delen door het aantal uitwendige haarcellen in het gebied van de foto.

Tabel 5 demonstreert de resultaten die verkregen zijn uit vier dieren die de door cisplatine geïnduceerde schade ondergingen en geanalyseerd werden op uitwendig haarcelverlies in de Hook-regio. Zoals aan het licht werd gebracht uit de resultaten, vertoonden dieren die siRNA verkregen gericht tegen p53 of 801, een lager uitwendig haarcelverlies en lagere verschuivingen in de drempel voor signalen van 32 kHz. Beide parameters geven aan dat siRNA gericht tegen p53 of 801 een beschermend effect heeft tegen door cisplatine geïnduceerde schade in de cochlea.

Tabel 5: Haarcelverlies versus drempelverschuiving in door cisplatine behandelde cochlea van ratten

Behandeling	Uitwendig haarcelverlies (OHC)	Gehoorhersenstamresponse (drempelverschuiving bij 32 KHz)
QC/L P53 siRNA (QM5)	50%	10 dB
QC/R PBS	100%	30 dB
QF/L P53 siRNA (QM5)	20%	10 dB
QF/R GFP	56%	27,5 dB
QJ/R 801 siRNA (REDD14)	20%	17,5 dB
QJ/L GFP	100%	27,5 dB
QN/L 801 siRNA (REDD14)	0%	10 dB
QN/R PBS	100%	17,5 dB

Conclusies

1. Werkwijze voor de behandeling van een patiënt die aan een gehoorstoornis lijdt, welke het toedienen omvat aan de patiënt van een farmaceutische samenstelling die een RTP801-polypeptide-inhibitor in een werkzame hoeveelheid bevat ter behandeling van de patiënt.
2. Werkwijze ter behandeling van een patiënt die aan drukzweren lijdt, welke het toedienen aan de patiënt omvat van een farmaceutische samenstelling die een RTP801-polypeptide-inhibitor bevat in een werkzame hoeveelheid ter behandeling van de patiënt.
3. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij de gehoorstoornis akoestisch trauma is.
4. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, waarbij de inhibitor een polynucleotide omvat dat achtereenvolgende nucleotiden omvat die een sequentie van voldoende lengte en homologie ten opzichte van een sequentie die aanwezig is binnen de sequentie van een gen coderende voor RTP801, zoals weergegeven in SEQ ID NO: 1 hebben, voor het mogelijk maken van hybridisatie van de inhibitor aan het gen en het verhinderen van de expressie van RTP801 in de patiënt.
5. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, waarbij de inhibitor een antilichaam omvat dat specifiek aan een epitoom bindt, welke aanwezig is binnen een RTP801-polypeptide dat achtereenvolgende aminozuren omvat, waarvan de sequentie in figuur 2 (SEQ ID NO: 2) weergegeven is en de activiteit van het RTP801-polypeptide in de patiënt remt.
6. Werkwijze voor de behandeling van een patiënt die aan een gehoorstoornis of aan drukzweren lijdt, welke het toedienen aan de patiënt van een farmaceutische samenstelling omvat, die een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een RTP801-polynucleotide-inhibitor omvat, waardoor de patiënt behandeld wordt.
7. Werkwijze volgens conclusie 6, waarbij het polynucleotide een siRNA is.

8. Werkwijze volgens conclusie 7, waarbij het siRNA achtereenvolgende nucleotiden omvat met een sequentie die identiek is aan één van de sequenties weergegeven in één of meer van de tabellen A-D (SEQ ID NOS: 3-536).

5

9. Werkwijze volgens conclusie 6, waarbij de inhibitor gekozen is uit de groep bestaande uit een siRNA, een vector die een siRNA omvat, een vector die een siRNA tot expressie brengt en een molecuul dat endogeen in een siRNA verwerkt wordt.

10

10. Toepassing van een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een RTP801-inhibitor voor de bereiding van een geneesmiddel ter bevordering van het herstel in een patiënt die aan een gehoorstoornis lijdt.

15

11. Toepassing van een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een RTP801-inhibitor ter bereiding van een geneesmiddel ter bevordering van het herstel in een patiënt die aan drukzweren lijdt.

12. Toepassing volgens conclusie 10, waarbij de gehoorstoornis akoestisch trauma is.

20

13. Toepassing volgens conclusie 10 of 11, waarbij de inhibitor een polynucleotide omvat dat achtereenvolgende nucleotiden omvat met een sequentie van voldoende lengte en homologie ten opzichte van een sequentie die aanwezig is binnen de sequentie coderende voor RTP801, zoals weergegeven in SEQ ID NO: 1, teneinde hybridisatie van de inhibitor aan het gen en het voorkomen van de expressie van RTP801 in de patiënt, mogelijk te maken.

25

14. Toepassing volgens conclusie 10 of 11, waarbij de RTP801-inhibitor een anti-lichaam is dat specifiek aan een epitoom bindt die aanwezig is binnen een RTP801-polypeptide dat achtereenvolgende aminozuren omvat, waarvan de sequentie in figuur 2 (SEQ ID NO: 2) weergegeven is en de activiteit van het RTP801-polypeptide in de patiënt remt.

30

15. Toepassing volgens conclusie 10 of 11, waarbij het polynucleotide de expressie van een RTP801-gen downreguleert.
16. Toepassing volgens conclusie 10 of 11, waarbij het polynucleotide een siRNA is.
17. Toepassing volgens conclusie 16, waarbij het siRNA achtereenvolgende nucleotiden met een sequentie die identiek is aan één of meer sequenties weergegeven in één of meer van de tabellen A-D (SEQ ID NOS: 3-536), omvat.
18. Toepassing volgens conclusie 14, waarbij de inhibitor gekozen is uit de groep bestaande uit een siRNA, een vector die een siRNA omvat, een vector die een siRNA tot expressie brengt en een molecuul dat endogeen in een siRNA verwerkt wordt.
19. Werkwijze voor de behandeling van een patiënt die aan een ziekte-toestand lijdt die gekozen is uit een ademhalingsstoornis, een oogziekte, een microvasculaire stoornis, of een ruggenmergletsel of ziekte welke het toedienen aan een patiënt van een farmaceutische samenstelling omvat, die een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een siRNA omvat, die de expressie van een RTP801-gen remt, welke achtereenvolgende nucleotiden met een sequentie die identiek is aan de sequentie weergegeven in tabel D (SEQ ID NOS: 345-536) omvat, waardoor de patiënt behandeld wordt.
20. Werkwijze volgens conclusie 19, waarbij de ziekte-toestand een oogziekte is.
21. Werkwijze volgens conclusie 20, waarbij de oogziekte maculaire degeneratie is.
22. Werkwijze volgens conclusie 19, waarbij de ziekte een ademhalingsziekte is.
23. Werkwijze volgens conclusie 22, waarbij de ademhalingsziekte COPD is.
24. Werkwijze volgens conclusie 22, waarbij de ademhalingsziekte astma is.

25. Werkwijze volgens conclusie 22, waarbij de ademhalingsziekte chronische bronchitis is.
26. Werkwijze volgens conclusie 22, waarbij de ademhalingsziekte emfyseem is.
- 5 27. Werkwijze volgens conclusie 19, waarbij de ziekte-toestand een microvasculaire stoornis is.
- 10 28. Werkwijze volgens conclusie 27, waarbij de microvasculaire stoornis diabetische retinopathie is.
29. Werkwijze volgens conclusie 27, waarbij de microvasculaire stoornis acuut nierfalen is.
- 15 30. Toepassing van een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een siRNA dat de expressie van een RTP801-gen remt, dat achtereenvolgende nucleotiden omvat met een sequentie die identiek is aan de sequentie weergegeven in tabel D (SEQ ID NOS: 345-536) ter bereiding van een geneesmiddel ter bevordering van het herstel in een patiënt die aan een ziekte-toestand lijdt die gekozen is uit een ademhalingsstoornis, een oogziekte, een microvasculaire stoornis of een ruggenmergletsel of -ziekte.
- 20 31. Toepassing volgens conclusie 30, waarbij de ziekte-toestand een oogziekte is.
- 25 32. Toepassing volgens conclusie 31, waarbij de oogziekte maculaire degeneratie is.
33. Toepassing volgens conclusie 30, waarbij de ziekte-toestand een ademhalingsstoornis is.
- 30 34. Toepassing volgens conclusie 33, waarbij de ademhalingsstoornis COPD is.
35. Toepassing volgens conclusie 33, waarbij de ademhalingsstoornis astma is.

36. Toepassing volgens conclusie 33, waarbij de ademhalingsstoornis chronische bronchitis is.

37. Toepassing volgens conclusie 33, waarbij de ademhalingsstoornis emfyseem is.

5

38. Toepassing volgens conclusie 30, waarbij de ziekte-toestand een microvasculaire stoornis is.

39. Toepassing volgens conclusie 38, waarbij de microvasculaire stoornis diabetische retinopathie is.

10

40. Toepassing volgens conclusie 38, waarbij de microvasculaire stoornis acuut renaal falen is.

15 41. Verbinding met de structuur:

$5'(N)_x - Z3'$ (antisens streng)

$3'Z'-(N')_y5'$ (sens streng),

20 waarbij elke N en N' een ribonucleotide is dat al dan niet gemodificeerd is in zijn suikerrest en $(N)_x$ en $(N')_y$ een oligomeer is waarin elke achtereenvolgende N of N' met de volgende N of N' door middel van een covalente binding verbonden is;

waarin elke van x en y een geheel getal tussen 19 en 40 is;

25

waarin elke van Z en Z' al dan niet aanwezig kan zijn, maar indien aanwezig dTdT is en met de 3'-terminus van de streng waarin deze aanwezig is, covalent gebonden is; en

30 waarin de sequentie van $(N)_x$ één van de sequenties aanwezig in tabel D omvat.

42. Verbinding volgens conclusie 41, waarbij de covalente binding een fosfodiesterbinding is, waarin $x = y$, bij voorkeur waarin $x = y = 19$, waarin Z en Z' beide

afwezig zijn, waarbij ten minste één ribonucleotide in zijn suikergroep op de 2'-positie gemodificeerd is, waarin de groep op de 2'-positie methoxy (2'-O-methyl) is, waarbij alternerende ribonucleotiden zowel in de antisens als in de sens strengen gemodificeerd zijn en waarbij de ribonucleotiden aan de 5'- en 3'-termini van de antisens streng in hun suikergroepen gemodificeerd zijn en de ribonucleotiden aan de 5'- en 3'-termini van de sens streng in hun suikergroepen gemodificeerd zijn.

43. Verbinding volgens één of meer der conclusies 41-42, waarbij de sequentie van (N)_x de antisens sequentie nr. 257 van tabel D (SEQ ID NO: 525) dan wel de antisens sequentie nr. 260 van tabel D (SEQ ID NO: 528) omvat.

44. Verbinding volgens conclusie 43, waarbij de verbinding een terminaal fosfaat ontbreekt.

45. Verbinding die een oligoribonucleotide omvat, waarin één streng achtereenvolgende nucleotiden die van 5' naar 3' de sequentie weergegeven in SEQ ID NOS: 441-536 of een homoloog hiervan hebben, waarin in ten hoogste 2 van de nucleotiden in elk terminaal gebied een base gewijzigd is.

46. Verbinding die een oligoribonucleotide omvat, waarin één streng achtereenvolgende nucleotiden omvat die van 5' naar 3' de sequentie weergegeven in SEQ ID NOS: 345-440 hebben, waarin een aantal van deze basen bij voorkeur door een 2-O-methylmodificatie gemodificeerd kunnen zijn, dan wel een homoloog hiervan, waarin in ten hoogste 2 van de nucleotiden in elk terminaal gebied een base gewijzigd is.

47. Verbinding volgens één of meer der voorafgaande conclusies 41-46 die een 2'-O-Me-groep op het eerste, derde, vijfde, zevende, negende, elfde, dertiende, vijftiende, zeventiende en negentiende nucleotide van de antisens streng en het tweede, vierde, zesde, achtste, tiende, twaalfde, veertiende, zestiende en achttiende nucleotide van de sens streng omvat.

48. Verbinding volgens één of meer der voorafgaande conclusies 41-47, waarbij de verbinding een al dan niet gefosforyleerde verbinding is.
- 5 49. Verbinding volgens één of meer der voorafgaande conclusies 41-48, waarbij het dinucleotide dTdT met het 3'-terminus covalent verbonden is.
50. Verbinding volgens één of meer der voorafgaande conclusies 41-49, waarbij in ten minste één nucleotide een suikergroep gemodificeerd is.
- 10 51. Verbinding volgens conclusie 50, waarbij de modificatie een 2'-O-methylmodificatie is.
52. Verbinding volgens één of meer der voorafgaande conclusies 41-51, waarbij de 2'-OH-groep vervangen is door een groep of rest die gekozen is uit de groep die
15 -H-OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂CH₃, -NH₂ en F omvat.
53. Werkwijze ter behandeling van een patiënt die aan een ziekte-toestand lijdt die gekozen is uit een ademhalingsstoornis, een oogziekte, een microvasculaire stoornis, een gehoorstoornis, drukzweren of een ruggenmergletsel of ziekte welke
20 het toedienen aan een patiënt van een farmaceutische samenstelling die een verbinding volgens één of meer der voorafgaande conclusies 41-52 in een therapeutisch werkzame hoeveelheid omvat, zodanig dat de patiënt hierdoor wordt behandeld.
- 25 54. Werkwijze volgens conclusie 53, waarbij de ziekte-toestand de oogziekte AMD is.
55. Werkwijze volgens conclusie 53, waarbij de ziekte-toestand de gehoorstoornis akoestisch trauma is.
- 30 56. Toepassing van een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een verbinding volgens één of meer der voorafgaande conclusies 41-52 voor de bereiding van een geneesmiddel ter bevordering van het herstel van een patiënt die aan een ziekte-toestand lijdt die gekozen is uit een ademhalingsstoornis, een oogziekte,

een microvasculaire stoornis, een gehoorstoornis, drukzweren of ruggenmergletsel of -ziekte.

57. Farmaceutische samenstelling die twee of meer verbindingen volgens één of meer
5 der voorafgaande conclusies 41-52 omvat.
58. Farmaceutische samenstelling die twee of meer verbindingen omvat, waarin de
eerste verbinding een oligoribonucleotide van tabel D en de tweede verbinding
een oligoribonucleotide volgens één of meer van de tabellen A-C of een anti-
10 lichaam of een aptameer is.
59. Samenstelling volgens conclusie 57, waarbij één of meer van de verbindingen een
oligoribonucleotide is dat uit ID nrs. 257, 260-262 en 264-268 van tabel D geko-
zen is.
15
60. Samenstelling volgens conclusie 58, waarbij de eerste verbinding een oligoribo-
nucleotide is dat uit ID nrs. 257, 260-262 en 264-268 van tabel D gekozen is
61. Samenstelling volgens conclusie 58, waarbij de tweede verbinding een oligoribo-
20 nucleotide is dat uit ID nrs. 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 en 50 van tabel A
gekozen is.
62. Samenstelling volgens één of meer der voorafgaande conclusies 57-61, waarbij
de twee verbindingen fysisch met elkaar gemengd worden in hoeveelheden die
25 een gunstige activiteit genereren.
63. Samenstelling volgens één of meer der voorafgaande conclusies 57-61, waarbij
de twee verbindingen al dan niet covalent verbonden zijn.
- 30 64. Samenstelling volgens één of meer der voorafgaande conclusies 57-61, waarbij
de twee verbindingen met elkaar verbonden zijn door middel van een nucleïne-
zuurbrugvormer met een lengte variërende van 2-100, bij voorkeur 2-50 of 2-30
nucleotiden.

65. Toepassing van een samenstelling volgens één of meer der voorafgaande conclusies 57-64 voor de behandeling van een ademhalingsstoornis, een oogziekte, een microvasculaire stoornis, drukzweren of een ruggenmergletsel of -ziekte.

Fig 1

Humaan RTP801 polynucleotide (SEQ ID NO:1)

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

Fig 2

Humaan RTP801 polypeptide (SEQ ID NO:2)

MPSLWDRFSS	SSTSSSPSSL	PRTPTPDRPP	RSAWGSATRE	EGFDRSTSLE	50
SSDCESLDSS	NSGFGPEEDT	AYLDGVSLPD	FELLSDPEDF	HLCANLMQLL	100
QESLAQARLG	SRRPARLLMP	SQLVSQVGKE	LLRLAYSEPC	GLRGALLDVC	150
VEQGKSCHSV	GQLALDPSLV	PTFQLTLVLR	LDSRLWPQIQ	GLESSANSPP	200
LPGFSQSLTL	STGFRVIKKK	LYSSEQLLIE	EC	232	

Fig 3

(NM_019058)

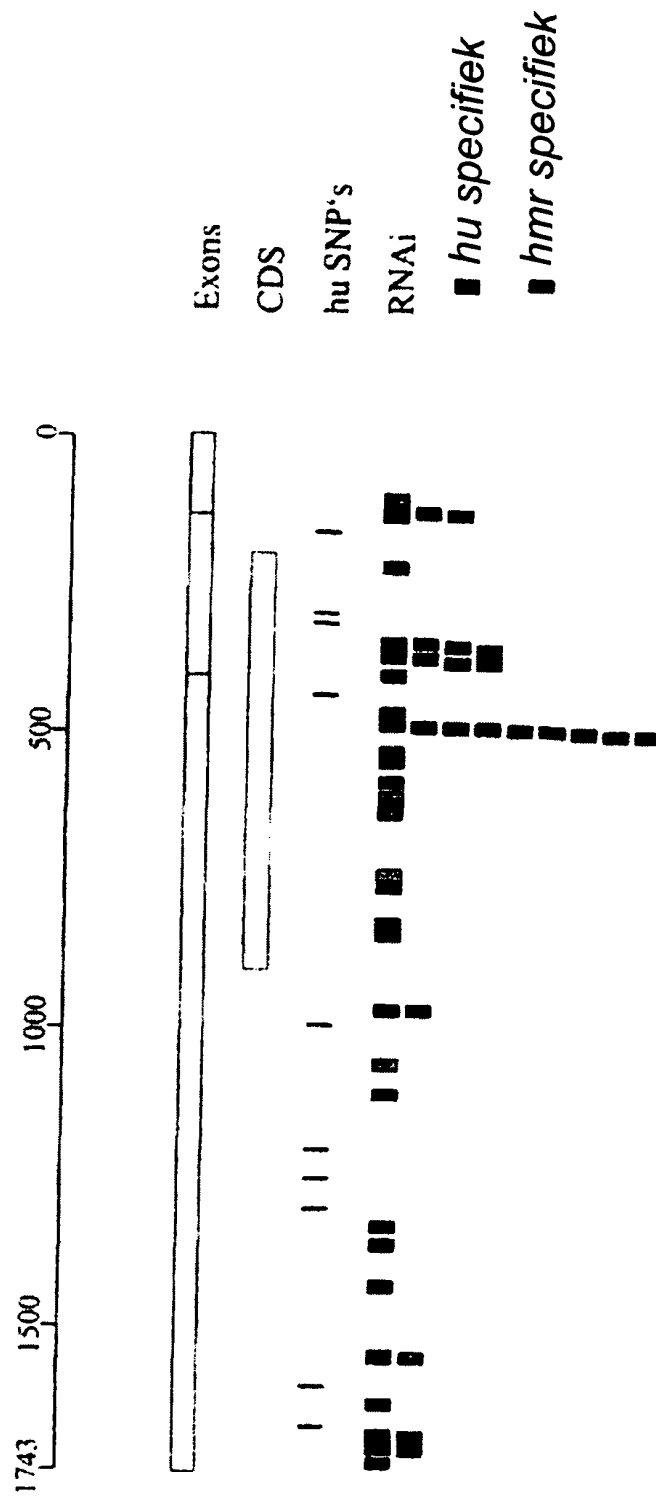


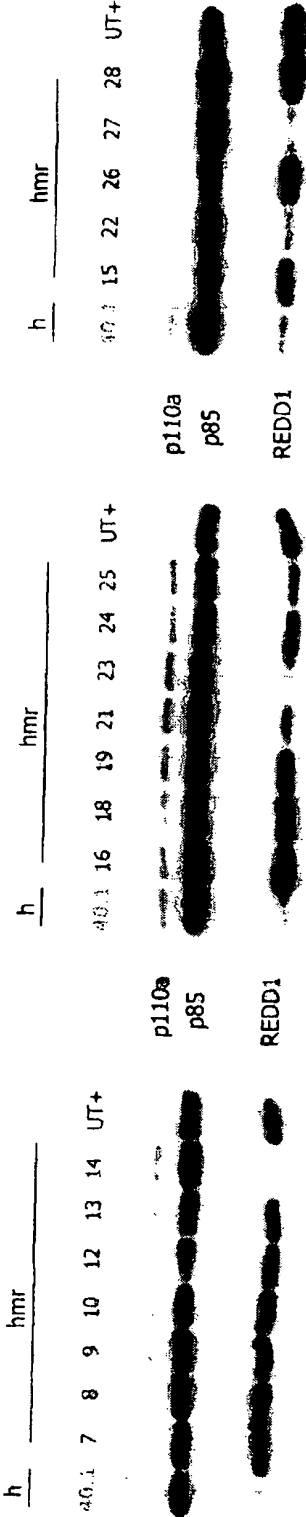
Fig 4.1

Experiment 1

A

B

C



Experiment 2

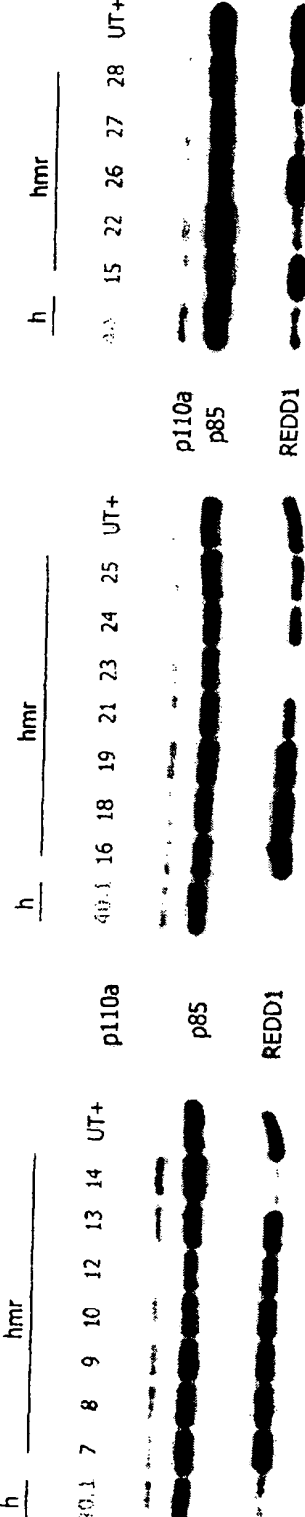
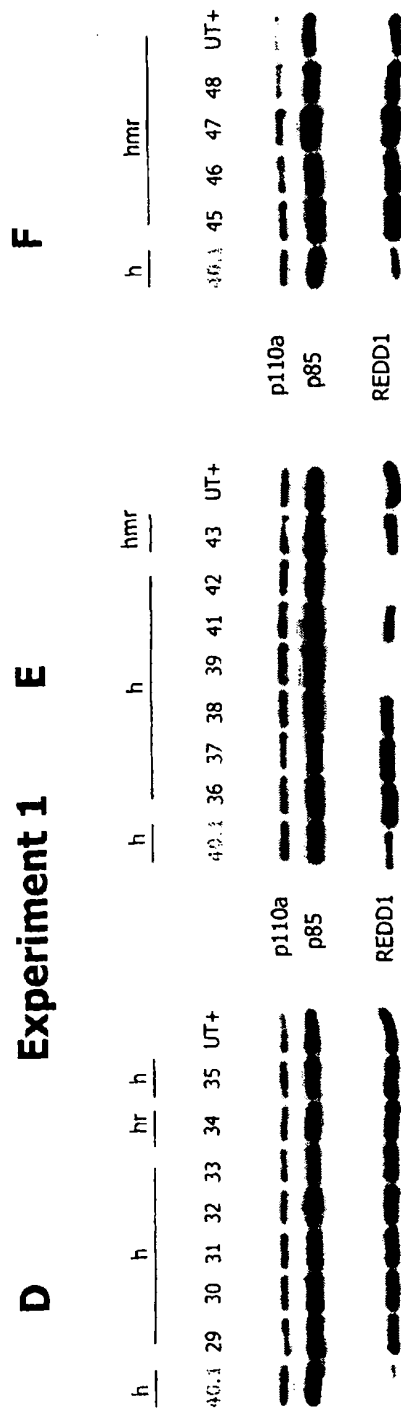


Fig 4.2



Experiment 2

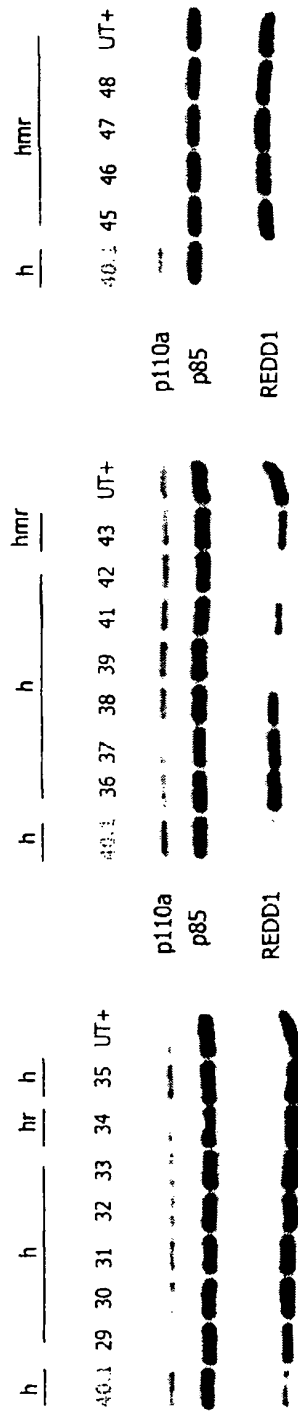
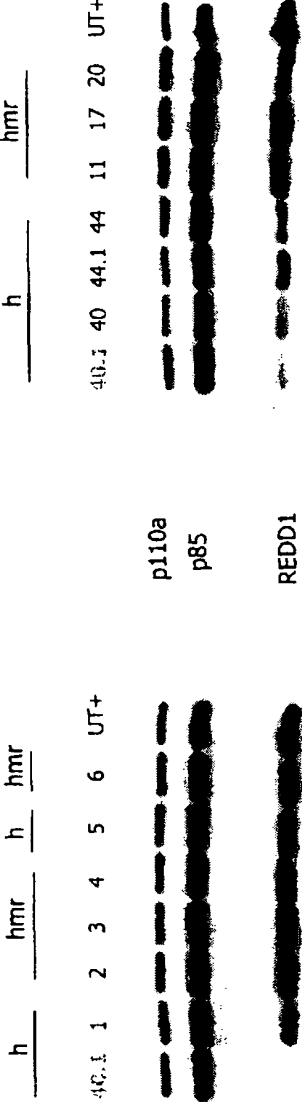


Fig 4.3

G

Experiment 1

H



Experiment 2

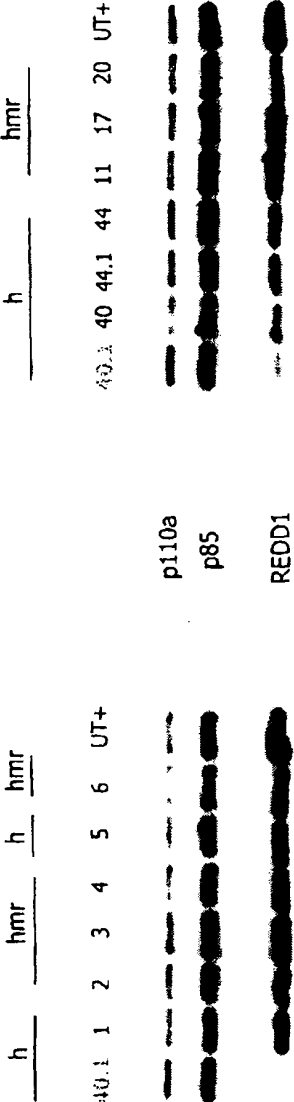


Fig 5.1

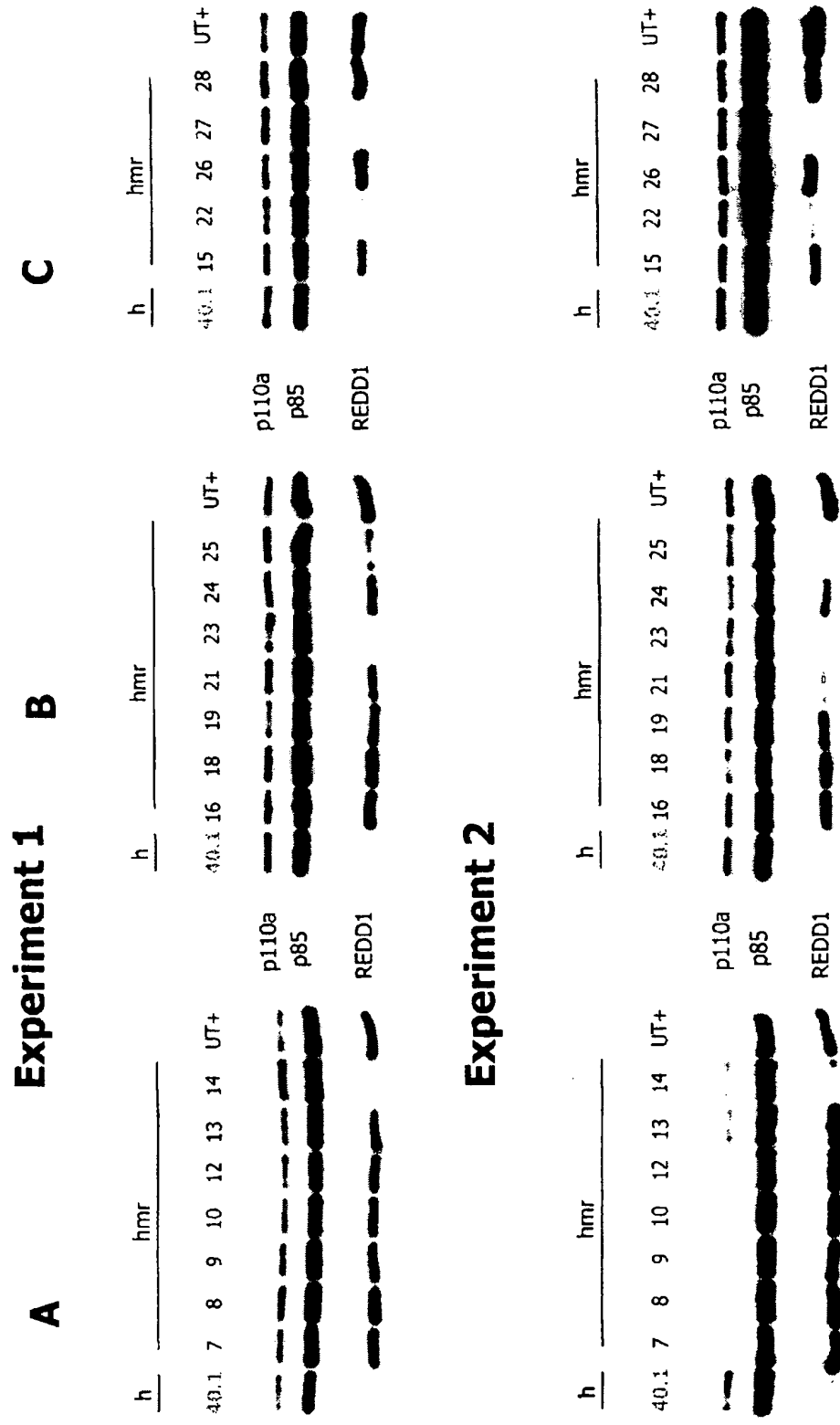


Fig 5.2

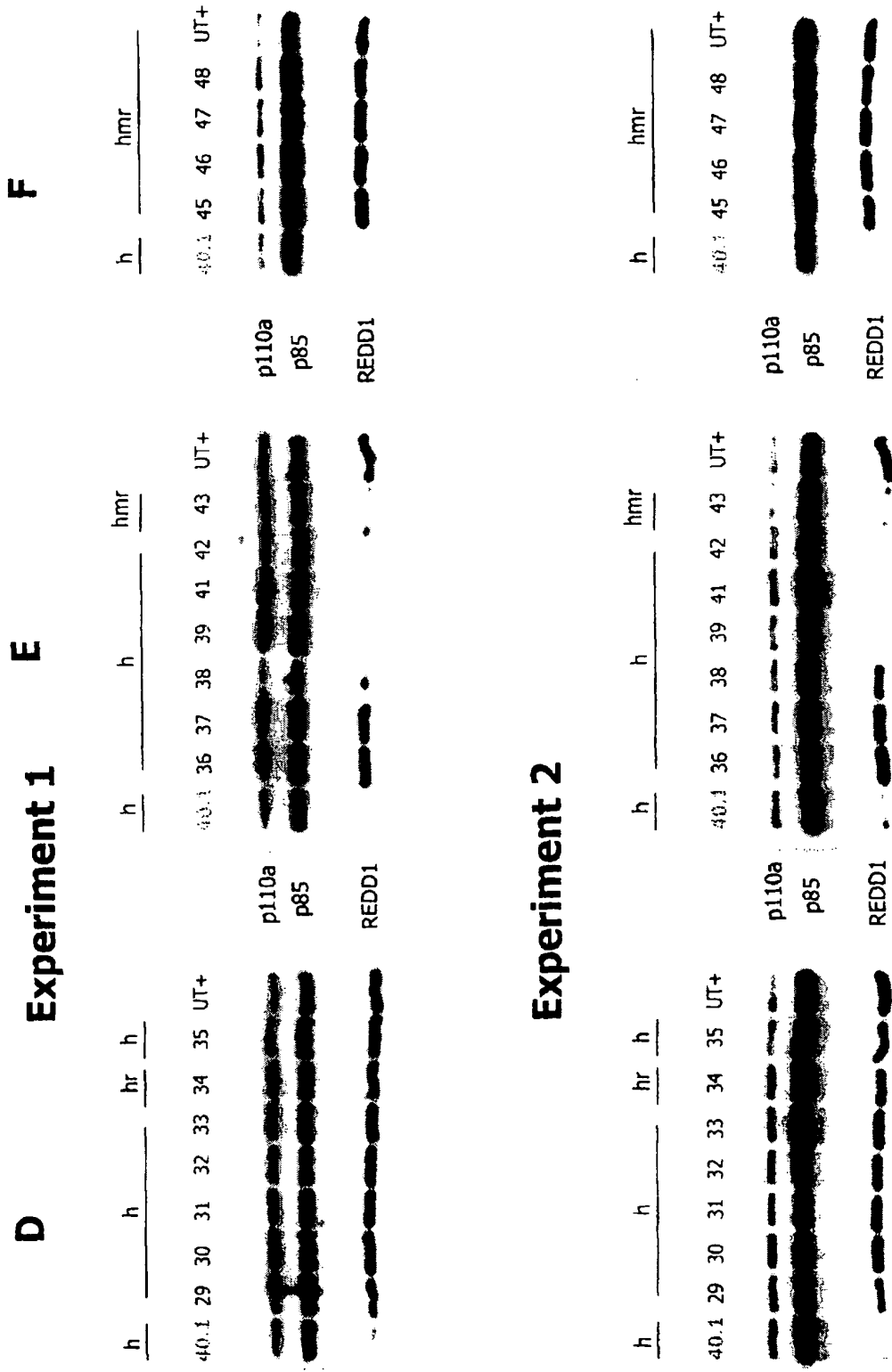


Fig 6

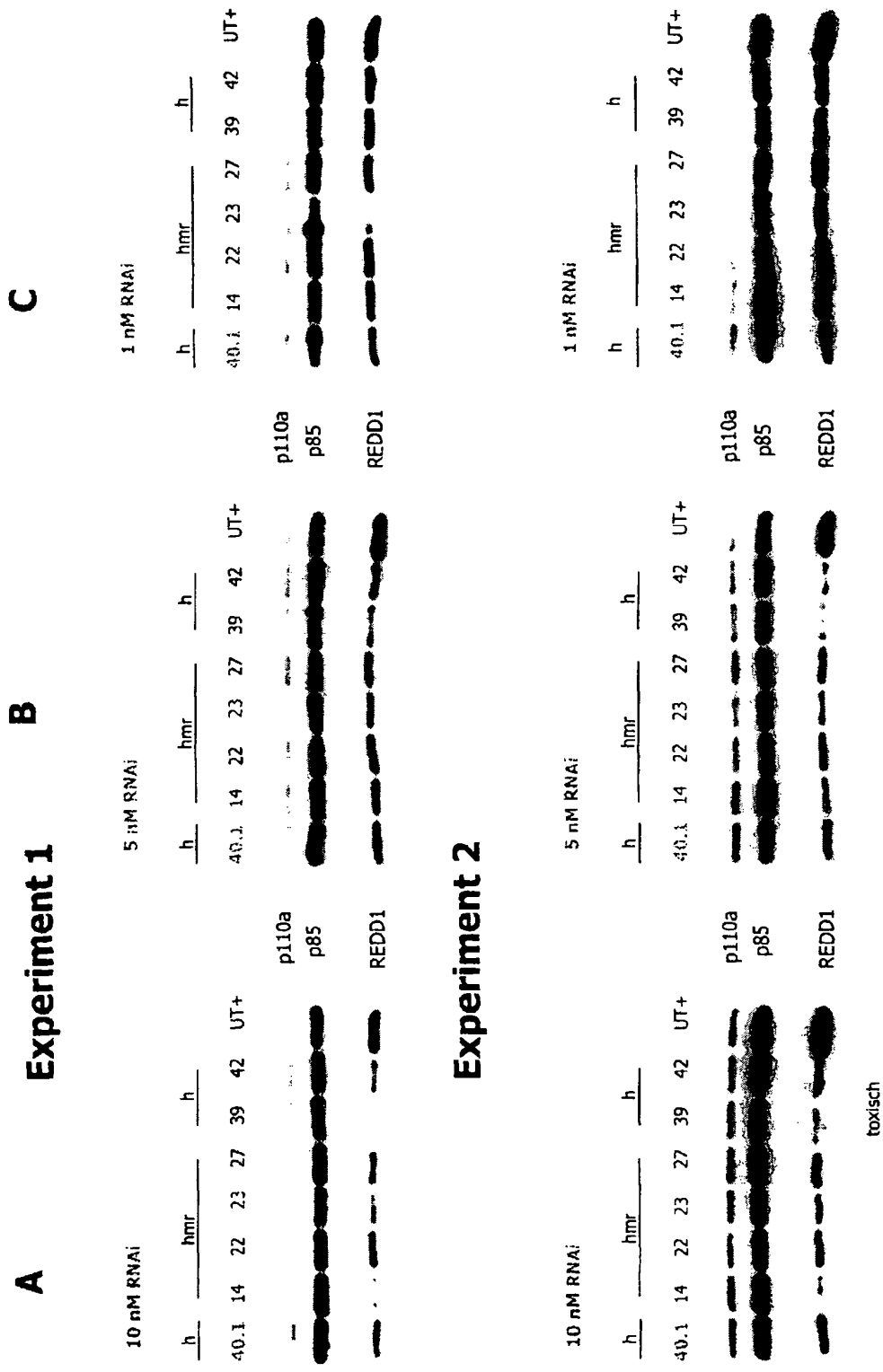
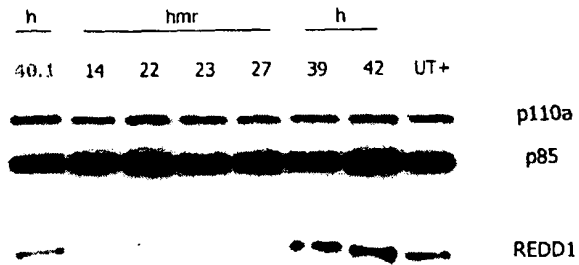


Fig 7

Experiment 1



Experiment 2



Fig 8

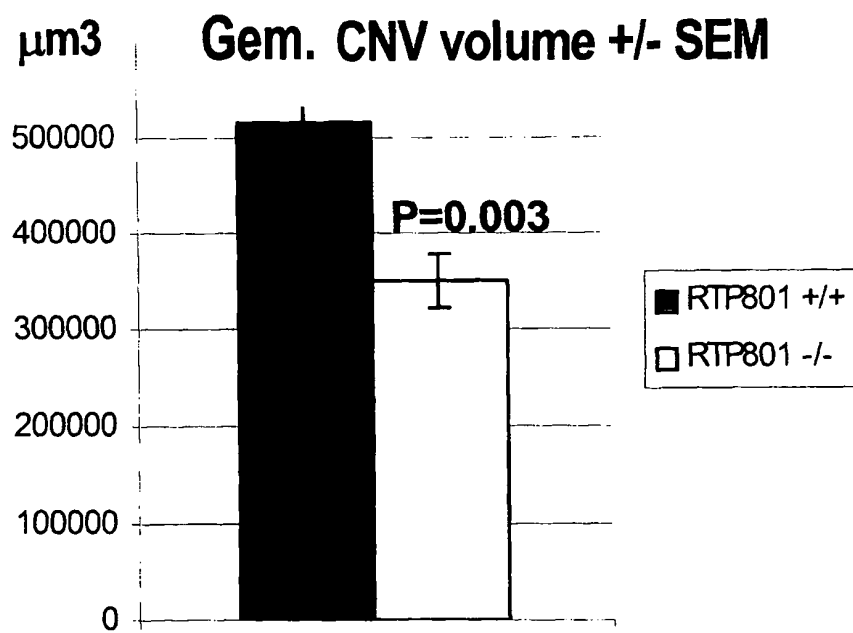


Fig 9

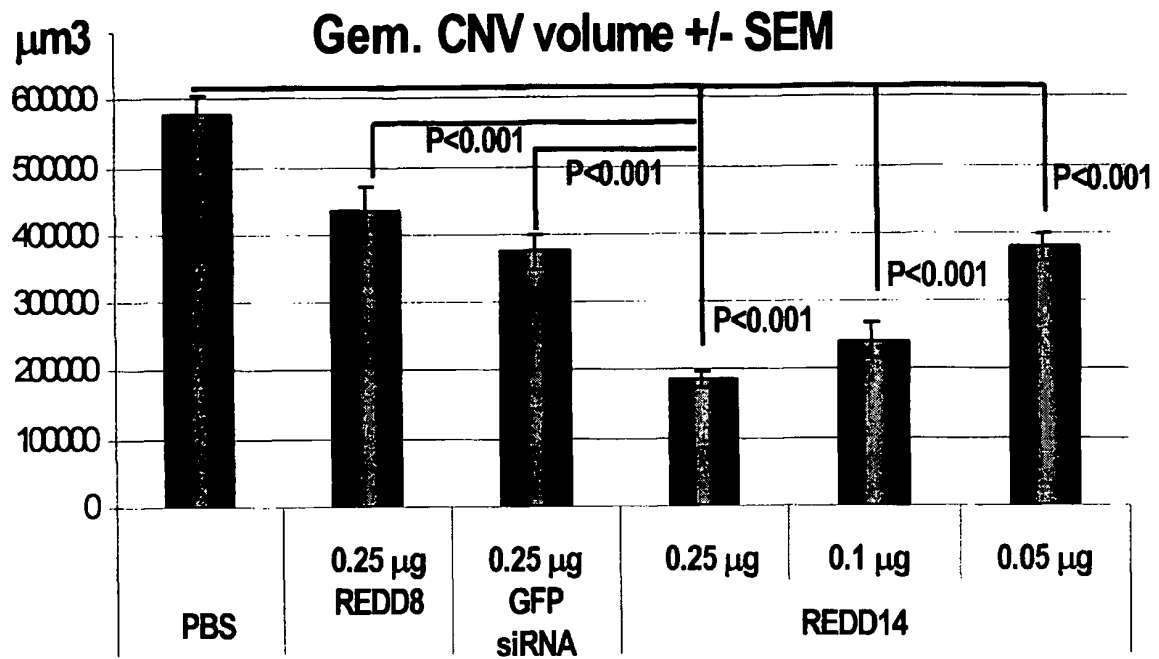


Fig 10

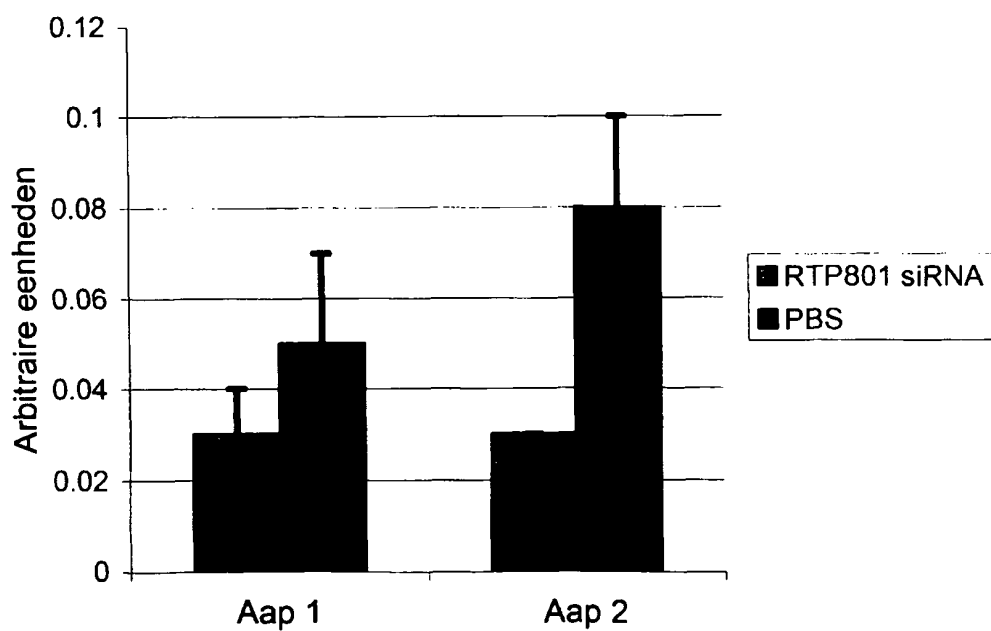


Fig 11a

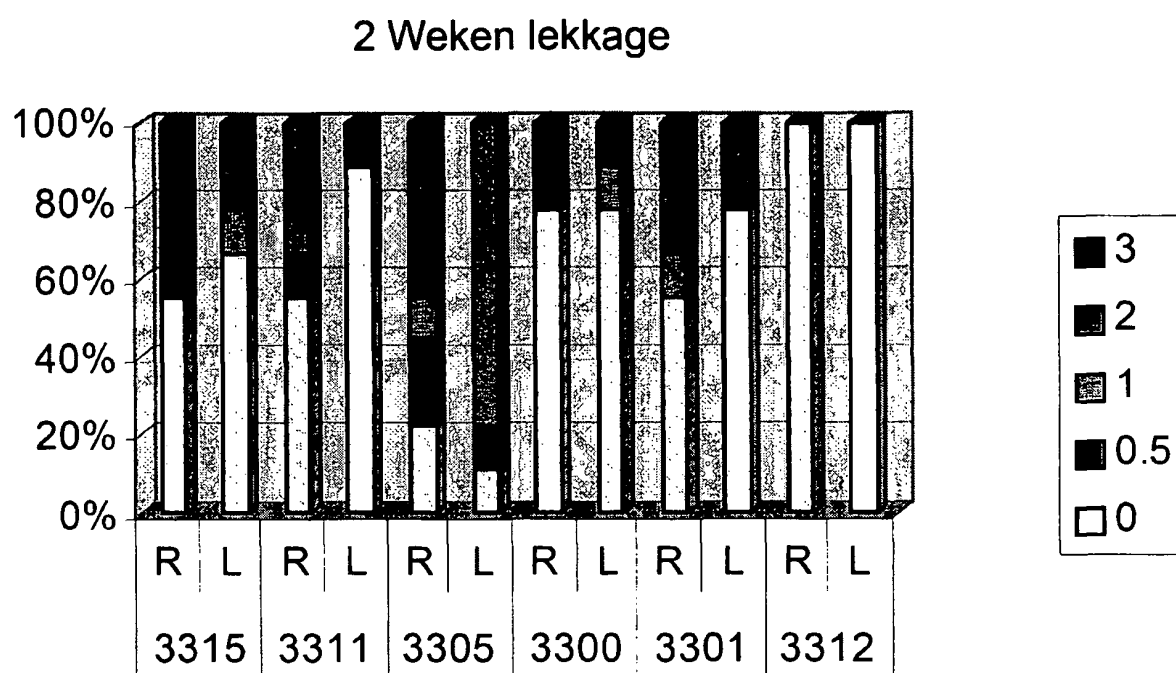


Fig 11b

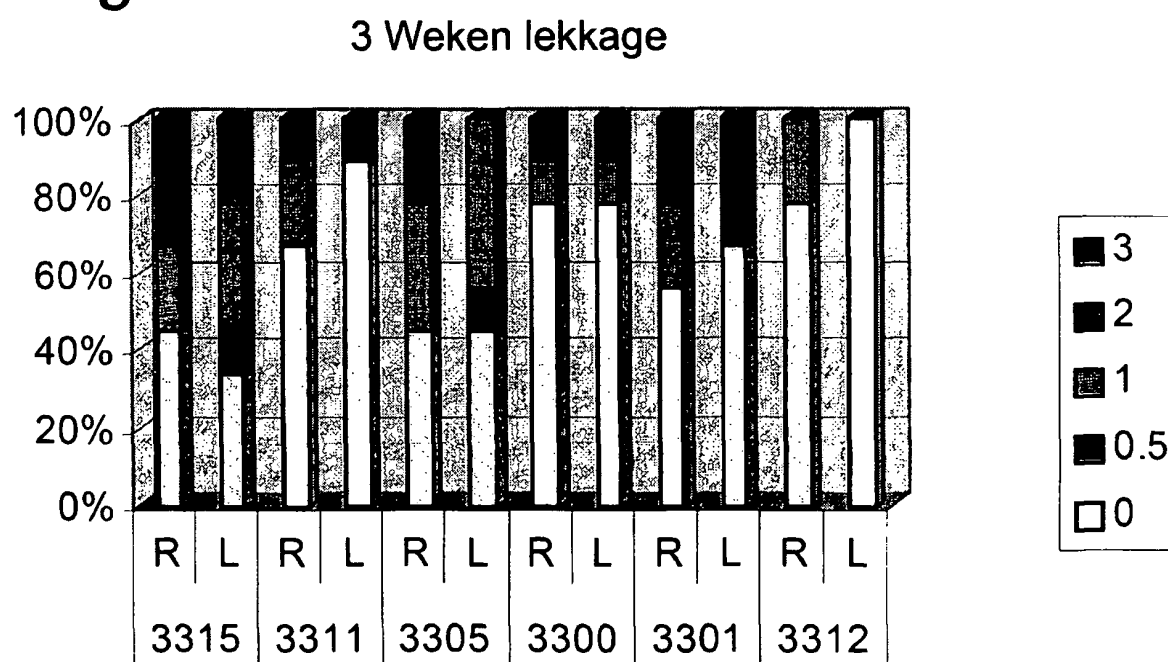


Fig 12a

2 weken - NV

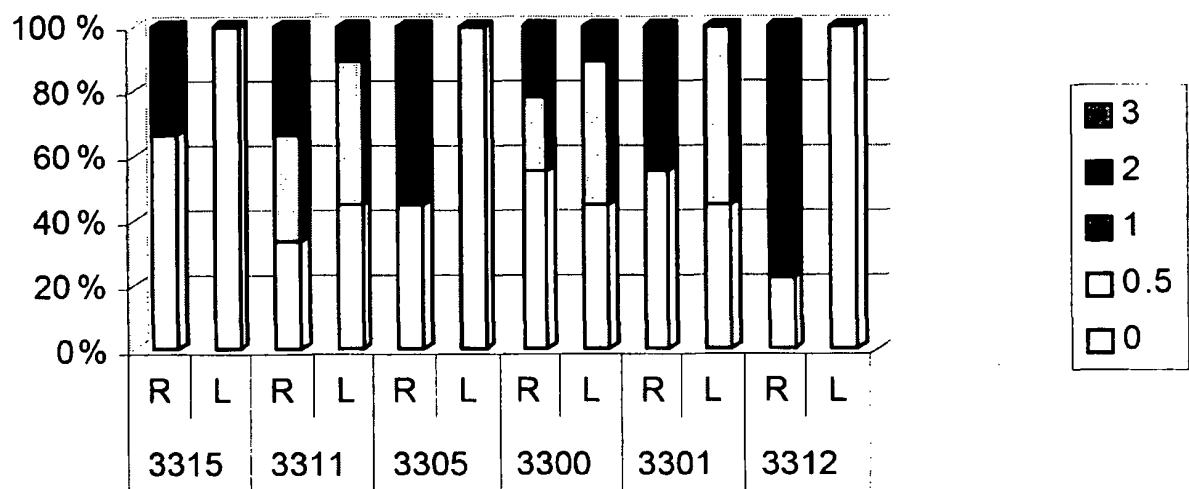


Fig 12b

3 weken - NV

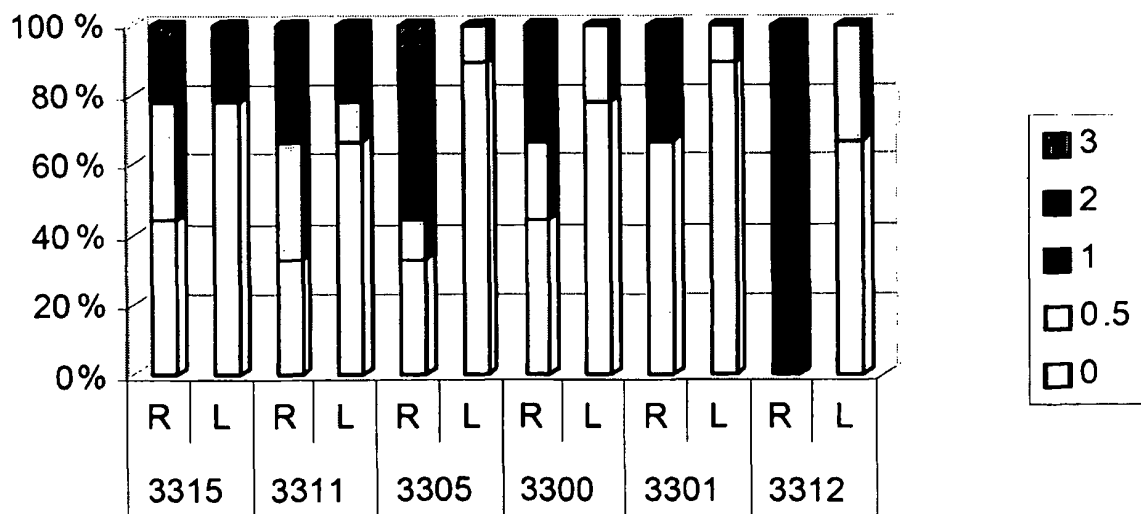


Fig 13a

Aantal spots met lekkage van beoordelingen 2+3

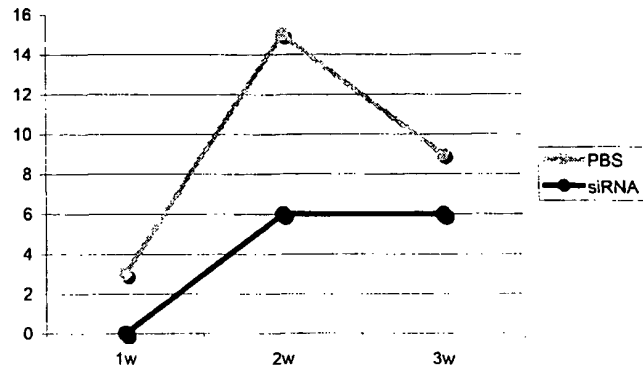


Fig 13b

Aantal spots met neovascularisatie van beoordelingen 2+3

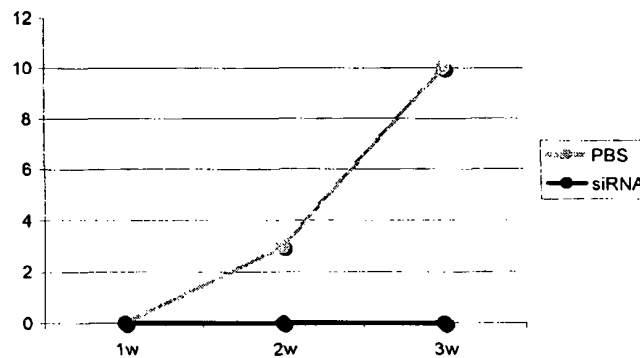
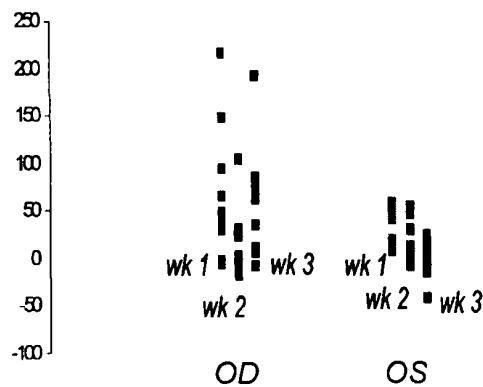


Fig 14

laat - vroeg,
3315



laat - vroeg,
3300

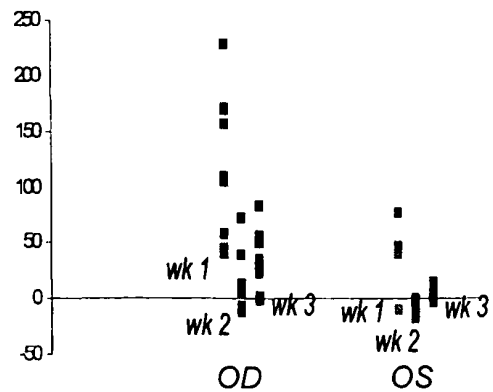


Fig 15a

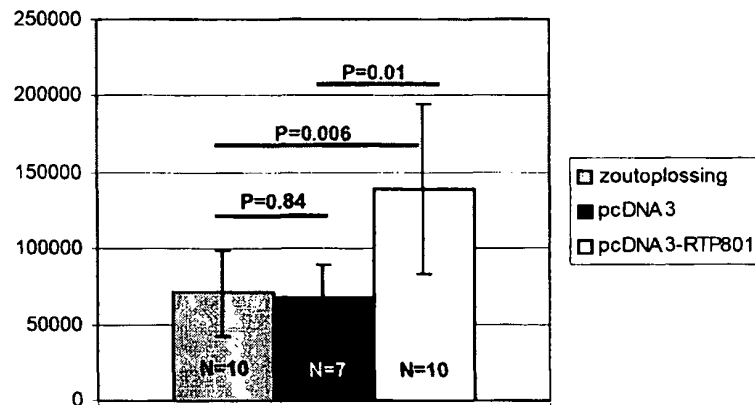


Fig 15b

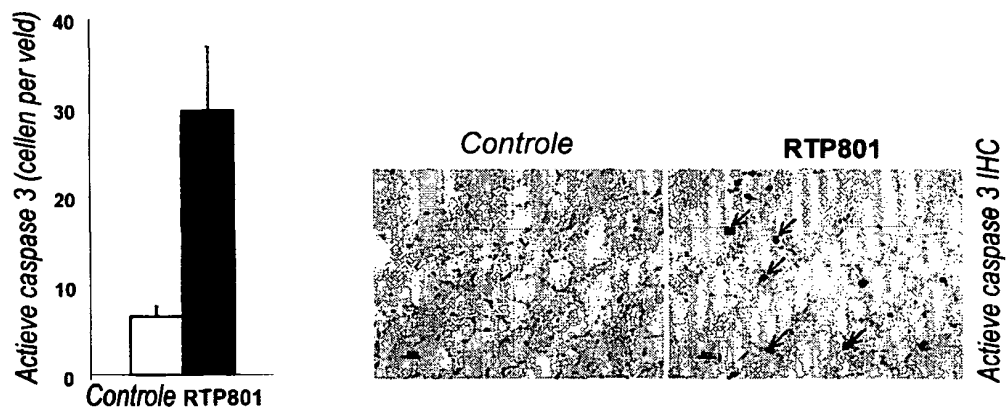


Fig 15c

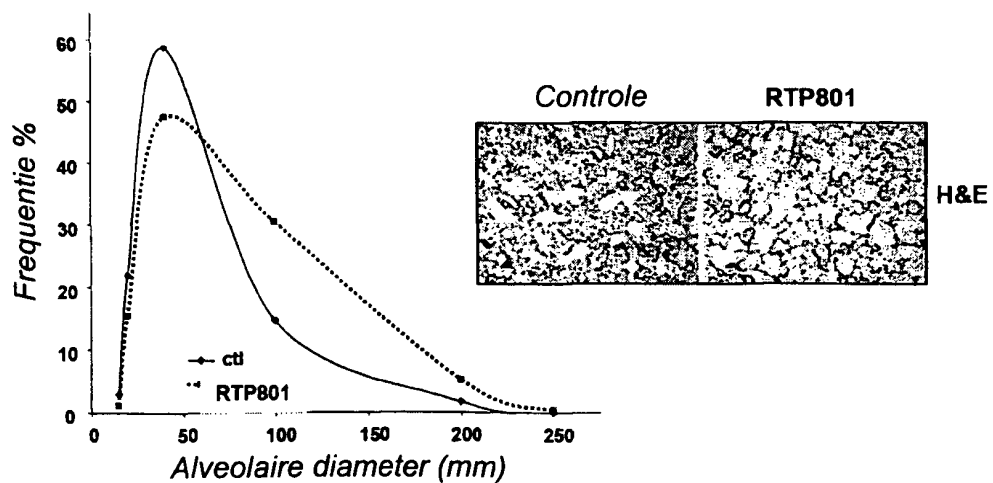


Fig 16a

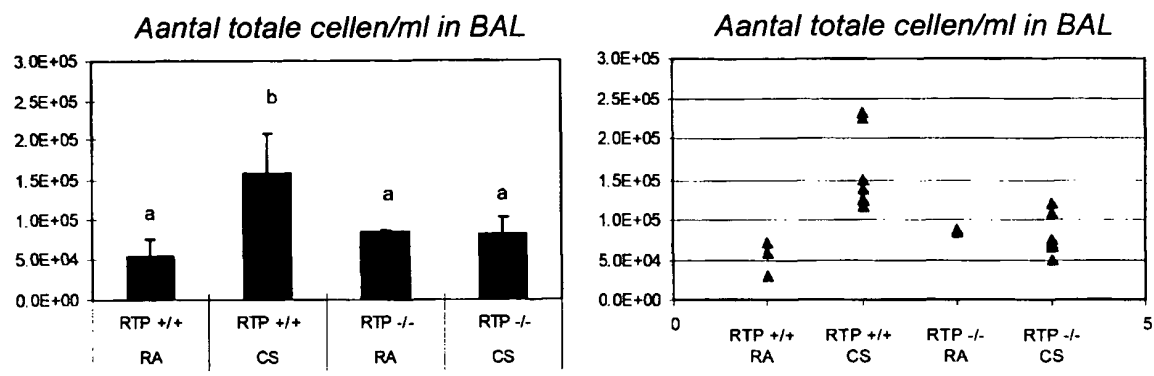


Fig 16b

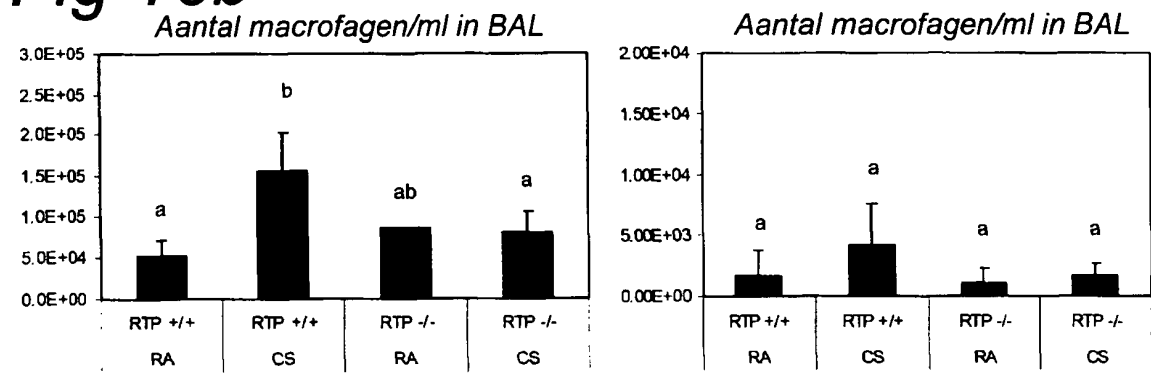


Fig 16c

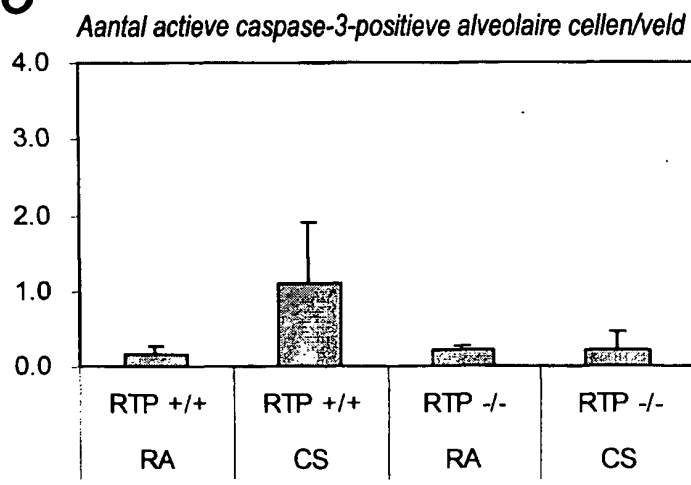


Fig 17a

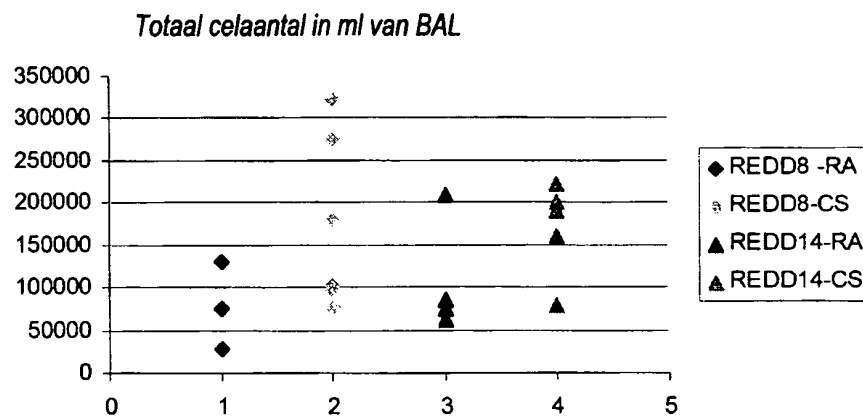


Fig 17b

Intensiteit van RTP801-expressiebrengende cel in de long

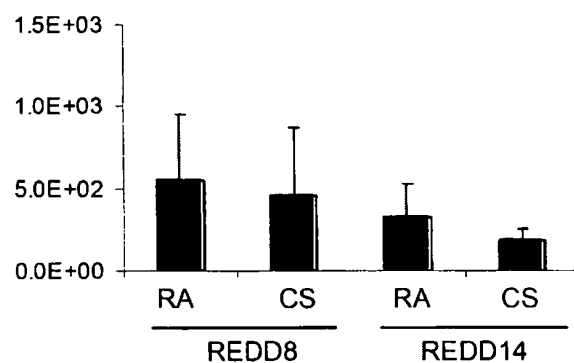
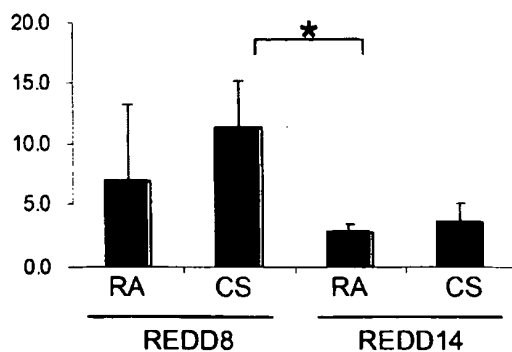


Fig 17c

Expressie van actieve caspase-3 in de long



Aantal anti-actieve caspase-3-Ab-positieve cellen/veld in de long

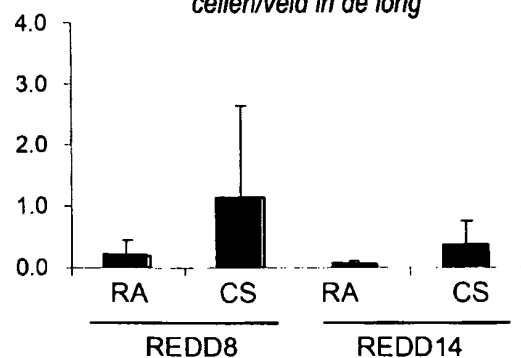


Fig 18

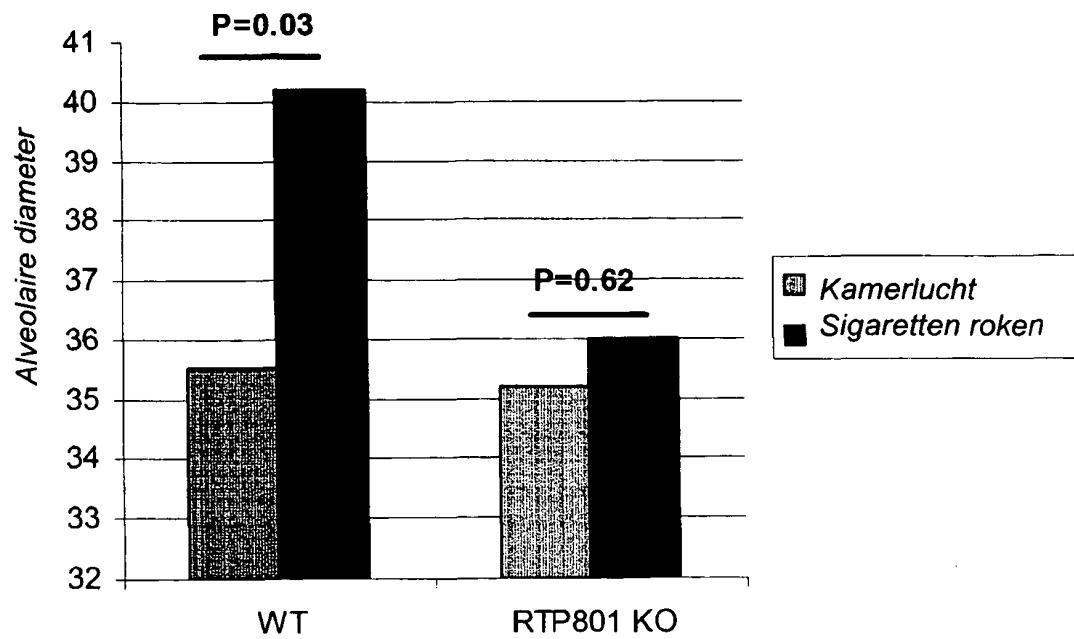


Fig 19

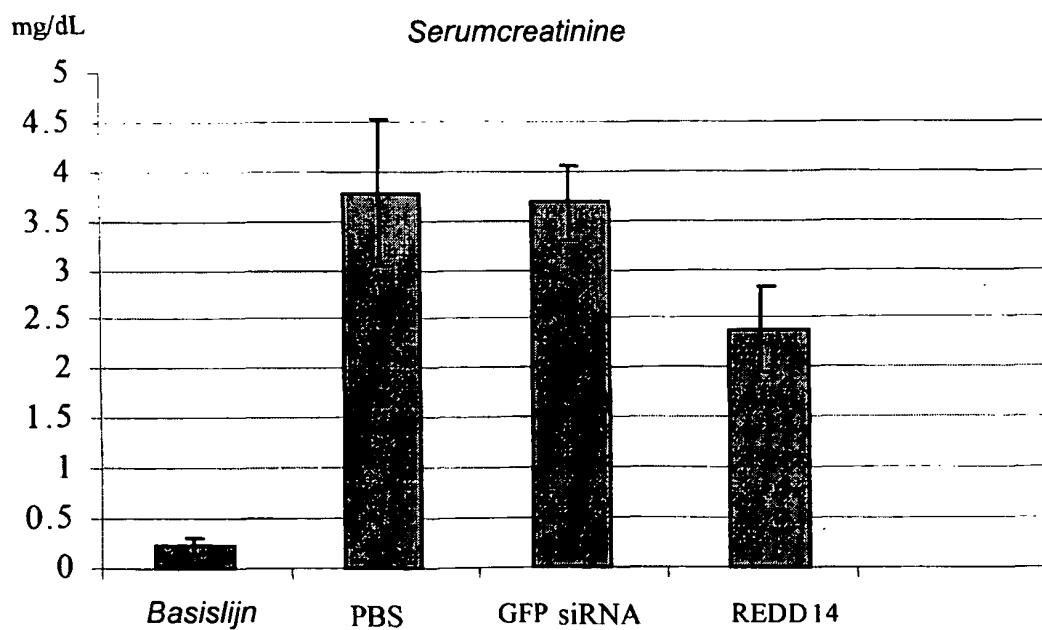


Fig 20

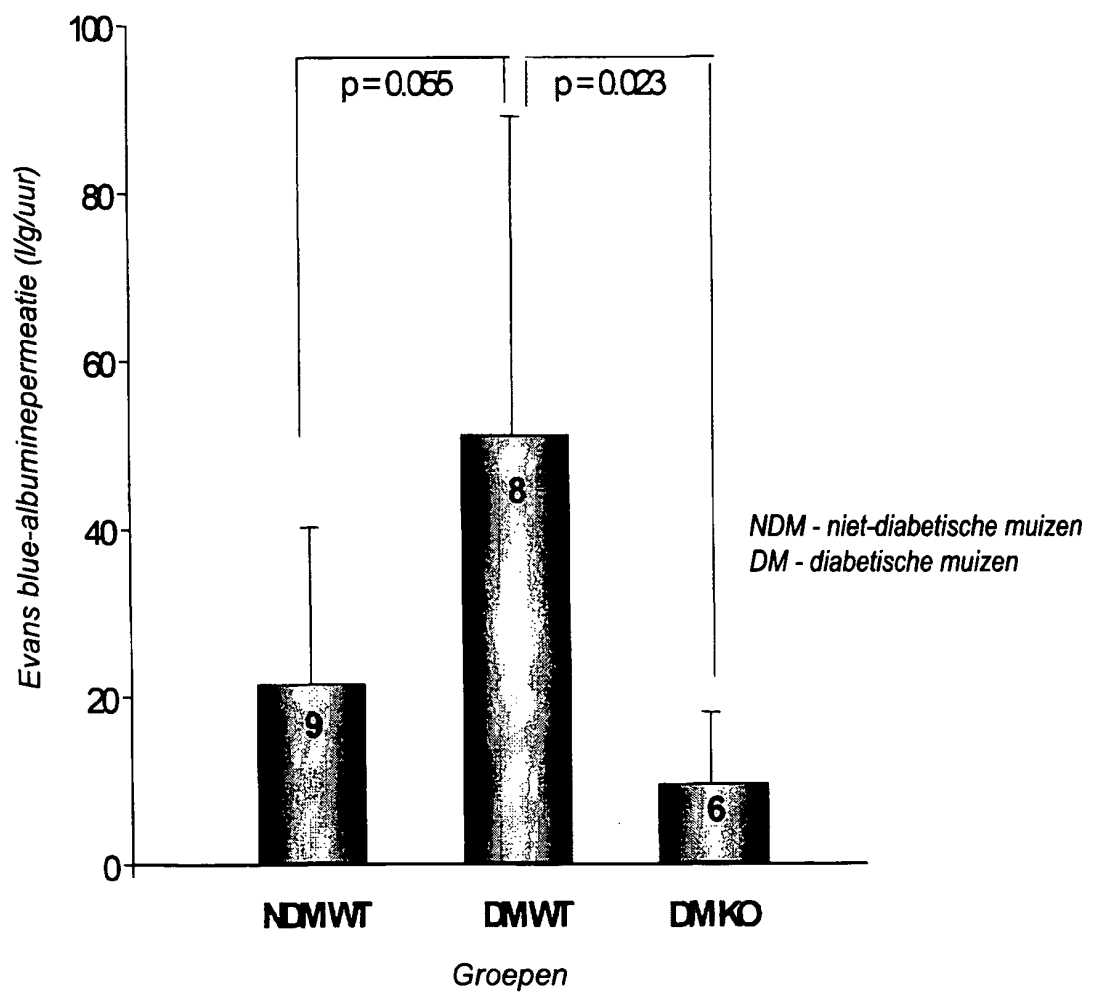


Fig 21

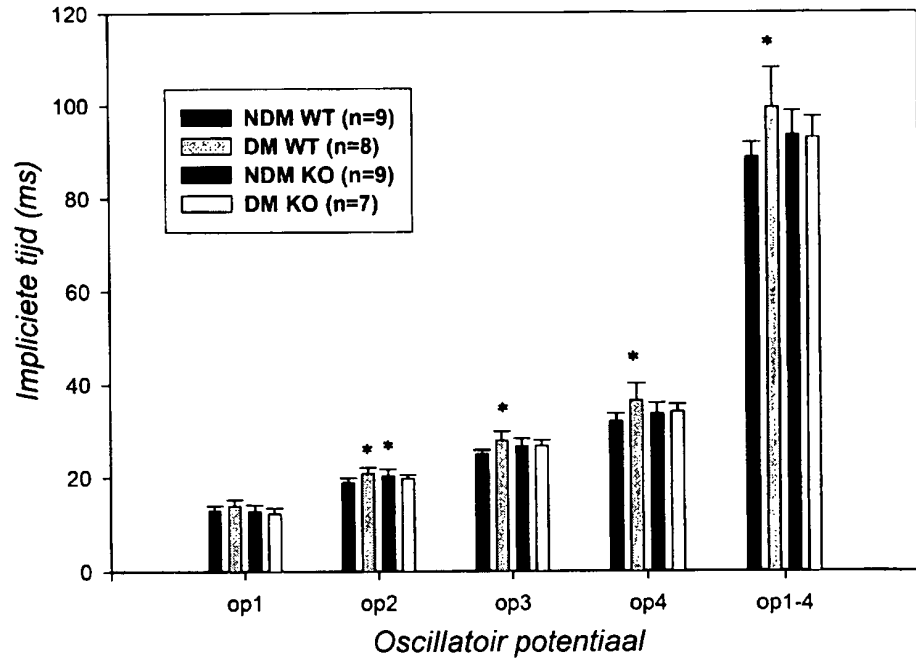


Fig 22

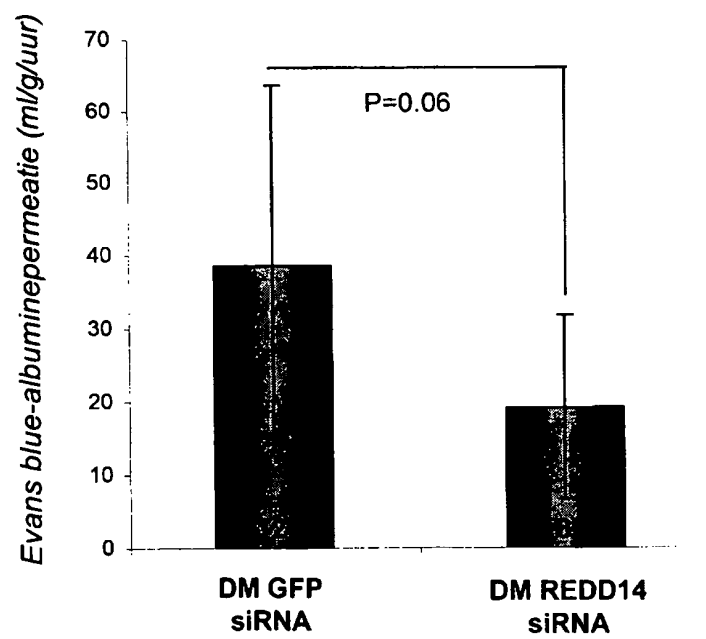


Fig 23

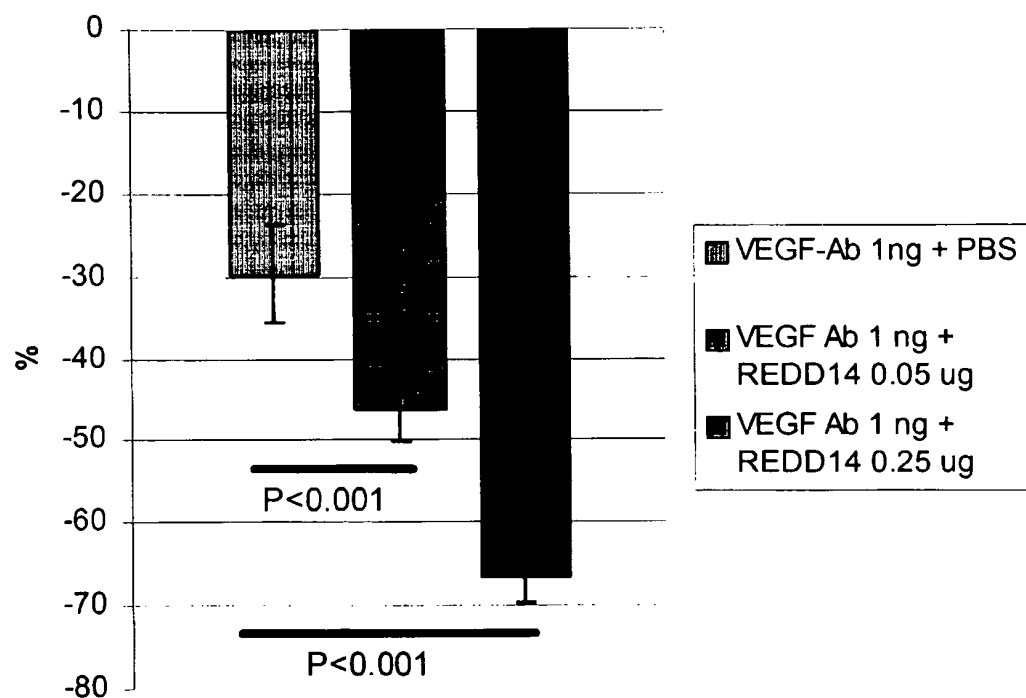


Fig 24

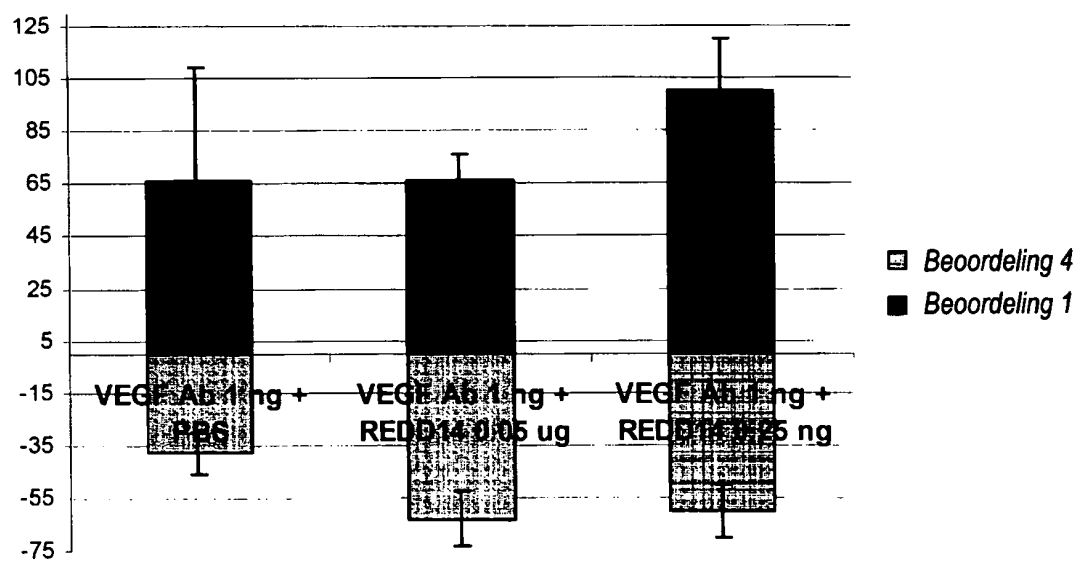


Fig 25

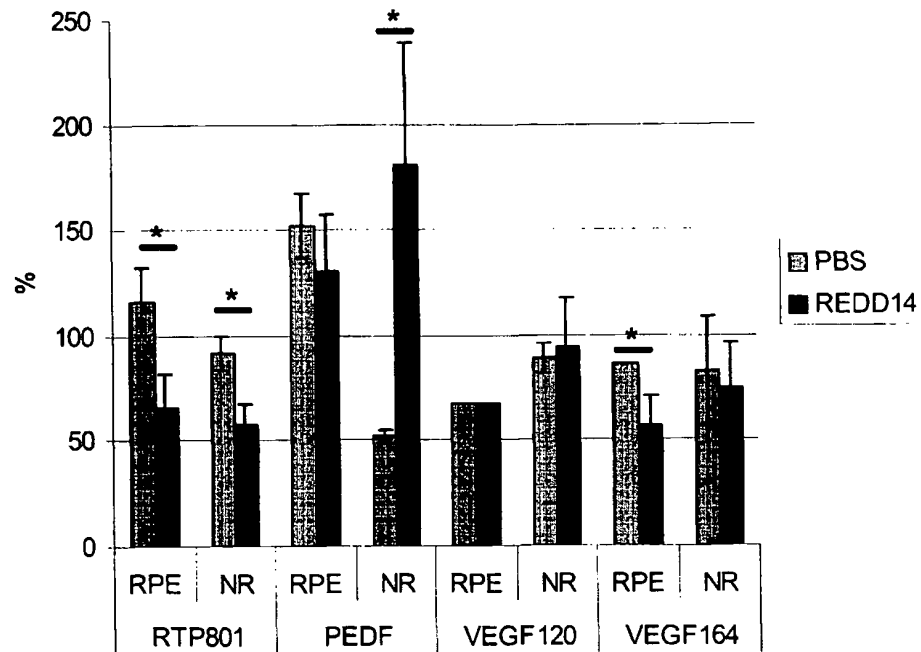


Fig 26a

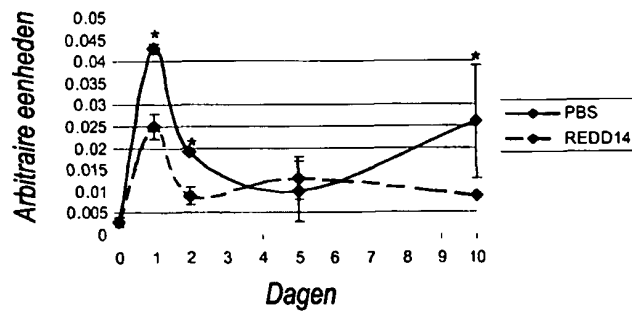


Fig 26b

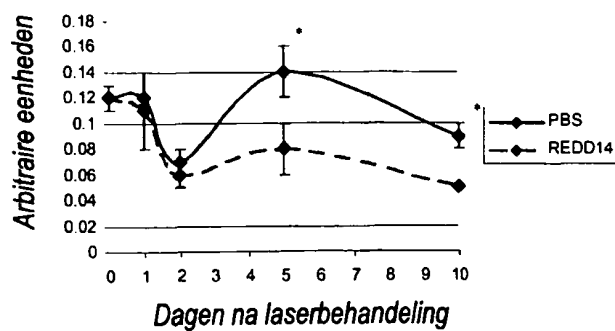


Fig 27

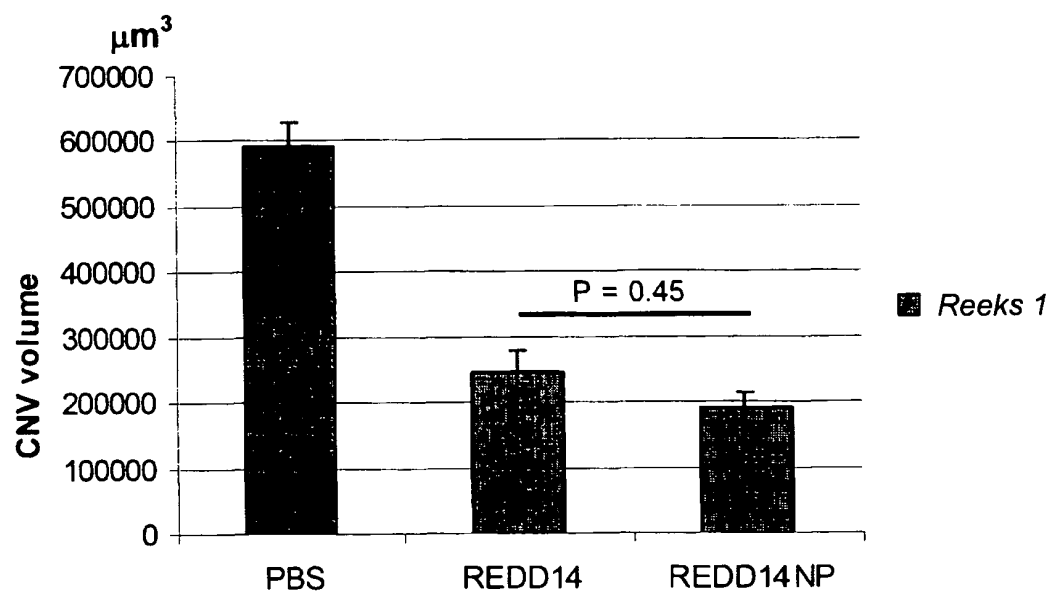


Fig 28

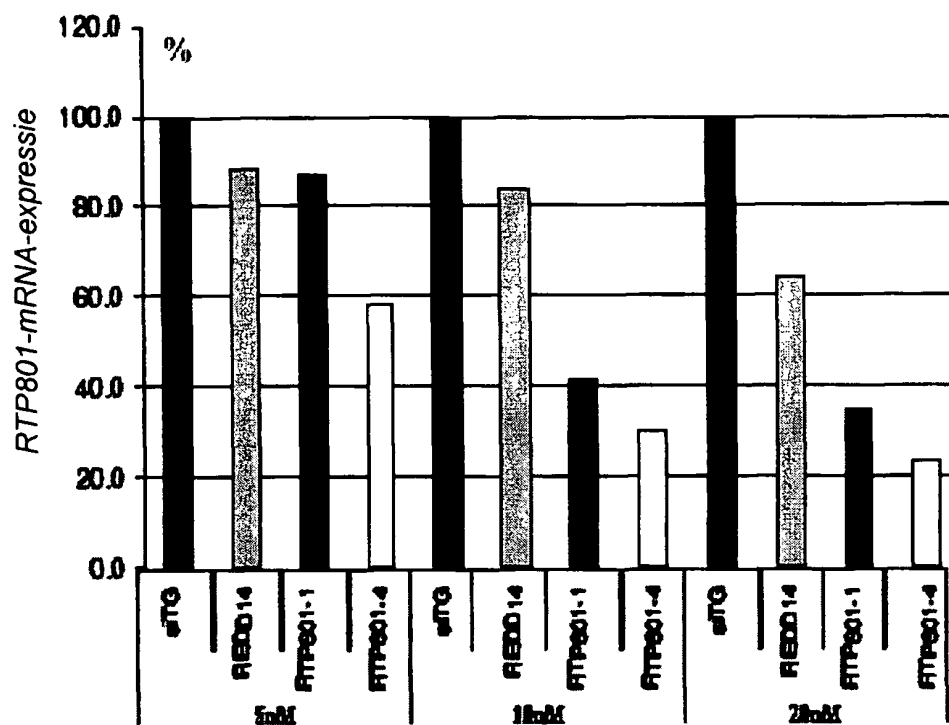


Fig 29

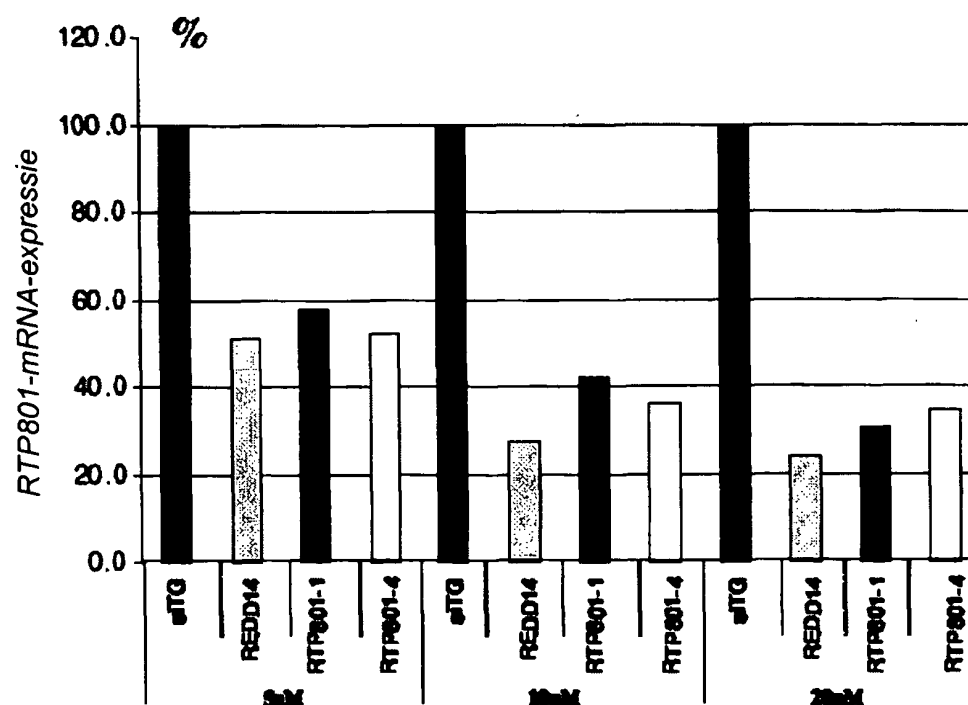
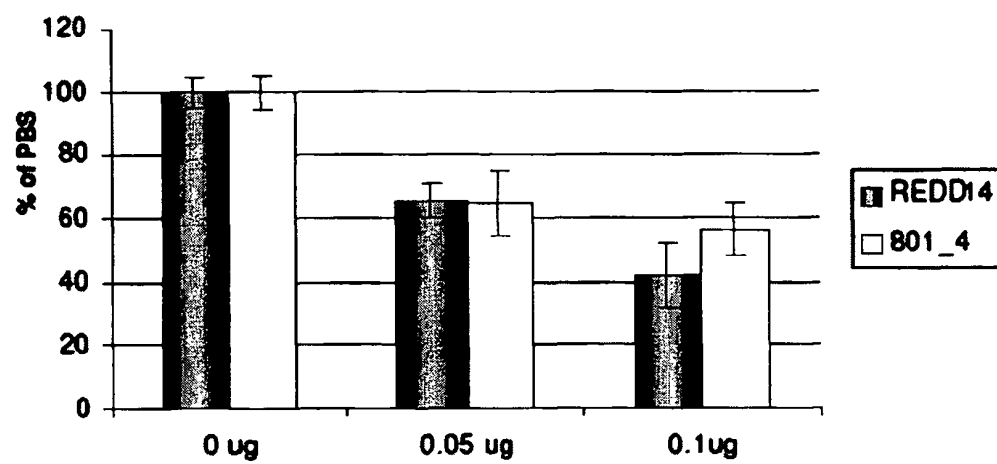


Fig 30



SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)

RAPPORT BETREFFENDE NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFICATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE		KENMERK VAN DE AANVRAGER OF VAN DE GEMACHTIGDE	
		P6013567NL	
Nederlands aanvraag nr.		Indieningsdatum	
2000439		17-01-2007	
		Ingeroepen voorrangsdatum	
Aanvrager (Naam)			
Quark Biotech, Inc.			
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type		Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr.	
26-04-2007		SN 48376	
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)			
Volgens de internationale classificatie (IPC)			
C12N15/11		C07K14/47	A61K31/713
II. ONDERZOChte GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK			
Onderzochte minimumdocumentatie			
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen		
IPC8	C12N	C07K	A61K
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen			
III.	☒ GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES (opmerkingen op aanvullingsblad)		
IV.	☒ GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING (opmerkingen op aanvullingsblad)		

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek
NL 2000439

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
INV. C12N15/11 C07K14/47 A61K31/713
ADD. A61P27/16 A61P27/02

Volgens de Internationale Classificatie van octroolen (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)
C12N C07K A61K

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het onderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
A	EENHEID VAN UITVINDING ONTBREEKT zie aanvullingsblad B ONVOLLEDIG ONDERZOEK zie aanvullingsblad C ----- NUTTALL, A.: "Sound-induced cochlear ischemia/hypoxia as a mechanism of hearing loss" NOISE & HEALTH, deel 5, 1999, bladzijden 17-31, XP002501638 het gehele document ----- -/--	1, 3-10, 12-18, 41-53, 55-65

☒ Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

☒ Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

* Speciale categorieën van aangehaalde documenten

A niet tot de categorie X of Y behorende literatuur die de stand van de techniek beschrijft

D in de octrooiaanvraag vermeld

E eerdere octrooi(aanvraag), gepubliceerd op of na de indieningsdatum, waarin dezelfde uitvinding wordt beschreven

L om andere redenen vermelde literatuur

O niet-schriftelijke stand van de techniek

P tussen de voorrangsdatum en de indieningsdatum gepubliceerde literatuur

T na de indieningsdatum of de voorrangsdatum gepubliceerde literatuur die niet bezwarend is voor de octrooiaanvraag, maar wordt vermeld ter verheldering van de theorie of het principe dat ten grondslag ligt aan de uitvinding

X de conclusie wordt als niet nieuw of niet inventief beschouwd ten opzichte van deze literatuur

Y de conclusie wordt als niet inventief beschouwd ten opzichte van de combinatie van deze literatuur met andere geciteerde literatuur van dezelfde categorie, waarbij de combinatie voor de vakman voor de hand liggend wordt geacht

Z lid van dezelfde octrooifamilie of overeenkomstige octrooipublicatie

Datum waarop het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type werd voltooid

29 Oktober 2008

Verzenddatum van het rapport van het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type

Naam en adres van de instantie
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

De bevoegde ambtenaar

Andres, Serge

ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek
NL 2000439

C. (Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie *	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	WO 2004/035615 A (ATUGEN AG [DE]; KLIPPEL-GIESE ANKE [DE]; KAUFMANN JOERG [DE]; SCHWARZE) 29 april 2004 (2004-04-29)	41-52, 57-64
A	het gehele document	1,3-10, 12-18, 41-53, 55-65
A	WO 2004/015107 A (ATUGEN AG [DE]; GIESE KLAUS [DE]; KAUFMANN JOERG [DE]; KLIPPEL-GIESE A) 19 februari 2004 (2004-02-19) in de aanvraag genoemd het gehele document	41-53
A	WO 99/09046 A (QUARK BIOTECH INC [US]; KOHN KENNETH I [US]; EINAT PAZ [IL]; SKALITER) 25 februari 1999 (1999-02-25) in de aanvraag genoemd het gehele document	1,3-10, 12-18, 41-53, 55-65
A	HOLLEY ET AL: "Keynote review: The auditory system, hearing loss and potential targets for drug development" DRUG DISCOVERY TODAY, deel 10, nr. 19, 1 oktober 2005 (2005-10-01), bladzijden 1269-1282, XP005105967 ISSN: 1359-6446 het gehele document	
A	SCHWARZER ROLF ET AL: "REDD1 integrates hypoxia-mediated survival signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase" ONCOGENE, deel 24, nr. 7, 10 februari 2005 (2005-02-10), bladzijden 1138-1149, XP002353260 ISSN: 0950-9232 het gehele document	
P,A	WO 2006/023544 A (QUARK BIOTECH INC [US] QUARK BIOTECH INC [US]; ATUGEN AG [DE]) 2 maart 2006 (2006-03-02) het gehele document	1,3-10, 12-18, 41-53, 55-65

**ONVOLLEDIG ONDERZOEK
AANVULLINGSBLAD C**

Octroolaanvraag Nr.:

SN 48376
NL 2000439

Ofschoon de conclusies 1,3-9,53,55 gericht zijn op een methode voor het therapeutisch behandelen van het menselijk of dierlijk lichaam, is het vooronderzoek uitgevoerd op basis van de veronderstelde werking van de verbinding/samenstelling.

Dit verslag van het onderzoek heeft geen betrekking op bepaalde conclusies omdat deze betrekking hebben op delen van de nationale aanvraag die niet voldoen aan de voorgeschreven vereisten, en wel in die mate dat geen zinvol nieuwheidsonderzoek verricht kan worden, in het bijzonder:

Volledig onderzochte conclusie(s):
1,3-9,13-18

Niet volledig onderzochte conclusie(s):
10,12

Niet onderzochte conclusie(s):
-

Reden voor de beperking van het onderzoek:

Dit verslag van het onderzoek heeft geen betrekking op bepaalde conclusies omdat deze betrekking hebben op delen van de nationale aanvraag die niet voldoen aan de voorgeschreven vereisten, en wel in die mate dat geen zinvol nieuwheidsonderzoek verricht kan worden, in het bijzonder:

De huidige conclusies 10 en 12 hebben betrekking op een produkt dat is gedefinieerd door middel van een verwijzing naar een verlangde karakteristiek of eigenschap, namelijk de eigenschap om RTP801 te remmen. De conclusies bedekken alle produkten welke deze karakteristiek of eigenschap hebben, terwijl de aanvraag ondersteuning en openbaring verschaft voor slechts een zeer beperkt aantal van zulke produkten. In het onderhavige geval ontbreekt het de conclusies zodanig aan ondersteuning en de aanvraag zodanig aan openbaring, dat een zinvol nieuwheidsonderzoek over de gehele reikwijdte van de conclusies onmogelijk is. Onafhankelijk van bovenstaande redenering ontbreekt het de conclusies aan duidelijkheid. Een poging is gedaan het produkt te definiëren door middel van een verwijzing naar een te behalen resultaat. Wederom, dit gebrek aan duidelijkheid is in het onderhavige geval zodanig dat een zinvol nieuwheidsonderzoek over de gehele reikwijdte van de conclusies onmogelijk is. Bijgevolg is het nieuwheidsonderzoek voor die delen van de conclusies uitgevoerd welke duidelijk, ondersteund en geopenbaard schijnen te zijn, namelijk die delen die betrekking hebben op de produkten gedefinieerd in conclusies 13-18.

GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING

Octroolaanvraag Nr.:

SN 48376

NL 2000439

AANVULLINGSBLAD B

De Instantie belast met het uitvoeren van het onderzoek naar de stand van de techniek heeft vastgesteld dat deze aanvraag meerdere uitvindingen bevat, te weten:

1. conclusies: 4-9,13-18,41-53,56-65 (gedeeltelijk) en 1,3,10,12,55

Toepassing van een RTP801 inhibitor ter behandeling van een gehoorstoornis. of van drukzweren.

2. conclusies: 4-9,13-18,41-53,56-65 (gedeeltelijk) en 2,11

Toepassing van een RTP801 inhibitor ter behandeling van drukzweren.

3. conclusies: 19,30,41-53,56-65 (gedeeltelijk) en 22-26,33-37

Een siRNA zoals in Tabel D weergegeven in de behandeling van een ademhalingsstoornis.

4. conclusies: 19,27,30,38,41-53,56-65 (gedeeltelijk) en
20,21,28,31,32,39,54

Een siRNA zoals in Tabel D weergegeven in de behandeling van een oogziekte.

5. conclusies: 19,27,30,38,41-53,56-65 (gedeeltelijk) en 29,40

Een siRNA zoals in Tabel D weergegeven in de behandeling van een microvasculaire stoornis.

6. conclusies: 19,30,41-53,56-65 (gedeeltelijk)

Een siRNA zoals in Tabel D weergegeven in de behandeling van een ruggenmergletsel of ziekte.

Het vooronderzoek werd tot het eerste onderwerp beperkt.

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek

NL 2000439

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie	
WO 2004035615	A	29-04-2004	AU 2003278112 A1	04-05-2004
			BR 0315411 A	16-08-2005
			CA 2501333 A1	29-04-2004
			CN 1705746 A	07-12-2005
			JP 2006520183 T	07-09-2006
			KR 20050056244 A	14-06-2005
			MX PA05004134 A	05-10-2005
			US 2006240022 A1	26-10-2006
ZA 200502483 A	06-10-2005			

WO 2004015107	A	19-02-2004	AT 350473 T	15-01-2007
			AU 2003260370 A1	25-02-2004
			AU 2008207337 A1	04-09-2008
			BR 0313202 A	21-06-2005
			CA 2494930 A1	19-02-2004
			CN 1675359 A	28-09-2005
			DE 60310944 T2	11-10-2007
			DK 1527176 T3	07-05-2007
			EP 1527176 A2	04-05-2005
			EP 1857547 A2	21-11-2007
			ES 2280826 T3	16-09-2007
			JP 2006500014 T	05-01-2006
			KR 20050035877 A	19-04-2005
			MX PA05001355 A	30-09-2005
			US 2004180351 A1	16-09-2004

WO 9909046	A	25-02-1999	AT 293633 T	15-05-2005
			AU 9028298 A	08-03-1999
			AU 9110798 A	08-03-1999
			DE 69829857 D1	25-05-2005
			DE 69829857 T2	02-02-2006
			EP 1015471 A1	05-07-2000
			EP 1009753 A1	21-06-2000
			JP 2002505841 T	26-02-2002
			WO 9909049 A1	25-02-1999

WO 2006023544	A	02-03-2006	AU 2005277508 A1	02-03-2006
			BR PI0514395 A	10-06-2008
			CA 2577423 A1	02-03-2006
			JP 2008510019 T	03-04-2008
			KR 20070050088 A	14-05-2007
			US 2006217329 A1	28-09-2006



OCTROOICENTRUM NEDERLAND

WRITTEN OPINION

File No. SN48376	Filing date (day/month/year) 17.01.2007	Priority date (day/month/year) 20.01.2006	Application No. NL2000439
International Patent Classification (IPC) INV. C12N15/11 C07K14/47 A61K31/713 ADD. A61P27/16 A61P27/02			
Applicant Quark Biotech, Inc. te Fremont, CaliforniÛ, Vereni			

This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the application

	Examiner Andres, Serge
--	---------------------------

WRITTEN OPINION

Application number

NL2000439

Box No. I Basis of this opinion

1. This opinion has been established on the basis of the latest set of claims filed before the start of the search.
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the application as filed.
 - ☒ filed together with the application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

WRITTEN OPINION

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step, or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire application
- ☒ claims Nos. 2,11,19-40,54 (totally) and 4-10,12-18,41-53,56-65 (all in part)

because:

- ☐ the said application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require a search (*specify*):
- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 10,12 (all in part) are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

see separate sheet

- ☒ the claims, or said claims Nos. 10,12 (all in part) are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

see separate sheet

- ☒ no search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 2,11,19-40,54 (totally) and 4-10,12-18,41-53,56-65 (all in part)
- ☐ a meaningful opinion could not be formed as the sequence listing was either not available, or was not furnished in the international format (WIPO ST25).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; or such tables were not available in electronic form.
- ☐ See Supplemental Box for further details.

Box No. IV Lack of unity of invention

1. The requirement of unity of invention is not complied with for the following reasons:

see separate sheet

2. This report has been established in respect of the following parts of the application:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. (see Search Report)

WRITTEN OPINION

Box No. V Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty	Yes: Claims	1,3-10,12-18,41-53,55-65
	No: Claims	
Inventive step	Yes: Claims	1,3-10,12-18,53,55,56,65
	No: Claims	41-52,57-64
Industrial applicability	Yes: Claims	10,12-18,41-52,56-65
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

☒ Certain published documents**see the Search Report**☐ Non-written disclosures

Prior art

Reference is made to the following documents:

- D1: NUTTALL, A.: "Sound-induced cochlear ischemia/hypoxia as a mechanism of hearing loss" NOISE & HEALTH, deel 5, 1999, bladzijden 17-31, XP002501638
- D2: WO 2004/035615 A (ATUGEN AG [DE]; KLIPPEL-GIESE ANKE [DE]; KAUFMANN JOERG [DE]; SCHWARZE) 29 april 2004 (2004-04-29)
- D3: WO 2004/015107 A (ATUGEN AG [DE]; GIESE KLAUS [DE]; KAUFMANN JOERG [DE]; KLIPPEL-GIESE A) 19 februari 2004 (2004-02-19) in de aanvraag genoemd
- D4: WO 99/09046 A (QUARK BIOTECH INC [US]; KOHN KENNETH I [US]; EINAT PAZ [IL]; SKALITER) 25 februari 1999 (1999-02-25) in de aanvraag genoemd
- D5: HOLLEY ET AL: "Keynote review: The auditory system, hearing loss and potential targets for drug development" DRUG DISCOVERY TODAY, deel 10, nr. 19, 1 oktober 2005 (2005-10-01), bladzijden 1269-1282, XP005105967 ISSN: 1359-6446
- D6: SCHWARZER ROLF ET AL: "REDD1 integrates hypoxia-mediated survival signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase" ONCOGENE, deel 24, nr. 7, 10 februari 2005 (2005-02-10), bladzijden 1138-1149, XP002353260 ISSN: 0950-9232

Item III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

III.1. Present claims 10 and 12 relate to compounds which have a given desired property or effect, namely the capacity to inhibit RTP801. However, the description does not provide support and disclosure for only a few of such compounds and there is no common general knowledge of this kind available to the person skilled in the art. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of the claim. The search of claims 10 and 12 was consequently restricted to the specifically disclosed compounds having the desired property or effect (see claims 13-18), and to the broad concept of a compound having the desired property or effect.

III.2. Due to the finding of lack of unity of invention (see Item IV. *infra*), this opinion only

covers the subject-matter of claims 1,3-10,12-18,41-53 and 55-65 and as far as concerning the treatment of hearing disorders.

Item IV. Lack of unity of invention

- IV.1. This Authority considers that there are six inventions covered by the claims as indicated on the additional sheet annexed to the international search report.
- IV.2. The reasons for which the inventions are not so linked as to form a single general inventive concept are that the use of RTP801 inhibitors of all kinds (including siRNAs) have already been described in the treatment of various diseases, such as cancers, angiogenesis-related disorders or hypoxia-related disorders (see D2, D4 and D6).
- IV.3. In view of said prior art, the problem underlying present application can be defined as the provision of alternative therapeutic uses of RTP801 inhibitors. The solutions provided are the uses in treating hearing disorders, pressure sore, respiratory disorders, eye diseases, microvascular disorders or spinal cord injuries or diseases.
- IV.4. Due to the fact that the use of RTP801 inhibitors of all kinds (including siRNAs) have already been described in the treatment of various diseases (see D2, D4 and D6), that the modification patterns applied to the specific siRNAs were known as well from the prior art (see D5) and that there is no other technical feature which could be seen as a special technical feature forming a single common inventive concept between the claimed therapeutic uses, said uses have to be considered as essentially different solutions to the stated problem.

Item V. Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- V.1. The subject-matter of present claims 1,3-10,12-18,41-53 and 55-65 is new as none of the available prior art documents discloses the use of RTP801 inhibitors in the treatment of hearing disorders.

- V.2. Concerning the subject-matter of present claims 1,3-10,12-18, an inventive step can be acknowledged as none of the prior art documents links clearly and unambiguously RTP801 to hearing disorders, even though RTP801 was known from D4 to be a hypoxia-related gene and that hypoxia was one of the causes of hearing loss (see D1).
- V.3. The same applies *mutatis mutandis* to the subject-matter of claims 53,55,56 and 65 which concerns the same therapeutic use.
- V.4. The subject-matter of claims 41-52 and 57-64 concerns specific siRNAs targeting RTP801 as defined in Table D, modified forms of said siRNAs and mixtures of them with other inhibitors of RTP801. As noted *supra*, siRNAs targeting RTP801 and capable of inhibiting its expression are known from the prior art (e.g. D2 and D6). The subject-matter of said claims consists therefore merely in the selection of a number of siRNAs from the range of possible siRNAs capable of inhibiting RTP801. Such a selection can only be regarded as inventive, if the compounds present unexpected effects or properties in relation to the siRNAs known from the prior art. However, no such effects or properties are indicated in the application. Hence, no inventive step is present for the claimed siRNAs.
- V.5. The specifically claimed patterns of modifications or combinations with other RTP801 inhibitors do not add any features which would meet the requirements of inventive step, as they simply describe classical embodiments known to the skilled person (see e.g. D3).
- V.6. The claims 1,3-9,53,55 relate to a method of treatment of the human/animal body by surgery/therapy. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims.

Item VI. Certain documents cited

Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO 2006/023544	02.03.2006	16.08.2005	16.08.2004

**WRITTEN OPINION
(SEPARATE SHEET)**

Application number
NL2000439