

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 491**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 31/7115 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 31/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2004 E 04789575 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 1678194**

54 Título: **Modulación de la síntesis y degradación de hialuronano en el tratamiento de enfermedad**

30 Prioridad:

10.10.2003 AU 2003905551
01.12.2003 AU 2003906658

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.01.2014

73 Titular/es:

ALCHEMIA ONCOLOGY PTY LIMITED (100.0%)
Suite 406, Pacific Tower, 737 Burwood Road
Hawthorn, VIC 3122, AU

72 Inventor/es:

BROWN, TRACEY JEAN y
BROWNLEE, GARY RUSSELL

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 437 491 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modulación de la síntesis y degradación de hialuronano en el tratamiento de enfermedad

5 Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere en general a la modulación de la síntesis y degradación de hialuronano (HA). Más particularmente, se dan a conocer composiciones y métodos para modular la expresión de material genético que codifica para HA sintasa (HAS) y otras enzimas o receptores implicados principalmente en el metabolismo del hialuronano o para modular las proteínas que sintetizan o degradan el hialuronano incluyendo la función o actividad de HAS. Las composiciones incluyen o comprenden moléculas de ácido nucleico y moléculas de interacción tales como anticuerpos e inhibidores de molécula pequeña y análogos de sustrato de HAS. La presente invención
15 contempla además la modulación de la proliferación celular, útil en la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos inflamatorios incluyendo estados hiperproliferativos, tales como pero sin limitarse a, cáncer y psoriasis.

Descripción de la técnica anterior

20 Los detalles bibliográficos de las publicaciones a las que se hace referencia en esta memoria descriptiva se recogen también al final de la descripción.

La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no se considera, y no debe considerarse como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general en cualquier país.

Los estados inflamatorios representan un factor causante principal en numerosos trastornos médicamente significativos. La inflamación puede resultar de una gama de estímulos de fuera o de dentro del cuerpo. Sin embargo, estos estímulos desencadenan células y procesos fisiológicos dentro del entorno de un huésped. Aunque se ha emprendido una cantidad sustancial de investigación para investigar la naturaleza celular y de citocinas de los procesos inflamatorios, se sabe menos sobre otros posibles participantes en la inflamación.

Una clase de participantes de este tipo son proteínas transmembrana. Las proteínas transmembrana están implicadas en una gama de actividades de señalización y pueden tener actividad anzimática.

El metabolismo del hialuronano (HA) es un equilibrio intrincado entre la tasa de síntesis y degradación de HA en el que, dependiendo del papel fisiológico desempeñado por el HA, la síntesis y degradación simultáneas se controlan cuidadosamente. El hialuronano se sintetiza por una familia proteínas transmembrana distintas aunque relacionadas denominadas isoformas de hialuronano sintasa (HAS) HAS1, 2 y 3, que pueden distinguirse unas de otras con respecto a su expresión temporal y diferencial durante la embriogénesis del ratón y en tejidos maduros, respectivamente, y también en el peso molecular del HA producido. El HA de polisacáridos de la matriz extracelular o su forma ácida, ácido hialurónico, es un polímero de alto peso molecular, lineal compuesto por unidades de repetición de disacárido de (β 1-3) D-glucuronato-(β 1-4)N-acetil-D-glucosamina (Weissman & Meyer, J. Am. Chem. Soc. 76: 1753, 1954). El hialuronano se degrada por una familia de enzimas conocidas como hialuronidasas que se denominan actualmente HYAL1, HYAL2, HYAL3 y PH-20, que como las enzimas que producen HA también pueden distinguirse unas de otras con respecto a su expresión temporal y diferencial durante diferentes procesos fisiológicos y estados patológicos.

En el trabajo que condujo a la presente invención, se observó que HAS y HYAL se expresan de manera diferencial en diversos estados fisiológicos. En particular, se regulaban por incremento durante estados patológicos tales como un estado inflamatorio o cáncer. HAS, y en particular, HAS1, 2 y/o 3 y HYAL1, 2 y/o 3 representan dianas farmacológicas útiles.

Sumario de la invención

55 A lo largo de toda la memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento o número entero establecido o grupo de elementos o números enteros pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Se hace referencia a secuencias de nucleótidos y aminoácidos mediante un número de identificador de secuencia (SEQ ID NO:). Los SEQ ID NO: corresponden numéricamente a los identificadores de secuencia <400>1 (SEQ ID NO: 1), <400>2 (SEQ ID NO: 2), etc. Se proporciona un resumen de los números de identificador de secuencia en la tabla 1. Se proporciona una lista de secuencias tras las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a compuestos que son anticuerpos o formas recombinantes o quiméricas o

derivadas de los mismos que antagonizan la función o actividad de HAS tal como se describe en las reivindicaciones.

- 5 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. También se proporcionan composiciones farmacéuticas y otras que comprenden los compuestos de la invención objeto. También se exponen en el presente documento los compuestos de la invención para su uso en el tratamiento de un animal, particularmente un ser humano, que se sospecha que tiene o es propenso a una enfermedad o estado asociado con los niveles de HA o el gen de HAS y la expresión génica de HYAL. Tales métodos comprenden administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los compuestos o las composiciones de la presente invención al sujeto que
- 10 necesita el tratamiento o que se sospecha que necesita tratamiento profiláctico.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto aislado tal como se describe en las reivindicaciones que puede reducir el nivel de actividad hialuronano sintasa (HAS)1.

15

TABLA 1

Resumen de identificadores de secuencia

SECUENCIA ID NO:	DESCRIPCIÓN
1	Cebador sentido para HAS2 humana
2	Cebador antisentido para HAS2 humana
3	Cebador para PCINeo
4	Cebador sentido para GSP2
5	Cebador sentido para GSP4
6	Cebador sentido para HAS1
7	Cebador antisentido para HAS1
8	Cebador sentido para HAS2
9	Cebador sentido para HAS2
10	Cebador antisentido para HAS2
11	Cebador sentido para HAS2
12	Cebador sentido para HAS3
13	Cebador antisentido para HAS3
14	Cebador sentido para HAS3
15	Cebador sentido para GAPDH
16	Cebador antisentido para GAPDH
17	Cebador sentido para GAPDH
18	Cebador sentido para HYAL1
19	Cebador antisentido para HYAL1
20	Cebador sentido HYAL2
21	Cebador antisentido HYAL2
22	Cebador sentido HYAL3
23	Cebador antisentido HYAL3
24	Péptido inmunizante HAS418
25	Péptido inmunizante HAS419
26	Péptido inmunizante HAS421
27	Cebador sentido para HAS1
28	Cebador sentido para HAS2
29	Cebador sentido para HAS3
30	Cebador sentido para GAPDH
31	Cebador sentido para HYAL1
32	Cebador sentido para HYAL2
33	Cebador sentido para HYAL3
34	Cebador antisentido para HAS1
35	Cebador antisentido para HAS2
36	Cebador antisentido para HAS3
37	Cebador antisentido para GAPDH
38	Cebador antisentido para HYAL1
39	Cebador antisentido para HYAL2
40	Cebador antisentido para HYAL3
41	Sonda de hibridación para HAS1
42	Sonda de hibridación para HAS2
43	Sonda de hibridación para HAS3
44	Sonda de hibridación para GAPDH
45	Cebador sentido para HAS2

46	Cebador antisentido para HAS2
47	Cebador para pCL-neo
48	Cebador sentido GSP2
49	Cebador sentido GSP4
50	Cebador sentido Alu
51	Cebador antisentido Alu

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una representación gráfica y fotográfica de la cuantificación por RT-PCR en tiempo real de la expresión de ARNm de la familia de HAS y la inmunodetección de HAS2 en MDA-MB 231 original y transfectantes de antisentido. A: Expresión y cuantificación de ARNm para HAS2 en clones de MDA-MB 231 originales, simulados (vector pCLneo sólo) y estables de MDA MB-231 que expresan ARNm antisentido para HAS2 (ASHAS2). B: Expresión y cuantificación de HAS1 y HAS3 en originales, transfectantes simulados y transfectantes de ASHAS2. C: Inmunodetección de proteína HAS2 en MDA-MB 231 original y, D: en clones estables que expresan ARNm antisentido para HAS2. Fotografías de células originales y transfectantes de ASHAS2 a 400x aumentos. En células originales obsérvese que la periferia de la célula se tiñe positivamente para el epítipo HAS2 (flechas) que está ausente en el antisentido transfectado, panel D, E y F: Inmunorreactividad de MDA MB231 original frente a CD44 (panel E) y MDA-MB 231 transfectado antisentido (panel F). Obsérvese la falta completa de tinción de las células transfectadas antisentido.

La figura 2 es una representación gráfica de la caracterización del peso molecular de HA sintetizada y la expresión diferencial de los genes de hialuronidasa por MDA-MB 231 originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con HAS2 antisentido. A: Se sembraron células a $7,5 \times 10^5$ células en frascos de cultivo de 75 cm^2 y se hicieron crecer durante 24 h en medio completo complementado con $5 \mu\text{Ci}$ de clorhidrato de D-[6- ^3H]-glucosamina. Para determinar el PM de ^3H -HA en el medio, se sometieron las muestras a cromatografía de exclusión molecular en un Sephacryl S-1000 SF eluido en fosfato/NaCl 0,15 M pH 7,25 a 13,6 ml/h. Esta figura demuestra las diferencias en peso molecular sintetizado por MDA-MD 231 originales y sus homólogos transfectados que albergan ARNm antisentido para HAS2. B: Se analizó el ARN total extraído de MDA-MD 231 originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2 mediante RT-PCR para detectar los niveles de los genes de hialuronidasa, notablemente HYAL-1, 2 y 3. Se resolvieron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa que contiene bromuro de etidio. Entonces se sometieron los geles teñidos a análisis densitométrico para permitir la comparación de los niveles para cada gen de HYAL entre células originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2. Obsérvese que las células MDA-MD 231 tanto originales como transfectadas de manera simulada expresan niveles comparables de tanto HYAL-1 como 2 pero no expresan HYAL-2. En cambio, en células transfectadas con ASHAS2, no se expresa HYAL-2 mientras que se detectó HYAL-3 y aumentó moderadamente la expresión de HYAL-1.

La figura 3 es una representación gráfica de la cuantificación y comparación de HAS en MDA-MB 231 originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2. Se sembraron las células a $2,5 \times 10^5$ células en frascos de cultivo de 25 cm^2 y se incubaron a 37°C durante 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h y 144 h. A cada punto de tiempo se tripsinizaron las células y se contaron usando un contador Coulter automatizado. Se determinó la concentración de HA en el medio de cultivo recogido usando un ensayo de proteína de unión a ácido hialurónico (HABP), con los patrones y el tampón de reacción proporcionados por Corgenix Inc (Colorado, EE.UU.). La síntesis de HA por MDA-MB 231 originales y transfectadas de manera simulada era comparable a lo largo de la duración del experimento. En cambio, la síntesis de HA aumentó significativamente en transfectantes de ASHAS2, en los que se liberó de aproximadamente 2 a 7 veces más HA al medio de cultivo.

La figura 4 es una representación gráfica que muestra la caracterización de la proliferación celular en MDA MB 231 originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2. Se recogieron originales, transfectantes simulados y transfectantes de ASHAS2 a aproximadamente el 80% de confluencia y se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 5×10^3 células/pocillo. Entonces se siguió la tasa de crecimiento celular durante 24, 48, 72 y 96 horas tras la siembra en placa. Se determinaron todos los recuentos celulares usando un contador Coulter automatizado. Mientras que MDA-MB 231 tanto originales como transfectadas de manera simulada presentaban crecimiento celular exponencial hasta las 72 horas cuando las células se hicieron confluentes, las células transfectadas con ASHAS2 crecieron a una velocidad mucho más lenta con un periodo de "latencia" aproximado en la duplicación celular de 24 horas.

La figura 5 es una representación gráfica del efecto de la inhibición antisentido de HAS2 sobre el ciclo celular. Se sembraron las células transfectadas y control a 2×10^5 células/frasco de 25 cm^2 en presencia de timidina 2 mM y se hicieron crecer hasta el 50% de confluencia. Se lavaron las células, se devolvieron entonces al medio de cultivo normal y se recogieron, mediante tripsinización, a los siguientes puntos de tiempo; 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h, 28 h, 32 h y 36 h, entonces se fijaron en etanol al 95% p/v etanol durante 2 h a 4°C . Se trataron previamente las células con ARNasa 100 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma) y yoduro de propidio 50 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma) durante 30 minutos a 37°C antes de determinar la fase del ciclo celular en un instrumento analítico FACS-Calibur (marca comercial) (Becton

Dickinson, San Jose, CA). Panel A: población de células en G₀/G₁; panel B: en fase S y PANEL C: en fase G₂/M. Obsérvese el retraso de 24 horas de entrada en la FASE S en los transfectantes de MDA MB 231 con ASHAS2.

La figura 6 es la representación gráfica del efecto de la inhibición de HAS2 sobre el comportamiento migratorio de la línea celular MDA MD 231 altamente metastásica. Se examinó la tasa de migración de células originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas antisentido usando el ensayo de quimioinvasión de cámara de Boyden tal como se describe en materiales y métodos. Mientras que las células originales y los transfectantes simulados presentaban el 100% de migración, se inhibió la migración de células que albergaban antisentido para HAS2 en un 93%.

La figura 7 es la representación gráfica del efecto de la inhibición de HAS2 antisentido sobre la tumorigenicidad y metástasis de MDA MB 231. A: Se inocularon originales, transfectantes simulados y transfectantes de ASHAS2 en la almohadilla adiposa mamaria de ratones desnudos. Se siguió el crecimiento del tumor primario a lo largo de un periodo de 12 semanas tras la implantación tras lo cual se detectó el grado de metástasis a otros órganos usando PCR de Alu. Los ratones inoculados con MDA MB 231 originales o transfectadas de manera simulada establecieron fácilmente tumores primarios que eran comparables en crecimiento a lo largo de la duración del experimento de 12 semanas. Los ratones inoculados con MDA MB 231 originales o transfectadas de manera simulada establecieron fácilmente tumores primarios que eran comparables en crecimiento a lo largo de la duración del experimento de 12 semanas. En cambio, sin embargo, los ratones inoculados con transfectantes de ASHAS2 no establecieron tumores primarios. B: Metástasis de órganos blandos en ratones inoculados con MDA MD 231 originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas antisentido. Tal como se evaluó mediante PCR de Alu, la metástasis era lo más prevalente en cerebro y pulmón pero también se detectó en riñones y el hígado en muestras preparadas a partir de ratones a los que se les inyectaron células MDA-MD 231 o bien originales o bien transfectantes de manera simulada. No pudo encontrarse metástasis en los órganos mencionados anteriormente en ratones a los que se les inyectaron transfectantes de ASHAS2.

La figura 8 es una representación esquemática que demuestra que HAS2 y HAS3 liberan HA de alto peso molecular que se despolimeriza rápidamente. Se sembraron células MDA-MB 231 a $7,5 \times 10^5$ células/frasco de cultivo de 75 cm² y se hicieron crecer durante 24 h en medios de crecimiento que contenían $\pm$ DE 400 µg/ml y D-[6-³H]glucosamina 250 µCi. A la finalización de la incubación, se separaron y dializaron los medios y el HA asociado a células (exclusión de M_r de 5 kDa). Tras la justificación de que el Dpm no dializable era HA (tal como se determinó mediante digestión con hialuronidasa de *Streptomyces*), se sometió a cromatografía de exclusión molecular en un gel Sephacryl S-1000 eluido en tampón fosfato/NaCl 0,15 M, pH 7,25 a 13,6 ml/h. Se determinaron las diferencias en el M_r de HA liberado (figuras 1A, C, E y G) y asociado a células (figuras 1B, D, F y G) en la siguiente línea celular: (figura 1A, B) línea celular MDA-MB 453, (figura 1C, D) MDA-MB 231, (figura 1E, F) BT-549 y (figura 1G, H) Hs578T. Para calificar el HA producido por las líneas celulares, se trataron los cultivos con sulfato de dextrano 400 µg/ml (●-●) y para la identificación de productos de degradación de HA los cultivos no contenían sulfato de dextrano (○-○).

La figura 9 es una representación esquemática que demuestra la comparación del potencial invasivo de líneas celulares de cáncer de mama humanas y receptores de HA. Se examinó el potencial invasivo de las líneas celulares de mama (●-●) usando el ensayo de quimioinvasión de cámara de Boyden tal como se describe en materiales y métodos. Se expresaron las células que habían atravesado el Matrigel y diseminado sobre la superficie inferior del filtro como un porcentaje del recuento celular determinado para la línea celular Hs578T. Los datos presentados representan la media $\pm$ DE promedio de experimentos por triplicado realizados en dos días separados. Obsérvese: porcentaje de varianza entre determinaciones por triplicado < 2%. Se determinó la cuantificación de receptores de HA (A) CD44 y (B) RHAMM mediante inmunotransferencia en la que se cuantificaron bandas inmunorreactivas mediante análisis de densitometría usando el generador de imágenes ProXpress [marca comercial] Imager y se analizaron los datos usando el software Phoretix 1D.

La figura 10 son representaciones gráficas y fotográficas de la expresión de ARNm de la familia de hialuronano sintasa y la inmunodetección de HAS2 en MDA-MB 231 originales y transfectantes de antisentido, respectivamente. A: Se extrajo el ARN total de cultivos en división exponencial de MDA-MB 231 originales, transfectantes simulados y clones estables que expresaban ARNm de ASHAS2. Se cuantificó el nivel de ARNm para HAS2 mediante RT-PCR en tiempo real. B: Inmunodetección de proteína HAS2 en clones estables que expresan ARNm antisentido para HAS2 de MDA-MB 231 originales y, C: en la línea celular MDA-MB 231 original. (Barra de escala de 20 µm).

La figura 11 es una representación gráfica que compara la expresión génica de hialuronidasa por MDA-MB 231 originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con HAS2 antisentido. Se analizó el ARN total extraído de MDA-MB 231 originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2 mediante RT-PCR para detectar la presencia de los genes de hialuronidasa, HYAL-1, 2 y 3. Se resolvieron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa que contenía bromuro de etidio. Entonces se sometió el volumen de bandas en geles teñidos a análisis densitométrico para permitir la comparación de los niveles para cada expresión génica de HYAL entre células originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2. Barra negra: HYAL1; barra blanca: HYAL2; barra con trama diagonal: HYAL3. Obsérvese: porcentaje de varianza entre determinaciones por triplicado < 2%.

La figura 12 es una representación fotográfica la muestra la reactividad inmunohistoquímica de MDA-MB 231 originales y transfectantes de antisentido frente a CD44. Se hicieron reaccionar transfectantes estables subconfluentes de MDA-MB 231 que expresaban ARNm antisentido para HAS2 (A) y (B) MDA-MB 231 originales con un anticuerpo anti-CD44 humano. (Barra de escala 20 μ m).

La figura 13 es una representación gráfica de la cuantificación y comparación de la síntesis de hialuronano en MDA-MB 231 originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2. Se sembraron las células a $2,5 \times 10^5$ células en frascos de cultivo de 25 cm^2 y se incubaron a 37°C durante 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h. A cada punto de tiempo, se tripsinizaron las células y se cuantificaron usando un contador Coulter automatizado. Se determinó la concentración de HA en el medio de cultivo recogido usando un ensayo de proteína de unión a ácido hialurónico (HABP). Se expresó la síntesis de HA por MDA-MB 231 originales y transfectadas de manera simulada como HA sintetizado (pg/célula). Los datos representan el promedio de determinaciones por triplicado a cada punto de tiempo $\pm$ DE. Δ - Δ : MDA-MB 231 originales; o—o: transfectantes simulados; ■-■: transfectantes de ASHAS2.

La figura 14 es una representación gráfica de la caracterización del peso molecular de HA sintetizado por originales y transfectantes estables de MDA-MB 231 que albergan ASHAS2. Se sembraron las células a $7,5 \times 10^5$ células en frascos de cultivo de 75 cm^2 y se hicieron crecer durante 24 h en medio completo complementado con 250 μ Ci de clorhidrato de D-[6- 3 H]-glucosamina. Para determinar el PM de 3 H-HA en el medio, se sometieron las muestras a cromatografía de exclusión molecular en un Sephacryl S-1000 SF eluido en fosfato/NaCl 0,15 M pH 7,25 a 13,6 ml/h. Esta figura demuestra las diferencias en peso molecular sintetizado por MDA-MB 231 originales y sus homólogos transfectados que albergan ARNm antisentido para HAS2. Se demostró que las fracciones eluidas eran HA tal como se determinó mediante digestión con hialuronidasa de *Streptomyces*. (●-●: línea celular original; o—o: transfectantes estables de MDA-MB 231 con ASHAS2).

La figura 15 es una representación gráfica que muestra el efecto de la inhibición antisentido de HAS2 sobre la proliferación celular y el ciclo celular en MDA-MB 231 originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2. A: Se recogieron originales, transfectantes simulados y transfectantes de ASHAS2 a aproximadamente el 80% de confluencia y se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 5×10^3 células/pocillo (2,5 cm^2). Entonces se siguió la tasa de crecimiento celular durante 24, 48, 72 y 96 h tras la siembra en placa. Se determinaron todos los recuentos celulares usando un contador Coulter automatizado. Los datos representan el promedio de determinaciones por triplicado a cada punto de tiempo $\pm$ DE. ■: transfectantes estables de ASHAS2; ▲: línea celular original; O: transfectantes simulados. Obsérvese: porcentaje de varianza entre determinaciones por triplicado < 2%. B: Se sembraron las células transfectadas y control a 2×10^5 células/frasco de 25 cm^2 en presencia de timidina 2 mM y se hicieron crecer hasta el 50% de confluencia. Se recogieron las células y entonces se determinó la proporción de células en una fase de ciclo celular particular en un instrumento analítico FACS-Calibur™. B: población de células en G₀/G₁; C: en fase S y D: en fase G₂/M. Obsérvese: el retraso en 24 horas de entrada en la fase S en los transfectantes de MDA-MB 231 con ASHAS2. ■: transfectantes estables de ASHAS2; ▲: línea celular original; d: transfectantes simulados.

La figura 16 es una representación gráfica que muestra la inhibición de la invasividad *in vitro* de MDA-MB 231 que expresan ARNm antisentido para HAS2. Se examinó el potencial invasivo de células MDA-MB 231 originales, transfectadas de manera simulada (vector sólo) y transfectadas con HAS2 antisentido usando el ensayo de quimioinvasión de cámara de Boyden. Se expresaron las células que habían atravesado el Matrigel y diseminado sobre la superficie inferior del filtro como un porcentaje del recuento celular determinado para la línea celular MDA-MB 231 original. Los datos presentados representan el promedio de experimentos por triplicado realizados en dos días separados $\pm$ DE. Obsérvese: porcentaje de varianza entre determinaciones por triplicado < 2%.

La figura 17 es una representación gráfica que muestra el efecto de la inhibición antisentido de HAS2 sobre la tumorigenicidad y metástasis en MDA-MB 231. A: Se inocularon originales, transfectantes simulados y transfectantes de ASHAS2 en la almohadilla adiposa mamaria de ratones desnudos. Se siguió el crecimiento del tumor primario a lo largo de un periodo de 12 semanas registrándose la progresión tumoral dos veces a la semana. Los resultados representados gráficamente representan el volumen tumoral promedio (mm^3) $\pm$ EEM, en los que $n = 9$ -13. B: Se utilizó PCR de Alu para determinar el grado de metástasis de órganos blandos a partir de cerebro, riñón, hígado y pulmón. Los resultados se expresan como el porcentaje de ADN de tumor humano en órganos blandos de ratón, $n = 8$ por grupo.

La figura 18 es una representación gráfica que muestra el efecto de la inhibición antisentido de HAS2 sobre la metástasis y la supervivencia animal. A: Se utilizó PCR de Alu para determinar el grado de metástasis de órganos blandos tras la inoculación intracardiaca de ratones desnudos a partir de cerebro, riñón, hígado, pulmón y hueso. Los resultados se expresan como el porcentaje de ADN de tumor humano en órganos blandos de ratón, $n = 9$ por grupo. No pudo detectarse metástasis a estos órganos cuando se les había inoculado a los animales células MDA-MB 231 transfectadas con ASHAS2. B: Se representó gráficamente la tasa de supervivencia de los ratones originales, transfectantes simulados y transfectantes de ASHAS2 usando el programa Prism stats (supervivencia de Kaplan-Meier) con los días transcurridos desde las inoculaciones intracardiacas. No hubo diferencias en la tasa de supervivencia animal ($P=0,0840$) entre los ratones originales y transfectados de manera simulada. La curva de supervivencia para ASHAS2 era significativamente diferente ($P<0,0001$) con respecto a ambos grupos control.

Transfectantes de ASHAS2 de MDA-MB 231 (línea continua); línea celular original (línea de trazos cortos); transfectantes simulados (línea de trazos largos).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Se dan a conocer en el presente documento compuestos, preferiblemente nucleótidos y especies similares para su uso en la modulación de la función de HAS o la expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican para HAS y, en particular HAS1, HAS2 y/o HAS3 o una molécula de ácido nucleico requerida para o que facilita la expresión de material genético de HAS (por ejemplo una región promotora). Tal como se usa en el presente documento, la referencia a HAS incluye cualquier molécula con la misma función. En un aspecto preferido, la referencia a "HAS" incluye la referencia a las isoformas HAS1, HAS2 o HAS3. En particular, la HAS es HAS2 o HAS3. También se dan a conocer compuestos, preferiblemente nucleótidos y especies similares para su uso en la modulación de la función de HYAL o la expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican para HYAL y, en una realización particular, HYAL1, HYAL2, HYAL3 y/o PH-20, o una molécula de ácido nucleico requerida para o que facilita la expresión de material genético de HYAL (por ejemplo una región promotora). Tal como se usa en el presente documento, la referencia a HYAL incluye cualquier molécula con la misma función. Preferiblemente, la referencia a "HYAL" incluye la referencia a las isoformas HYAL1, HYAL2, HYAL3 y/o PH-20. En particular, la HYAL es HYAL1, HYAL2 o HYAL3.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse para regular por disminución la expresión de material genético de HAS y HYAL. Esto se logra proporcionando oligonucleótidos que se hibridan específicamente o interaccionan de otra forma con una o más moléculas de ácido nucleico que codifican para HAS y/o HYAL o una molécula de ácido nucleico requerida para o que facilita la expresión génica de HAS y/o HYAL. Tal como se usan en el presente documento, los términos "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico que codifica para HAS o HYAL" se han usado por conveniencia para abarcar ADN que codifica para HAS, ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm o partes del mismo) transcrito a partir de tal ADN, y también ADNc derivado de tal ARN. La hibridación o interacción de un compuesto descrito en el presente documento con un ácido nucleico diana puede abarcar selección como diana antisentido o sentido. Se hace referencia a esta última en el presente documento como supresión sentido. En consecuencia, esto proporciona inhibición antisentido o sentido. Tal inhibición antisentido o sentido se basa normalmente en la hibridación basada en enlaces de hidrógeno de hebras o segmentos de oligonucleótidos de manera que al menos una hebra o segmento se escinde, degrada o se vuelve inoperante de otra forma. Alternativamente, puede lograrse silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) usando supresión sentido (formalmente conocida como cosupresión). Aún en otra alternativa, pueden emplearse complejos que comprenden moléculas de ácido nucleico y proteínas (por ejemplo ribonucleasas) tales como iARN, ribozimas y ADNzimas.

Las moléculas de ácido nucleico diana incluyen las secuencias que codifican para HAS y HYAL, una región promotora, una región reguladora en 3' o una secuencia de nucleótidos cuya expresión facilita o inhibe la expresión génica de HAS o HYAL (por ejemplo un gen regulador, gen activador o gen indicador).

Las funciones de la molécula de ácido nucleico que va a regularse por disminución incluyen replicación, transcripción y/o traducción. Cuando la molécula de ácido nucleico es ARN, los compuestos pueden seleccionar como diana la translocación del ARN a un sitio de traducción de proteínas, la translocación del ARN a sitios dentro de la célula que están distantes del sitio de síntesis de ARN, la traducción de proteína a partir del ARN, el corte y empalme del ARN para producir una o más especies de ARN y la actividad catalítica o la formación de complejos que implica al ARN que puede entablarse o facilitarse por el ARN. Un resultado preferido de tal interferencia con la función del ácido nucleico diana es la reducción en el nivel de expresión de material genético de HAS y/o HYAL y, por tanto, los niveles de HAS y/o HYAL. La inhibición es la forma preferida de modulación de la expresión y el ARNm es el ácido nucleico diana preferido.

Tal como se hace referencia en el presente documento, "hibridación" significa el apareamiento de hebras complementarias de ácidos nucleicos. El mecanismo preferido de apareamiento implica enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, de Hoogsteen o Hoogsteen inversos, entre bases de nucleótidos o nucleósidos (nucleótidos) complementarias de las hebras de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y timina son nucleótidos complementarios que se aparean a través de la formación de enlaces de hidrógeno. Puede producirse hibridación en circunstancias variables.

Un compuesto antisentido o sentido puede hibridarse específicamente cuando la unión del compuesto con el ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana provocando una pérdida de actividad, y hay un suficiente grado de complementariedad como para evitar la unión no específica del compuesto antisentido o sentido a secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que se realizan ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

Un compuesto sentido incluye iARN u otro complejo que incluye PTGS.

Tal como se hace referencia en el presente documento, la frase "condiciones de hibridación rigurosas" o "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que un compuesto dado a conocer en el presente documento

se hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias y se determinan "condiciones rigurosas" en las que compuestos oligoméricos se hibridan con una secuencia diana por la naturaleza y composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que están investigándose.

"Complementario", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad para el apareamiento preciso entre dos nucleótidos de un compuesto oligomérico. Por ejemplo, si un nucleótido en una determinada posición de un oligonucleótido (un compuesto oligomérico) puede unirse por enlaces de hidrógeno con un nucleótido en una determinada posición de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana una molécula de ADN, ARN u oligonucleótido, entonces la posición de unión por enlaces de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera que es una posición complementaria. El oligonucleótido y la molécula de ADN, ARN u oligonucleótido adicional son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden unirse por enlaces de hidrógeno entre sí. Por tanto, "que puede hibridarse específicamente" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o complementariedad a lo largo de un número suficiente de nucleótidos de manera que se produce unión estable y específica entre el oligonucleótido y un ácido nucleico diana.

Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto antisentido o sentido no necesita ser el 100% complementaria a la de su ácido nucleico diana para poder hibridarse específicamente. Además, un oligonucleótido puede hibridarse a lo largo de uno o más segmentos de manera que segmentos adyacentes o intermedios no están implicados en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle o estructura de horquilla). Se prefiere que los compuestos antisentido o sentido descritos en el presente documento comprendan al menos el 70% de complementariedad de secuencia con una región diana dentro del ácido nucleico diana; tal como el 71, el 72, el 73, el 74, el 75, el 76, el 77, el 78, el 79, el 80, el 81, el 82, el 83, el 84, el 85, el 86, el 87, el 88, el 89, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99 o el 100% de complementariedad con la secuencia de ácido nucleico a la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido o sentido en el que 18 de 20 nucleótidos del compuesto antisentido o sentido son complementarios a una región diana, y por tanto se hibridarían específicamente, representaría un 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden estar agrupados o intercalados con nucleótidos complementarios y no es necesario que sean contiguos entre sí o a nucleótidos complementarios. Como tal, un compuesto antisentido o sentido que tiene 18 nucleótidos de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría un 77,8% de complementariedad global con el ácido nucleico diana.

El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido o sentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando los programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineación local básica, "*basic local alignment search tools*") y los programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul *et al.*, J Mol. Biol. 215: 403-410, 1990; Zhang y Madden, Genome Res. 7: 649-656, 1997).

Los compuestos para los usos descritos en el presente documento incluyen ácidos nucleicos antisentido o sentido, compuestos oligoméricos antisentido o sentido, oligonucleótidos antisentido o sentido, ribozimas, oligonucleótidos sentido, moléculas sentido de longitud completa, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), moléculas de corte y empalme alternativo, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que se hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o en horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como bucles o protuberancias internas o terminales. Una vez introducidos en un sistema, los compuestos pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la modificación del ácido nucleico diana.

Tal como se usa en el presente documento, una molécula "antisentido" o "sentido" incluye una molécula de ARN que, al unirse a una secuencia complementaria en o bien ARN o bien ADN, inhibe la función y/o la finalización de la síntesis de esta última molécula. Está implicada en diversos sistemas reguladores *in vivo*. Se han usado ARN antisentido o sentido artificiales para inhibir la traducción de moléculas de ARNm específicas tanto en células vivas (eucariotas y bacterianas) como en sistemas libres de células.

Un ejemplo no limitativo de una enzima de este tipo es la ARNasa H, una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. Se sabe en la técnica que compuestos antisentido o sentido monocatenarios que son "de tipo ADN" estimulan la ARNasa H. La activación de ARNasa H, por tanto, da como resultado la escisión de la diana de ARN, potenciando de ese modo en gran medida la eficacia de la inhibición mediada por oligonucleótidos de la expresión génica. Se han postulado papeles similares para otras ribonucleasas tales como las de la familia de enzimas de ARNasa III y ribonucleasa L.

Aunque la forma preferida de compuestos antisentido o sentido son oligonucleótidos monocatenarios, en muchas especies pueden usarse estructuras bicatenarias, tales como moléculas de ARN bicatenario (ARNbc), ARNm, moléculas de ARN de interferencia corto (ARNip) y ARNbc de longitud completa.

Los ARN de interferencia pequeños (ARNip) tienen un papel integral en el fenómeno de interferencia por ARN (iARN). En iARN, ARNbc introducidos en determinados organismos o células se degradan en fragmentos de aproximadamente 22 nucleótidos. Estas moléculas de ARNip de 22 nucleótidos se unen entonces a la parte complementaria de su ARNm diana y lo etiquetan para su degradación.

Una segunda clase ARN pequeños reguladores se denominan ARN temporales pequeños. Los ARN de *lin-4* y *let-7* de aproximadamente 22 nucleótidos son ejemplos de este grupo. Estas moléculas de ARN tienen un papel en la regulación temporal del desarrollo de *C. elegans*. Éstas se procesan inicialmente a partir de un transcrito de ARNmc de aproximadamente 70 nucleótidos plegado en una estructura de tallo-bucle. Tras el procesamiento, se cree que estos ARNtp impiden la traducción de sus ARNm diana uniéndose a las regiones no traducidas en 3' (UTR) complementarias diana. La enzima ARNasa Dicer procesa ambos tipos de ARN (Grishok *et al.* Science 287(562):2494-2497, 2000).

Tal como se usa en el presente documento, el término "compuesto oligomérico" se refiere a un polímero u oligómero que comprende una pluralidad de unidades monoméricas. Tal como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos, quimeras, análogos y homólogos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleótidos, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (estructura principal) que se producen de manera natural así como oligonucleótidos que tienen partes que no se producen de manera natural que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren a menudo por encima de las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por un ácido nucleico diana y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

Aunque pueden usarse oligonucleótidos en los métodos descritos en el presente documento, pueden usarse las otras familias de compuestos también, incluyendo pero sin limitarse a análogos y miméticos de oligonucleótidos tales como los descritos en el presente documento.

Los compuestos descritos anteriormente comprenden preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 2000 nucleótidos (es decir, desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 2000 nucleósidos unidos), por ejemplo compuestos de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1080, 1090, 1100, 1110, 1120, 1130, 1140, 1150, 1160, 1170, 1180, 1190, 1200, 1210, 1220, 1230, 1240, 1250, 1260, 1270, 1280, 1290, 1300, 1310, 1320, 1330, 1340, 1350, 1360, 1370, 1380, 1390, 1400, 1410, 1420, 1430, 1440, 1450, 1460, 1470, 1480, 1490, 1500, 1510, 1520, 1530, 1540, 1550, 1560, 1570, 1580, 1590, 1600, 1610, 1620, 1630, 1640, 1650, 1660, 1670, 1680, 1690, 1700, 1710, 1720, 1730, 1740, 1750, 1760, 1770, 1780, 1790, 1800, 1810, 1820, 1830, 1840, 1850, 1860, 1870, 1880, 1890, 1900, 1910, 1920, 1930, 1940, 1950, 1960, 1970, 1980, 1990 ó 2000 nucleótidos de longitud.

Se considera que compuestos antisentido o sentido de 10-2000 nucleótidos de longitud que comprenden un tramo de al menos diez (10) tal como 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 nucleótidos consecutivos seleccionados de los compuestos antisentido o sentido ilustrativos son compuestos antisentido o sentido adecuados también.

Los compuestos antisentido o sentido preferidos a modo de ejemplo incluyen secuencias de oligonucleótido que comprenden al menos los 10 nucleótidos consecutivos del extremo 5' terminal de uno de los compuestos antisentido o sentido preferidos ilustrativos (siendo los nucleótidos restantes un tramo consecutivo del mismo oligonucleótido que comienza inmediatamente en el sentido de 5' del extremo 5' terminal del compuesto antisentido o sentido que puede hibridarse específicamente con el ácido nucleico diana y que continúa hasta que el oligonucleótido contiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 2000 nucleótidos). Compuestos antisentido o sentido preferidos de manera similar se representan por secuencias de oligonucleótido que comprenden al menos los 10 nucleótidos consecutivos del extremo 3' terminal de uno de los compuestos antisentido o sentido preferidos ilustrativos (siendo los nucleótidos restantes un tramo consecutivo del mismo oligonucleótido que comienza inmediatamente en el sentido de 3' del extremo 3' terminal del compuesto antisentido o sentido que puede hibridarse específicamente con el ácido nucleico diana y que continúa hasta que el oligonucleótido contiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 2000 nucleótidos). Un experto en la técnica provisto de los compuestos antisentido o sentido preferidos ilustrados en el presente documento podrá identificar, sin excesiva experimentación, compuestos antisentido o sentido preferidos adicionales.

También se hace referencia a compuestos candidatos en el presente documento como compuestos "líder". En la presente descripción, el ácido nucleico diana codifica para HAS o HYAL o es un gen requerido para la expresión génica de HAS o HYAL. Tal como se indicó anteriormente, el término "HAS" incluye las isoformas HAS1, HAS2 y

HAS3. Se prefieren particularmente HAS2 y HAS3. Tal como se indicó anteriormente, el término "HYAL" incluye las isoformas HYAL1, HYAL2, HYAL3 y PH-20. Se prefieren particularmente HYAL1, HYAL2 y HYAL3.

El proceso de selección como diana también incluye habitualmente la determinación de al menos una región, segmento o sitio diana dentro del ácido nucleico diana para que se produzca la interacción antisentido o sentido de manera que resultará el efecto deseado, por ejemplo, reducir la expresión. Tal como se hace referencia en el presente documento, el término "región" se define como una parte del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de ácidos nucleicos diana están los segmentos. Los "segmentos" se definen como regiones más pequeñas o subpartes de regiones dentro de un ácido nucleico diana. Los "sitios", tal como se usa en el presente documento, se definen como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

Puesto que, tal como se conoce en la técnica, el codón de iniciación de la traducción es normalmente 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcritas; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción se denomina también "codón AUG", el "codón de inicio" o el "codón de inicio AUG". Una minoría de genes tienen un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y se ha mostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan *in vivo*. Por tanto, los términos "codón de iniciación de la traducción" y "codón de inicio" pueden abarcar muchas secuencias de codón, aún cuando el aminoácido iniciador en cada caso es normalmente metionina (en eucariotas). Se sabe también en la técnica que los genes eucariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos; uno cualquiera de los cuales puede utilizarse preferentemente para la iniciación de la traducción en un tipo celular o tejido particular, o en un conjunto particular de condiciones. Tal como se usa en el presente documento, "codón de inicio" y "codón de iniciación de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un ARNm transcrito a partir de un gen que codifica para HAS, independientemente de la(s) secuencia(s) de tales codones. Se sabe también en la técnica que un codón de terminación de la traducción (o "codón de parada") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

Los términos "región de codón de inicio" y "región de codón de iniciación de la traducción" se refieren a una parte de un ARNm o gen de este tipo que abarca desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') a partir de un codón de iniciación de la traducción. De manera similar, los términos "región de codón de parada" y "región de codón de terminación de la traducción" se refieren a una parte de un ARNm o gen de este tipo que abarca desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') a partir de un codón de terminación de la traducción. En consecuencia, la "región de codón de inicio" (o "región de codón de iniciación de la traducción") y la "región de codón de parada" (o "región de codón de terminación de la traducción") son todas regiones que pueden seleccionarse como diana eficazmente con los compuestos antisentido o sentido descritos en el presente documento.

El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que se sabe en la técnica que se refiere a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción, es también una región que puede seleccionarse como diana eficazmente. Una región preferida es la región intragénica que abarca el codón de iniciación o terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

Otras regiones diana incluyen la región no traducida en 5' (5'UTR), que se sabe en la técnica que se refiere a la parte de un ARNm en la dirección 5' a partir del codón de iniciación de la traducción, y que incluye por tanto los nucleótidos entre el sitio de caperuza 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm (o los nucleótidos correspondientes en el gen), y la región no traducida en 3' (3'UTR), que se sabe en la técnica que se refiere a la parte de un ARNm en la dirección 3' a partir del codón de terminación de la traducción, y que incluye por tanto los nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm (o los nucleótidos correspondientes en el gen). El sitio de caperuza 5' de un ARNm comprende un residuo de guanosina metilado en N7 unido al residuo más en 5' del ARNm mediante un enlace trifosfato 5'-5'. Se considera que región de caperuza en 5' de un ARNm incluye la propia estructura de caperuza 5' así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio de caperuza. También se prefiere seleccionar como diana la región de caperuza en 5'.

Aunque algunos transcritos de ARNm eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", que se cortan de un transcrito antes de que se traduzca. Las regiones restantes (y por tanto traducidas) se conocen como "exones" y se cortan y empalman de manera alternativa juntas formando una secuencia de ARNm continua. La selección como diana de los sitios de corte y empalme alternativo, es decir, uniones intrón-exón o uniones exón-intrón, también puede ser particularmente útil en situaciones en las que está implicado en la enfermedad un corte y empalme alternativo aberrante, o cuando está implicado en la enfermedad una sobreproducción de un producto de corte y empalme alternativo particular. Uniones de fusión aberrantes debidas redistribuciones o delecciones también son sitios diana preferidos. Los transcritos de ARNm producidos mediante el proceso de corte y empalme alternativo de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes génicas se conocen como "transcritos de fusión". Se sabe también que los intrones pueden seleccionarse como diana eficazmente usando compuestos antisentido o sentido dirigidos a, por ejemplo, ADN o pre-ARNm.

Se sabe también en la técnica que pueden producirse transcritos de ARN alternativos a partir de la misma región genómica de ADN. Estos transcritos alternativos se conocen generalmente como “variantes”. Más específicamente, “variantes de pre-ARNm” son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que difieren de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de o bien inicio o bien parada y contienen secuencias tanto intrónicas como exónicas.

Tras el corte de una o más regiones de exón o intrón, o partes de las mismas durante el corte y empalme alternativo, las variantes de pre-ARNm producen “variantes de ARNm” más pequeñas. En consecuencia, las variantes de ARNm son variantes de pre-ARNm procesadas y cada variante de pre-ARNm única debe producir siempre una variante de ARNm única como resultado del corte y empalme alternativo. Estas variantes de ARNm se conocen también como “variantes de corte y empalme alternativo”. Si no se produce corte y empalme alternativo de la variante de pre-ARNm, entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

Se sabe también en la técnica que pueden producirse variantes a través del uso de señales alternativas para iniciar o parar la transcripción y que pre-ARNm y ARNm pueden presentar más de un codón de inicio o codón de parada. Las variantes que se originan a partir de pre-ARNm o ARNm que usan codones de inicio alternativos se conocen como “variantes de inicio alternativas” de ese pre-ARNm o ARNm. Los transcritos que usan un codón de parada alternativo se conocen como “variantes de parada alternativas” de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de parada alternativa es la “variante de poliA” en la que los múltiples transcritos producidos resultan de la selección alternativa de una de las “señales de parada de poliA” por la maquinaria de transcripción, produciendo de ese modo transcritos que terminan en sitios de poliA únicos.

Los tipos de variantes descritas en el presente documento son también ácidos nucleicos diana preferidos.

Las ubicaciones en el ácido nucleico diana en las que se hibridan los compuestos antisentido o sentido preferidos se denominan continuación en el presente documento “segmentos diana preferidos”. Tal como se usa en el presente documento, el término “segmento diana preferido” se define como una parte de al menos 10 nucleótidos de una región diana a la que se dirige un compuesto antisentido o sentido activo. Sin querer restringirse a la teoría, actualmente se cree que estos segmentos diana representan partes del ácido nucleico diana que son accesibles para la hibridación.

Aunque se exponen las secuencias específicas de determinados segmentos diana preferidos en el presente documento, un experto en la técnica reconocerá que éstas sirven para ilustrar y describir realizaciones particulares. Un experto habitual puede identificar segmentos diana preferidos adicionales.

Se considera que segmentos diana de 10-2000 nucleótidos de longitud que comprenden un tramo de al menos diez (10) nucleótidos consecutivos seleccionados de los segmentos diana preferidos ilustrativos son adecuados para la selección como diana también.

Los segmentos diana pueden incluir secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 8 nucleótidos consecutivos del extremo 5' terminal de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los nucleótidos restantes un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que comienza inmediatamente en el sentido de 5' del extremo 5' terminal del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 2000 nucleótidos). De manera similar, se representan segmentos diana preferidos por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 10 nucleótidos consecutivos del extremo 3' terminal de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los nucleótidos restantes un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que comienza inmediatamente en el sentido de 3' del extremo 3' terminal del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 2000 nucleótidos). Un experto en la técnica provisto de los segmentos diana preferidos ilustrados en el presente documento podrá identificar, sin excesiva experimentación, segmentos diana preferidos adicionales.

Una vez que se han identificado una o más regiones, segmentos o sitios diana, se eligen compuestos antisentido o sentido que son suficientemente complementarios con la diana, es decir, se hibridan lo suficientemente bien y con suficiente especificidad como para proporcionar el efecto deseado, es decir, reducir la expresión génica de HAS y/o HYAL o los niveles de HAS y/o HYAL.

Los “segmentos diana preferidos” identificados en el presente documento pueden emplearse en una selección de compuestos adicionales que modulan la expresión del gen de HAS y/o HYAL. “Moduladores” son los compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica para HAS y/o HYAL y que comprenden una parte de al menos 10 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana preferido. El método de selección comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica para HAS y/o HYAL con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica para HAS y/o HYAL. Una vez que se muestra que el modulador o moduladores candidatos pueden modular (por ejemplo o bien disminuir o bien aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica para HAS y/o

HYAL, entonces puede emplearse el modulador en estudios de investigación adicionales de la función de HAS y/o HYAL, o para su uso como agente de investigación, diagnóstico o terapéutico.

Los segmentos diana preferidos también pueden combinarse con sus compuestos antisentido o sentido complementarios respectivos tal como se describe en el presente documento formando oligonucleótidos bicatenarios (dúplex) estabilizados.

Se ha mostrado en la técnica que tales restos oligonucleotídicos bicatenarios modulan la expresión de la diana y regulan la traducción así como el procesamiento del ARN mediante un mecanismo antisentido o sentido. Además, los restos bicatenarios pueden someterse a modificaciones químicas (Fire *et al.*, Nature 391: 806,811, 1998; Timmons y Fire, Nature 395: 854, 1998; Timmons *et al.*, Gene 263: 103-112, 2001; Tabara *et al.*, Science 282: 430-431, 1998; Montgomery *et al.*, 1998, citado anteriormente; Tuschl *et al.*, Genes Dev. 13: 3191-3197, 1999; Elbashir *et al.*, Nature, 411: 494-498, 2001, Elbashir *et al.*, Genes Dev. 15: 188-200, 2001). Por ejemplo, se ha mostrado que tales restos bicatenarios inhiben la diana mediante la hibridación clásica de la hebra antisentido o sentido del dúplex con la diana, desencadenando de ese modo la degradación enzimática de la diana (Tijsterman *et al.*, 2002, citado anteriormente).

Tal como se indicó anteriormente, se dan a conocer en el presente documento moléculas de interacción específicas para una HAS, incluyendo una o más de HAS1, 2 y/o 3 y que modifican la función o actividad de HAS. Se dan a conocer además moléculas de interacción específicas para una HYAL, incluyendo una o más de HYAL1, HYAL2, HYAL3 y/o PH-20 y que modifican la función o actividad de HYAL.

Se dan a conocer en el presente documento antagonistas de la función o actividad de HAS y/o HYAL. Tales antagonistas son útiles en la reducción de los efectos de HAS y/o HYAL y por tanto en la reducción o elevación de los niveles de HA.

El término "antagonista" incluye una molécula de HAS y/o HYAL o sustrato de HAS y/o HYAL modificado así como sus homólogos o equivalente químico o análogos. Preferiblemente, abarca moléculas de interacción tales como anticuerpos e inhibidores de molécula pequeña.

Las moléculas de interacción tales como pero sin limitarse a anticuerpos y otras inmunoglobulinas incluyen fragmentos, derivados, partes de unión a antígeno, formas recombinantes, formas quiméricas así como formas desinmunizadas incluyendo humanizadas de las mismas dirigidas a los moduladores e inhibidores de molécula pequeña objeto.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a anticuerpos que se unen, interaccionan o se asocian de otra forma con HAS y/o HYAL y que reducen la función o actividad de HAS y/o HYAL.

En particular, la presente invención proporciona un compuesto aislado que reduce el nivel de actividad de hialuronano sintasa (HAS)1 siendo dicho compuesto un anticuerpo específico para una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 25 ó 26.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales, aunque se prefieren anticuerpos monoclonales. Generalmente, los anticuerpos están en forma aislada, homogénea o completa o parcialmente purificada.

Los anticuerpos también pueden ser humanizados o quiméricos o son anticuerpos humanos adecuados para su administración a seres humanos. Estos incluyen anticuerpos humanizados preparados, por ejemplo, a partir de anticuerpos monoclonales murinos y anticuerpos monoclonales humanos que pueden prepararse, por ejemplo, usando ratones transgénicos tal como se describe a continuación, o mediante presentación en fago. Un anticuerpo "humanizado" incluye un anticuerpo desinmunizado.

Se generan anticuerpos contra una HAS tal como HAS1, 2 ó 3 o partes inmunogénicas de la misma o moléculas homólogas inmunológicamente y son específicas para un aminoácido seleccionado SEQ ID NO: 25 ó 26.

La referencia a un "anticuerpo" o "anticuerpos" incluye la referencia a todas las diversas formas de anticuerpos, incluyendo pero sin limitarse a: anticuerpos completos (por ejemplo que tienen una región Fc intacta), incluyendo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales; fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo, por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂; anticuerpos humanizados; anticuerpos humanos (por ejemplo, producidos en animales transgénicos o a través de presentación en fago); y polipéptidos derivados de inmunoglobulinas producidos a través de técnicas de ingeniería genética. A menos que se especifique lo contrario, los términos "anticuerpo" o "anticuerpos" y tal como se usan en el presente documento abarcan tanto anticuerpos completos como fragmentos de unión a antígeno de los mismos

A menos que se establezca lo contrario, especificidad con respecto a un anticuerpo de la presente invención pretende significar que el anticuerpo se une sustancialmente sólo a su antígeno diana sin unión apreciable a

proteínas no relacionadas. Sin embargo, es posible que un anticuerpo se diseñe o se seleccione para unirse a dos o más proteínas relacionadas. Una proteína relacionada incluye diferentes variantes de corte y empalme alternativo o fragmentos de la misma proteína o proteínas homólogas de diferentes especies. Se considera todavía que tales anticuerpos tienen especificidad por esas proteínas y se abarcan por la presente invención. El término "sustancialmente" significa en este contexto que no hay unión detectable a un antígeno no diana por encima de los niveles basales, es decir, no específicos.

Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse mediante procedimientos bien conocidos. Véanse, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet *et al.* (eds.), Plenum Press, Nueva York (1980); y *Antibodies; A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

Un método para producir un anticuerpo de la presente invención comprende inmunizar un animal no humano, tal como un ratón o un ratón transgénico, con HAS o partes inmunogénicas de la misma mediante lo cual se generan anticuerpos dirigidos contra la molécula de HAS o partes inmunogénicas en dicho animal. Los expertos en la técnica conocen bien diversos medios de aumento de la antigenicidad de un inmunógeno particular, tal como administrando adyuvantes o antígenos conjugados, que comprenden el antígeno contra el que se desea una respuesta de anticuerpos y otro componente, y pueden utilizarse. Las inmunizaciones implican normalmente una inmunización inicial seguida por una serie de inmunizaciones de refuerzo. Puede extraerse sangre de los animales y someterse a ensayo el suero para determinar el título de anticuerpos. Los animales pueden reforzarse hasta la meseta del título. Pueden prepararse conjugados en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. Además, se usan adecuadamente agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria.

Pueden producirse anticuerpos tanto policlonales como monoclonales mediante este método. Los métodos para obtener ambos tipos de anticuerpos se conocen bien en la técnica. Se prefieren menos los anticuerpos policlonales pero son relativamente fáciles de preparar mediante inyección en un animal de laboratorio adecuado de una cantidad eficaz de una molécula de HAS, o partes inmunogénicas de la misma, recogiendo el suero del animal y aislando anticuerpos específicos frente a la molécula de HAS mediante cualquiera de las técnicas de inmunoadsorción conocidas. Los anticuerpos producidos mediante esta técnica están generalmente menos favorecidos, debido al potencial de heterogeneidad del producto.

El uso de anticuerpos monoclonales se prefiere particularmente debido a la capacidad para producirlos en grandes cantidades y la homogeneidad del producto. Pueden producirse anticuerpos monoclonales mediante procedimientos convencionales.

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen de manera natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraposición a preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen normalmente anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo tal como está obteniéndose a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que se requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos usando por ejemplo las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628, 1991 y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991.

También se describe en el presente documento un método para producir una línea celular de hibridoma que comprende inmunizar un animal no humano, tal como un ratón o un ratón transgénico, con una HAS o partes inmunogénicas de la misma; recoger células de bazo del animal inmunizado; fusionar las células de bazo recogidas con una línea celular de mieloma para generar células de hibridoma; e identificar una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a una HAS

Los anticuerpos monoclonales frente a HAS producidos por los mismos que son específicos para una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 25 ó 26 se abarcan por la presente invención. Se purifican los anticuerpos monoclonales secretados por la línea celular de hibridoma mediante técnicas convencionales. Los hibridomas o los anticuerpos monoclonales producidos por los mismos pueden seleccionarse adicionalmente para identificar anticuerpos monoclonales con propiedades particularmente deseables.

La molécula de HAS o parte inmunogénica de la misma que puede usarse para inmunizar animales en las fases iniciales de la producción de los anticuerpos de la presente invención puede ser de cualquier fuente de mamífero.

Pueden producirse fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos de la presente invención mediante técnicas convencionales. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, incluyendo fragmentos Fv de cadena sencilla (denominados sFv o scFv). También se contemplan para su uso según la presente invención fragmentos de anticuerpos y derivados producidos mediante técnicas de ingeniería genética, tales como fragmentos Fv estabilizados por puentes disulfuro (dsFv), moléculas de dominio de región variable de cadena sencilla (Abs), minicuerpos y diacuerpos.

Pueden prepararse tales fragmentos y derivados de anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas de HAS y seleccionarse por sus propiedades deseadas, mediante técnicas conocidas, incluyendo los ensayos descritos en el presente documento. Determinadas técnicas implican aislar ADN que codifica para una cadena polipeptídica (o una parte de la misma) de un AcM de interés, y manipular el ADN a través de tecnología de ADN recombinante. El ADN puede fusionarse con otro ADN de interés, o alterarse (por ejemplo mediante mutagénesis u otras técnicas convencionales) para añadir, delecionar o sustituir uno o más residuos de aminoácido, por ejemplo.

Puede aislarse ADN que codifica para polipéptidos de anticuerpos (por ejemplo cadena pesada o ligera, región variable sólo o longitud completa) a partir de células B de ratones que se han inmunizado con moléculas de HAS. El ADN puede aislarse usando procedimientos convencionales. La presentación en fago es otro ejemplo de una técnica conocida mediante la cual pueden prepararse derivados de anticuerpos. En un enfoque, se expresan polipéptidos que son componentes de un anticuerpo de interés en cualquier sistema de expresión recombinante adecuado, y se deja que los polipéptidos expresados se ensamblen para formar moléculas de anticuerpo.

Pueden formarse anticuerpos de cadena sencilla uniendo fragmentos de región variable de cadena pesada y ligera (región Fv) mediante un puente de aminoácidos (ligador peptídico corto), dando como resultado una única cadena polipeptídica. Tales Fv de cadena sencilla (scFv) se han preparado fusionando ADN que codifica para un ligador peptídico entre ADN que codifican para los dos polipéptidos de región variable (VL y VH). Los fragmentos de anticuerpos resultantes pueden formar dímeros o trímeros, dependiendo de la longitud de un ligador flexible entre los dos dominios variables (Kortt *et al.*, Protein Engineering 10: 423, 1997). Las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla incluyen las descritas en la patente estadounidense n.º 4.946.778; Bird (Science 242: 423, 1988), Huston *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879, 1988) y Ward *et al.* (Nature 334: 544, 1989). Se abarcan por la presente invención anticuerpos de cadena sencilla derivados de los anticuerpos proporcionados en el presente documento.

En una realización, la presente invención proporciona fragmentos de anticuerpos o formas químicas, recombinantes o sintéticas de los anticuerpos de la presente invención que se unen a una HAS tal como HAS1, 2 y/o 3, siendo el anticuerpo específico para una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 25 ó 26.

Se conocen técnicas para derivar un anticuerpo de una subclase o isotipo diferente de un anticuerpo de interés, es decir, cambio de subclase. Por tanto, pueden derivarse anticuerpos monoclonales de IgG1 o IgG4 de un anticuerpo monoclonal de IgM, por ejemplo, y viceversa. Tales técnicas permiten la preparación de nuevos anticuerpos que presentan propiedades de unión a antígeno de un anticuerpo dado (el anticuerpo original), pero también presentan propiedades biológicas asociadas con un isotipo o subclase de anticuerpo diferente de el del anticuerpo original. Pueden emplearse técnicas de ADN recombinante. Puede emplearse ADN clonado que codifica para polipéptidos de anticuerpos particulares en tales procedimientos, por ejemplo ADN que codifica para la región constante de un anticuerpo del isotipo deseado.

El procedimiento de producción monoclonal descrito anteriormente puede usarse en animales, por ejemplo ratones, para producir anticuerpos monoclonales. Se sabe que anticuerpos convencionales derivados de tales animales, por ejemplo anticuerpos murinos, no son generalmente adecuados para su administración a seres humanos ya que pueden provocar una respuesta inmunitaria. Por tanto, puede ser necesario modificar tales anticuerpos con el fin de proporcionar anticuerpos adecuados para su administración a seres humanos. Se conocen bien en la técnica procedimientos para preparar anticuerpos químicos y/o humanizados y se describen en detalle adicional a continuación.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "químicos" en los que el dominio variable de la cadena pesada y/o ligera es idéntico a u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie no humana (por ejemplo, murina), mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son idéntica(s) a u homóloga(s) a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de seres humanos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente estadounidense n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984).

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos químicos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por CDR correspondientes de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene las propiedades deseadas, por ejemplo especificidad y afinidad. En algunos casos, se reemplazan residuos de regiones de entramado de la

inmunoglobulina humana por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador.

Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones determinantes de complementariedad corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los residuos de la región de entramado son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véanse Jones *et al.*, Nature 321:522,525, 1986; Reichmann *et al.*, Nature 332:323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992; Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84; 3439, 1987; Larrick *et al.*, Bio/Technology 7 934, 1989; y Winter y Harris, TIPS 14: 139, 1993.

Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo dado pueden identificarse fácilmente, por ejemplo, usando el sistema descrito por Kabat *et al.* en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, publicación de los NIH n.º 91-3242, 1991).

Se han desarrollado procedimientos para generar anticuerpos humanos en animales no humanos y los conocen bien los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse ratones transgénicos en los que se ha introducido material genético que codifica para una o más cadenas de inmunoglobulina humana para producir los anticuerpos de la presente invención. Los anticuerpos producidos en los animales incorporan cadenas polipeptídicas de inmunoglobulina humana codificadas por el material genético humano introducido en el animal. Se describen ejemplos de técnicas para la producción y el uso de tales animales transgénicos en las patentes estadounidenses n.ºs 5.814.318, 5.569.825 y 5.545.806.

Otro método para generar anticuerpos humanos es la presentación en fago. Los expertos en la técnica conocen bien técnicas de presentación en fago para generar anticuerpos humanos, e incluyen los métodos usados por compañías tales como Cambridge Antibody Technology y MorphoSys y que se describen en las publicaciones de patente internacional n.ºs WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213 y WO 93/11236.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden aplicarse también en las áreas de descubrimiento de fármacos y validación de dianas. Los compuestos y segmentos diana preferidos identificados en el presente documento pueden usarse en esfuerzos de descubrimiento de fármacos para dilucidar las relaciones que existen entre HA, HAS o HA/HAS y HA, HYAL o la interacción HA/HYAL y un estado patológico, fenotipo o estado. Estos métodos incluyen detectar o modular HAS y/o HYAL que comprende poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos descritos en el presente documento, medir el nivel de ácido nucleico o proteína de HAS y/o HYAL y/o un criterio de valoración químico o fenotípico relacionado a algún tiempo después del tratamiento, y opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o una muestra tratada con un compuesto adicional descrito en el presente documento. Estos métodos pueden realizarse también en paralelo a o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el procedimiento de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, estado o fenotipo particular.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse como agentes terapéuticos para tratar a sujetos que padecen enfermedades y trastornos asociados con HA. En particular, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en la reducción del nivel y/o actividad de HAS en un sujeto. Los sujetos tratados usando las composiciones y los compuestos de la presente invención incluyen cualquier animal que pueda beneficiarse de tal tratamiento. Estos incluyen, sin limitación, seres humanos, titís, orangutanes y gorilas, ganado (por ejemplo vacas, ovejas, cerdos, caballos, asnos), animales de prueba de laboratorio (por ejemplo ratones, ratas, cobayas, hámsteres, conejos), animales de compañía (por ejemplo gatos, perros) y animales salvajes capturados (por ejemplo roedores, zorros, ciervos, canguros). Un huésped particularmente preferido es un ser humano, primate o ganado.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden utilizarse para agentes de diagnóstico, terapéuticos, de profilaxis y como kits y reactivos de investigación. Además, los expertos en la técnica usan a menudo oligonucleótidos antisentido o sentido o anticuerpos frente a HAS y/o HYAL que pueden inhibir la expresión génica o la actividad de HAS y/o HYAL con especificidad exquisita, para dilucidar la función de genes particulares o productos génicos o para distinguir entre las funciones de diversos miembros de una ruta biológica.

Para su uso en kits y agentes de diagnóstico, los compuestos descritos en el presente documento, o bien solos o bien en combinación con otros compuestos o agentes terapéuticos, pueden usarse como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para dilucidar los patrones de expresión de una parte o todo el complemento de genes expresados dentro de células y tejidos.

Como ejemplo no limitativo, se comparan los patrones de expresión dentro de células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido o sentido con células o tejidos control no tratados con compuestos antisentido o sentido

y los patrones producidos se analizan para determinar niveles diferenciales de expresión génica según correspondan, por ejemplo, a asociación con una enfermedad, ruta de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. En otro ejemplo, se realizan experimentos similares con anticuerpos frente a HAS. Estos análisis pueden realizarse en células estimuladas o no estimuladas y en presencia o ausencia de otros compuestos que afectan a los patrones de expresión.

Los ejemplos de métodos de análisis de la expresión génica conocidos en la técnica incluyen alineamientos o microalineamientos de ADN (Brazma y Vilo, FEBS Lett, 480: 17-24, 2000; Celis *et al.*, FEBS Lett. 480: 2-16, 2000), SAGE (análisis en serie de la expresión génica, "*serial analysis of gene expression*") (Madden *et al.*, Drug Discov. Today 5: 415-425, 2000), READS (amplificación por enzimas de restricción de ADNc digeridos, "*restriction enzyme amplification of digested cDNAs*") (Prashar y Weissman, Methods Enzymol. 303: 258-272, 1999), TOGA (análisis de la expresión génica total, "*total gene expression analysis*") (Sutcliffe *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 1976-1981, 2000), alineamientos de proteínas y proteómica (Celis *et al.* 2000, citado anteriormente; Jungblut *et al.*, Electrophoresis 20: 2100-2110, 1999), secuenciación de etiqueta de secuencia expresada ("*expressed sequence tag*", EST) (Celis *et al.*, 2000, citado anteriormente; Larsson *et al.*, J. Biotechnol. 80: 143-157, 2000), obtención del perfil de ARN sustractivo ("*subtractive RNA fingerprinting*", SuRF) (Fuchs *et al.*, Anal. Biochem. 286: 91-98, 2000; Larson *et al.*, Cytometry 41: 203-208, 2000), clonación sustractiva, presentación diferencial ("*differential display*" DD) (Jurecic y Belmont, Curr. Opin. Microbiol. 3: 316-321, 2000), hibridación genómica comparativa (Carulli *et al.*, J. Cell Biochem. Supl. 31: 286-296, 1998), técnicas de FISH (hibridación fluorescente *in situ*, "*fluorescent in situ hybridation*") (Going y Gusterson, Eur. J. Cancer, 35: 1895-1904, 1999) y métodos de espectrometría de masas (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 3: 235-241, 2000).

Los compuestos descritos en el presente documento son útiles para investigación y diagnóstico, porque estos compuestos se hibridan con ácidos nucleicos que codifican para HAS o HYAL o se unen a la propia HAS o HYAL. Por ejemplo, oligonucleótidos que se muestra que se hibridan con tal eficacia y en tales condiciones que se dan a conocer en el presente documento que son inhibidores de HAS o HYAL eficaces de inhibidores de la expresión génica de HAS o HYAL serán también cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o la detección, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en métodos que requieren la detección específica de moléculas de ácido nucleico que codifican para HAS o HYAL y en la amplificación de dichas moléculas de ácido nucleico para la detección o para el uso en estudios adicionales de HAS o su gen. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido o sentido, particularmente los cebadores y sondas, descritos en el presente documento con un ácido nucleico que codifica para HAS o HYAL puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Tales medios pueden incluir conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcaje del oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. De manera similar, pueden marcarse anticuerpos con moléculas indicadoras incluyendo enzimas y radiomarcadores para fines de obtención de imágenes, fines de diagnóstico o fines cuantitativos. También pueden prepararse kits que usan tales medios de detección para detectar el nivel de HAS o HYAL en una muestra.

Los expertos en la técnica también pueden aprovechar la especificidad y sensibilidad de compuestos antisentido o sentido o anticuerpos para usos terapéuticos. Tales compuestos se han empleado como restos terapéuticos en el tratamiento de estados patológicos en animales, incluyendo seres humanos.

Para usos terapéuticos, un animal, preferiblemente un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión del gen de HAS y/o HYAL se trata administrando compuestos antisentido o sentido descritos en el presente documento. Alternativamente, pueden usarse anticuerpos para inhibir la actividad de HAS y/o HYAL. Por ejemplo, los métodos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la expresión génica de HAS y/o HYAL. Los inhibidores de la expresión génica de HAS o HYAL inhiben eficazmente la actividad de la proteína HAS y/o HYAL o inhiben la expresión del gen de HAS y/o HYAL. En una realización, la actividad o expresión de HAS o su gen en un animal se inhibe en aproximadamente el 10%. Preferiblemente, la actividad o expresión de HAS y/o HYAL o su gen en un animal se inhibe en aproximadamente el 30%. Más preferiblemente, la actividad o expresión de HAS y/o HYAL o su gen en un animal se inhibe en el 50% o más.

Por ejemplo, la reducción de la expresión del gen de HAS y/o HYAL puede medirse en suero, tejido adiposo, células cutáneas, hígado o cualquier otro fluido corporal, tejido u órgano del animal. Preferiblemente, las células contenidas dentro de dichos fluidos, tejidos u órganos que están analizándose contienen una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína HAS y/o HYAL.

También se proporcionan métodos de selección de compuestos que comprenden, por ejemplo, poner en contacto un compuesto candidato con material genético que codifica para HAS y/o HYAL incluyendo ARNm o la propia HAS o HYAL. El procedimiento de selección incluye someter a ensayo (i) la presencia de un complejo entre el fármaco y HAS y/o HYAL o material genético que codifica para la misma o (ii) una alteración en los niveles de expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican para la HAS y/o HYAL. También pueden seleccionarse células completas para determinar la interacción entre la célula y el fármaco.

Una forma de ensayos implica ensayos de unión competitiva. En tales ensayos de unión competitiva, el compuesto

candidato o HAS y/o HYAL está normalmente marcado. Se separa HAS y/o HYAL libre de cualquier supuesto completo y la cantidad de marcador libre (es decir, no complejo) es una medida de la unión del agente que está sometido a prueba a la molécula diana. Puede medirse también la cantidad de HAS y/o HYAL unida, en vez de libre. También es posible marcar el compuesto en vez de HAS o HYAL y medir la cantidad de compuesto que se une a HAS o HYAL en presencia y en ausencia del compuesto que está sometido a prueba. Tales compuestos pueden inhibir HAS y/o HYAL lo que es útil, por ejemplo, en el hallazgo de inhibidores de la expresión génica o, alternativamente, pueden potenciar la inhibición de HAS y/o HYAL.

Otra técnica para la selección de fármacos proporciona la selección de alto rendimiento de compuestos que tienen afinidad de unión adecuada por una diana y se describe en detalle en Geysen (publicación de patente internacional n.º WO 84/03564). En resumen, se sintetizan grandes números de diferentes compuestos de prueba peptídicos pequeños sobre un sustrato sólido, tal como clavijas de plástico o alguna otra superficie. Se hacen reaccionar los compuestos de prueba peptídicos con HAS y/o HYAL y se lavan. Entonces se detectan las moléculas de HAS y/o HYAL unidas mediante métodos bien conocidos en la técnica. Este método puede adaptarse para seleccionar entidades químicas no peptídicas. Esto se extiende a enfoques combinatorios para seleccionar antagonistas o agonistas de HAS y/o HYAL.

Puede recubrirse directamente HAS y/o HYAL purificada directamente sobre placas para su uso en la técnica de selección de fármacos mencionada anteriormente. Sin embargo, también pueden usarse anticuerpos no neutralizantes frente a la diana para inmovilizar la diana sobre la fase sólida.

Otro grupo útil de compuestos es un mimético. Un mimético en este contexto se refiere a una sustancia que tiene alguna similitud química con el sustrato de HAS y/o HYAL pero que antagoniza la actividad de HAS y/o HYAL. Un mimético puede ser un hidrato de carbono o péptido o molécula química que imita a elementos de estructura secundaria (Johnson *et al.*, "Peptide Turn Mimetics" en *Biotechnology and Pharmacy*, Pezzuto *et al.*, Eds., Chapman and Hall, Nueva York, 1993). El motivo subyacente detrás del uso de miméticos es que la estructura principal del sustrato de HAS y/o HYAL existe principalmente para orientar el sustrato de una manera tal que se facilitan las interacciones moleculares con HAS y HYAL. Se diseña un mimético para permitir interacciones moleculares similares a la molécula natural. Miméticos peptídicos o no peptídicos pueden ser útiles, por ejemplo, para inhibir la actividad de HAS y/o HYAL.

El diseño de miméticos para un compuesto farmacéuticamente activo es un enfoque conocido para el desarrollo de productos farmacéuticos basados en un compuesto "líder". Esto podría ser deseable cuando el compuesto activo es difícil o caro de sintetizar o cuando no es adecuado para un método de administración particular. El diseño, la síntesis y las pruebas de miméticos se usan generalmente para evitar seleccionar aleatoriamente grandes números de moléculas para una propiedad deseada.

Hay varias etapas comúnmente seguidas en el diseño de un mimético a partir de un compuesto que tiene una propiedad deseada dada. En primer lugar, se determinan las partes particulares del compuesto que son críticas y/o importantes en la determinación de la propiedad deseada. En el caso de un péptido, esto puede realizarse variando sistemáticamente los residuos de aminoácido en el péptido, por ejemplo, sustituyendo cada residuo sucesivamente. Se usan comúnmente exploraciones de alanina de péptidos para refinar tales motivos peptídicos. Estas partes o residuos que constituyen la región activa del compuesto se conocen como "farmacóforo".

Una vez que se ha encontrado el farmacóforo, se modela su estructura según sus propiedades físicas, por ejemplo estereoquímica, uniones, tamaño y/o carga, usando datos de una gama de fuentes, por ejemplo técnicas espectroscópicas, datos de difracción de rayos x y RMN. Pueden usarse análisis computacional, mapeo de similitud (que modela la carga y/o volumen de un farmacóforo, en vez de las uniones entre átomos) y otras técnicas en este procedimiento de modelado.

En una variante de este enfoque, se modelan la estructura tridimensional del ligando y su pareja de unión. Esto puede ser especialmente útil cuando el ligando y/o la pareja de unión cambian de conformación al unirse, permitiendo que el modelo tenga en cuenta esto en el diseño del mimético. Puede usarse el modelado para generar inhibidores que interaccionan con la secuencia lineal o una configuración tridimensional.

Se selecciona entonces una molécula molde sobre la que pueden injertarse grupos químicos que imitan el farmacóforo. La molécula molde y los grupos químicos injertados sobre la misma pueden seleccionarse convenientemente de modo que el mimético sea fácil de sintetizar, sea probablemente aceptable farmacológicamente y no de degrade *in vivo*, mientras que conserva la actividad biológica del compuesto líder. Alternativamente, cuando el mimético es peptídico, puede lograrse estabilidad adicional ciclando el péptido, lo que aumenta su rigidez. El mimético o miméticos encontrados mediante este enfoque pueden seleccionarse entonces para observar si tienen la propiedad diana, o en qué grado la presentan. Entonces puede llevarse a cabo optimización o modificación adicional para llevar a uno o más miméticos finales para pruebas clínicas o *in vivo*.

El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptidos de interés biológicamente activos o de moléculas pequeñas con las que interaccionan (por ejemplo, agonistas, antagonistas,

inhibidores o potenciadores) con el fin de diseñar fármacos que, por ejemplo, son más activos o formas estables del polipéptido o que, por ejemplo, potencian o interfieren con la función de un polipéptido *in vivo*. Véase, por ejemplo Hodgson (Bio/Technology 9: 19-21, 1991). En un enfoque, se determina la estructura tridimensional de HAS y/o HYAL de interés mediante cristalografía de rayos x, mediante modelado por ordenador o lo más normalmente mediante una combinación de enfoques. También puede obtenerse información útil referente a la estructura de un polipéptido mediante modelado basado en la estructura de proteínas homólogas. Un ejemplo de diseño racional de fármacos es el desarrollo de inhibidores de la proteasa de VIH (Erickson *et al.*, Science 249: 527-533, 1990). Además, pueden analizarse moléculas diana mediante una exploración de alanina (Wells, Methods Enzymol. 202: 2699-2705, 1991). En esta técnica, se reemplaza un residuo de aminoácido por Ala y se determina su efecto sobre la actividad del péptido. Cada uno de los residuos de aminoácido del péptido se analiza de esta manera para determinar las regiones importantes del péptido.

También es posible aislar un anticuerpo específico para HAS y/o HYAL, seleccionado mediante un ensayo funcional y entonces resolver su estructura cristalina. En principio, este enfoque produce un farmacóforo sobre el que puede basarse el diseño de fármaco posterior. Es posible sortear la cristalografía de proteínas completamente generando anticuerpos anti-idiotípicos (anti-id) frente a un anticuerpo funcional, farmacológicamente activo. Como imagen especular de una imagen especular, se esperaría que el sitio de unión de los anti-id fuese un análogo del receptor original. El anti-id podría usarse entonces para identificar y aislar péptidos a partir de bancos de péptidos producidos química o biológicamente. Entonces los péptidos seleccionados actuarían como el farmacóforo.

También es útil la selección de dos híbridos en la identificación de otros miembros de una ruta genética o bioquímica asociada con una diana. La selección de dos híbridos usa convenientemente *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe*. Pueden llevarse a cabo interacciones de dianas y selecciones de inhibidores usando el sistema de dos híbridos de levaduras, que se aprovecha de factores transcripcionales que están compuestos por dos dominios funcionales, físicamente separables. El más comúnmente usado es el activador transcripcional GAL4 de levaduras que consiste en un dominio de unión a ADN y un dominio de activación de la transcripción. Se usan dos vectores de clonación diferentes para generar fusiones separadas de los dominios de GAL4 a genes que codifican para posibles proteínas de unión. Las proteínas de fusión se expresan conjuntamente, se dirigen al núcleo y si se producen interacciones, la activación de un gen indicador (por ejemplo *lacZ*) produce un fenotipo detectable. En el presente caso, por ejemplo, se transforma conjuntamente *S. cerevisiae* con una biblioteca o vector que expresa una fusión de ADNc-dominio de activación de GAL4, y un vector que expresa un gen diana tal como, por ejemplo, el gen de HAS o HYAL fusionado a GAL4. Si se usa *lacZ* como gen indicador, la expresión conjunta de las proteínas de fusión producirá un color azul. Moléculas pequeñas u otros compuestos candidatos que interaccionan con una diana darán como resultado pérdida de color las células. Puede hacerse referencia a los sistemas de dos híbridos de levaduras tal como se da a conocer por Munder *et al.* (Appl. Microbiol. Biotechnol. 52(3): 311-320, 1999) y Young *et al.*, Nat. Biotechnol. 16(10): 946-950, 1998). Las moléculas así identificadas mediante este sistema vuelven a someterse a prueba en células animales.

Tal como se indicó anteriormente, se dan a conocer en el presente documento inhibidores de molécula pequeña identificados tal como se describió anteriormente y que se unen e inhiben la actividad de HAS y/o HYAL.

Debe entenderse que a menos que se indique lo contrario, la invención objeto no se limita a formulaciones específicas de componentes, métodos de fabricación, regímenes de dosificación, protocolos de tratamiento o similares, ya que tales pueden variar. Debe entenderse también que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares sólo y no pretende ser limitativa.

Debe indicarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva objeto, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen aspectos en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un compuesto" incluye un único compuesto, así como dos o más compuestos; la referencia a "un anticuerpo" incluye un único anticuerpo, así como dos o más anticuerpos; y así sucesivamente.

Los términos "compuesto", "agente activo", "agente farmacológicamente activo", "medicamento", "activo" y "fármaco" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un antagonista de la función o actividad de HAS y/o HYAL o de la expresión de material genético que codifica para lo mismo que induce un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado tal como, pero sin limitarse a controlar la inflamación y reducir el crecimiento del cáncer. Los términos también abarcan el principio farmacéuticamente aceptable y farmacológicamente activo de los agentes activos mencionados específicamente en el presente documento incluyendo pero sin limitarse a sales, ésteres, amidas, profármacos, metabolitos activos, análogos y similares. Cuando se usan los términos "compuesto", "agente activo", "agente farmacológicamente activo", "medicamento", "activo" y "fármaco", entonces debe entenderse que esto incluye el agente activo *per se* así como sales, ésteres, amidas, profármacos, metabolitos, análogos, etc. farmacéuticamente aceptables, farmacológicamente activos. El término "compuesto" no debe interpretarse como un compuesto químico sino que se extiende a ARN y ADN que codifica para una molécula de LIF modificada.

Los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" del compuesto tal como se usan en el presente documento significan una cantidad suficiente del agente para proporcionar el efecto terapéutico o fisiológico deseado tal como inhibir la inflamación o reducir el crecimiento o la diseminación de células cancerosas. Algunas veces se

manifiestan efectos no deseados, por ejemplo efectos secundarios junto con el efecto terapéutico deseado; por tanto, un profesional sanitario equilibra los posibles beneficios frente a los posibles riesgos al determinar lo que es una "cantidad eficaz" apropiada. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, el modo de administración y similares. Por tanto, puede no ser posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, un experto habitual en la técnica puede determinar una "cantidad eficaz" apropiada en cualquier caso individual usando sólo experimentación de rutina. Los usos dados a conocer en el presente documento se extienden a métodos de tratamiento o profilaxis.

Por portador, excipiente o diluyente "farmacéuticamente aceptable" quiere decirse un vehículo farmacéutico compuesto por un material que no es indeseable biológicamente o de otra forma, es decir, el material puede administrarse a un sujeto junto con el agente activo seleccionado sin provocar ninguna reacción adversa o una reacción adversa sustancial. Los portadores pueden incluir excipientes y otros aditivos tales como diluyentes, detergentes, agentes colorantes, agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, conservantes, y similares.

De manera similar, una sal, éster, amida, profármaco o derivado de un compuesto "farmacológicamente aceptable" tal como se proporciona en el presente documento es una sal, éster, amida, profármaco o derivado que no es indeseable biológicamente o de otra forma.

Los términos "tratar" y "tratamiento" tal como se usan en el presente documento se refieren a la reducción de la gravedad y/o frecuencia de los síntomas de enfermedades o trastornos o a la eliminación de estados fisiológicos de síntomas y/o una causa subyacente, a la prevención de la aparición de síntomas de enfermedad y/o su causa subyacente y a la mejora o remediación de estados asociados con actividad de citocinas.

"Tratar" a un paciente puede implicar la prevención del trastorno o estado patológico o acontecimiento fisiológico en un individuo susceptible así como el tratamiento de un individuo clínicamente sintomático inhibiendo una enfermedad o trastorno.

Por consiguiente, también se da a conocer en el presente documento una composición terapéutica o profiláctica que comprende un compuesto que puede reducir los niveles o actividad de HAS y/o HYAL y por tanto reducir los niveles de HA.

Las composiciones y los compuestos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con HA. La presente invención contempla el tratamiento de enfermedades y trastornos tales como A-Beta-lipoproteinemia, A-V, A Beta-2-microglobulin amiloidosis, A-T, A1AD, A1AT, Aagenaes, síndrome de Aarskog, síndrome de Aarskog-Scott, síndrome de Aase-Smith, síndrome de Aase, AAT, síndrome de Abderhalden-Kaufmann-Lignac, síndrome de deficiencia muscular abdominal, defecto de pared abdominal, epilepsia abdominal, migraña abdominal, disfonía espasmódica del abductor, disfonía espástica del abductor, síndrome de Abercrombie, síndrome de Ablepharon-macrostomia, ABS, ausencia de HPRT, ausencia de cuerpo calloso de tipo Schinzel, defecto de ausencia de extremidades, cuero cabelludo y cráneo, ausencia de menstruación primaria, ausencia de HGPR, hiperoxaluria absorbente entérica, enfermedad de Abt-Letterer-Siwe, ACADL, deficiencia de ACADM, ACADM, ACADS, trastorno de acantocitosis-neurológico, acantocitosis, acantolisis bullosa, acantosis nigricans, acantosis bullosa, acantosis nigricans con resistencia a la insulina de tipo B, nevus acantótico, acatalasemia, acatalasia, ACC, rutas atrioventriculares accesorias, rutas atrioventriculares accesorias, acefalia, ACF con defectos cardíacos, acalasia, síndrome de Achard-Thiers, ACHARD (variante de Marfan), síndrome de Achard, ictericia ictericia, acondrogénesis, acondrogénesis de tipo IV, acondrogénesis de tipo III, acondroplasia, acondroplasia tarda, enanismo acondroplásico, síndrome de Achoo, acromat, acromatopo, acromatopico, acromatopsia, nevus acrómicos, deficiencia de ceramidasasa ácida, deficiencia de maltasa ácida, deficiencia de maltasa ácida, deficiencia de Beta-glucosidasa ácida, acidemia metilmalónica, acidemia propiónica, acidemia con debilidad y ataxia episódica, acidosis, aclasis tarsoepifisaria, ACM, neurilemoma acústico, neuroma acústico, ACPS con hipoplasia de las piernas, ACPS II, ACPS IV, ACPS III, afasia adquirida con trastorno convulsivo, síndrome de Brown adquirido, afasia epiléptica adquirida, deficiencia de factor XIII adquirida, forma adquirida de ACC (provocada por infección mientras está todavía en el útero), hiperoxaluria adquirida, hipogammaglobulinemia adquirida, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), sobrecarga de hierro adquirida, lipodistrofia adquirida, lipodistrofia parcial adquirida, bazo errante adquirido, ACR, disostosis acral con anomalías faciales y genitales, acro-renal, síndrome acrocalloso de tipo Schinzel, acrocefalosindactilia, acrocefalosindactilia de tipo I, acrocefalosindactilia de tipo I subtipo I, acrocefalopolisindactilia de tipo II, acrocefalopolisindactilia de tipo III, acrocefalopolisindactilia de tipo IV, acrocefalosindactilia V (ACS5 o ACS V) subtipo I, asimetría del cráneo por acrocefalia y sindactilia leve, acrocefalia, acrocondrohiperplasia, acrodermatitis enteropática, acrodisostosis, neuropatía acrodistrófica, neuropatía acrodistrófica, disostosis acrofacial de tipo Nager, disostosis acrofacial de tipo Nager, disostosis acrofacial de tipo postaxial, disostosis acrofacial de tipo Genee-Wiedep, acrogeria familiar, acromegalia, acromelalgia hereditaria, displasia acromesomélica, enanismo acromesomélico, displasia esquelética acromérica, displasia acromérica, acroosteólisis con osteoporosis y cambios en el cráneo y la mandíbula, acroosteólisis, acroparestesia, ACS I, ACS de tipo II, ACS de tipo III, ACS, ACS3, deficiencia de ACTH, mioclonos de acción, síndrome de neuritis braquial aguda, síndrome de radiculitis braquial aguda, enfermedad de Gaucher cerebral aguda, colangitis aguda, encefalomielopatía diseminada aguda,

histiocitosis X diseminada aguda, polioencefalitis hemorrágica aguda, polineuritis idiopática aguda, polineuritis de
 mediación inmunitaria aguda, esclerosis cerebral de Pelizaeus-Merzbacher infantil aguda, porfiria intermitente
 aguda, porfirias agudas, sarcoidosis aguda, neuritis en el hombro aguda, epidermólisis tóxica aguda, deficiencia de
 5 acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta, acil-CoA
 dihidroxiacetona aciltransferasa, deficiencia de acil-coenzima A oxidasa, ADA, deficiencia de ADA, complejo de
 Adam, síndrome de Adamantiades-Behcet's, adamantinoma, síndrome de Adams Oliver, colitis adaptiva, ADD de
 tipo combinado, ADD, enfermedad de Addison con esclerosis cerebral, anemia de Addison, anemia de Addison,
 10 enfermedad de Addison, enfermedad de Addison, enfermedad de Addison, anemia de Addison-Biermer, anemia de
 Addison-Biermer, enfermedad de Addison-Schilder, anemia perniciosa addisoniana, anemia perniciosa addisoniana,
 pulgares aducidos-retraso mental, disfonía espasmódica del abductor, disfonía espástica del abductor, virilismo
 asociado con adenoma de mujeres ancianas, adenomatosis del colon y el recto, poliposis adenomatosa del colon,
 poliposis adenomatosa familiar, deficiencia de adenosina desaminasa, deficiencia de adenosina desaminasa,
 15 deficiencia de adenilo succinasa, ADHD predominantemente de tipo hiperactivo-impulsivo, ADHD
 predominantemente de tipo distraído, ADHD, aracnoiditis adhesiva, síndrome de Adie, síndrome de Adie, pupila
 tónica de Adie, pupila de Adie, polidactilia pigmentaria por retinitis adipogenital, síndrome de retinitis pigmentaria
 adipogenital, adiposis dolorosa, adiposis dolorosa, distrofia adiposogenital, cistinosis en el adolescente, ADPKD,
 adenoma de corteza suprarrenal, enfermedad suprarrenal, hiperfunción suprarrenal resultante de exceso de ACTH
 epifisaria, hipoplasia suprarrenal, insuficiencia suprarrenal, neoplasma suprarrenal, virilismo suprarrenal, virilismo
 20 suprarrenal, síndrome de adreno-retinitis pigmentaria-polidactilia, insuficiencia adrenocortical, hipofunción
 adrenocortical, deficiencia de hormona adrenocorticotropa aislada, síndrome adrenogenital, síndrome adrenogenital,
 adrenoleucodistrofia, adrenomieloneuropatía, síndrome de adreno-retinitis pigmentaria-polidactilia, cistinosis del
 adulto, dermatomiositis del adulto, hipofosfatasa del adulto, degeneración de la mácula lútea de la retina del adulto,
 ALD de aparición en el adulto, ceroidosis de aparición en el adulto, enfermedad quística medular de aparición en el
 25 adulto, anemia perniciosa de aparición en el adulto, anemia perniciosa de aparición en el adulto, enfermedad de
 Schindler de aparición en el adulto, encefalomielopatía necrotizante subaguda de aparición en el adulto, anemia
 perniciosa de aparición en el adulto, enfermedad de riñón poliquístico del adulto, enfermedad quística medular de
 aparición en el adulto, deficiencia de adenilosuccinato liasa, AE, síndrome de AEC, AFD, AFD, afibrinogenemia,
 siderosis africana, AGA, megacolon agangliónico, degeneración macular relacionada con la edad, agenesia de la
 30 comisura magna del cerebro, agenesia del cuerpo calloso, agenesia del cuerpo calloso-espasmos infantiles-
 anomalías oculares, agenesia del cuerpo calloso y anomalía coriorretiniana, agenesia del cuerpo calloso-anomalía
 por coriorretinitis, mastocitosis agresiva, agnosia primaria, tríada de AGR, AGU, agiria, espectro de bandas de agiria-
 paquigiria, AHC, AHD, AHDS, deficiencia de AHF, deficiencia de AHG, AHO, Ahumada Del Castillo, síndrome de
 Aicardi, síndrome de Aicardi, AIED, AIMP, AIP, AIS, AIS, convulsiones acinéticas, porfiria de ALA-D, alactasia,
 35 alactasia, síndrome de Alagille, enfermedad ocular de la isla de Aland (ligada al cromosoma X), alaninuria,
 enfermedad de Albers-Schonberg, albinismo, albinismo, albinismo, albinoidismo, osteodistrofia hereditaria de
 Albright, alcaptonuria, Alcaptonuria, defectos del nacimiento relacionados con el alcohol, embriopatía alcohólica, Ald,
 ALD, ALD, aldosterona, aldosteronismo con tensión arterial normal, síndrome de Aldrich, enfermedad de Alexander,
 enfermedad de Alexanders, algodistrofia, algoneurodistrofia, alcaptonuria, ocronosis alcaptonúrica, deficiencia de
 40 alquil DHAP sintasa, síndrome de Allan-Herndon-Dudley, síndrome de Allan-Herndon, retraso mental de Allan-
 Herndon-Dudley, antitis granulomatosa alérgica, angiitis granulomatosa alérgica de Cronkhite-Canada,
 haloprosencefalia de Alobar, alopecia areata, alopecia areata, alopecia celsi, alopecia cicatrizada, alopecia
 circumscripta, alopecia-poliosis-uveítis-vitiligo-sordera-cutánea-Uveo-O, alopecia seminiversalis, alopecia totalis,
 alopecia universalis, enfermedad de Alpers, enfermedad de Alpers, degeneración difusa de Alpers de la materia gris
 45 cerebral con cirrosis hepática, poliostrosis infantil progresiva de Alpers, deficiencia de alfa-1-antitripsina, deficiencia
 de alfa-1 4 glucosidasa, deficiencia de alfa-1 4 glucosidasa, deficiencia de alfa-galactosidasa A, deficiencia de alfa-
 galactosidasa B, deficiencia de alfa-1 4 glucosidasa, deficiencia de lipoproteína de alta densidad alfa, fucosidosis por
 deficiencia de alfa-L-fucosidasa de tipo 3, deficiencia de alfa-GalNAc de tipo Schindler, deficiencia de alfa-1 4
 glucosidasa, fucosidosis por deficiencia de alfa-L-fucosidasa de tipo 3, alfalipoproteinemia, mannosidosis alfa,
 50 deficiencia de alfa-N-acetilgalactosaminidasa de tipo Schindler, deficiencia de alfa-NAGA de tipo Schindler,
 deficiencia de alfa-neuraminidasa, síndrome de alfa-talasemia/retraso mental de tipo sin delección,
 alfalipoproteinemia, síndrome de Alport, ALS, síndrome de Alstroem, Alstroem, síndrome de Alstrom, síndrome de
 hemiplejía alternante, hemiplejía alternante de la infancia, enfermedad de Alzheimer, idiocia familiar amaurótica,
 idiocia familiar amaurótica, idiocia familiar amaurótica del adulto, idiocia infantil familiar amaurótica, idiocia infantil
 55 familiar amaurótica, genitalia ambigua, AMC, AMD, ameloblastoma, amelogénesis imperfecta, amenorrea-
 galactorrea no puerperal, síndrome de amenorrea-galactorrea-disminución de FSH, amenorrea, trastornos de
 aminoácidos, síndrome de aminoaciduria-osteomalacia-hiperfosfatúria, AMN, AMN, amniocentesis, amniocentesis,
 bandas amnióticas, síndrome de bandas amnióticas, complejo de alteración de bandas amnióticas, secuencia de
 bandas amnióticas, secuencia de ruptura amniótica, amputación congénica, AMS, síndrome de enano de
 Amsterdam de Lange, deficiencia de amilo-1 6-glucosidasa, artropatía amiloide de hemodiálisis crónica, distrofia
 60 corneal amiloide, polineuropatía amiloide, amiloidosis, amiloidosis de fiebre mediterránea familiar, amilopectinosis,
 amioplasia congénita, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral amiotrófica-
 cuerpos de poliglucosano, AN, AN 1, AN 2, atresia anal, membrana anal, malformaciones anales rectales,
 malformaciones anales recales, estenosis anal, amiloidosis de analina 60, analfalipoproteinemia, anal-rectal, anal-
 rectal, Anal-rectal, astrocitoma anaplásico, enfermedad de Andersen, enfermedad de Anderson-Fabry, glucogenosis
 65 de Andersen, síndrome de Anderson-Warburg, síndrome de Andre, síndrome de Andre de tipo II, insensibilidad a
 andrógenos, síndrome de insensibilidad a andrógenos parcial, síndrome de insensibilidad a andrógenos, síndrome

de insensibilidad a andrógenos parcial, esteroides androgénicos, anemia autoinmunitaria hemolítica, anemia de Blackfan Diamond, anemia congénita, síndrome de pulgar trifalángico, anemia hemolítica de anticuerpos fríos, anemia hemolítica de anticuerpos fríos, anemia hemolítica con deficiencia de PGK, anemia perniciosa, anencefalia, síndrome de Angelman, síndrome de angio-osteohipertrofia, hiperplasia de ganglios linfáticos angiofoliculares, angiohemofilia, angioqueratoma corporis, angioqueratoma corporis diffusum, angioqueratoma difuso, angiomas de la retina, linfoide angiomatoso, edema angioneurótico hereditario, displasia ectodérmica anhidrótica, displasias ectodérmicas ligadas al cromosoma X anhidróticas, aniridia, aniridia-genitalia ambigua-retraso mental, aniridia asociada con retraso mental, aniridia-ataxia cerebelar-deficiencia mental, aniridia parcial-ataxia cerebelar-retraso mental, aniridia parcial-ataxia cerebelar-oligofrenia, aniridia de tipo I, aniridia de tipo II, asociación de aniridia-tumor de Wilms, aniridia-tumor de Wilms-gonadoblastoma, anquiloblastoma-defectos ectodérmicos-fisura labio/palatina, espondilitis anquilosante, espondilitis anquilosante, estrías anulares, anodoncia, anodoncia, anodoncia vera, tricromasia anómala, displasia anómala de la dentina, displasia de la dentina coronal, afasia anómica, anoftalmia, anorrectal, malformaciones anorrectales, anosmia, arqueamiento anterior de las piernas con enanismo, distrofia corneal de la membrana anterior, síndrome anticonvulsivante, deficiencia de anticuerpo anti-antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr (EBNA), deficiencia de anticuerpos, deficiencia de anticuerpos con inmunoglobulinas casi normales, deficiencia de factor antihemofílico, deficiencia de globulina antihemofílica, síndrome de antifosfolípidos, síndrome de antifosfolípidos, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, deficiencia de antitrombina III, deficiencia de antitrombina III clásica (tipo I), deficiencia de antitripsina, síndrome de Antley-Bixler, parálisis de Antoni, ansiedad tibialis, síndrome de arco aórtico, atresia aórtica y mitral con síndrome de corazón izquierdo hipoplásico, estenosis aórtica, estenosis aórtica, aparosquiasis, APC, síndrome de APECED, síndrome de Apert, Aperts, afasia, aplasia axial extracortical congénita, aplasia cutis congénita, aplasia cutis congénita con defectos de las extremidades transversales terminales, anemia aplásica, anemia aplásica con anomalías congénitas, APLS, apnea, amiloidosis de tipo apalachiano, síndrome de Apple Peel, apraxia, apraxia, apraxia bucofacial, apraxia construccional, apraxia ideacional, apraxia ideocinética, apraxia ideomotora, apraxia motora, apraxia oculomotora, APS, aracnitis, aracnodactilia contractural de tipo Beals, aracnodactilia, quistes aracnoides, aracnoiditis osificante, aracnoiditis, Aran-Duchenne, atrofia muscular de Aran-Duchenne, anemia arregenerativa, deficiencia de arginasa, argininemia, deficiencia de arginino succinasa, deficiencia de argininosuccinasa, deficiencia de argininosuccinato liasa, ácido argininosuccínico liasa-ASL, deficiencia de ácido argininosuccínico sintetasa, aciduria argininosuccínica, síndrome de Argonz-Del Castillo, arinencefalia, síndrome de Armenia, malformación de Arnold-Chiari, síndrome de Arnold-Chiari, ARPKD, miclono arritmico, displasia ventricular derecha arritmogénica, displasia arteriohepática, malformación arteriovenosa, malformación arteriovenosa, malformación arteriovenosa del cerebro, arteritis de células gigantes, artritis, artritis uretrítica, artro-dento-osteodisplasia, artro-oftalmopatía, artrocalasia múltiple congénita, artrogriposis múltiple congénita, artrogriposis múltiple congénita, distal, tipo IIA, ARVD, deficiencia de arilsulfatasa-B, deficiencia de AS, AS, AS, AS, ASA; parálisis ascendente, ASD, defectos atrioseptales, ASH, síndrome de Ashermans, amiloidosis de tipo Ashkenazi, deficiencia de ASL, aspartilglucosaminuria, aspartilglucosaminuria, síndrome de Asperger, autismo de tipo Asperger, displasia torácica asfíxica, síndrome de Asplenia, deficiencia de ASS, asma, astrocitoma de grado I (benigno), astrocitoma de grado II (benigno), facies asimétricas con llanto con defectos cardíacos, hipertrofia septal asimétrica, agenesia callosa asimétrica, deficiencia de AT, AT III, AT III variante IA, AT III variante Ib, AT 3, ataxia, ataxia telangiectasia, ataxia telangiectasia, ataxia con acidosis láctica de tipo II, parálisis cerebral atáxica, ataxiadinamia, ataxiofemia, ATD, parálisis cerebral atetoide, eccema atópico, atresia de esófago con o sin fístula traqueoesofágica, defectos del tabique auricular, defecto primario del tabique auricular, defecto del tabique auricular y tabique ventricular pequeño, aleteo auricular, fibrilación auricular, displasia atriodigital, defectos atrioseptales, bloqueo atrioventricular, defecto del canal atrioventricular, defecto del tabique atrioventricular, defecto del tabique atrioventricular, atrofia bulbosa hereditaria, beriberi atrófico, atrofia olivopontocerebelar, trastorno de déficit de atención, trastornos de déficit de atención con hiperactividad, poliposis coli adenomatosa atenuada, amiloidosis atípica, hiperfenilalaninemia atípica, hiperfenilalaninemia atípica, atresia del canal auditivo, síndrome auriculotemporal, autismo, autismo de tipo Asperger, autismo, demencia, ataxia y pérdida intencionada del uso de la mano, autismo infantil, enfermedad de Addison autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, Poliendocrinopatía-autoinmunitaria-candidiasis, enfermedad poliglandular autoinmunitaria de tipo I, albinismo dominante autosómico, síndrome de estallido heliooftálmico apremiante dominante autosómico, miopatía distal de desmina dominante autosómica con aparición tardía, EDS dominante autosómica, distrofia muscular de Emery-Dreifuss dominante autosómica, queratocono dominante autosómico, esclerosis cerebral de Pelizaeus-Merzbacher dominante autosómica, enfermedad de riñón poliquístico dominante autosómica, degeneración espinocerebelar dominante autosómica, agammaglobulinemia recesiva autosómica, miopatía centronuclear recesiva autosómica, síndrome de Conradi-Hunermann recesivo autosómico, EDS recesiva autosómica, distrofia muscular de Emery-Dreifuss recesiva autosómica, formas de albinismo ocular recesivas autosómicas, agenesia del cuerpo calloso de herencia recesiva autosómica, queratocono recesivo autosómico, enfermedad de riñón poliquístico recesiva autosómica, inmunodeficiencia combinada grave recesiva autosómica, AV, AV, AVM, AVSD, AWT, absceso de axila, neuropatía axonal gigante, enfermedad neurológica de las Azores, síndrome de B-K Mole, síndrome de Babinski-Froelich, BADS, síndrome de Baillarger, enfermedad de Balkan, síndrome de Baller-Gerold, dilatación de la válvula mitral, esclerosis concéntrica de enfermedad de Baló, epilepsia mioclónica báltica, síndrome de Bannayan-Zonana (BZS), síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, enfermedad de Banti, síndrome de Bardet-Biedl, síndrome de linfocito desnudo, síndrome de Barlow, enfermedad de Barraquer-Simons, esófago de Barrett, úlcera de Barrett, síndrome de Barth, síndrome de Barth, síndrome de Barter, síndrome de nevus celular basal, enfermedad de Basedow, síndrome de Bassen-Kornzweig, enfermedad de Batten, síndrome

de Batten-Mayou, enfermedad de Batten-Spielmeyer-Vogt, síndrome de Batten Turner, miopatía congénita de tipo Batten Turner, síndrome de Batten-Vogt, síndrome de BBB, síndrome de BBB (Opitz), síndrome de BBB, síndrome de BBBG, deficiencia de BCKD, BD, BDLS, BE, síndrome de Beals, síndrome de Beals, síndrome de Beals-Hecht, síndrome de Bean, BEB, BEB, síndrome de Bechterew, enfermedad de Becker, distrofia muscular de Becker, 5 distrofia muscular de Becker, nevus de Becker, síndrome de Beckwith Wiedemann, síndrome de Beckwith, síndrome de Begnez-Cesar, síndrome de Behcet, enfermedad Behcet, enfermedad Behcet, Behr 1, Behr 2, parálisis de Bell, acantosis nigricans benigna, astrocitoma benigno, tumores de nervios craneales benignos, cistinosis benigna, blefarospasmo esencial benigno, temblor esencial benigno, hematuria familiar benigna, amiotrofia focal benigna, amiotrofia focal benigna de ALS, hidrocefalo benigno, síndrome de hipermovilidad benigno, queratosis nigricans 10 benigna, peritonitis paroxismal benigna, hematuria recurrente benigna, colestasis intrahepática recurrente benigna, atrofia muscular espinal benigna con hipertrofia de las pantorrillas, lipomatosis simétrica benigna, tumores benignos del sistema nervioso central, síndrome de Berardinelli-Seip, enfermedad de Berger, beriberi, síndrome de Berman, síndrome de Bernard-Horner, síndrome de Bernard-Soulier, prurigo de Besnier, enfermedad de Best, Beta-alanina-piruvato aminotransferasa, síndrome de Morquio de deficiencia de Beta-galactosidasa, deficiencia de Beta-glucuronidasa, defectos de la Beta oxidación, defectos de la Beta oxidación, Beta talasemia mayor, Beta talasemia menor, deficiencia de betalipoproteína, miopatía de Betlem, síndrome de Beuren, deficiencia de BH4, deficiencia de 15 BH4, distrofia corneal de Biber-Haab-Dimmer, válvula aórtica bicúspide, válvula aórtica bicúspide, Biedl-Bardet, cráneo bifido, deficiencia enzimática bifuncional, neurofibromatosis acústica bilateral, neuroma acústico bilateral, secuencia de dextroisomerismo bilateral, agenesia renal bilateral, trastorno del lóbulo temporal bilateral, ataques biliosos, deficiencia de bilirrubina glucuronosiltransferasa de tipo I, síndrome de Binder, enfermedad de Binswanger, encefalopatía de Binswanger, deficiencia de biotinidasa, enanismo de cabeza de pájaro de tipo Seckel, defectos de nacimiento, marca de nacimiento, síndrome de marcas de fórceps bitemporales, fibrosis biventricular, síndrome de Bjornstad, síndrome de B-K Mole, mechones negros-albinismo-sordera de tipo sensoneural (BADS), anemia de Blackfan-Diamond, artritis idiopática blenorragica, blefarofimosis, ptosis, síndrome de epicanto inverso, 25 blefaroespasmo, blefaroespasmo, blefaroespasmo benigno esencial, distonía por blefaroespasmo, quistes de Blessig, BLFS, ceguera, incontinencia pigmentaria de Bloch-Siemens, melanoblastosis cutis linearis, síndrome de Bloch-Siemens-Sulzberger, síndrome de Bloch-Sulzberger, tipos sanguíneos, tipo sanguíneo A, tipo sanguíneo B, tipo sanguíneo AB, tipo sanguíneo O, síndrome de Bloom, síndrome de Bloom-Torre-Mackacek, nevus gomoso azul, bebé azul, síndrome del pañal azul, BMD, BOD, BOFS, tumor óseo-quiste epidermoide-poliposis, síndrome de Bonnet-Dechaume-Blanc, síndrome de Bonnevie-Ulrich, síndrome de Book, síndrome de BOR, BORJ, síndrome de Borjeson, síndrome de Borjeson-Forssman-Lehmann, síndrome de Bowen, síndrome de Bowen-Conradi, huterira de Bowen-Conradi, síndrome de Bowen-Conradi tipo huterita, capa de Bowman, BPEI, BPES, neuritis braquial, síndrome de neuritis braquial, neuritis de plexo braquial, neuropatía de plexo braquial, isquemia braquiocefálica, 30 síndrome de Brachmann-de Lange, braquicefalia, braquicefalia, braquimórfico tipo congénito, bradicardia, tumores cerebrales, tumores cerebrales benignos, tumores cerebrales malignos, deficiencia de cadena alfa ramificada-cetoácido deshidrogenasa, cetonuria I de cadena ramificada, deficiencia de enzima ramificante, síndrome branquio-óculo-facial, displasia branquio-oto-renal, síndrome branquio-oto-renal, síndrome branquiooculofacial, síndrome branquioótico, síndrome de Brandt, dentinogénesis imperfecta de tipo Brandywine, dentinogénesis imperfecta de tipo Brandywine, cáncer de mama, síndrome de BRIC, enfermedad de huesos frágiles, enfermedad beta amplia, 40 síndrome de pulgares anchos, pulgares anchos y facies características de dedos gordos del pie anchos y retraso mental, pulgar ancho-Hallux, afasia de Broca, enfermedad de Brocq-Duhring, diabetes de bronce, enfermedad de Schilder de bronce, albinismo marrón, esmalte marrón hereditario, síndrome de Brown-Sequard, síndrome de Brown, BRRS, síndrome de Brueghel, agammaglobulinemia común de Bruton, BS, BSS, síndrome de Buchanan, síndrome de Budd, síndrome de Budd-Chiari, síndrome de Buerger-Gruetz, atrofia muscular bulboespinal ligada al cromosoma X, síndrome de Bulldog, bullosa hereditaria, CIE bullosa, CIE bullosa, eritroderma ictiosiforme congénito bulloso, 45 ictiosis bullosa, penfigoide bulloso, linfoma de Burkitt, linfoma de Burkitt de tipo africano, linfoma de Burkitt de tipo no africano, BWS, enfermedad de Biler, síndrome C, angioedema por disfunción de inhibidor de esterasa C1 de tipo II, C1-INH, angioedema por disfunción de inhibidor de esterasa C1 de tipo I, C1NH, enfermedad de Cacchi-Ricci, CAD, CADASIL, CAH, CAH, valgo calcáneo, valgo calcáneo, depósitos de pirofosfato de calcio dihidratado, agenesia callosa y anomalías oculares, hipertrofia de las pantorrillas de atrofia muscular espinal, displasia campomélica, enanismo campomélico, síndrome campomélico, camptodactilia-fisura palatina-pie zambo, camptodactilia-excursión mandibular limitada, enanismo camptomélico, síndrome camptomélico, síndrome camptomélico de tipo extremidades largas, enfermedad de Camurati-Engelmann, enfermedad de Camurati-Engelmann, enfermedad de Canada-Cronkhite, enfermedad de Canavan, enfermedad de Canavan incluida, leucodistrofia de Canavan, cáncer, síndrome 55 de familia del cáncer de tipo Lynch, síndrome de Cantrell, síndrome de Cantrell-Haller-Ravich, pentalogía de Cantrell, deficiencia de carbamilo fosfato sintetasa, síndrome de glicoproteína deficiente en hidratos de carbono, síndrome de glicoproteína deficiente en hidratos de carbono de tipo Ia, hiperlipemia inducida por hidratos de carbono, intolerancia a hidratos de carbono de glucosa galactosa, acidosis de dióxido de carbono, deficiencia de carboxilasa múltiple, síndrome cardiaco-de extremidades, síndrome cardio-auditorio, síndrome cardioauditorio de Jervell y Lange-Nielsen, síndrome cardiocutáneo, síndrome cardio-facial-cutáneo, síndrome cardiofacial de tipo Cailer, cardiomegalia glicogénica difusa, cardiomegalia glicogénica difusa, lentiginosis cardiomiopática, cardiomiopatía, cardiomiopatía, cardiomiopatía asociada con miopatía de almacenamiento de desmina, cardiomiopatía debida a defecto de desmina, síndrome de cardiomiopatía-neutropenia, síndrome de cardiomiopatía-neutropenia, síndrome de cardiomiopatía-neutropenia de cardiomiopatía infantil letal, amiloidosis cardiopática, 60 cardioespasmo, síndrome cardocardiaco, deficiencia de carnitina-acilcarnitina translocasa, deficiencia y trastornos de carnitina, deficiencia de carnitina primaria, deficiencia de carnitina secundaria, deficiencia de carnitina secundaria

a deficiencia de MCAD, síndrome de deficiencia de carnitina, carnitina palmitoiltransferasa I y II (CPT I y II), deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa, deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa de tipo 1, forma muscular clásica benigna de deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa de tipo 2 incluida la forma infantil grave, defecto de transporte de carnitina (deficiencia de carnitina primaria), deficiencia de carnosinasa, carnosinemia, enfermedad de Caroli, síndrome de Carpenter, Carpenter, hipoplasia de cartílago-cabello, hipoplasia de cartílago-cabello, enfermedad de Castleman, enfermedad de Castleman tipo vascular hialino, enfermedad de Castleman tipo células plasmáticas, tumor de Castleman, síndrome de ojo de gato, síndrome de llanto de gato, deficiencia de catalasa, síndrome de cataratas-dental, cataratas ligadas al cromosoma X con dientes de Hutchinson, hormonas de catecolamina, síndrome de Catel-Manzke, síndrome palatodigital de tipo Catel-Manzke, displasia caudal, secuencia de displasia caudal, síndrome de regresión caudal, síndrome de causalgia mayor, cavernomas, angioma cavernoso, hemangioma cavernoso, linfangioma cavernoso, malformaciones cavernosas, síndrome de Cailier, vitiligo de Cazenave, CBGD, CBGD, CBPS, CBPS, CCA, CCD, CCD, CCHS, síndrome de CCM, CCMS, CCO, CD, CDG1a, CDG1A, CDGS tipo Ia, CDGS tipo Ia, CDGS, CDI, CdLS, enfermedad celíaca, esprúe celíaco, esprúe celíaco-Dermatitis, inmunodeficiencia celular con deficiencia de purina nucleósido fosforilasa, vitiligo de Celsus, apnea central, enfermedad de Core central, enfermedad de Core central, diabetes central insípida, neurofibromatosis de forma central, hipoventilación central, apnea del sueño central, lipodistrofia centrífuga, miopatía centronuclear, CEP, cefalocele, lipodistrofia cefalotorácica, deficiencia de ceramida trihexosidasa, agenesia cerebelar, aplasia cerebelar, hemiagenesia cerebelar, hipoplasia cerebelar, aplasia de vermis cerebelar, agenesia de vermis cerebelar-hipernea-movimientos episódicos de los ojos-ataxia-retardo, síndrome cerebelar, trastorno cerebelarparenquimal IV, síndrome de malformación cerebelomedular, síndrome de malformación cerebelomedular, telangiectasia cerebelo-oculocutánea, trastorno cerebeloparenquimal IV familiar, tumor de ángulo cerebelopontino, aracnoiditis cerebral, arteriopatía dominante autosómica cerebral con infartos subcorticales y leucodistrofia, beriberi cerebral, diplegia cerebral, gigantismo cerebral, malformaciones vasculares cerebrales, parálisis cerebral, distrofia cerebro-Ocutorrenal, síndrome cerebro-óculo-facio-esquelético, síndrome cerebrocostomandibular, síndrome cerebrohepatorrenal, degeneración cerebromacular, degeneración cerebromacular, distrofia cerebromuscular de tipo Fukuyama, disgenesia cerebroocular, síndrome de displasia cerebroocular-distrofia muscular, síndrome cerebrooculofacioesquelético, aneurisma arteriovenoso cerebrotretiniano, lipidosis de cerebrósido, cerebrósidos, xantomatosis cerebrotendinosa, ferocalcinos cerebrosvascular, forma adulta de ceroid-lipofuscinosis, distonía cervical, distonía cervical, síndrome cérvico-óculo-acústico, estenosis espinal cervical, fusión vertebral cervical, CES, CF, síndrome de CFC, CFIDS, CFND, CGD, CGF, CGF, calasodermia generalizada, enfermedad de Chananin Dorfman, síndrome de Chananin Dorfman, síndrome de ictiosis de Chananin Dorfman, síndrome de Chandler, enfermedad de Charcot, Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth variante, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth-Roussy-Levy, asociación de CHARGE, síndrome de Charge, síndrome de CHARGE, displasias ectodérmicas de Chaund, síndrome de Chediak-Higashi, síndrome de Chediak-Higashi, síndrome de Chediak-Steinbrinck-Higashi, queilitis granulomatosa, queilosisquis, síndrome de Chemke, síndrome de Cheney, síndrome de punto rojo cereza y mioclono, CHF, CHH, CHH, enfermedad de Chiari, malformación de Chiari I, malformación de Chiari, Chiari tipo I (malformación de Chiari I), Chiari tipo II (malformación de Chiari II), síndrome de Chiari I, síndrome de Chiari-Budd, síndrome de Chiari-Frommel, malformación de Chiari II, síndrome de CHILD, síndrome de ictiosis de CHILD, síndrome de ictiosis de CHILD, adrenoleucodistrofia infantil, dermatomiositis infantil, distonía de aparición infantil, vómitos cíclicos infantiles, neuropatía axonal gigante infantil, hipofosfatasa infantil, distrofia muscular infantil, CHN, colestasis, colestasis hereditaria de tipo noruego, colestasis intrahepática, colestasis neonatal, colestasis de usuarios de anticonceptivos orales, colestasis con estenosis pulmonar periférica, colestasis del embarazo, deficiencia de colesterol desmolasa, deficiencia de colesterol desmolasa, condrodisplasia punctata, condrodistrofia calcificante congénita, condrodistrofia fetal, miotonía condrodistrófica, condrodistrofia, condrodistrofia con pies zambos, condrodistrofia epifisaria, condrodistrofia de forma hiperplástica, displasias condroectodérmicas, condrogénesis imperfecta, condrodistrofia, condroosteodistrofia, coreoacantocitosis, muestreo de vellosidades coriónicas, anomalías coriorretinianas, anomalías coriorretinianas con ACC, síndrome de Coloboma-Joubert coriorretiniano, esclerosis coroidal, coroideremia, síndrome de Chotzen, síndrome de Chotzen, síndrome de Christ-Siemens-Touraine, síndrome de Christ-Siemans-Touraine; enfermedad de navidad, síndrome de árbol de navidad, delección de 3p distal del cromosoma 3, monosomía 3p distal del cromosoma 3, duplicación de 3q2 distal del cromosoma 3, trisomía 3q2 distal del cromosoma 3, monosomía 3p2 del cromosoma 3, síndrome de duplicación parcial del cromosoma 3q, cromosoma 3q, síndrome de trisomía parcial, trisomía 3q2 del cromosoma 3, síndrome de delección de 4q31-qter del cromosoma 4, síndrome de delección de 4q32-qter del cromosoma 4, síndrome de delección de 4q33-qter del cromosoma 4, delección del brazo largo del cromosoma 4, delección del brazo largo del cromosoma 4, monosomía 4q del cromosoma 4, monosomía 4q del cromosoma 4, monosomía distal 4q del cromosoma 4, delección parcial de 4p del cromosoma 4, cromosoma 4, delección parcial del brazo corto, monosomía parcial 4q distal del cromosoma 4, monosomía parcial 4p del cromosoma 4, trisomía parcial 4 (q25-qter) del cromosoma 4, trisomía parcial 4 (q26 o q27-qter) del cromosoma 4, trisomía parcial 4 (q31 o 32-qter) del cromosoma 4, trisomía parcial 4p del cromosoma 4, trisomías parciales 4q2 y 4q3 del cromosoma 4, trisomía parcial distal 4 del cromosoma 4, anillo del cromosoma 4, síndrome de delección terminal 4q del cromosoma 4, síndrome de cromosoma 4q, síndrome de cromosoma 4q, trisomía 4 del cromosoma 4, trisomía 4p del cromosoma 4, XY/47 XXY (mosaico) del cromosoma 4, monosomía 5p del cromosoma 5, síndrome de delección parcial del brazo corto del cromosoma 5, trisomía 5p del cromosoma 5, trisomía 5p completa (5p11-pter) del cromosoma 5, trisomía 5p parcial (5p13 o 14-pter) del cromosoma 5, síndrome de cromosoma 5, trisomía parcial 6q del cromosoma 6, anillo del cromosoma 6, trisomía 6q2 del cromosoma 6, monosomía 7p2 del cromosoma 7, delección parcial del brazo corto (7p2-) del cromosoma 7, delección 7p terminal [del (7) (p21-p22)] del cromosoma 7, monosomía 8p2 del

cromosoma 8, monosomía 8p21-pter del cromosoma 8, delección parcial (brazo corto) del cromosoma 8, monosomía
 parcial 8p2 del cromosoma 8, trisomía completa 9P del cromosoma 9, delección parcial del brazo corto del
 cromosoma 9, monosomía parcial 9p del cromosoma 9, monosomía parcial 9p22 del cromosoma 9, monosomía
 parcial 9p22-pter del cromosoma 9, trisomía parcial 9P del cromosoma 9 incluido, anillo del cromosoma 9,
 5 tetrasomía 9p del cromosoma 9, mosaicismo de tetrasomía 9p del cromosoma 9, trisomía 9p del cromosoma 9
 (múltiples variantes), trisomía 9 (pter-p21 a q32) del cromosoma 9 incluido, mosaico de trisomía del cromosoma 9,
 mosaico de trisomía del cromosoma 9, trisomía distal 10q del cromosoma 10, monosomía del cromosoma 10,
 monosomía 10p del cromosoma 10, delección parcial (brazo corto del cromosoma 10, cromosoma 10, 10p-parcial,
 trisomía parcial 10q24-qter del cromosoma 10, trisomía 10q2 del cromosoma 10, monosomía parcial del brazo largo
 10 del cromosoma 11, monosomía parcial 11q del cromosoma 11, trisomía parcial del cromosoma 11, trisomía parcial
 11q13-qter del cromosoma 11, trisomía parcial 11q21-qter del cromosoma 11, trisomía parcial 11q23-qter del
 cromosoma 11, trisomía parcial del cromosoma 11q, mosaico de isocromosoma 12p del cromosoma 12, monosomía
 parcial 13q del cromosoma 13, monosomía parcial del brazo largo del cromosoma 13, anillo del cromosoma 14,
 anillo del cromosoma 14, trisomía distal 15q del cromosoma 15, cromosoma r15, anillo del cromosoma 15,
 15 trisomía 15q2 del cromosoma 15, síndrome de duplicación parcial del cromosoma 15q, delección intersticial 17p del
 cromosoma 17, síndrome de delección del brazo largo del cromosoma 18, monosomía 18p del cromosoma 18,
 monosomía 18Q del cromosoma 18, anillo del cromosoma 18, tetrasomía 18p del cromosoma 18, síndrome de
 cromosoma 18q, síndrome de mosaico 21 del cromosoma 21, anillo del cromosoma 21, síndrome de translocación
 21 del cromosoma 21, duplicación invertida del cromosoma 22 (22pter-22q11), trisomía parcial (22pter-22q11) del
 20 cromosoma 22, anillo del cromosoma 22, mosaico de trisomía del cromosoma 22, cromosoma 48 XYY, cromosoma
 48 XYY, cromosoma r15, triplicación cromosómica, triplicación cromosómica, síndrome de cromosoma triploide,
 cromosoma X, cromosoma XXY, ictericia crónica acolúrica, aracnoiditis adhesiva crónica, insuficiencia adrenocortical
 crónica, cavernositis crónica, anemia arregenerativa congénica crónica, disfagocitosis crónica, granulomatosis
 25 familiar crónica, icterus familiar crónico, síndrome de disfunción inmunitaria por fatiga crónica (CFIDS), enfermedad
 granulomatosa crónica, síndrome de Guillain-Barre crónico, ictericia idiopática crónica, polineuritis idiopática crónica
 (CIP), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria
 crónica, tic motor crónico, candidiasis mucocutánea crónica, tics múltiples crónicos, colitis ulcerosa no específica
 crónica, colitis ulcerosa no específica crónica, colangitis obliverativa crónica, síndrome de úlcera péptica crónica y
 30 esofagitis, corea progresiva crónica, síndrome de oftalmoplegia externa progresiva crónica, oftalmoplegia externa
 progresiva crónica y miopatía, oftalmoplegia externa progresiva crónica con fibras rojas deshinchadas,
 polineuropatía recidivante crónica, sarcoidosis crónica, disfonía espasmódica crónica, vómitos crónicos en la
 infancia, CHS, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, CIP, cirrosis congénita pigmentaria, cirrosis,
 cistinuria, citrulinemia, CJD, enfermedad de Schindler clásica, síndrome de Pfeiffer de tipo clásico, enfermedad de
 35 orina de jarabe de arce clásica, hemofilia clásica, síndrome de Cockayne de forma clásica de tipo I (tipo A),
 enfermedad de Leigh clásica, fenilcetonuria clásica, esclerosis cerebral de Pelizaeus-Merzbacher ligada al
 cromosoma X clásica, CLE, fisura labio-palatina/quistes mucosos/labio inferior PP digital y anomalías genitales,
 fisura labio-palatina/blefarofimosis/lagofthalmos e hipertelorismo, fisura labio-palatina con pulgares anómalos y
 microcefalia, fisura palatina-contraturas articulares-malformaciones de dandy walquer, fisura palatina y labio
 40 leporino, displasia cleidocraneal con micrognatia, pulgares ausentes y afalangia distal, disostosis cleidocraneal,
 displasia cleidocraneal, síndrome de clic soplo, CLN1, espasmódico clónico, síndrome de Clouston, pie zambo,
 CMDI, CMM, CMT, CMTX, síndrome de COA, coartación de la aorta, coartación de la aorta, enfermedad de
 Coats, displasia de Cobblestone, trastorno de Cochin Jewish, síndrome de Cockayne, síndrome de COD-MD, COD,
 síndrome de Coffin-Lowry, síndrome de Coffin, síndrome de Coffin Siris, síndrome de COFS, distrofia corneal de
 Cogan, síndrome de Cogan Reese, síndrome de Cohen, enfermedad de aglutininas frías, enfermedad de
 45 anticuerpos fríos, enfermedad de anticuerpos fríos, anemia hemolítica de anticuerpos fríos, enfermedad de
 aglutininas frías, enfermedad de aglutininas frías, colitis ulcerosa, colitis grave, colitis grave, colitis ulcerosa crónica
 no específica, bebé colodión, coloboma-defectos cardiacos-atresia del retraso del crecimiento coanal y anomalías
 del desarrollo genital y urinario y anomalías del oído, coloboma, coloboma, neurosis colónica, ceguera al color,
 ceguera al color, ceguera al color, colpocefalia, esófago de tipo columnar, degeneración de conos-
 50 bastones combinada, inmunodeficiencia combinada con inmunoglobulinas, displasia mesoectodérmica combinada,
 hipogammaglobulinemia variable común, inmunodeficiencia variable común, ventriculo común, hidrocefalo
 comunicante, ausencia completa de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, defecto del tabique
 auriculoventricular completo, deficiencia de inhibidor del componente 1 del complemento, deficiencia de componente
 regulador del componente C1 del complemento, bloqueo cardiaco completo, intolerancia a hidratos de carbono
 55 complejos, síndrome de dolor regional complejo, deficiencia de complejo V de ATP sintasa, complejo I, deficiencia
 de complejo I de NADH deshidrogenasa, complejo II, deficiencia de complejo II de succinato deshidrogenasa,
 complejo III, deficiencia de complejo III de ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa, complejo IV, deficiencia de
 complejo IV de citocromo c oxidasa, deficiencia de complejo IV, complejo V, degeneración de conos-bastones,
 degeneración de conos-bastones progresiva, distrofia de conos, distrofia de conos-bastones, papilomatosis reticular
 60 confluyente, congénita con cinética PK baja, ausencia congénita de músculos abdominales, ausencia congénita del
 timo y la glándula paratiroides, acromia congénita, enfermedad de Addison congénita, hiperplasia suprarrenal
 congénita, hiperplasia adrenérgica congénita, afibrinogenemia congénita, hipoventilación alveolar congénita, anemia
 del recién nacido congénita, síndrome de Persilvian bilateral congénito, síndrome de Brown congénito, defectos
 65 vasculares congénitos, síndrome de hipoventilación central congénito, parálisis cerebral congénita, sinostosis
 cervical congénita, pulgar cerrado congénito con retraso mental, aracnodactilia contractural congénita, contracturas
 congénitas múltiples con aracnodactilia, cianosis congénita, defecto congénito del cráneo y el cuero cabelludo,

dilatación congénita del conducto biliar intrahepático, neuropatía desmielinizante congénita, disfagocitosis congénita, angiectasia displásica congénita, porfiria eritropoyética congénita, porfiria eritropoyética congénita, deficiencia de factor XIII congénita, insuficiencia congénita del control autónomo de la respiración, ictericia no hemolítica familiar congénita de tipo I, diarrea prolongada familiar congénita, síndrome de Cockayne de forma congénita de tipo II (tipo B), fibromatosis generalizada congénita, sarampión alemán congénito, neuropatía axonal gigante congénita, bloqueo cardíaco congénito, defectos cardíacos congénitos, hemidisplasia congénita con ictiosis, eritroderma y defectos labiales, ictericia hemolítica congénita, anemia hemolítica congénita, fibrosis hepática congénita, distrofia corneal hereditaria congénita, linfedema hereditario congénito, hipercondroplasia congénita, polineuropatía hipomielinizante congénita, neuropatía por hipomielinización congénita, hipomielinización congénita, neuropatía por hipomielinización congénita, polineuropatía por hipomielinización congénita (bulbo de cebolla), eritroderma ictiosiforme congénito, queratocono congénito, acidosis láctica congénita, intolerancia a la lactosa congénita, lipodistrofia congénita, cirrosis hepática congénita, enfisema lobar congénito, enfisema localizado congénito, macroglosia congénita, estenosis medular congénita, megacolon congénito, nevus melanocítico congénito, dismorfo-distrofia mesodérmica congénita, distrofia mesodérmica congénita, atrofia de microvellosidades congénita, artrogriposis múltiple congénita, distrofia miotónica congénita, neuropatía congénita provocada por hipomielinización, pancitopenia congénita, anemia perniciosa congénita, anemia perniciosa congénita debida a defecto de factor intrínseco, anemia perniciosa congénita debida a defecto de factor intrínseco, cirrosis pigmentaria congénita, porfiria congénita, miopatía proximal congénita asociada con miopatía de almacenamiento de desmina, enfisema pulmonar congénito, anemia de glóbulos rojos pura congénita, aplasia de glóbulos rojos pura congénita, ceguera retiniana congénita, quiste retiniano congénito, retinitis pigmentaria congénita, retinosquiasis congénita, enfermedad de bastones congénita, síndrome de rubeola congénito, defectos del cuero cabelludo congénitos con anomalías de reducción de las extremidades distales, neuropatía sensorial congénita, SMA congénita con artrogriposis, anemia esferótica congénita, displasia espondiloepifisaria congénita, síndrome de médula espinal cervical anclada congénito, tirosinosis congénita, síndrome de varicela congénito, malformaciones cavernosas vasculares congénitas, velos vasculares congénitos en la retina, ceguera de palabras congénita, bazo errante congénito (pediátrico), cardiomiopatía congestiva, córnea cónica, hiperbilirrubinemia conjugada, conjuntivitis, conjuntivitis lígnea, síndrome conjuntivo-uretro-sinovial, síndrome de Conn, enfermedad de tejidos conjuntivos, enfermedad de Conradi, síndrome de Conradi Hunermann, anemia aplásica constitucional, hipoplasia eritroide constitucional, ecczema constitucional, disfunción hepática constitucional, trombopatía constitucional, bandas constrictivas congénitas, pericarditis constrictiva con enanismo, síndrome de actividad de fibras musculares continua, aracnodactilia contractural, aracnodactilia contractural, contracturas de atrofia de los músculos de la piel y apraxia oculomotora, convulsiones, anemia de Cooley, enfermedad de transporte de cobre, corpoporfiria porfiria hepática, cor triatriatum, cor triatriatum sinistrum, cor trilobulatum, cor bilobulatum, enfermedad de Cori, distrofia de la córnea, amiloidosis corneal, enturbiamiento corneal-cutis laxa-retraso mental, distrofia corneal, síndrome de Cornelia de Lange, displasia de la dentina coronal, arteriopatía coronaria, cardiopatía coronaria, agenesia del cuerpo calloso, degeneración ganglionar cortical-basal, corticalis deformaris, degeneración ganglionar cortico-basal (CBGD), degeneración corticobasal, deficiencia de corticosterona metiloxidasa de tipo I, deficiencia de corticosterona metiloxidasa de tipo II, cortisol, síndrome de Costello, muerte súbita, síndrome de COVESDEM, COX, deficiencia de COX, deficiencia de COX de tipo francés-canadiense, miopatía mitocondrial infantil por deficiencia de COX de Toni-Fanconi-Debre incluida, miopatía mitocondrial infantil por deficiencia de COX de tipo infantil benigna, CP, CPEO, CPEO con miopatía, CPEO con fibras rojas dehilachadas, CPPD de forma familiar, deficiencia de CPT, CPTD, arteritis craneal, meningoencefalocèle craneal, síndrome craneo-oro-digital, distrofia craneocarpotarsal, craneocèle, síndrome craneodigital-retraso mental de tipo Scott, disostosis craneofacial, disostosis craneofacial-PD arterioso-hipertrófico-hipoplasia de los labios, displasia craneofrontonasal, displasia craneometáfsea, síndrome craneo-orodigital, síndrome craneo-orodigital de tipo II, craneoestenosis de tipo Crouzon, craneoestenosis, craneoestenosis, craneosinostosis-atresia coanal-sinostosis humeral radial, craneosinostosis-hipertrófico-facial y otras anomalías, craneosinostosis-hipoplasia medifacial y anomalías de los pies, craneosinostosis primaria, craneosinostosis-síndrome de aplasia radial, craneosinostosis con defectos radiales, cráneo bífido, síndrome de CREST, síndrome de CREST, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, síndrome de Cri du Chat, muerte de cuna, síndrome de Crigler Najjar de tipo I, enfermedad de Crohn, enfermedad de Crohn, síndrome de Cronkhite-Canada, síndrome de Cross, síndrome de Cross, síndrome de Cross-McKusick-Breen, Crouzon, síndrome de Crouzon, disostosis craneofacial de Crouzon, crioglobulinemia esencial mixta, síndrome de criptoftalmos-sindactilia, criptorquidismo-enanismo-mentalidad subnormal, distrofia corneal cristalina de Schnyder, CS, CSD, CSID, CSO, síndrome de CST, cabello rizado-anquiloblefanon-displasia de las uñas, síndrome de Curschmann-Batten-Steinert, ictiosis hística de tipo Curth Macklin, tipo Curth-Macklin, síndrome de Cushing, Cushing, Cushing III, melanoma maligno cutáneo hereditario, porfirias malignas, cutis laxa, cutis laxa, síndrome de cutis laxa-deficiencia del crecimiento, cutis marmorata telangiectática congénita, CVI, CVID, CVS, CVS, síndrome de vómitos cíclicos, enfermedad quística de la médula renal, enfermedad quística de la médula renal, higroma quístico, fibrosis quística, linfangioma quístico, cistina-lisina-arginina-arnitúria, enfermedad de almacenamiento de cistina, cistinosis, cistinuria, cistinuria con aminoaciduria dibásica, cistinuria de tipo I, cistinuria de tipo II, cistinuria de tipo III, quistes de la médula renal congénitos, quistes de la médula renal congénitos, deficiencia de citocromo C oxidasa, D.C., dacrioadenopatía, dacrioadenopatía, Dalpro, Dalton, daltonismo, síndrome de Danbolt-Cross, síndrome de ojos danzante-pies danzantes, síndrome de Dandy-Walquer, quiste de Dandy-Walquer, deformidad de Dandy-Walquer, malformación de Dandy Walquer, amiloidosis de tipo cardíaca danesa (tipo III), enfermedad de Darier, enfermedad de Davidson, enfermedad de Davies, DBA, DBS, DC, DD, síndrome de De Bary, síndrome de De Bary-Moens-Diercks, síndrome de de Lange, síndrome de De Morsier, síndrome de De Santis Cacchione, síndrome de de Toni-Fanconi, sordera congénita y cardiopatía funcional, sordera-enanismo-atrofia retiniana,

sordera-cardiopatía funcional, sordera-onicodistrofia-osteodistrofia y retraso mental, sordera y pili torti de tipo Bjornstad, sordera sensorineural con ano no perforado y pulgares hipoplásicos, deficiencia de enzima desramificante, piel decidua, defecto de receptor de factor intrínseco de enterocitos, defecto de receptor de factor intrínseco de enterocitos, defecto de linfocitos citolíticos naturales, defecto de la reabsorción renal de carnitina, deficiencia de glicoproteína neuraminidasa, deficiencia de complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, deficiencia de glicoproteína Ib de las plaquetas, deficiencia de receptor de factor de Von Willebrand, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (ACADS), deformidad con enanismo mesomérico, corea degenerativa, estenosis espinal lumbar degenerativa, enfermedad de Degos, enfermedad de Degos-Kohlmeier, síndrome de Degos, DEH, síndrome de Dejerine-Roussy, enfermedad de Dejerine Sottas, síndrome de delección 9p parcial, síndrome de delección 11q parcial, síndrome de delección 13q parcial, síndrome de Delleman-Oorthuys, síndrome de Delleman, demencia con atrofia lobar e inclusiones citoplasmáticas neuronales, enfermedad desmielinizante, síndrome de DeMyer, displasia de la dentina coronal, displasia de la dentina radicular, displasia de la dentina de tipo I, displasia de la dentina de tipo II, dentinogénesis imperfecta de tipo Brandywine, dentinogénesis imperfecta de tipo Shields, dentinogénesis imperfecta de tipo Shields, dentinogénesis imperfecta de tipo III, dentinogénesis imperfecta de tipo III, displasia dento-óculo-ósea, displasia dento-óculo-ósea, síndrome dento-oculocutáneo, síndrome de Denys-Drash, Depakene, exposición a DepakeneTM, Depakote, rociado de Depakote, despigmentación-fibromatosis gingival-microftalmia, enfermedad de Dercum, enfermedad de Dercum, dermatitis atópica, dermatitis exfoliativa, dermatitis herpática, dermatitis multiforme, dermatocalasia generalizada, dermatolisis generalizada, dermatomegalia, dermatomiositis sin miositis, dermatomiositis, dermatosparaxis, dermatostomatitis de tipo Stevens Johnson, síndrome de Desbuquois, miopatía de almacenamiento de desmina, descamación del recién nacido, deuteranomalía, deuteranomalía, trastorno de lectura del desarrollo, síndrome de Gerstmann del desarrollo, enfermedad de Devergie, enfermedad de Devic, síndrome de Devic, dextrocardia-bronquiectasia y sinusitis, dextrocardia con situs inversus, DGS, síndrome de DGSX Golabi-Rosen incluido, DH, deficiencia de DHAP alquilo transferasa, deficiencia de DHBS, deficiencia de DHBS, DHOF, deficiencia de DHPR, deficiencia de DHPR, diabetes insípida, diabetes insípida-diabetes mellitus-atofia óptica y sordera, diabetes insípida neurohipofisaria, diabetes insulino dependiente, diabetes mellitus, diabetes mellitus-enfermedad de Addison-mixedema, acidosis diabética, síndrome de mujer barbuda diabética, anemia de Diamond-Blackfan, apnea diafragmática, aclasis diafísea, enanismo diastrófico, displasia diastrófica, síndrome de enanismo diastrófico, aminoaciduria dicarboxílica, aciduria dicarboxílica provocada por defecto en la Beta-oxidación de los ácidos grasos, aciduria dicarboxílica provocada por defecto en la Beta-oxidación de los ácidos grasos, aciduria dicarboxílica debida a deficiencia de MCADH, dicromasia, Dicker-Opitz, DIDMOAD, síndrome diencefálico, síndrome diencefálico de la infancia, síndrome diencefálico de la emaciación, deficiencia de dienoil-CoA reductasa, degeneración cerebral difusa en la infancia, enfermedad cerebral degenerativa difusa, hiperostosis esquelética idiopática difusa, glicopeptiduria difusa, síndrome de DiGeorge, síndrome de DiGeorge, síndrome digital-oro-craneal, síndrome digito-oto-palatal, síndrome digito-oto-palatal de tipo I, síndrome digito-oto-palatal de tipo II, deficiencia de dihidrobiopterina sintetasa, deficiencia de dihidrobiopterina sintetasa, deficiencia de dihidropteridina reductasa, deficiencia de dihidropteridina reductasa, dihidroxiacetonafofato sintasa, cardiomiopatía dilatada (congestiva), enfermedad de Dimitri, diplegia de parálisis cerebral, síndrome de doble cromosoma Y, deficiencia de disacaridasa, intolerancia a disacáridos I, lupus discoide, lupus eritematoso discoide, DISH, trastorno de cornificación, trastorno de cornificación de tipo I, trastorno de cornificación 4, trastorno de cornificación 6, trastorno de cornificación 8, trastorno de cornificación 9 de tipo Neterton, trastorno de cornificación 11 de tipo ácido fitánico, trastorno de cornificación 12 (de tipo almacenamiento de lípidos neutros), trastorno de cornificación 13, trastorno de cornificación 14, trastorno de cornificación 14 de tipo tricotiodistrofia, trastorno de cornificación 15 (de tipo queratitis-sordera), trastorno de cornificación 16, trastorno de cornificación 18 de tipo eritroqueratodermia variable, trastorno de cornificación 19, trastorno de cornificación 20, trastorno de cornificación 24, bazo desplazado, lupus eritematoso disseminado, neurodermatitis disseminada, esclerosis disseminada, monosomía distal 11q, síndrome distal 11q-, artrogriposis distal múltiple congénita de tipo IIA, artrogriposis distal múltiple congénita de tipo IIA, artrogriposis distal de tipo IIA, artrogriposis distal de tipo 2A, duplicación distal 6q, duplicación distal 10q, síndrome de Dup(10q), duplicación distal 15q, monosomía distal 9p, trisomía distal 6q, síndrome de trisomía distal 10q, trisomía distal 11q, Divalproex, DJS, DKC, DLE, DLPIII, DM, síndrome de DMC, enfermedad de DMC, DMD, DNS hereditario, DOC I, DOC 2, DOC 4, DOC 6 (tipo harlequín), DOC 8 de tipo Curth-Macklin, DOC 11 de tipo ácido fitánico, DOC 12 (de tipo almacenamiento de lípidos neutros), DOC 13, DOC 14, DOC 14 de tipo tricotiodistrofia, DOC 15 (de tipo queratitis-sordera), DOC 16, DOC 16 de tipo hemidisplasia unilateral, DOC 18, DOC 19, DOC 20, DOC 24, mielopatía de cuerpos de Dohle, displasia dolicoespondílica, dolicoestenomelia, síndrome de dolicoestenomelia, síndrome de Kenny-Caffe de tipo dominante, miotonía congénita de tipo dominante, síndrome de Donahue, anemia hemolítica de Donath-Landsteiner, síndrome de Donath-Landsteiner, síndrome de DOOR, síndrome de DOORS, distonía sensible a dopa (DRD), síndrome de Dorfman Chanarin, síndrome de Dowling-Meara, síndrome de Down, síndrome de DR, síndrome de Drash, DRD, distrofia muscular con contracturas de tipo Dreifuss-Emerly, síndrome de Dressler, bazo a la deriva, acantosis nigricans inducida por fármacos, lupus eritematoso inducido por fármacos, insuficiencia suprarrenal relacionada con fármacos, síndrome de Drummond, beriberi seco, ojo seco, DTD, síndrome de retracción de Duane, síndrome de Duane, síndrome de Duane de tipo 1A 1B y 1C, síndrome de Duane de tipo 2A 2B y 2C, síndrome de Duane de tipo 3A 3B y 3C, síndrome de Dubin Johnson, síndrome de Dubowitz, Duchenne, distrofia muscular de Duchenne, parálisis de Duchenne, enfermedad de Duhring, enfermedad de Duncan, enfermedad de Duncan, atresia duodenal, estenosis duodenal, duodenitis, síndrome de duplicación 4p, duplicación 6q parcial, síndrome de Dupuy, contractura de Dupuytren, síndrome de Dutch-Kennedy, enanismo, enanismo campomérico, enanismo cortical-engrosamiento de los huesos tubulares e hipocalcemia transitoria, enanismo de tipo Levi, enanismo metatrópico, enanismo-

onicodisplasia, enanismo-pericarditis, enanismo con atrofia renal y sordera, enanismo con raquitismo, DWM, síndrome de Dyggve Melchior Clausen, disautonomía familiar, disbetalipoproteinemia familiar, discondrodisplasia con hemangiomas, discondroosteosis, discromatosis universal hereditaria, disencefalia esplanocnoústica, disqueratosis congénita, disqueratosis congénita autosómica recesiva, disqueratosis congénita de tipo Scoggins, síndrome de
 5 disqueratosis congénita, disqueratosis folicular vegetante, dislexia, leucodistrofia desmielogénica, leucodistrofia desmielogénica-megalobare, disfonía espástica, displasia epifisaria punctata, displasia epifisaria hemimélica, displasia de las uñas con hipodondia, displasia cleidocraneal, displasia fibrosa, displasia-síndrome de gigantismo ligado al cromosoma X, displasia osteodental, síndrome de nevus displásico, síndrome de nevus displásico, tipo de nevus displásico, disinergia cerebral mioclónica, disinergia del esófago, distonía, distonía, distopia cantorum, distopia
 10 cantorum, distrofia adiposogenital, distrofia endotelial de la córnea, distrofia mesodérmica, epidermolísis distrófica bullosa, epidermolísis distrófica bullosa, distrofia torácica asfixiante, distrofia miotónica, síndrome de E-D, síndrome de Eagle-Barrett, retinopatía de Eales, enfermedad de Eales, anomalías en los oídos-contracturas-displasia de huesos con cifoescoliosis, síndrome de oído-rótula-estatura baja, defectos de restricción tempranos, síndrome de hipercalcemia temprana con facie de diablillo, distonía de aparición temprana, síndrome de Eaton Lambert, EB, anomalía de Ebstein, susceptibilidad a EBV (EBVS), EBVS, ECD, ECPDG, displasias ectodérmicas, displasia
 15 ectodérmica anhidrótica con fisura labial y fisura palatina, displasia extodérmica-insuficiencia pancreática exocrina, displasia ectodérmica de tipo Rapp-Hodgkin, displasia ectodérmica y mesodérmica congénita, displasia ectodérmica y mesodérmica con implicación ósea, ectodermosis erosiva pluriorificial, ectopia lentis, ectopia vesicae, síndrome de ACTH ectópico, síndrome de hormona adrenocorticotropa ectópica, ano ectópico, ectrodactilia de la mano, ectrodactilia, síndrome de ectrodactilia-displasia ectodérmica-fisura, síndrome de ectrodactilia-displasias
 20 ectodérmicas-fisuras, ectrodactilia-displasia ectodérmica-fisura labial/fisura palatina, eccema, síndrome de eccema-trombocitopenia-inmunodeficiencia, EDA, EDMD, EDS, EDS de tipo arterial-equimótico, EDS de artroclasia, forma grave clásica de EDS, EDS disfibronectinémica, EDS de tipo grave, EDS de hipermovilidad, EDS cifoescoliótico, EDS de cifoescoliosis, EDS de tipo Mitis, EDS ocular-escoliótica, EDS progeroide, EDS de periodontosis, EDS vascular, síndrome de EEC, EFE, EHBA, EHK, síndrome de Ehlers Danlos, síndrome de Ehlers-Danlos, Ehlers
 25 Danlos IX, complejo de Eisenmenger, complejo de Eisenmenger, enfermedad de Eisenmenger, reacción de Eisenmenger, síndrome de Eisenmenger, síndrome de Eisenmenger, síndrome de Ekbom, enfermedad de Ekman-Lobstein, ectrodactilia de la mano, ectrodactilia de la mano, EKV, trastornos de fibras de elastina, elastorrhexis generalizada, síndrome de elastosis distrófica, mutismo electivo (obsoleto), mutismo electivo, electrocardiograma (ECG o EKG), deficiencia de flavoproteína de transferencia de electrones (ETF) deshidrogenasa: (GAIL & MADD), estudio electrofisiológico (EPS), uñas de elefante desde el nacimiento, elefantiasis congénita angiomas, hipertrofia hemangiectática, facies de diablillo con hipercalcemia, síndrome de Ellis-van Creveld, síndrome de Ellis
 30 Van Creveld, embrioma de riñón, adenomiosarcoma embrional de riñón, carcinosarcoma embrional de riñón, tumor mixto embrional de riñón, EMC, distrofia muscular de Emery Dreyfus, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, síndrome de Emery-Dreifuss, EMF, síndrome de EMG, síndrome de silla vacía, encefalitis periaxial difusa, encefalitis periaxial concéntrica, encefalocele, angiomas encefalofaciales, encefalopatía, angiomas encefalotrigeminales, encondromatosis con hemangiomas cavernosos múltiples, polineuritis endémica, defecto de almohadillas endocárdicas, defecto de almohadillas endocárdicas, defectos de almohadillas endocárdicas, displasia endocárdica, fibroelastosis endocárdica (EFE), hipertrigliceridemia endógena, hidrops endolinfático, crecimientos endometriales, endometriosis, fibrosis endomiocárdica, distrofia corneal endotelial congénita, distrofia corneal epitelial endotelial, endotelio, enfermedad de Engelmann, lengua alargada, enterocolitis, malabsorción de cobalamina por enterocitos, síndrome de eosinofilia, celulitis eosinofílica, fascitis eosinofílica, granuloma eosinofílico, síndrome eosinofílico, síndrome de nevus epidérmico, epidermolísis bullosa, epidermolísis bullosa, epidermolísis bullosa adquirida, epidermolísis bullosa hereditaria, epidermolísis bullosa letal, epidermolísis hereditaria tarda, hiperqueratosis
 45 epidermolítica, hiperqueratosis epidermolítica (CIE bulloso), epilepsia procursiva, epilepsia, epinefrina, cambios epifisarios y miopía alta, osteocondroma epifisario benigno, displasia hemimélica epifisaria, movimientos de los ojos anómalos-episódicos, distrofia corneal de membrana basal epitelial, distrofia corneal epitelial de Meesmann juvenil, epiteliomatosis múltiple con nevus, epitelio, epival, EPS, enfermedad linfoproliferativa inducida por virus de Epstein-Barr en hombres, síndrome de Erb-Goldflam, enfermedad de Erdheim Chester, eritema multiforme exudativo, eritema polimorfo de tipo Stevens Johnson, eritroblastofitosis, eritroblastosis fetal, eritroblastosis neonatal, anemia eritroblástica de la infancia, deficiencia de eritrocito fosfoglicerato cinasa, eritrogenesis imperfecta, eritroqueratoderma progresiva simétrica, eritroqueratoderma progresiva simétrica-ictiosis, eritroqueratoderma variable, eritroqueratoderma variable, eritroqueratoderma de tipo variable, eritroqueratolisis hiemalis, eritroqueratolisis hiemalis, eritroqueratolisis hiemalis, porfirias eritropoyéticas, porfiria eritropoyética, síndrome de
 50 Escobar, atresia esofágica, aperistalsis esofágica, esofagitis-úlceras pépticas, atresia del esófago y/o fístula traqueoesofágica, hiperlipemia familiar esencial, fructosuria esencial, hematuria esencial, trombocitopenia hemorrágica esencial, trombocitopenia hemorrágica esencial, crioglobulinemia mixta esencial, enfermedad de Moschowitz esencial, trombocitemia esencial, trombocitemia esencial, trombocitopenia esencial, trombocitosis esencial, trombocitosis esencial, temblor esencial, deficiencia de inhibidor de esterasa, variante de Estren-Dameshek de la anemia de Fanconi, colestasis relacionada con estrógenos, ET, ET, ETF, adipicaciduria etilmalónica, enfermedad de Eulenburg, pc, EVCS, reacción de sobresalto exagerada, exencefalia, hipertrigliceridemia exógena, síndrome de exomfalos-macroglossa-gigantismo, bocio exoftálmico, síndrome de rubeola expandida, extrofia de la vejiga, EXT, síndrome de condromatosis externa, atresia biliar extrahepática, plasmacitoma extramedular, retinitis exudativa, síndrome de retracción de los ojos, FA1, enfermedad de Fabry, FAC, FACB, FACD, FACE, FACF, FACG, FACH, parálisis de nervios faciales, parálisis facial, displasias ectodérmicas faciales, displasia ectodérmica facial, distrofia facio-escapulo-humeral, espectro facio-auriculo-vertebral, síndrome facio-cardio-cutáneo, displasia

facio-fronto-nasal, síndrome faciocutaneoesquelético, síndrome faciodigitogenital, displasia faciogenital, síndrome
 faciogenitopopliteal, síndrome faciopalatoóseo, síndrome faciopalatoóseo de tipo II, distrofia muscular
 facioscapulohumeral, hipoglucemia facticia, deficiencia de factor VIII, deficiencia de factor IX, deficiencia de factor IX,
 5 deficiencia de factor XI, deficiencia de factor XII, deficiencia de factor XIII, enfermedad de Fahr, enfermedad de Fahr,
 insuficiencia de secreción factor intrínseco gástrico, enfermedad de Fairbank, tetralogía de Fallot, acrogeria familiar,
 acrogeria familiar, acromicria familiar, acromicria familiar, poliposis de colon adenomatosa familiar, poliposis
 adenomatosa familiar con manifestaciones extraintestinales, holoprosencefalia alobar familiar, deficiencia de alfa-
 10 Lipoproteína familiar, corea amiotrófica familiar con acantocitosis, mioclonos arrítmico familiar, condrocalcinosis
 articular familiar, síndrome de mola atípica familiar-melanoma maligno, enfermedad beta amplia familiar, gota de
 calcio familiar, artropatía de pirofosfato de calcio familiar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica familiar,
 descamación cutánea continua familiar, amiloidosis cutánea familiar, disproteinemia familiar, enfisema familiar,
 enteropatía familiar de microvellosidades, retinosquiasis foveal familiar, síndrome de hibernación familiar, colesterol
 15 alto familiar, hemocromatosis familiar, colesterol en sangre alto familiar, deficiencia de lipoproteínas de alta densidad
 familiar, colesterol sérico alto familiar, hiperlipidemia familiar, hipoproteinemia familiar con enteropatía
 linfangiectática, ictericia familiar, nefronofitosis juvenil familiar-anomalía ocular asociada, amiloidosis de líquen familiar
 (tipo IX), estenosis lumbar familiar, linfedema familiar precoz, fiebre mediterránea familiar, poliposis múltiple familiar,
 ampolla nuchal familiar, poliserositis paroxismal familiar, poliposis coli familiar, hipertensión pulmonar primaria familiar,
 glicosuria renal familiar, anemia esplénica familiar, enfermedad de sobresalto familiar, amiloidosis visceral familiar
 20 (tipo VIII), FAMMM, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD, FANCE, panmielopatía de Fanconi, pancitopenia de
 Fanconi, Fanconi II, anemia de Fanconi, anemia de Fanconi tipo I, grupo de complementación de anemia de
 Fanconi, grupo de complementación A de anemia de Fanconi, grupo de complementación B de anemia de Fanconi,
 grupo de complementación C de anemia de Fanconi, grupo de complementación D de anemia de Fanconi, grupo de
 complementación E de anemia de Fanconi, grupo de complementación G de anemia de Fanconi, grupo de
 25 complementación H de anemia de Fanconi, anemia de Fanconi variante Estren-Dameshek, FANF, FANG, FANH,
 FAP, FAPG, enfermedad de Farber, lipogranulomatosis de Farber, FAS, hipoglucemia en ayunas, hiperlipemia
 inducida por grasas, enfermedad granulomatosa mortal de la infancia, trastornos de oxidación grasos, hígado graso
 con encefalopatía, FAV, FCH, FCMD, síndrome de FCS, FD, FDH, síndrome mucocutáneo febril de tipo Stevens
 Johnson, dermatosis neutrofílica febril aguda, convulsiones febriles, síndrome de Feinberg, síndrome de Feissinger-
 30 Leroy-Reiter, síndrome de pseudo-Turner femenino, disgenesia femoral bilateral-anomalía de Robin, disgenesia
 femoral bilateral, síndrome facial femoral, síndrome de hipoplasia femoral-facies inusuales, síndrome de alcohol
 fetal, síndrome anticonvulsivo fetal, higroma quístico fetal, efectos fetales del alcohol, efectos fetales de la varicela,
 efectos fetales de la talidomida, efectos fetales del virus de la varicela zóster, fibrosis endomiocárdica fetal, síndrome
 de cara fetal, síndrome de iritis fetal, síndrome de transfusión vetal, síndrome de valproato fetal, síndrome de
 35 exposición a ácido valproico fetal, infección por varicela fetal, síndrome de la varicela zóster fetal, FFDD tipo II,
 síndrome de FG, FGDY, FHS, deficiencia de factor estabilizador de fibrina, deficiencia de fibrinasa, degeneración
 fibrinoide de astrocitos, leucodistrofia fibrinoide, deficiencia de fibrinoligasa, fibroblastoma perineural, enfermedad
 fibroquística del páncreas, fibrodisplasia osificante progresiva, endocarditis fibroelástica, fibromialgia, fibromialgia-
 fibromiositis, fibromiositis, colangitis fibrosante, fibrositis, anquilosis fibrosa de articulaciones múltiples, cavernositis
 40 fibrosa, displasia fibrosa, placas fibrosas del pene, esclerosis fibrosa del pene, tipo Fickler-Winkler, enfermedad de
 Fiedler, síndrome del quinto dígito, síndrome de Filippi, amiloidosis de tipo finés (tipo V), bloqueo cardíaco congénito
 de primer grado, síndrome de primer y segundo arco branquial, síndrome de de Fischer, síndrome de olor a
 pescado, lengua fisurada, síndrome de adenoma plano, enfermedad de Flatau-Schilder, monooxigenasa 2 que
 contiene flavina, enfermedad beta flotante, síndrome de Floating-Harbor, bazo flotante, síndrome de lactante
 hipotónico, síndrome de válvula hipotónica, afasia fluente, FMD, FMF, forma hepática adulta de FMO, FMO2, FND,
 45 síndrome de displasia dérmica focal, hipoplasia dérmica focal, displasia dermatofalángica focal, distonía focal,
 epilepsia focal, displasia dérmica facial focal de tipo II, neuromiotonía focal, FODH, síndrome de Folling, enfermedad
 de Fong, FOP, enfermedad de Forbes, síndrome de Forbes-Albright, enfermedad de Forestier, síndrome de Forsius-
 Eriksson (ligado al cromosoma X), enfermedad de Fothergill, síndrome de Fountain, distrofia foveal progre-
 siva, síndrome de FPO de tipo II, FPO, acondrogénesis de tipo Fraccaro (tipo IB), síndrome de cromosoma X frágil,
 50 síndrome de Franceschetti-Zwahlen-Klein, síndrome de discefalia de Francois, distrofia moteada de Francois-
 Neetens, distrofia corneal jaspeada, síndrome de Fraser, FRAXA, FRDA, hiperlipoproteinemia de Fredrickson de tipo
 I, síndrome de Freeman-Sheldon, síndrome de Freire-Maia, síndrome de Frey, ataxia de Friedreich, ataxia de
 Friedreich, enfermedad de Friedreich, tabes de Friedreich, FRNS, síndrome de Froelich, síndrome de Frommel-
 Chiari, síndrome de Frommel-Chiari-Lactación-atrofia del útero, síndrome frontodigital, disostosis frontofacial,
 55 displasia frontofacial, displasia frontonasal, displasia frontonasal con craneosinostosis coronal, deficiencia de
 fructosa-1-fosfato aldolasa, fructosemia, fructosuria, síndrome de Fryns, FSH, FSHD, FSS, distrofia de Fuchs,
 fucosidosis de tipo 1, fucosidosis de tipo 2, fucosidosis de tipo 3, síndrome de Fukuhara, enfermedad de Fukuyama,
 distrofia muscular de tipo Fukuyama, distrofia muscular de tipo Fukuyama, deficiencia de fumarilacetacetasa,
 lengua acanalada, síndrome G, deficiencia de G6PD, G6PD, GA I, GA IIB, GA IIA, GA II, GAI y MADD, síndrome de
 60 galactorrea-amenorrea no puerperal, galactorrea-amenorrea sin embarazo, deficiencia de galactosamina-6-
 sulfatasa, deficiencia de galactosa-1-fosfato uridil transferasa, galactosemia, deficiencia de GALB, síndrome de
 Galloway-Mowat, síndrome de Galloway, deficiencia de GALT, deficiencia de gammaglobulina, GAN, deficiencia de
 gangliósido neuraminidasa, deficiencia de gangliósido sialidasa, gangliosidosis GM1 de tipo 1, gangliosidosis GM2
 de tipo 2, gangliosidosis beta-deficiencia de hexosaminidasa B, síndrome de Gardner, síndrome de Gardner,
 65 gargolismo, síndrome de Garies-Mason, síndrome de Gasser, insuficiencia de secreción de factor intrínseco
 gástrico, cobalamina de enterocitos, gastrinoma, gastritis, laceración-hemorrágica gastroesofágica, poliposis

gastrointestinal y cambios ectodérmicos, gastrosquisis, enfermedad de Gaucher, Gaucher-Schlagenhauser, síndrome de Gayet-Wernicke, GBS, GCA, síndrome de GCM, GCPS, enfermedad de Gee-Herter, enfermedad de Gee-Thaysen, enfermedad de Gehrig, síndrome de Gelineau, síndrome de Genée-Wiedemann, distonía generalizada, neuromiotonía familiar generalizada, fibromatosis generalizada, epilepsia en flexión generalizada, glucogenosis generalizada, glucogenosis generalizada, hiperhidrosis generalizada, lipofuscinosis generalizada, miastenia grave generalizada, miotonía generalizada, neuromiotonía esporádica generalizada, trastornos genéticos, defectos de los tractos genital y urinario, defectos de los tractos genital y urinario, síndrome de Gerstmann, tetrada de Gerstmann, GHBP, GHD, GHR, enfermedad axonal gigante, neuropatía axonal gigante, linfoma benigno gigante, glioblastoma-astrocitoma de células gigantes, arteritis de células gigantes, enfermedad de células gigantes del hígado, hepatitis de células gigantes, cirrosis de células gigantes de recién nacidos, quiste gigante de la retina, hiperplasia de ganglios linfáticos gigantes, síndrome de plaquetas gigantes hereditario, lengua gigante, distrofia macular en patrón, enfermedad de Gilbert, síndrome de Gilbert, síndrome de Gilbert-Dreyfus, síndrome de Gilbert-Dreyfus, síndrome de Gilbert-Lereboullet, síndrome de Gilford, síndrome de Gilles de la Tourette, síndrome de Gillespie, fibromatosis gingival-dedos, uñas, nariz, oído anómalos-esplenomegalia, deficiencia de GLA, GLA, GLB1, glioma de la retina, afasia global, leucodistrofia globosa, glosptosis-micronagtia y fisura palatina, deficiencia de glucocerebrosidasa, glucocerebrosidosis, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, defecto de transporte de glucosa-6-fosfato, deficiencia de glucosa-6-fosfato translocasa, deficiencia de glucosa-6-fosfatasa, malabsorción de glucosa-galactosa, malabsorción de glucosa-galactosa, lipidosis de glucosilo ceramida, aciduria glutárica I, acidemia glutárica I, acidemia glutárica II, aciduria glutárica II, aciduria glutárica tipo II, aciduria glutárica tipo III, acidemia glutárica I, acidemia glutárica II, aciduria glutárica I, aciduria glutárica II, aciduria glutárica tipo IIA, aciduria glutárica tipo IIB, deficiencia de glutaril-CoA deshidrogenasa, defecto de transporte de glutarato-aspartato, enteropatía sensible al gluten, enfermedad de glucógeno del músculo tipo VII, enfermedad de almacenamiento de glucógeno I, enfermedad de almacenamiento de glucógeno III, enfermedad de almacenamiento de glucógeno IV, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo V, enfermedad de almacenamiento de glucógeno VI, enfermedad de almacenamiento de glucógeno VII, enfermedad de almacenamiento de glucógeno VIII, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, glucogenosis, glucogenosis tipo I, glucogenosis tipo IA, glucogenosis tipo IB, glucogenosis tipo II, glucogenosis tipo II, glucogenosis tipo III, glucogenosis tipo IV, glucogenosis tipo V, glucogenosis tipo VI, glucogenosis tipo VII, glucogenosis tipo VIII, aciduria glicólica, aciduria glicólica, lipidosis de glucolípidos, gangliosidosis GM2 tipo 1, gangliosidosis GM2 tipo 1, GNPTA, tiroiditis autoinmunitaria bociosa, síndrome de Goldenhar, síndrome de Goldenhar-Gorlin, enfermedad de Goldscheider, síndrome de Goltz, síndrome de Goltz-Gorlin, disgenesia gonadal 45 X, disgenesia gonadal XO, goniodisgenesia-hipodoncia, síndrome de Goodman, Goodman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Gordon, síndrome de Gorlin, síndrome de Gorlin-Chaudhry-Moss, eritroqueratodermia congénita progresiva simétrica de Gottron, síndrome de Gottron, síndrome de Gougerot-Carteaud, epilepsia gran mal, distrofia corneal de tipo granular, arteritis granulomatosa, colitis granulomatosa, dermatitis granulomatosa con eosinofilia, ileitis granulomatosa, enfermedad de Graves, hipertiroidismo de Graves, enfermedad de Graves, síndrome de cefalopolisindactilia de Greig, distrofia corneal de tipo I de Groenouw, distrofia corneal de tipo II de Groenouw, síndrome de Gronblad-Strandberg, síndrome de Grotton, deficiencia de receptor de hormona de crecimiento, deficiencia de proteína de unión a hormona de crecimiento, deficiencia de hormona de crecimiento, síndrome de deficiencia mental-de crecimiento de Myhre, retraso del crecimiento-anomalía de Rieger, GRS, síndrome de Gruber, GS, GSD6, GSD8, GTS, deficiencia de guanosina trifosfato-ciclohidrolasa, deficiencia de guanosina trifosfato-ciclohidrolasa, porfiria de Guenther, síndrome de Guerin-Stem, Guillain-Barré, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad Gunther, enfermedad H, síndrome de H. Gottron, síndrome de H. Gottron, espasmos habituales, HAE, deficiencia de factor de Hageman, factor de Hageman, síndrome de Haim-Munk, síndrome de Hajdu-Cheney, Hajdu Cheney, deficiencia de HAL, síndrome de Hall-Pallister, síndrome de Hallermann-Streiff-Francois, síndrome de Hallermann-Streiff, enfermedad de Hallervorden-Spatz, síndrome de Hallervorden-Spatz, enfermedad de Hallopeau-Siemens, duplicación de Hallux-polidactilia postaxial y ausencia de cuerpo calloso, síndrome de Halushi-Behcet, hamartoma de los ganglios linfáticos, síndrome de Hand-Schueller-Christian, HANE, síndrome de Hanhart, síndrome de la marioneta feliz, síndrome de Harada, síndrome de HARD +/-E, síndrome de HARD, labio leporino, feto feto arlequín, arlequín tipo DOC 6, arlequín tipo ictiosis, arlequín tipo ictiosis, síndrome de Harley, síndrome de Harrington, síndrome de Hart, enfermedad de Hartnup, Trastorno de Hartnup, síndrome de Hartnup, enfermedad de Hashimoto, síndrome de Hashimoto-Pritzker, síndrome de Hashimoto, Thyroiditis de Hashimoto, Thyroiditis de Hashimoto, síndrome de Hashimoto-Pritzker, síndrome de Hay Well, síndrome de Hay-Wells displasia ectodérmica, HCMM, HCP, HCTD, HD, síndrome de corazón-mano (tipo Holt-Oram), cardiopatía, síndrome de Hecht, HED, síndromes de Heerferdt-Waldenstrom y Lofgren, enfermedad de Hegglin, síndrome de Heinrichsbauer, hemangiomas, hemangioma familiar, síndrome de hemangioma-trombocitopenia, hemangiomatosis condrodistrófica, síndrome de fisuras branquiales hemangiomatosis-pseudofisura labial, microsomía hemifacial, hemimegalencefalia, hemiparesis de parálisis cerebral, hemiplegia de parálisis cerebral, hemisección de la médula espinal, hemocromatosis, síndrome de hemocromatosis, amiloidosis relacionada con hemodiálisis, síndromes de hemoglobina lepore, anemia hemolítica del recién nacido, anemia de anticuerpos fríos hemolítica, enfermedad hemolítica del recién nacido, síndrome hemolítico-urémico, síndrome hemolítico-urémico, hemofilia, hemofilia A, hemofilia B, factor IX de hemofilia B, hemofilia C, trombocitopenia distrófica hemorrágica, aleucia hemorrágica, hemosiderosis, deficiencia de fructocinasa hepática, deficiencia de fosforilasa cinasa hepática, porfiria hepática, porfirias hepáticas, porfirias hepáticas, enfermedad veno-oclusiva hepática, síndrome hepatorenal, degeneración hepatolenticular, deficiencia de hepatofosforilasa, glucogenosis hepatorenal, síndrome hepatorenal, tirosinemia hepatorenal, acromelalgia hereditaria, alcaptonuria hereditaria, amiloidosis hereditaria, angioedema hereditario,

distasia arreflética hereditaria, heredopatía atáctica-ataxia hereditaria polineurítica, ataxia hereditaria, ataxia hereditaria de tipo Friedrich, acantosis nigricans benigna hereditaria, ataxia cerebelar hereditaria, corea hereditaria, corea progresiva crónica hereditaria, trastornos del tejido conjuntivo hereditarios, coproporfiria hereditaria, coproporfiria hereditaria-porfiria, melanoma maligno cutáneo hereditario, sordera coproporfiria hereditaria-retinitis pigmentaria, trastorno heredable de deficiencia de zinc, DNS hereditaria, lipodosis distópica hereditaria, enfisema hereditario, intolerancia a la fructosa hereditaria, telangiectasia hemorrágica hereditaria, telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I, telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo II, telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo III, síndrome de hiperuricemia hereditaria y coreoatetosis, leptocitosis hereditaria mayor, leptocitosis hereditaria menor, linfedema hereditario, linfedema hereditario tarda, linfedema hereditario tipo I, linfedema hereditario tipo II, neuropatía sensorial motora hereditaria, neuropatía sensorial motora hereditaria I, neuropatía sensorial motora hereditaria tipo III, nefritis hereditaria, nefritis hereditaria y sordera nerviosa, amiloidosis nefropática hereditaria, nefropatía hereditaria y sordera, cáncer colorrectal no poliposo hereditario, carcinoma colorrectal no poliposo hereditario, anemia hemolítica no esferocítica hereditaria, onicoosteodisplasia hereditaria, neuroretinopatía óptica hereditaria, poliposis coli hereditaria, neuropatía sensorial y autónoma hereditaria tipo I, neuropatía sensorial y autónoma hereditaria tipo II, neuropatía sensorial y autónoma hereditaria tipo III, neuropatía sensorial motora hereditaria, neuropatía sensorial hereditaria tipo I, neuropatía sensorial hereditaria tipo I, neuropatía sensorial hereditaria tipo II, neuropatía sensorial hereditaria tipo III, neuropatía radicular sensorial hereditaria tipo I, neuropatía radicular sensorial hereditaria tipo I, neuropatía radicular sensorial hereditaria tipo II, cáncer específico de sitio hereditario, anemia hemolítica esferocítica hereditaria, esferocitosis hereditaria, tirosinemia hereditaria tipo 1, trastornos del tejido conjuntivo heredables, síndrome de Herlitz, facomatosis de Hermans-Herzberg, síndrome de Hermansky-Pudlak, síndrome de Hermansky-Pudlak, hermafroditismo, herpes zóster, herpes iris de tipo Stevens-Johnson, enfermedad de Hers, beta talasemia heterocigota, deficiencia de subunidad alfa de hexoaminidasa (variante B), deficiencia de subunidad alfa de hexoaminidasa (variante B), HFA, HFM, HGPS, HH, HHHO, HHRH, HHT, hernia de hiato-microcefalia-nefrosis de tipo Galloway, hidradenitis supurativa, hidrosadenitis axilar, hidrosadenitis supurativa, displasias ectodérmicas hidróticas, síndrome de HIE, ano imperforado alto, alto contenido en potasio, escápula alta, HIM, enfermedad de Hirschsprung, enfermedad de Hirschsprung adquirida, enfermedad de Hirschsprung-polidactilia del cúbito y dedo gordo del pie grande y VSD, enfermedad de Hirschsprung con braquidactilia de tipo D, hirsutismo, deficiencia de HIS, deficiencia de histidina amoniaco-asa (HAL), deficiencia de histidasa, histidinemia, histidinemia, histiocitosis, histiocitosis X, HLHS, HLP tipo II, HMG, HMI, HMSN I, HNHA, HOCM, enfermedad de Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, enfermedad de Hollaender-Simons, síndrome de Holmes-Adie, deficiencia de holocarboxilasa sintetasa, holoprosencefalia, complejo de holoprosencefalia-malformación, secuencia de holoprosencefalia, síndrome de Holt-Oram, síndrome de Holt-Oram tipo corazón-mano, homocistinemia, homocistinuria, homocistinuria, deficiencia de ácido homogentísico oxidasa, aciduria homogentísica, deficiencia de alfa-1-antitripsina homocigota, HOOD, síndrome de Homer, enfermedad de Horton, HOS, HOS1, acroandrogonesis de tipo Houston-Harris (tipo IA), HPS, HRS, HS, HS, HS, HS, HS, HSAN tipo I, HSAN tipo II, HSAN-III, HSMN, HSMN tipo III, HSN I, HSN-III, enfermedad de Huebner-Herter, parche de Hunner, úlcera de Hunner, síndrome de Hunter, síndrome de Hunter, displasia acromesomélica de tipo Hunter-Thompson, corea de Huntington, enfermedad de Huntington, enfermedad de Hurler, enfermedad de Hurler, síndrome de Hurler, síndrome de Hurler-Scheie, HUS, HUS, síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford, síndrome de Hutchinson-Gilford, síndrome de Hutchinson-Weber-Peutz, síndrome de Hutchinson-Weber-Peutz, síndrome huterita de tipo Bowen-Conradi, panneuropatía hialina, hidranencefalia, hidrocefalo, hidrocefalo, agria y displasia retiniana, hidrocefalo interno de tipo Dandy-Walquer, hidrocefalo no comunicante de tipo Dandy-Walquer, hidrocefalia, hidronefrosis con expresión facial peculiar, deficiencia de hidroxilasa, higroma colli, síndrome de hiper-IgE, síndrome de hiper-IgM, síndrome de hiper IgM, hiperaldosteronismo, hiperaldosteronismo alcatosis hipocalémica, hiperaldosteronismo sin hipertensión, hiperamonemia, hiperamonemia debida a deficiencia de carbamifosfato sintetasa, hiperamonemia debida a deficiencia de ornitina transcarbamilasa, hiperamonemia tipo II, hiper-beta carnosinemia, hiperbilirrubinemia I, hiperbilirrubinemia II, hipercalcemia familiar con nefrocalcinosis e indicanuria, hipercalcemia-estenosis aórtica supraavalar, raquitismo hipercalcúrico, acidosis hipercápnica, enteropatía por pérdida de proteína hipercatabólica, acidosis hiperclorémica, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia tipo IV, hiperquilomicronemia, hipercistinuria, hipereplexia, articulaciones hiperextensibles, púrpura hiperglobulinémica, hiperglicinemia con cetoacidosis y acidosis láctica de tipo propiónico, hiperglicinemia no cetósica, hipogonadismo hipergonadotrópico, síndrome de hiperinmunoglobulina E, síndrome de hiperinmunoglobulina E-infección recurrente, hiperinmunoglobulinaemia E-estafilocócica, hiperaemia, síndrome hiperkinético, retinitis hiperlipémica, hiperlipidemia I, hiperlipidemia IV, hiperlipoproteinemia tipo I, hiperlipoproteinemia tipo III, hiperlipoproteinemia tipo IV, hiperoxaluria, hiperfalangia-clinodactilia de dedo índice con síndrome de Pierre Robin, hiperfenilalanemia, epidermolisis hiperplásica bullosa, hiperpnea, hiperpotasemia, hiperprebeta-lipoproteinemia, hiperprolinemia tipo I, hiperprolinemia tipo II, hiperesplenismo, hipertelorismo con anomalías esofágicas e hipospadias, síndrome de hipertelorismo-hipospadias, cardiomiopatía hipertrófica, heuropatía intersticial hipertrófica, neuritis intersticial hipertrófica, radiculoneuropatía intersticial hipertrófica, neuropatía hipertrófica de Refsum, cardiomiopatía obstructiva hipertrófica, síndrome de hiperuricemia-coreoatetosis-automutilación, hiperuricemia-oligofrenia, hipervalinemia, tipo hipocalcificada (hipomineralizada), hipocondrogénesis, hipocondroplasia, hipogammaglobulinemia, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, distrofia hipogenital con tendencia diabética, síndrome de hipoglosia-hipodactilia, hipoglucemia, hipoglucemia, hipoglucemia exógena, hipoglucemia con macroglosia, síndrome de hipoglicosilación tipo 1a, síndrome de hipoglicosilación tipo 1a, hipogonadismo con anosmia, hipogonadismo hipogonadotrópico y anosmia, displasia ectodérmica hipohidrótica, displasia ectodérmica hipohidrótica de tipo dominante autosómico, displasias ectodérmicas hipohidróticas autorrecesivas, hipocalemia,

alcalosis hipocalémica con hipercalcemia, síndrome hipocalémico, hipolactasia, tipo hipomadura (dientes cubiertos de nieve), hipomelanosis de Ito, síndrome de hipomelia-hipotricosis-hemangioma facial, neuropatía por hipomielinización, hipoparatiroidismo, hipofosfatasa, raquitismo hipofosfatémico con hipercalcemia, hipopigmentación, hipopigmentación, lesión macular hipopigmentada, hipoplasia del músculo depresor del ángulo de la boca con defectos cardíacos, anemia hipoplásica, anemia congénita hipoplásica, condrodistrofia hipoplásica, esmalte hipoplásico-onicosis-hipohidrosis, tipo hipoplásico (hipoplásico-explásico), síndrome de corazón izquierdo hipoplásico, síndrome de corazón izquierdo hipoplásico, pulgares hipoplásicos-trifalángicos, síndrome de hipotalasemia, síndrome de hipospadias-disfagia, hiposmia, hamartoblastoma hipotalámico-hipopituitarismo-ano imperforado-polidactilia, infantilismo hipotalámico-obesidad, hipotiroidismo, síndrome de hipotonía-hipomente-hipogonadismo-obesidad, defecto de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (ausencia completa de), enfermedad de células I, hipoglucemia iatrogénica, IBGC, síndrome de IBIDS, IBM, IBS, IC, enfermedad de células I, ICD, síndrome de ICE tipo Cogan-Reese, amiloidosis de tipo islandés (tipo VI), enfermedad de células I, eritroderma ictiosiforme con implicación corneal y sordera, eritroderma ictiosiforme-anomalía del cabello-crecimiento y hombres, eritroderma ictiosiforme con vacuolización leucocitaria, ictiosis, ictiosis congénita, ictiosis congénita con tricodistrofia, ictiosis hystrix, ictiosis hystrix gravior, ictiosis lineal circumfleja, ictiosis simple, ictiosis-síndrome de Tay, ictiosis vulgar, ictiosis vulgar, enfermedad de almacenamiento de lípidos neutros ictiódica, leptospirosis ictérica, leptospirosis icterohemorrágica, icterus (familiar crónico), icterus grave neonatal, icterus intermitente juvenil, hipoventilación alveolar idiopática, amiloidosis idiopática, arteritis idiopática de Takayasu, calcificación de ganglios basales idiopática (IBGC), neuropatía de plexo braquial idiopática, distonía cervical idiopática, dilatación idiopática de la arteria pulmonar, dilatación idiopática de la arteria pulmonar, parálisis facial idiopática, hiperlipemia familiar idiopática, estenosis subaórtica hipertrófica idiopática, hipoproteinemia idiopática, deficiencia de inmunoglobulina idiopática, hepatitis neonatal idiopática, colitis ulcerosa no específica idiopática, colitis ulcerosa no específica idiopática, periflebitis periférica idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, anemia sideroblástica refractaria idiopática, anemia sideroblástica refractaria idiopática, hematuria renal idiopática, esteatorrea idiopática, trombocitemia idiopática, trombocitemia idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), IDPA, IDPA, nefropatía de IgA, nefropatía de IgA, IHSS, ileítis, ileocolitis, amiloidosis de tipo Illinois, ILS, IM, IMD2, IMD5, IMD5, defecto inmunitario debido a ausencia de tipo, anemia hemolítica inmunitaria paroxismal fría, inmunodeficiencia con ataxia telangiectasia, inmunodeficiencia celular con síntesis de inmunoglobulinas anómala, inmunodeficiencia común variable inclasificable, inmunodeficiencia con hiper-IgM, inmunodeficiencia con leucopenia, inmunodeficiencia-2, inmunodeficiencia-5 (IMD5), deficiencia de inmunoglobulinas, ano imperforado, ano imperforado con anomalías de mano, pie y oído, síndrome de conducto nasolacrimal imperforado y envejecimiento prematuro, síndrome de neutrófilos impotentes, incapacidad para abrir la boca completamente y flexor de los dedos corto, INAD, INAD, error innato de la síntesis de urea de tipo arginasa, error innato de la síntesis de urea de tipo arginino succínico, errores innatos de la síntesis de urea de tipo carbamilo fosfato, error innato de la síntesis de urea de tipo citrulinemia, errores innatos de la síntesis de urea de tipo glutamato sintetasa, INCL, miositis de cuerpos de inclusión, defecto de tabique auriculoventricular incompleto; feminización testicular incompleta, feminización testicular incompleta, incontinencia pigmentaria, incontinencia pigmentaria, incontinencia pigmentaria acrómica, anomalía del dedo índice con síndrome de Pierre Robin, amiloidosis de tipo Indiana (tipo II), mastocitosis sistémica indolente, afasia adquirida infantil, enfermedad de riñón poliquístico recesiva autosómica infantil, beriberi infantil, gangliosido cerebral infantil, gangliosido cerebral infantil, parálisis cerebral infantil, cistinosis infantil, epilepsia infantil, síndrome de Fanconi infantil con cistinosis, lipofuscinosis ceroides neuronal de tipo finés infantil, enfermedad de Gaucher infantil, hipoglucemia infantil, hipofosfatasa infantil, enfisema lobar infantil, encefalopatía mioclónica infantil, encefalopatía mioclónica infantil y polimiclonía, iofibromatosis infantil, encefalopatía necrotizante infantil, lipofuscinosis ceroides neuronal infantil, distrofia neuroaxonal infantil, enfermedad de Schindler de aparición infantil, enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico infantil, enfermedad de Refsum infantil (IRD), sipoidosis infantil GM-2 gangliosidosis (tipo S), sipoidosis infantil GM-2 gangliosidosis (tipo S, apnea del sueño infantil, espasmos infantiles, atrofia muscular espinal infantil (todos los tipos), atrofia muscular espinal infantil ALS, atrofia muscular espinal infantil tipo I, lipofuscinosis ceroides neuronal de tipo infantil, ictericia infecciosa, cáncer de mama inflamatorio, síndrome sebáceo de nevus lineal inflamatorio; iniencefalia, acantosis nigricans resistente a la insulina, lipodistrofia de insulina, diabetes insulino dependiente, mioclono de intención, cistinosis intermedia, enfermedad de orina de jarabe de arce intermedia, ataxia intermitente con deficiencia de piruvato deshidrogenasa, ataxia intermitente con deficiencia de piruvato deshidrogenasa, enfermedad de orina de jarabe de arce intermitente, hidrocefalo interno, cistitis intersticial, delección intersticial de 4q incluida, delección intersticial de 4q- incluida, lipodistrofia intestinal, granulomatosis lipofágica intestinal, limfangiectasia intestinal, poliposis intestinal I, poliposis intestinal II, poliposis intestinal II, poliposis intestinal III, síndrome de poliposis intestinal-pigmentación cutánea, síndrome de poliposis intestinal-pigmentación cutánea, pseudo-obstrucción intestinal con oftalmoplegia externa, neoplasma intracraneal, tumores intracraneales, malformaciones vasculares intracraneales, enanismo intrauterino, sinequia intrauterina, sonrisa invertida y vejiga neuropática oculta, amiloidosis tipo Iowa (tipo IV), IP, IPA, síndrome endotelial iridocorneal, síndrome endotelial iridocorneal (ICE) de tipo Cogan-Reese, iridogoniodisgeneria anomalías somáticas, atrofia del iris con edema corneal y glaucoma, síndrome de nevus del iris, anemia por sobrecarga de hierro, anemia por sobrecarga de hierro, enfermedad de sobrecarga de hierro, síndrome de intestino irritable, síndrome de colon irritable, síndrome de Isaacs, síndrome de Isaacs-Merten, cardiomiopatía isquémica, secuencia de lisencefalia aislada, amiloidosis de isoleucina 33, deficiencia de ácido isovalérico CoA deshidrogenasa, acidemia isovalérica, acidemia isovalérica, deficiencia de isovalerilo CoA carboxilasa, hipomelanosis de ITO, ITO, ITP, IVA, síndrome de Ivemark, quistes de Iwanoff, convulsión de Jackknife, craneosinostosis de Jackson-Weiss, síndrome de Jackson-Weiss, epilepsia jacksoniana, síndrome de Jacobsen, síndrome de Jadassohn-Lewandowsky, enfermedad de Jaffe-

Lichenstein, enfermedad de Jakob, enfermedad de Jakob-Creutzfeldt, Janeway I, disgammaglobulinemia de Janeway, disostosis metafísica de Jansen, condrodisplasia metafísica de tipo Jansen, síndrome de Jarcho-Levin, Jaw-Winking, JBS, JBS, JDMS, síndrome de Jegher, síndrome de Jegher, atresia duodenal, yeyunitis, yeyunoileítis, síndrome de Jervell y Lange-Nielsen, síndrome de Jeune, JMS, síndrome de Job, síndrome de Job-Buckley, 5
 síndrome de Johanson-Blizzard, John Dalton, enfermedad de Johnson-Stevens, alopecia de Jonston, enfermedad de Joseph, enfermedad de Joseph tipo I, enfermedad de Joseph tipo II, enfermedad de Joseph tipo III, síndrome de Joubert, síndrome de Joubert-Bolthausen, JRA, JRA, síndrome de Jüberg-Hayward, síndrome de Jüberg-Marsidi, 10
 síndrome de retraso mental de Jüberg-Marsidi, Jumping Frenchmen, Jumping Frenchmen de Maine, artritis juvenil, artritis juvenil, enfermedad de riñón poliquístico recesiva autosómica juvenil, cistinosis juvenil, dermatomiositis juvenil (infancia) (JDMS), diabetes juvenil, enfermedad de Gaucher juvenil, síndrome de coreoatetosis gotosa juvenil y 15
 retraso mental, malabsorción intestinal juvenil de vit. B12, malabsorción intestinal juvenil de vit. B12, degeneración macular juvenil, anemia perniciosa juvenil, retinosquiasis juvenil, artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil incluida, atrofia muscular espinal juvenil ALS incluida, atrofia muscular espinal juvenil 20
 tipo III, adiposis yuxta-articular dolorosa, adiposis yuxta-articular dolorosa, hiperplasia yuxtaglomerular, síndrome de maquillaje Kabuki, enfermedad de Kahler, síndrome de Kallmann, síndrome de Kanner, enfermedad de Kanzaki, enfermedad de Kaposi (no sarcoma de Kaposi), deficiencia de cadena ligera kappa, síndrome de Karsch-Neugebauer, síndrome de Karsch-Neugebauer, síndrome de Kartagener-enfermedad sinobronquial crónica y 25
 dextrocardia, tríada de Kartagener, síndrome de Kasabach-Merritt, síndrome de Kast, enfermedad de Kawasaki, síndrome de Kawasaki, síndrome de KBG, KD, enfermedad de Kearns-Sayre, síndrome de Kearns-Sayre, síndrome de Kearns-Sayre, enfermedad de Kennedy, síndrome de Kennedy, atrofia muscular espinal y bulbar de tipo 30
 Kennedy, enfermedad de Kennedy-Stefanis, enfermedad de Kenny, síndrome de Kenny, estenosis tubular de tipo Kenny, síndrome de Kenny-Caffe, quera. palmoplant. con. pies planos oni. periodon. arac., síndrome de queratosis-ictiosis-sordera, queratocono, queratocono, queratocono posticus circumscriptus, queratolisis, queratolisis exfoliativa congénita, eritema invernal queratolítico, queratomalacia, queratosis folicular, queratosis folicular espinulosa 35
 decalvante, queratosis folicular espinulosa decalvante-ictiosis, queratosis nigricans, queratosis palmoplantar con periodontopatía y onicogripos, queratosis palmoplantar congénita pies planos onicogripos periodontosis aracnodactilia, queratosis palmoplantar congénita, pies planos, onicogripos, periodontosis, aracnodactilia, acroosteólisis, queratosis rubra figurata, queratosis seborreica, deficiencia de cetoácido descarboxilasa, 40
 cetoaciduria, glicinemia cetósica, glicinemia cetósica, KFS, síndrome de KID, agenesia de riñón, riñones quísticos-aplasia renal-síndrome de Joubert, síndrome de Killian, síndrome de Killian/Teschler-Nicola, síndrome de Kiloh-Nevin III, enfermedad de cabello ensortijado, síndrome de Kinsbourne, deformidad de Kleeblattschadel, síndrome de 45
 Kleine-Levin, síndrome de hibernación de Kleine-Levin, Klinefelter, síndrome de Klippel-Feil, síndrome de Klippel-Feil tipo I, síndrome de Klippel-Feil tipo II, síndrome de Klippel-Feil tipo III, síndrome de Klippel-Trenaunay, síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber, síndrome de Kluver-Bucy, KMS, displasia de Kniest, síndrome de Kniest, enfermedad 50
 de Kobner, síndrome de Koebberling-Dunnigan, enfermedad de Kohlmeier-Degos, enfermedad de Kok, psicosis de Korsakoff, síndrome de Korsakoff, enfermedad de Krabbe incluida, leucodistrofia de Krabbe, síndrome de Kramer, KSS, KSS, KTS, síndrome de KTW, enfermedad de Kufts, enfermedad de Kugelberg-Welander, enfermedad de Kugelberg-Welander, 55
 síndrome de Kugelberg-Welander, síndrome de Kugelberg-Welander, síndrome de Kugelberg-Welander, parálisis de Kussmaul-Landry, KWS, deficiencia de L-3-hidroxilo-Acil-CoA deshidrogenasa (LCHAD), síndrome de Laband, síndrome de Labhart-Willi, síndrome laberíntico, hidrops laberíntico, síndrome lacrimo-auriculo-60
 dento-digital, intolerancia a lactasa aislada, deficiencia de lactasa, lactación-atrofia del útero, acidosis láctica-neuropatía óptica hereditaria de Leber, acidemia láctica y piruvato con sensibilidad a hidratos de carbono, acidemia láctica y piruvato con ataxia episódica y debilidad, acidemia láctica y piruvato con sensibilidad a hidratos de carbono, láctica y piruvato, acidosis láctica, intolerancia a la lactosa en la edad adulta, intolerancia a la lactosa, intolerancia a 65
 la lactosa en la infancia, intolerancia a la lactosa, síndrome de LADD, LADD, enfermedad de Lafora incluida, enfermedad de cuerpos de Lafora, deficiencia de factor de Laki-Lorand, LAM, ictiosis tipo Lambert, síndrome de Lambert-Eaton, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, ictiosis recesiva lamelar, ictiosis recesiva lamelar, ictiosis lamelar, ictiosis recesiva lamelar, espiroquetosis de Lancereaux-Mathieu-Weil, síndrome de Landau-Kleffner, distrofia muscular de Landouzy Dejerine, parálisis ascendente de Landry, acondrogenesia de tipo Langer-Salidino 70
 (tipo II), síndrome de Langer Giedion, granulomatosis de células de Langerhans, histiocitosis de células de Langerhans (LCH), defecto ventricular y auricular grande, enanismo de Laron, enanismo hipofisario de tipo Laron, síndrome de Larsen, distonía laríngea, Latah (observado en Malasia), distrofia neuroaxonal infantil tardía, distrofia neuroaxonal infantil tardía, síndrome de Cockayne de aparición tardía tipo III (tipo C), distonía de aparición tardía, deficiencia de inmunoglobulinas de aparición tardía, deficiencia de inmunoglobulinas de aparición tardía, esclerosis 75
 cerebral de Pelizaeus-Merzbacher de aparición tardía, distrofia corneal reticular, distrofia reticular, Launois-Bensaude, síndrome de Launois-Cleret, síndrome de Laurence, síndrome de Laurence-Moon, Laurence-Moon/Bardet-Biedl, síndrome de Lawrence-Seip, LCA, deficiencia de LCAD, LCAD, LCAD, LCAD, deficiencia de LCADH, LCH, LCHAD, LCHAD, LCPD, síndrome de Le Jeune, síndrome de Leband, amaurosis de Leber, amaurosis congénita de Leber, ausencia congénita de los conos y bastones, degeneración del tapete retiniano congénita de Leber, displasia del tapete retiniano congénita de Leber, enfermedad de Leber, atrofia óptica de Leber, neuropatía 80
 óptica de Leber, fibrosis ventricular izquierda, úlcera de la pierna, enfermedad de Legg-Calve-Perthes, enfermedad de Leigh, enfermedad Leigh, síndrome de Leigh, síndrome de Leigh (encefalomielopatía necrotizante subaguda), encefalopatía necrotizante de Leigh, síndrome de Lennox-Gastaut, síndrome lentigio-poliposo-digestivo, síndrome lentigio-poliposo-digestivo, síndrome dismorfogenético de Lenz, displasia de Lenz, síndrome de microftalmia de Lenz, síndrome de Lenz, 85
 síndrome de LEOPARD, leprecaunismo, leprecaunismo, angiomas leptomeningea, ictericia leptoespiral, enfermedad de Leri-Weill, discondrosteosis de Leri-Weill, síndrome de Leri-Weill, síndrome de

Lermoyez, enfermedad de Leroy, síndrome de Lesch Nyhan, cardiomiopatía infantil letal, enanismo neonatal letal, osteocondrodisplasia letal, enfermedad de Letterer-Siwe, albinismo de anomalía leucocítica, inclusiones leucocíticas con anomalía de plaquetas, leucodistrofia, leucodistrofia con fibras de Rosenthal, leucoencefalitis periaxial concéntrica, síndrome de Levine-Critchley, levulosis, síndrome de Levy-Hollister, LGMD, LGS, LHON, LHON, LIC, 5
 liquen ruber acuminatus, liquen acuminatus, liquen amiloide, liquen plano, liquen psoriásico, síndrome de Lignac-Debre-Fanconi, síndrome de Lignac-Fanconi, conjuntivitis línea, distrofia muscular de Limb-Girdle, distrofia muscular de Limb Girdle, síndrome de malformaciones de las extremidades-dento-digital, dextrinosis límite, hipermelanosis nevoide lineal, síndrome de nevus lineal sebáceo, esclerodermia lineal, secuencia de nevus lineal sebáceo, síndrome de nevus lineal sebáceo, lengua fisurada, lengua plegada, lengua escrotal, discinesia 10
 linguofacial, síndrome de pseudofisura labial-quiste branquial hemangiomatoso, granulomatosis lipídica, histiocitosis lipídica, tipo lípido queratina, enfermedad de almacenamiento de lípidos, miopatía de almacenamiento de lípidos asociada con deficiencia de SCAD, lipodosis por gangliósidos infantil, lipodosis por gangliósidos infantil, diabetes mellitus lipoatrófica, lipodistrofia, distrofia corneal lipoide, hiperplasia lipoide-pseudohermafroditismo masculino, hiperplasia lipoide-pseudohermafroditismo masculino, lipomatosis de páncreas congénita, lipomucopolisacaridosis 15
 tipo I, lipomielomeningocele, deficiencia de lipoproteína lipasa familiar, LIS, LIS1, lisencefalia 1, lisencefalia tipo I, variantes de lisencefalia con agenesia del cuerpo calloso, hipoplasia cerebelar u otras anomalías, enfermedad de Little, deficiencia de fosforilasa hepática, LKS, síndrome de LM, atrofia lobar, atrofia lobar del cerebro, holoprosencefalia lobar, enfisema de tensión lobar en la infancia, enfermedad de Lobstein (tipo I), deformidad de pinza de langosta, deformidad de pinza de langosta, epidermolisis bullosa localizada, lipodistrofia localizada, neuritis 20
 localizada de la cintura del hombro, enfermedad de Loeffler, fibrosis endomiocárdica de Loeffler con eosinofilia, endocarditis parietal fibroplástica de Loeffler, síndrome de Loken, síndrome de Loken-Senior, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHAD), deficiencia de acil CoA deshidrogenasa de cadena larga, acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (ACADL), deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga, síndrome QT 25
 largo sin sordera, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de Lou Gehrig incluida, síndrome de Louis-Bar, azúcar en sangre baja, deficiencia de lipoproteína beta de baja densidad, ano imperforado bajo, síndrome de potasio bajo, síndrome de Lowe, síndrome de Lowe, síndrome de Lowe-Bickel, síndrome de Lowe-Terry-MacLachlan, LS, LS, LTD, síndrome de Lubs, síndrome de Lubs, enfermedad de Luft, estenosis del canal lumbar, estenosis del canal 30
 lumbar, estenosis espinal lumbosacral, enfermedad de Lundborg-Unverricht, enfermedad de Lundborg-Unverricht incluida, lupus, lupus eritematoso, atresia del foramen de Luschka-Magendie, síndrome de Lyell, síndrome de Lyelles, bocio linfadenóide, enteropatía por pérdida de proteína linfangiectática, linfangioleiomatosis, linfangioleiomatosis, linfangiomas, malformaciones linfáticas, síndromes de Lynch, síndrome de Lynch I, síndrome 35
 de Lynch II, deficiencia de alfa-N-acetilgalactosaminidasa lisosómica de tipo Schindler, enfermedad de almacenamiento de glicoaminoácidos lisosómicos-angioqueratoma de cuerpos difusos, deficiencia de glucosidasa lisosómica, deficiencia de glucosidasa lisosómica, MAA, enfermedad de Machado, enfermedad de Machado-Joseph, macrocefalia, macrocefalia, macrocefalia hemihipertrófica, macrocefalia con lipomas múltiples y hemangiomata, 40
 macrocefalia con pseudopapiledema y hemangiomata múltiple, macroglobulinemia, macroglosia, síndrome de macroglosia-onfalocele-visceromegalia, síndrome de macrostomia-ableferon, macrotrombocitopenia familiar de tipo Bernard-Soulier, degeneración de la mácula lútea, amiloidosis macular, degeneración macular, degeneración macular disciforme, degeneración macular senil, distrofia macular, distrofia corneal de tipo macular, MAD, MAD, 45
 enfermedad de Madelung, síndrome de Maffucci, epilepsia mayor, malaabsorción, malaabsorción-displasia ectodérmica-hipoplasia nasal alar, enfermedad de Roger, enfermedad de tics, malformación masculina de extremidades y riñones, síndrome de Turner masculino, acantosis maligna, acantosis nigricans maligna, astrocitoma maligno, papulosis atrófica maligna, fiebre maligna, hiperfenilalaninemia maligna, hiperfenilalaninemia maligna, hiperpirexia maligna, hipertermia maligna, melanoma maligno, tumores malignos del sistema nervioso central, 50
 laceración de Mallory-Weiss, lágrima de Mallory-Weiss, síndrome de Mallory-Weiss, enfermedad de Paget mamaria, ameloblastoma mandibular, disostosis mandibulofacial, manosidosis, distrofia corneal de tipo mapa-punto-huella, enfermedad de orina de jarabe de arce, enfermedad de orina de jarabe de arce, huesos de mármol, síndrome de Marchiafava-Micheli, síndrome de guiño mandibular de Marcus Gunn, fenómeno de Marcus Gunn, ptosis de Marcus Gunn Ptosis con guiño mandibular, síndrome de Marcus Gunn, síndrome de Marcus Gunn (guiño mandibular), ptosis 55
 de Marcus Gunn (con guiño mandibular), síndrome de Marden-Walquer, trastorno del tejido conjuntivo de tipo Marden-Walquer, abiotrofia de Marfan, síndrome de Marfan-Achard, síndrome de Marfan, síndrome de Marfan, síndrome de Marfan I, variante de Marfan, síndrome de Marfan-Achard, síndrome de hipermovilidad marfanoide, distrofia corneal marginal, ataxia de Marie, ataxia de Marie, enfermedad de Marie, enfermedad de Marie-Sainton, enfermedad de Marie Strumpell, espondilitis de Marie-Strumpell, síndrome de Marinesco-Sjogren, síndrome de 60
 Marinesco-Sjogren-Gorland, síndrome de Marker X, síndrome de Maroteaux Lamy, displasia acromesomélica de tipo Maroteaux, displasias ectodérmicas de Marshall con defectos oculares y auditivos, síndrome de Marshall-Smith, síndrome de Marshall, sordera de tipo Marshall-miopia-cataratas-nariz en silla de montar, síndrome de Martin-Albright, síndrome de Martin-Bell, síndrome de Martorell, síndrome de MASA, mioclonía masiva, leucemia de mastocitos, mastocitosis, mastocitosis con un trastorno hematológico asociado, distrofia corneal de Maumenee, 65
 ameloblastoma maxilar, disostosis maxilofacial, displasia maxilonasal, displasia maxilonasal de tipo Binder, sincenesia maxilopalpebral, anomalía de May-Hegglin, deficiencia de MCAD, MCAD, MCAD, MCAD, enfermedad de McArdle, McCune-Albright, MCD, condrodisplasia metafísica de tipo McKusick, condrodisplasia metafísica de tipo McKusick, MCR, MCTD, síndrome de Meckel, síndrome de Meckel-Gruber, síndrome de fisura media del rostro, anemia mediterránea, acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (ACADM), deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa 65
 de cadena media (MCAD), deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, deficiencia de acil CoA deshidrogenasa de cadena media, enfermedad quística medular, enfermedad quística medular, riñón en esponja

medular, MEF, megaesófago, megalencefalia, megalencefalia con inclusión hialina, megalencefalia con panneuropatía hialina, anemia megaloblástica, anemia megaloblástica del embarazo, síndrome de megalocornea-retraso mental, síndrome de Meier-Gorlin, linfedema de Meige, síndrome de Meige, leucodistrofia melanodérmica, melanoplaquia-poliposis intestinal, melanoplaquia-poliposis intestinal, síndrome de MELAS, MELAS, síndrome de Melkersson, síndrome de Melnick-Fraser, osteodisplasia de Melnick-Needles, síndrome de Melnick-Needles, lipodistrofia membranosa, síndrome de Mendes Da Costa, enfermedad de Meniere, enfermedad de Meniere, angiomas capilares meníngeos, enfermedad de Menkes, síndrome de Menkes I, retraso mental-afasia-marcha con arrastre-pulgares aducidos (MASA), retraso mental-sordera-anomalías esqueléticas-cara ancha con labios gruesos, retraso mental con uñas de los quintos dedos de las manos y los pies hipoplásicas, retraso mental con anomalías osteocartilaginosas, retraso mental ligado al cromosoma X con retraso del crecimiento-sordera-microgenitalismo, OPCA tipo Menzel, síndrome de Mermaid, MERRF, síndrome de MERRF, MERRF, síndrome de Merten-Singleton, MES, nefropatía de IGA mesangial, lipodistrofia mesentérica, síndrome de mesiodens-cataratas, dismorfodistrofia mesodérmica, enanismo mesomélico-deformidad de Madelung, acidosis metabólica, leucodistrofia metacromática, metatarsus varo, síndrome de enanismo metatrófico, displasia metatrófica, displasia metatrófica I, displasia metatrófica II, acidemia metilmalónica, aciduria acidemia metilmalónica, enfermedad de Meulengracht, MFD1, MG, MH, MHA, micrencefalia, enanismo primordial microcefálico I, microcefalia, microcefalia-hernia de hiato-nefrosis de tipo Galloway, microcefalia-hernia de hiato-síndrome nefrótico, distrofia corneal microquística, microcitemia, microlisencefalia, microftalmia, microftalmia, microftalmia o anoftalmos con anomalías asociadas, micropoligiria con distrofia muscular, síndrome de microtia-rótula ausente-micrognatia, enfermedad de inclusión de microvellosidades, MID, síndrome de murmullo mediosistólico-clíc-sistólico tardío, síndrome de Miescher tipo I, síndrome de Mikulicz, síndrome de Mikulicz-Radecki, síndrome de Mikulicz-Sjogren, autosómico recesivo leve, enfermedad de orina de jarabe de arce intermedia leve, enfermedad de orina de jarabe de arce leve, síndrome de Miller, síndrome de Miller-Dieker, síndrome de Miller-Fisher, enfermedad de Milroy, síndrome de Minkowski-Chauffard, epilepsia menor, enfermedad de Minot-Von Willebrand, dextrocardia de imagen especular, trastornos de la beta-oxidación mitocondrial, mitocondrial y citósica, citopatía mitocondrial, citopatía mitocondrial, tipo Kearns-Sayre, encefalopatía mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial-acidosis láctica y episodios similares a accidente cerebrovascular, miopatía mitocondrial, miopatía mitocondrial-encefalopatía-acidosis láctica-episodio similar a accidente cerebrovascular, deficiencia de PEPCK mitocondrial, prolapso de válvula mitral, apnea mixta, enfermedad de tejidos conjuntivos mixta, enfermedad de tejidos conjuntivos mixta, porfiria hepática mixta, afasia no fluente mixta, apnea del sueño mixta, tortícolis tónica y clónica mixta, MJD, MKS, ML I, ML II, ML II, ML III, ML IV, trastorno de ML tipo I, trastorno de ML tipo II, trastorno de ML tipo III, trastorno de ML tipo IV, MLNS, síndrome de MMR, MND, MNGIE, MNS, Mobitz I; Mobitz II, síndrome de Mobius, síndrome de Moebius, síndrome de Moersch-Woltmann, síndrome de Mohr, Moniletrix, amnesia visual monomodal, mononeuritis múltiple, mononeuritis periférica, mononeuropatía periférica, monosomía 3p2, monosomía 9p parcial, monosomía 11q parcial, monosomía 13q parcial, síndrome de monosomía 18q, monosomía X, displasia fibrosa monostótica, síndrome de Morgagni-Turner-Albright, morfea, enfermedad de Morquio, síndrome de Morquio, síndrome de Morquio A, síndrome de Morquio B, síndrome de Morquio-Brailsford, enfermedad de Morvan, tetrasomía 9p en mosaico, enfermedad de neuronas motoras, enfermedad de neuronas motoras, síndrome de neuronas motoras, enfermedad de neuronas motoras, enfermedad de motoneuronas, enfermedad de motoneuronas, enfermedad del sistema motor (focal y lenta), enfermedad de Moya-moya, enfermedad de Moyamoya, MPS, MPS I, MPS I H, síndrome de MPS 1 H/S Hurler/Scheie, síndrome de MPS I S Scheie, MPS II, MPS IIA, MPS IIB, MPS II-AR síndrome de Hunter autosómico recesivo, MPS II-XR, MPS II-XR recesivo autosómico grave, MPS III, MPS III A B C y D Sanfilippo A, MPS IV, MPS IV A y B Morquio A, MPS V, MPS VI, MPS VI intermedio grave Maroteaux-Lamy leve, MPS VII, MPS VII síndrome de Sly, MPS VIII, trastorno de MPS, trastorno de MPS I, trastorno de MPS II, trastorno de MPS III, trastorno de MPS VI, trastorno de MPS tipo VII, MRS, MS, MSA, MSD, MSL, MSS, MSUD, MSUD, MSUD tipo Ib, MSUD tipo II, síndrome de ganglios linfáticos mucocutáneos, mucopolisacaridosis I, mucopolisacaridosis II, mucopolisacaridosis II, mucopolisacaridosis III, mucopolisacaridosis IV, mucopolisacaridosis, mucopolisacaridosis I-H, mucopolisacaridosis I-S, mucopolisacaridosis II, mucopolisacaridosis III, mucopolisacaridosis IV, mucopolisacaridosis VI, mucopolisacaridosis VII, mucopolisacaridosis tipo I, mucopolisacaridosis tipo II, mucopolisacaridosis tipo III, mucopolisacaridosis tipo VII, mucosis, mucosulfatidosis, colitis mucosa, mucoviscidosis, enanismo de Mulibrey, síndrome de nanismos de Mulibrey, aplasia del conducto mülleriano-aplasia renal-displasia de somitas cervicotorácicas, defectos de conducto mülleriano-renales-cervicotorácicos-extremidades superiores, agenesia del conducto mülleriano y renal con anomalías de las extremidades superiores y costillas, anomalías müllerianas-renales-de somitas cervicotorácicas, demencia multiinfarto de tipo Binswanger, enfermedad de Castleman multicéntrica, granuloma eosinofílico multifocal, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa múltiple, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa múltiple, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa múltiple / aciduria glutárica tipo II, angiomas y endocondromas múltiples, deficiencia de carboxilasa múltiple, endondrositis cartilaginosa múltiple, exostosis cartilaginosa múltiple, endondromatosis múltiple, síndrome de deficiencia endocrina múltiple tipo II, displasia epifisaria múltiple, exostosis múltiple, síndrome de exostosis múltiple, poliposis familiar múltiple, síndrome de lentiginosis múltiple, mieloma múltiple, neuritis múltiple de la cintura del hombro, osteocondromatosis múltiple, neuritis periférica múltiple, poliposis múltiple de colon, síndrome de pterygium múltiple, esclerosis múltiple, esclerosis múltiple, deficiencia de sulfatasa múltiple, lipomatosis simétrica múltiple, atrofia sistémica múltiple, osteodisgenesia multisistémica, osteodisgenesia multisistémica con fracturas de huesos largos, síndrome de Mulvihill-Smith, asociación de MURCS, condrodisplasia metafísica de tipo Murk Jansen, deficiencia de carnitina muscular, enfermedad de núcleo muscular, deficiencia de fosfofructocinasa muscular, enfermedad de núcleo central muscular, distrofia muscular, distrofia muscular clásica ligada al cromosoma X recesiva, distrofia muscular congénita con implicación del sistema nervioso central, distrofia muscular congénita

progresiva con retraso mental, distrofia muscular facioscapulohumeral, reumatismo muscular, rigidez muscular -
 espasmo progresivo, síndrome de dolor musculoesquelético, acropatía mutilante, acropatía mutilante, mutismo, mvp,
 MVP, MWS, miastenia grave, miastenia grave, miastenia grave pseudoparalítica, síndrome miasténico de Lambert-
 Eaton, esclerosis difusa mielinoelástica, mielomatosis, síndrome de Myhre, epilepsia de pequeño mal astática
 5 mioclónica, distonía mioclónica, encefalopatía mioclónica de los lactantes, epilepsia mioclónica, epilepsia mioclónica
 de tipo Hartung, mioclonos epilépticos asociados con fibras rojas deshilachadas, epilepsia mioclónica y enfermedad de
 fibras rojas deshilachadas, epilepsia familiar progresiva mioclónica, epilepsia familiar progresiva mioclónica,
 convulsión mioclónica, mioclonos, mioclonos epilépticos, mioencefalopatía-enfermedad de fibras rojas deshilachadas,
 10 miofibromatosis, miofibromatosis congénita, síndrome facio-escapulo-peroneal miogénico, trastorno
 mioneurogastrointestinal y encefalopatía, artrogriposis miopática múltiple congénita, deficiencia de carnitina
 miopática, miopatía central fibrilar, miopatía congénita no progresiva, miopatía congénita no progresiva con eje
 central, miopatía con deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa, síndrome de miopatía-Marinesco-Sjogren,
 miopatía-deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa metabólica, miopatía mitocondrial-encefalopatía-acidosis
 15 láctica-accidente cerebrovascular, miopatía con cuerpos sarcoplásmicos y filamentos intermedios, deficiencia de
 miosforilasa, miositis osificante progresiva, miotonía atrófica, miotonía congénita, miotonía congénita intermitente,
 distrofia miotónica, miopatía miotónica-enanismo-condrodistrofia ocular y anomalías faciales, miopatía miotubular,
 miopatía miotubular ligada al cromosoma X, ácido miproico, myriachit (observada en Siberia), mixedema, deficiencia
 de N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, deficiencia de N-acetilglutamato sintetasa, deficiencia de NADH-CoQ
 20 reductasa, displasias ectodérmicas de Naegeli, síndrome de Nager, síndrome de disostosis acrofacial de Nager,
 síndrome de disostosis acrofacial de Nager, síndrome de Nager, deficiencia de NAGS, síndrome de distrofia de las
 uñas-sordera, disgenesia de las uñas e hipodondia, síndrome de uñas-rótula, síndrome de Nance-Horan, enanismo
 nanocefálico, nanocefalia, nanofthalmia, narcolepsia, síndrome narcoléptico, NARP, nasal-fronto-facioidisplasia,
 hipoplasia nasal alar-hipotiroidismo-aquilia pancreática-sordera congénita, hipoplasia nasomaxilar, lipodistrofia de
 25 Nasu, NBIA1, ND, NDI, NDP, encefalomielopatía necrotizante de Leigh, granulomatosis respiratoria necrotizante,
 síndrome de Neill-Dingwall, síndrome de Nelson, miopatía nemalínica, adrenoleucodistrofia neonatal,
 adrenoleucodistrofia neonatal (NALD), adrenoleucodistrofia neonatal (ALD), enfermedad de riñón poliquístico
 recesiva autosómica neonatal, enanismo neonatal, hepatitis neonatal, hipoglucemia neonatal, intolerancia a la
 lactosa neonatal, linfedema neonatal debido a arteropatía exudativa, síndrome progeroide neonatal, síndrome
 30 progeroide pseudo-hidrocefálico neonatal de Wiedemann-Rautenstrauch, aracnoiditis neoplásica, nefroblastoma,
 diabetes insípida nefrogénica, nefronofteosis familiar juvenil, nefronofteosis familiar juvenil, cistinosis nefropática,
 nefropatía-pseudohermafroditismo-tumor de Wilms, síndrome de nefrosis-microcefalia, síndrome de nefrosis-
 dismigración neuronal, síndrome nefrótico-glicosúrico-enanismo-raquitismo-hipofosfatémico, enfermedad de
 Neterton, síndrome de Neterton, síndrome de Neterton-ictiosis, síndrome de Nettleship Falls (ligado al cromosoma
 35 X), síndrome de Neu-Laxova, síndrome de Neuhauser, defectos del tubo neural, amiotrofia neurálgica, amiotrofia
 neurálgica, deficiencia de neuraminidasa, melanosis neurocutánea, neurinoma del nervio acústico, neurinoma,
 neuroacantocitosis, distrofia neuroaxonal de tipo Schindler, neurodegeneración con acumulación de hierro en el
 cerebro tipo 1 (NBIA1), neurofibroma del nervio acústico, artrogriposis neurogénica múltiple congénita, neuromielitis
 40 óptica, neuromiotonía, neuromiotonía, focal, neuromiotonía, generalizada, familiar, neuromiotonía, generalizada,
 esporádica, distrofia neuronal axonal de tipo Schindler, lipofuscinosis ceróide neuronal de tipo adulto, lipofuscinosis
 ceróide neuronal de tipo juvenil, lipofuscinosis ceróide neuronal tipo 1, enfermedad de Gaucher aguda neuropática,
 amiloidosis neuropática, beriberi neuropático, ataxia neuropática y retinitis pigmentaria, síndrome de neuropatía del
 plexo braquial, neuropatía hereditaria sensorial tipo I, neuropatía hereditaria sensorial tipo II, enfermedad de
 almacenamiento de lípidos neutros, nevus, síndrome de carcinoma de células basales nevoide, nevus, nevus
 45 cavernoso, nevus comedonicus, nevus depigmentosus, nevus sebáceo de Jadassohn, síndrome de Nezelof, aplasia
 tímica de Nezelof, inmunodeficiencia combinada grave de tipo Nezelof, NF, NF1, NF2, NF-1, NF-2, NHS,
 enfermedad de Niemann Pick, enfermedad de Nieman Pick tipo A (forma neuropática aguda), enfermedad de
 Nieman Pick tipo B, enfermedad de Nieman Pick tipo C (forma neuropática crónica), enfermedad de Nieman Pick
 tipo D (variante de Nueva Escocia), enfermedad de Nieman Pick tipo E, enfermedad de Nieman Pick tipo F
 50 (enfermedad de histiocitosis de mar azul), ceguera nocturna, degeneración nigroespinodentatal, síndrome de
 Niikawakuroki, NLS, NM, síndrome de Noack de tipo I, mioclonos nocturnos hereditarios, mioclonos esenciales,
 degeneración corneal nodular, CIE no buloso, eritroderma ictiosiforme congénito no buloso, hidrocefalo no
 comunicante, síndrome de talasemia de tipo alfa sin delección / retraso mental, hiperglicinemia no cetónica tipo I
 (NKH1), hiperglicinemia no cetónica, reticuloendoteliosis no lipídica, enfermedad de Gaucher adulta crónica no
 55 neuronopática, epidermolisis bullosa no cicatrizante, calcificaciones cerebrales no arterioescleróticas, reumatismo
 no articular, enfermedad de Gaucher juvenil, no cerebral, glicosuria no diabética, cardiomiopatía no isquémica,
 hipogucemia no cetósica y deficiencia de carnitina debida a deficiencia de MCAD, hipoglucemia no cetósica
 provocada por deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa, glicinemia no cetósica, síndrome de Nonne, síndrome de
 Nonne-Milroy-Meige, dentina opalescente no opalescente, galactorrea-amenorrea no puerperal, mieloma no
 60 secretor, anemia hemolítica no esferocítica, esprúe no tropical, síndrome de Noonan, norepinefrina, hidrocefalo de
 presión normal, síndrome de Norman-Roberts, enfermedad de Norrbottnian Gaucher, enfermedad de Norrie,
 colestasis hereditaria de tipo noruego, NPD, NPS, NS, NSA, síndrome de distonía nucal-demencia, neuropatía
 nutricional, síndrome de Nyhan, espectro de OAV, apnea obstructiva, hidrocefalo obstructivo, apnea del sueño
 obstructiva, síndrome de OCC, tromboarropatía oclusiva, OCCS, malformaciones vasculares intracraneales ocultas,
 65 secuencia de disrafismo espinal oculto, síndrome de Ochoa, ocrónosis, artritis ocrónótica, OCR, octocefalia,
 albinismo ocular, herpes ocular, miastenia grave ocular, displasia oculo-auriculo-vertebral displasia, espectro oculo-
 auriculo-vertebral, síndrome oculo-buco-genital, síndrome oculocerebral con hipopigmentación, síndrome

5 oculocerebrocutáneo, oculo-cerebro-renal, distrofia oculocerebrorrenal, síndrome oculocerebrorrenal, síndrome
 oculocraneosomático (obsoleto), albinismo oculocutáneo, albinismo oculocutáneo de tipo Chediak-Higashi, displasia
 oculo-dento-digital, displasia oculo-dento-digital, síndrome oculodentodigital, displasia oculo-dento-ósea, displasia
 10 oculo-dento-ósea, distrofia muscular oculo gastrointestinal, distrofia muscular oculo gastrointestinal, distrofia
 muscular oculo gastrointestinal, oculomandibulodiscefalia con hipotricosis, síndrome oculomandibulofacial,
 oculomotor con contracturas congénitas y atrofia muscular, parálisis oculosimpática, síndrome de ODD, síndrome de
 ODD, ODOD, tumor odontogénico, síndrome odontotricomélico, OFD, síndrome de OFD, amiloidosis de tipo Ohio
 (tipo VII), OI, OI congénita, OI tarda, síndrome de Oldfield, secuencia de oligohidramnios, oligofrenia microftalmos,
 15 polidistrofia oligofrénica, atrofia olivopontocerebelar, atrofia olivopontocerebelar, atrofia olivopontocerebelar con
 demencia y signos extrapiramidales, atrofia olivopontocerebelar con degeneración retiniana, atrofia
 olivopontocerebelar I, atrofia olivopontocerebelar II, atrofia olivopontocerebelar III, atrofia olivopontocerebelar IV,
 atrofia olivopontocerebelar V, enfermedad de Ollier, osteocondromatosis de Ollier, síndrome de onfalocele-
 visceromegalia-macroglosia, curso de Ondine, neuropatía de bulbo de cebolla, polineuropatía de de bulbo de
 20 cebolla, onicoosteodisplasia, onicotricodisplasia con neutropenia, OPCA, OPCA I, OPCA II, OPCA III, OPCA IV,
 OPCA V, síndrome de OPD, síndrome de OPD tipo I, síndrome de OPD tipo II, síndrome de OPD I, síndrome de
 OPD II, oftalmoartropatía, oftalmoplegia-pseudoobstrucción intestinal, oftalmoplegia, degeneración pigmentaria de la
 retina y cardiomiopatía, oftalmoplegia-síndrome de Plus, síndrome de oftalmoplegia, síndrome de Opitz BBB,
 25 síndrome de Opitz BBB/G compuesto, síndrome de Opitz BBBG, síndrome de Opitz-Frias, síndrome de Opitz G,
 síndrome de Opitz G/BBB, síndrome de hipertelorismo de Opitz-hipospadias, síndrome de Opitz-Kaveggia, síndrome
 oculogenitolaríngeo de Opitz, síndrome de trigonocefalia de Opitz, síndrome de Opitz, opsoclono, opsoclono-
 mioclono, oftalmoneuromielitis, polineuropatía de atrofia óptica y sordera, neuroencefalomielopatía óptica,
 neuromielitis óptica, mielitis óptica, aracnoiditis optoquiasmática, fisuras orales-faciales, discinesia oral-facial,
 30 distonía oral facial, síndrome oral-facial-digital, síndrome oral-facial-digital tipo I, síndrome oral-facial-digital I,
 síndrome oral-facial-digital II, síndrome oral-facial-digital III, síndrome oral-facial-digital IV, quiste orbital con
 malformaciones cerebrales y dérmicas focales, deficiencia de ornitina carbamilo transferasa, deficiencia de ornitina
 transcarbamilasa, síndrome orocraniodigital, síndrome orofaciocdigital, distonía oromandibular, hipotensión
 ortostática, enfermedad de Osler-Weber-Rendu, displasia oseo-oculo-dental, displasia oseo-oculo-dental, osteítis
 35 deformante, osteocondrodistrofia deformante, osteocondroplasia, osteodisplasia de Melnick y Needles, osteogénesis
 imperfecta, osteogénesis imperfecta, osteogénesis imperfecta congénita, osteogénesis imperfecta tarda, nevus
 flammeus osteohipertrófico, osteopatía hiperostótica escleroticante múltiple infantil, osteopatía hiperostótica
 escleroticante múltiple infantil, osteopatirosis, osteopetrosis, osteopetrosis autosómica dominante de tipo adulta,
 osteopetrosis autosómica recesiva maligna de tipo infantil, osteopetrosis leve autosómica recesiva de tipo
 40 intermedio, osteoesclerosis frágil generalizada, mieloma osteoesclerótico; defecto de ostium primum (defectos de
 almohadillas endocárdicas inclidos), defecto de Ostium Secundum, deficiencia de OTC, síntome oto-palato-digital,
 síntome oto-palato-digital tipo I, síntome oto-palato-digital tipo II, displasia otodental, síndrome otopalatodigital,
 síndrome otopalatodigital tipo II, piel de Oudtshoorn, enanismo de ovarios de tipo Turner, aplasia de ovarios de tipo
 Turner, OWR, oxalosis, deficiencia de oxidasa, oxicefalia, oxicefalia, oxicefalia-acrocefalia, P-V, PA, PAC,
 45 paquioniquia ictiosiforme, paquioniquia congénita con dientes natales, paquioniquia congénita, paquioniquia
 congénita-queratosis diseminada circunscrita (folicular), paquioniquia congénita de tipo Jadassohn-Lewandowsky,
 PAF con MSA, enfermedad de Paget, enfermedad de Paget del hueso, enfermedad de Paget de la mama,
 enfermedad de Paget del pezón, enfermedad de Paget del pezón y la aureola, síndrome de Pagon, oftalmoplegia
 dolorosa, PAIS, mioclono palatal, síndrome palato-oto-digital, síndrome palato-oto-digital tipo I, síndrome palato-oto-
 50 digital tipo II, síndrome de Pallister, síndrome de Pallister-Hall, síndrome de mosaico de Pallister-Killian, aneuploidía
 de mosaico de Pallister, síndrome de mosaico de Pallister, síndrome de mosaico de Pallister de tetrasomía 12p,
 síndrome de Pallister-W, hiperqueratosis palmoplantar y alopecia, parálisis, fibrosis pancreática, insuficiencia
 pancreática y disfunción de la médula ósea, síndrome de tumor ulcerogénico pancreático, panmieloftisis,
 panmielopatía, neurodegeneración asociada a pantotenato cinasa (PKAN), síndrome de Papillon-Lefevre,
 55 pseudotabes pupilotóica, parálisis periódica paramiotónica, beriberi paralítico, neuritis braquial paralítica, síndrome
 de fosas en el labio inferior paramediano-pyerygium poplíteo, síndrome diencefálico paramediano, paramieloidosis,
 paramioclonos múltiple, paramiotonía congénita, paramiotonía congénita de Von Eulenburg, enfermedad de
 Parkinson, taquicardia axial paroxismal, hemoglobinuria fría paroxismal, distonía paroxismal, distonía paroxismal
 coreatetosis, distonía cinesigénica paroxismal, hemoglobinuria nocturna paroxismal, hemoglobinuria nocturna
 60 paroxismal, sueño paroxismal, síndrome de Parrot, enfermedad de Parry, síndrome de Parry-Romberg, síndrome de
 Parsonage-Turner, síndrome de insensibilidad a andrógenos parcial, delección parcial del brazo corto del cromosoma
 4, delección parcial del brazo corto del cromosoma 5, delección parcial del brazo corto del cromosoma 9, síndrome de
 duplicación parcial 3q, síndrome de duplicación parcial 15q, parálisis facial parcial con anomalías urinarias,
 65 gigantismo parcial de las manos y los pies-nevi-hemihipertrofia-macrocefalia, lipodistrofia parcial, monosomía parcial
 del brazo largo del cromosoma 11, monosomía parcial del brazo largo del cromosoma 13, síndrome sensorial
 espinal parcial, trisomía parcial 11q, síndrome de Partington, PAT, conducto arterial patente, mioclono patológico,
 artritis juvenil de aparición pauciarticular, artritis juvenil de aparición pauciarticular, paulitis, PBC, PBS, deficiencia de
 PC, deficiencia de PC grupo A, deficiencia de PC grupo B, PC, enfermedad de Eulenburg, deficiencia de PCC, PCH,
 PCLD, PCT, PD, PDA, deficiencia de PDH, deficiencia de PDH, síndrome de Pearson de deficiencia de piruvato
 carboxilasa, apnea del sueño obstructiva cardíaca, síndrome de descamación de la piel, enfermedad de Pelizaeus-
 Merzbacher, esclerosis cerebral de Pelizaeus-Merzbacher, esclerosis cerebral de Pelizaeus-Merzbacher, síndrome
 70 de pelagra-ataxia cerebelar-aminoaciduria renal, síndrome de dolor pélvico, pénfigo vulgar, síndrome de Pena
 Shokeir II, síndrome de Pena Shokeir tipo II, pibromatosis del pene, fibrosis del pene, induración del pene, síndrome

de penta X, pentalogía de Cantrell, síndrome de pentalogía, pentasomía X, deficiencia de PEPCK, síndrome de Pepper, síndrome de Perheentupa, fibrositis periarticular, constricción pericárdica con insuficiencia de crecimiento, amiloidosis pericolágena, enfermedades de riñón poliquístico perinatal, ano perineal, síndrome de amiloide periódico, síndrome de peritonitis periódico, somnolencia periódica y hambre mórbida, síndrome periódico, degeneración quistoide periférica de la retina, disostosis periférica-hipoplasia nasal-retraso mental, neuritis periférica, neuropatía periférica, hernia diafragmática peritoneopericardial, anemia perniciosa, anemia perniciosa, anemia perniciosa, peromelia con micrognatia, atrofia muscular peroneal, parálisis del nervio peroneal, estornudo de Peroutka, acil-CoA oxidasa peroxisomal, trastornos de beta-oxidación peroxisomales, enzima bifuncional peroxisomal, tiolasa peroxisomal, deficiencia de tiolasa peroxisomal, tronco arterioso persistente, enfermedad de Perthes, epilepsia de pequeño mal, variante de pequeño mal, síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de Peutz-Touraine, síndrome de Peutz-Touraine, enfermedad de Peyronie, Pfeiffer, síndrome de Pfeiffer tipo I, PGA I, PGA II, PGA II, PGA III, PGK, PH tipo I, PH tipo I, síndrome de bolsa faríngea, deficiencia de PHD acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta, deficiencia de fenilalanina hidroxilasa, fenilalaninemia, fenilcetonuria, fenilcetonuria, oligofrenia fenilpirúvica, focomelia, síndrome de focomelia, deficiencia de fosfoenolpiruvato carboxinas, deficiencia de fosfofructocinasa, deficiencia de fosfoglicerato cinasa, fosfoglicerocinasa, deficiencia de fosforilasa 6 cinasa, enfermedad de almacenamiento de glucógeno por deficiencia de fosforilasa, deficiencia de fosforilasa cinasa del hígado, reflejo de estornudo fótico, estornudo fótico, queratectomía fototerapéutica, PHS, médico John Dalton, enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico, Pi fenotipo ZZ, PI, enfermedad de Pick del cerebro, enfermedad de Pick, enfermedad de Pick, síndrome de Pickwickian, anomalía de Pierre Robin, complejo de Pierre Robin, secuencia de Pierre Robin, síndrome de Pierre Robin, síndrome de Pierre Robin con hiperfalangia y clinodactilia, enfermedad de Pierre-Marie, degeneración pigmentaria del globo pálido-sustancia negra-núcleo rojo, pili torti y sordera nerviosa, pili torti-pérdida de audición sensorineural, enanismo hipofisario II, tumor hipofisario tras suprarrenalectomía, pityriasis pilaris, pityriasis rubra pilaris, PJS, PJS, PKAN, PKD, PKD, PKD1, PKD2, PKD3, PKU, PKU, PKU1, plagiocefalia, plagiocefalia, plagiocefalia, mieloma de células plasmáticas, leucemia de células plasmáticas, deficiencia de componente de tromboplastina plasmático, deficiencia de transglutaminasa plasmática, induración plástica-corpora cavernosa, induración plástica del pene, PLD, lengua plegada, PLS, PMD, síndrome pneumorrenal, PNH, PNM, deficiencia de PNP, POD, POH, poiquilodermia atrófica y cataratas, poiquilodermia congénita, anomalía de Poland, secuencia de Poland, sindactilia de Poland, síndrome de Poland, polidistrofia cerebral progresiva, poliartritis entérica, poliarteritis nudosa, artritis juvenil de comienzo poliarticular tipo I, artritis juvenil de comienzo poliarticular tipo II, artritis juvenil de comienzo poliarticular tipos I y II, policondritis, enfermedad de riñón poliquístico, enfermedad de riñón poliquístico de tipo medular, enfermedad de riñón poliquístico de tipo medular, enfermedad de hígado poliquístico, enfermedad de ovario poliquístico, enfermedades renales poliquísticas, polidactilia-síndrome de Joubert, epidermolisis bullosa polidisplásica, oligofrenia polidistrófica, enanismo polidistrófico, síndrome autoinmunitario poliglandular tipo III, síndrome autoinmunitario poliglandular tipo II, síndrome autoinmunitario poliglandular tipo I, síndrome autoinmunitario poliglandular tipo II, síndrome de deficiencia poliglandular tipo II, síndrome poliglandulares, degeneración de la mácula lútea polimórfica, degeneración macular polimórfica, polimorfismo de glicoproteína de plaquetas Ib, distrofia corneal polimorfa hereditaria, polimialgia reumática, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, polineuritis periférica, polineuropatía-sordera-atrofia óptica, polineuropatía periférica, polineuropatía y polirradiculoneuropatía, displasia fibrosa polioestótica, histiocitosis esclerosante polioestótica, poliposis familiar, poliposis de tipo Gardner, poliposis hamartomatosa intestinal, poliposis hamartomatosa intestinal, síndrome de poliposis-osteomatosi-quiste epidermoide, poliposis-pigmentación de la piel-alopecia y cambios en las uñas de los dedos, síndrome de pólipos y manchas, síndrome de pólipos y manchas, poliserositis recurrente, polisomía Y, polisindactilia con forma del cráneo peculiar, polisindactilia-craneofacies dismórficas de tipo Greig, enfermedad de Pompe, enfermedad de Pompe, síndrome de pterygium plopíteo, hombre puercoespín, porencefalia, porencefalia, porfobilinógeno desaminasa (PBG-D), porfiria, porfiria aguda intermitente, porfiria aguda intermitente, porfiria ALA-D, porfiria cutánea tarda, porfiria cutánea tarda, porfiria cutánea tarda hereditaria, porfiria cutánea tarda sintomática, porfiria hepática variegada, porfiria de tipo sueco, porfiria variegada, porfiria aguda intermitente, porfirinas, porfirio decalvante, manchas de Port Wine, amiloidosis de tipo portugués, polineuritis posinfecciosa, mioclonos de intención postanóxico, disostosis acrofacial postaxial, polidactilia postaxial, mioclonos de intención posencefálico, distrofia corneal posterior hereditaria, síndrome talámico posterior, aracnoiditis posmielográfica, parálisis cerebral posnatal, colestasis posoperatoria, síndrome de galactorrea-amenorrea posparto, hipopituitarismo posparto, síndrome de panhipofituitarismo posparto, panhipopituitarismo posparto, necrosis de la hipófisis posparto, hipotensión postural, nefritis por pérdida de potasio, síndrome de pérdida de potasio, enfermedades de riñón poliquístico infantil de Potter tipo I, enfermedad de riñón poliquístico de Potter tipo III, PPH, PPS, síndrome de Prader-Willi, síndrome de Prader-Labhart-Willi Fancone, amiloidosis de prealbúmina Tyr-77, síndrome de preexcitación, síndrome de preexcitación, deficiencia de pregnenolona, contracciones auriculares prematuras, síndrome de senilidad prematura, contracciones supraventriculares prematuras, complejos ventriculares prematuros, distrofia neuroaxonal prenatal o connatal, demencia presenil, degeneración de la mácula lútea de la retina presenil, insuficiencia suprarrenal primaria, agammaglobulinemias primarias, aldosteronismo primario, hipoventilación alveolar primaria, amiloidosis primaria, anemia primaria, anemia primaria, beriberi primario, biliar primaria, cirrosis biliar primaria, síndrome de Brown primario, deficiencia de carnitina primaria, síndrome de hipoventilación central primario, discinesia ciliar primaria de tipo Kartagener, amiloidosis cutánea primaria, distonía primaria, insuficiencia adrenocortical primaria, hipoplasia familiar primaria de la maxila, hemocromatosis primaria, hiperhidrosis primaria, hiperoxaluria primaria [tipo II], hiperoxaluria primaria tipo I (PH1), hiperoxaluria primaria tipo 1, hiperoxaluria primaria tipo II, hiperoxaluria primaria tipo III, hipogonadismo primario, linfangiectasia intestinal

primaria, esclerosis lateral primaria, amiloidosis no hereditaria primaria, enfermedad pulmonar obliterativa primaria, esclerosis múltiple progresiva primaria, hipertensión pulmonar primaria, incapacidad de lectura primaria, glicosuria renal primaria, colangitis esclerosante primaria, trombocitemia primaria, trombocitemia primaria, tumores primarios del sistema nervioso central, agnosia visual primaria, proctocolitis idiopática, proctocolitis idiopática, progeria de la edad adulta, progeria de la infancia, nanismo progeroide, estatura baja progeroide con nevus pigmentados, síndrome progeroide de De Bary, insuficiencia autónoma progresiva con atrofia sistémica múltiple, parálisis bulbar progresiva, parálisis bulbar progresiva incluida, lentiginosis cardiomiopática progresiva, ataxia cerebelar progresiva familiar, poliodistrofia cerebral progresiva, atrofia coroidal progresiva, displasia diafísea progresiva, displasia diafísea progresiva, hemiatrofia facial progresiva, epilepsia mioclónica familiar progresiva, atrofia hemifacial progresiva, hipoeritemia progresiva, poliodistrofia infantil progresiva, degeneración lenticular progresiva, lipodistrofia progresiva, distrofia muscular progresiva de la infancia, epilepsia mioclónica progresiva, heteroplasia ósea progresiva, síndrome de degeneración pálida progresiva, síndrome de degeneración pálida progresiva, atrofia muscular espinobulbar progresiva, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis sistémica progresiva, distrofia tapetocoroidal progresiva, deficiencia de prolina oxidasa, acidemia propiónica, acidemia propiónica, acidemia propiónica tipo I (deficiencia de PCCA), acidemia propiónica tipo II (deficiencia de PCCB), deficiencia de propionil CoA carboxilasa, deficiencia de propionil CoA carboxilasa, protanomalía, protanopia, enteropatía por pérdida de proteínas secundaria a insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome de Proteus, delección proximal de 4q incluida, delección proximal de 4q- incluida, PRP, PRS, síndrome de vientre en ciruela, PS, poliodistrofia de pseudo-Hurler, pseudo-poliodistrofia, pseudoacantosis nigricans, pseudoacondroplasia, deficiencia de pseudocolinesterasa, pseudogota familiar, pseudohemofilia, pseudohermafroditismo, pseudohermafroditismo, pseudohermafroditismo-trastorno de nefronas-tumor de Wilm, distrofia muscular pseudohipertrófica, pseudohipoparatiroidismo, pseudohipoparatiroidismo, pseudohipofosfatasa, pseudopoliodistrofia, síndrome de pseudotalidomida, pseudoxantoma elasticum, pseudoxantoma elasticum, psoriasis, psorospermiosis follicularis, PSP, PSS, convulsión psicomotora, epilepsia psicomotora, epilepsia equivalente psicomotora, deficiencia de PTC, pterygium, síndrome de pterygium colli, pterygium universale, pterigolinfangiectasia, atresia pulmonar, linfangiomatosis pulmonar, estenosis pulmonar, estenosis pulmonar-defecto del tabique ventricular, piedras pulpares, displasia pulpal, enfermedad de Pulseless, alinfocitosis pura, histiocitosis cutánea pura, deficiencia de nucleósido de purina fosforilasa, púrpura hemorrágica, síndrome de Purtilo, PXE, PXE tipo dominante, PXE tipo recesivo, picnodisostosis, picnodisostosis, picnoepilepsia, aciduria piroglutámica, aciduria piroglutámica, deficiencia de pirrolina carboxilato deshidrogenasa, deficiencia de piruvato carboxilasa, deficiencia de piruvato carboxilasa grupo A, deficiencia de piruvato carboxilasa grupo B, deficiencia de piruvato deshidrogenasa, deficiencia de piruvato deshidrogenasa, deficiencia de piruvato deshidrogenasa, deficiencia de piruvato cinasa, q25-qter, q26 o q27-qter, q31 o 32-qter, prolongación QT con hipohipocalcemia extracelular, prolongación QT sin sordera congénita, QT prolongado con sordera congénita, cuadriparesia de parálisis cerebral, cuadriplegia de parálisis cerebral, derroche cuántico, derroche cuántico, r4, r6, r14, r 18, r21, r22, raquisquisis posterior, aplasia radial-trombocitopenia amegacariocítica, síndrome de aplasia radial-trombocitopenia, parálisis de nervios radiales, neuropatía radicular sensorial, neuropatía radicular sensorial, neuropatía radicular sensorial recesiva, displasia de dentina radicular, distonía-parkinsonismo de aparición rápida, síndrome de Rapp-Hodgkin, síndrome de displasia ectodérmica de Rapp-Hodgkin (hipohidrótico), displasias ectodérmicas hipohidróticas de Rapp-Hodgkin, ataxia hereditaria rara con cambios polineuríticos y sordera provocada por un defecto de la enzima ácido fitánico hidroxilasa, síndrome de Rautenstrauch-Wiedemann, progeria neonatal de tipo Rautenstrauch-Wiedemann, fenómeno de Raynaud, RDP, hipoglucemia funcional reactiva, hipoglucemia reactiva secundaria a diabetes leve, síndrome de Kenny-Caffe de tipo recesivo, miotonía congénita de tipo recesivo de Recklin, enfermedad de Recklinghausen; fístula rectoperineal, vómitos recurrente, distrofia neurovascular refleja, síndrome de distrofia simpática refleja, errores de refracción, anemia refractaria, parálisis de refrigeración, enfermedad de Refsum, enfermedad de Refsum, enteritis regional, síndrome de Reid-Barlow, síndrome de Reifenstein, síndrome de Reifenstein, anomalía de Reiger-retraso del crecimiento, síndrome de Reiger, enfermedad periódica de Reimann, síndrome de Reimann, distrofia corneal de Reis-Bucklers, síndrome de Reiter, síndrome de Reiter, síndrome de Guillain-Barre recidivante, esclerosis múltiple recidivante-remitente, agenesia renal, displasia renal-ceguera hereditaria, displasia renal-aplasia retiniana de tipo Loken-Senior, glicosuria renal, glicosuria renal tipo A, glicosuria renal tipo B, glicosuria renal tipo O, renal-oculocerebrodistrofia, displasia renal-retiniana con enfermedad quística medular, displasia renal-retiniana con enfermedad quística medular, distrofia renal-retiniana familiar, síndrome de renal-retiniano, síndrome de Rendu-Osler-Weber, acidosis respiratoria, trastornos de la cadena respiratoria, mioclono respiratorio, síndrome de las piernas cansadas, cardiomiopatía restrictiva, hiperlipemia de retención, síndrome de Retore (obsoleto), disgenesia reticular, síndrome aplásico retiniano-de riñones quísticos-de Joubert, degeneración de conos retiniana, distrofia de conos retiniana, distrofia de conos-bastones retiniana, retinitis pigmentaria, retinitis pigmentaria y sordera congénita, retinoblastoma, deficiencia de retinol, retinosquiasis, retinosquiasis juvenil, síndrome de retracción, neuropatía retrobulbar, síndrome retrolenticular, síndrome de Rett, coacción inversa, síndrome de Reye, síndrome de Reye, RGS, factores sanguíneos de Rh, enfermedad de Rh, incompatibilidad de factor de Rh, incompatibilidad de Rh, incompatibilidad de rhesus, fiebre reumática, artritis reumatoide, miositis reumatoide, aracnoiditis cerebral rinosinusogénica, condrodisplasia rizomélica punctata (RCDP), acatalasemia, enfermedad clásica de Refsum, RHS, mioclono rítmico, defectos de los huesos entre las costillas con micrognatia, enfermedad de Ribbing (obsoleto), enfermedad de Ribbing, síndrome de Richner-Hanhart, síndrome de Rieger, síndrome de Rieter, fibrosis ventricular derecha, síndrome de Riley-Day, síndrome de Riley-Smith, cromosoma en anillo 14, cromosoma en anillo 18, anillo 4, cromosoma en anillo 4, anillo 6, cromosoma en anillo 6, anillo 9, cromosoma en anillo 9 R9, anillo 14, anillo 15, cromosoma en anillo 15 (patrón de mosaico), anillo 18, cromosoma en anillo 18, anillo 21, cromosoma en anillo 21, anillo 22, cromosoma en anillo 22, enfermedad de Ritter,

síndrome de Ritter-Lyell, RLS, RMSS, síndrome de Roberts SC-focomelia, síndrome de Roberts, síndrome de Roberts tetrafocomelia, displasias ectodérmicas de Robertson, anomalía de Robin, secuencia de Robin, síndrome de Robin, enanismo de Robinow, síndrome de Robinow, síndrome de Robinow de forma dominante, síndrome de Robinow de forma recesiva, miopatía de bastones, enfermedad de Roger, enfermedad de Rokitsansky, síndrome de Romano-Ward, síndrome de Romberg, dientes sin raíces, síndrome de Rosenberg-Chutorian, síndrome de Rosewater, síndrome de Rosewater, síndrome de Rosselli-Gulienatti, síndrome de Rothmund-Thomson, síndrome de Roussy-Levy, RP, RS ligado al cromosoma X, RS, RS, RSDS, síndrome de RSH, RSS, RSTS, RTS, RTS, RTS, rubeola congénita, síndrome de Rubinstein, síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Rubinstein Taybi-pulgares anchos-Hallux, albinismo de Rufous, síndrome de Ruhr, caquexia diencefálica de Russell, síndrome de Russell, síndrome de Russell, enanismo de Russell-Silver, síndrome de Russell-Silver, síndrome de Russell-Silver ligado al cromosoma X, síndrome de Ruvalcaba-Myhre-Smith (RMSS), síndrome de Ruvalcaba, displasia ósea de tipo Ruvalcaba con retraso mental, regresión sacral, agenesia sacral congénita, SAE, síndrome de Saetre-Chotzen, Sakati, síndrome de Sakati, síndrome de Sakati-Nyhan, espasmos de Salaam, síndrome de glándulas salivales-sudoríparas, distrofia corneal nodular de Salzman, enfermedad de Sandhoff, síndrome de Sanfilippo, Sanfilippo tipo A, Sanfilippo tipo B, enfermedad de Santavuori, enfermedad de Santavuori-Haltia; sarcoide de Boeck, sarcoidosis, sarcoidosis, Sathre-chotzen, parálisis del sábado noche, SBMA, síndrome de SC focomelia, síndrome de SC, SCA 3, deficiencia de SCAD, deficiencia de SCAD de aparición en el adulto localizada, deficiencia de SCAD congénita generalizada, SCAD, SCAD, SCAD, deficiencia de SCADH, síndrome de piel escaldada, defecto del cuero cabelludo congénito, escapocefalia, escapocefalia, escapocefalia, escápula elevada, miopatía escapulooperoneal, distrofia muscular escapulooperoneal, síndrome escapulooperoneal de tipo miopático, cicatriz bullosa, cicatriz bullosa, SCHAD, enfermedad de Schaumann, síndrome de Scheie, síndrome de Schereshevskii-Turner, enfermedad de Schilder, encefalitis de Schilder, enfermedad de Schilder, enfermedad de Schindler tipo I (aparición infantil), enfermedad de Schindler de aparición infantil, enfermedad de Schindler, enfermedad de Schindler tipo II (aparición en el adulto), síndrome de Schinzel, síndrome de Schinzel-Giedion, síndrome acrocalloso de Schinzel, síndrome de Schinzel-Giedion Midface-retracción, esquizencefalia, condrodisplasia metafísea de tipo Schmid, disostosis metafísea de tipo Schmid, síndrome de Schmid-Fraccaro, síndrome de Schmidt, síndrome de Schopf-Schultz-Passarge, enfermedad de Schueller-Christian, tipo Schut-Haymaker, síndrome de Schwartz-Jampel-Aberfeld, síndrome de Schwartz-Jampel tipos 1A y 1B, síndrome de Schwartz-Jampel, síndrome de Schwartz-Jampel tipo 2, SCI, D SCID, esclerodermia, esclerodermia, esclerosis familiar progresiva sistémica, esclerosis difusa familiar del cerebro, síndrome craneodigital de Scott con retraso mental, lengua escrotal, SCS, SCS, SD, SDS, SDYS, conjuntivitis estacional, síndrome de nevus sebáceo, nevus sebáceo, queratosis seborreica, verrugas seborreicas, síndrome de Seckel, enanismo de tipo Seckel, bloqueo cardíaco congénito de segundo grado, amiloidosis secundaria, blefarospasmo secundario, esprúe no tropical secundario, síndrome de Brown secundario, beriberi secundario, amiloidosis generalizada secundaria, distonía secundaria, deficiencia de componentes secretores, deficiencia de IgA secretora, SED tarda, SED congénita, SEDC, nevus acrómico lineal segmentario, distonía segmentaria, mioclonos segmentarios, síndrome de Seip, enfermedad de enfermedad de Seitelberger, enfermedad de Seitelberger, convulsiones, deficiencia selectiva de subclases de IgG, mutismo selectivo, deficiencia selectiva de subclase de IgG, deficiencia de IgM selectiva, mutismo selectivo, deficiencia de IgA selectiva, histiocitosis autocicatrizante, holoprosencefalia semilobar, disgenesia de túbulos seminíferos, retinosquiasis senil, verrugas seniles, síndrome de Senior-Loken, neuropatía sensorial hereditaria tipo I, neuropatía sensorial hereditaria tipo II, neuropatía sensorial hereditaria tipo I, neuropatía radicular sensorial, neuropatía radicular sensorial, neuropatía radicular sensorial recesiva, granulomatosis progresiva séptica, displasia septo-óptica, meningitis circunscrita serosa, deficiencia de inhibidor de proteasas séricas, deficiencia de carnosinasa sérica, síndrome de Settleis, inmunodeficiencia combinada grave, inmunodeficiencia combinada grave con deficiencia de adenosina desaminasa, inmunodeficiencia combinada grave (SCID), inversión sexual, infantilismo sexual, síndrome de SGB, síndrome de Sheehan, dentinogénesis imperfecta de tipo Shields, herpes, virus de la varicela zóster, beriberi de barcos, síndrome de SHORT, síndrome de delección del brazo corto 18, deficiencia de acil CoA deshidrogenasa de cadena corta, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (SCAD), estatura baja y telangiectasia facial, estatura baja-anomalías faciales esqueléticas-retraso-macrodontia, estatura baja-hiperextensibilidad-anomalía de Rieger-retraso en la dentición, estatura baja-onicodisplasia, estatura baja-eritema telangiectático de la cara, síndrome de SHORT, beriberi de Shoshin, síndrome de la cintura del hombro, síndrome de Shprintzen-Goldberg, síndrome de Shulman, síndrome de Shwachman-Bodian, síndrome de Shwachman-Diamond, síndrome de Shwachman, síndrome de Shwachman-Diamond-Oski, síndrome de Shwachmann, síndrome de Shy Drager, síndrome de Shy-Magee, deficiencia de SI, deficiencia de sialidasa, sialidosis tipo I juvenil, sialidosis tipo II infantil, sialidosis, sialolipidosis, síndrome de seno enfermo, anemia falciforme, enfermedad de células falciformes, enfermedad de células falciformes-hemoglobina C, enfermedad de células falciformes-hemoglobina D, enfermedad de células falciformes-talasemia, rasgo de células falciformes, anemias sideroblásticas, anemia sideroblástica, sideroblastosis, sideroblastosis, SIDS, síndrome de Siegel-Cattan-Mamou, dermatosis pigmentada de tipo Siemens-Bloch, síndrome de Siemens, enfermedad de Siewerling-Creutzfeldt, síndrome de Siewert, síndrome de Silver, enanismo de Silver-Russell, síndrome de Silver-Russell, enfermedad de Simmond, síndrome de Simony, epidermolisis bullosa simple, síndrome de dismorfia de Simpson, síndrome de Simpson-Golabi-Behmel, enfermedad de Sinding-Larsen-Johansson, síndrome de Singleton-Merten, arritmia sinusal, seno venoso, taquicardia sinusal, secuencia de sirenomelia, sirenomelus, bronquiectasia de sitio inverso y sinusitis, síndrome de SJA, síndrome de Sjogren Larsson-ictiosis, síndrome de Sjogren, síndrome de Sjogren Larsson-ictiosis, síndrome de Sjögren, SJS, displasia esquelética, displasia esquelética de tipo Weismann Netter Stuhl, síndrome de descamación de la piel, neoplasmas de la piel, asimetría del cráneo y retraso leve, asimetría del cráneo y sindactilia leve, SLE, epilepsia del sueño, apnea del sueño, SLO, síndrome de Sly, SMA, forma aguda infantil de SMA, SMA I, SMA III, SMA tipo I, SMA

tipo II, SMA tipo III, SMA3, SMAX1, SMCR, síndrome de Smith Lemli Opitz, síndrome de Smith Magenis, región cromosómica de Smith-Magenis, enanismo de Smith-McCort, síndrome de Smith-Opitz-innato, enfermedad de Smith, mieloma latente, SMS, SMS, SNE, estornudo por exposición a la luz, valproato de sodio, plasmacitoma solitario del hueso, enfermedad de Sorsby, síndrome de Sotos, síndrome de Souques-Charcot, porfiria genética sudafricana, disfonía espasmódica, tortícolis espasmódica, tortícolis espasmódica, Wryneck espasmódico, parálisis cerebral espástica, colon espástico, disfonía espástica, paraplegia espástica, calcinosis de SPD, deficiencia específica de anticuerpos con inmunoglobulinas normales, incapacidad de lectura específica, SPH2, anemia esferocítica, esferocitosis, síndrome de esferofaquia-braquimorfia, liposidosis de esfingomielina, deficiencia de esfingomielinasa, dedos de araña, enfermedad de Spielmeyer-Vogt, síndrome de Spielmeyer-Vogt-Batten, espina bífida, espina bífida, espina bífida abierta, aracnoiditis espinal, malformación arteriovenosa espinal, ataxia espinal espinal hereditaria familiar, atrofia muscular espinal y bulbar, hiperestosis esquelética idiopática difusa espinal, DISH espinal, atrofia muscular espinal, atrofia muscular espinal, atrofia muscular espinal todos los tipos, atrofia muscular espinal tipo ALS, atrofia muscular espinal-hipertrofia de las pantorrillas, atrofia muscular espinal tipo I, atrofia muscular espinal tipo III, atrofia muscular espinal tipo 3, atrofia muscular espinal-hipertrofia de las pantorrillas, aracnoiditis osificante espinal, estenosis espinal, ataxia espinocerebelar, atrofia espinocerebelar tipo I, ataxia espinocerebelar tipo I (SCA1), ataxia espinocerebelar tipo II (SCAII), ataxia espinocerebelar tipo III (SCAIII), ataxia espinocerebelar tipo III (SCA 3), ataxia espinocerebelar tipo IV (SCAIV), ataxia espinocerebelar tipo V (SCAV), ataxia espinocerebelar tipo VI (SCAVI), ataxia espinocerebelar tipo VII (SCAVII), ictericia espiroquetal, síndrome de agenesia esplénica, ptosis esplénica, esplenoptosis, deformidad de mano hendida-disostosis mandibulofacial, deformidad de mano hendida-disostosis mandibulofacial, deformidad de mano hendida, deformidad de mano hendida, espondiloartritis, displasia espondilocostal - tipo I, displasia espondiloepifisaria Tarda, displasia espondilotorácica, radiculopatía caudal espondilótica, riñón en esponta, espongioblastoma multiforme, hipoglucemia espontánea, deformidad de Sprengel, oftalia primaveral, SRS, ST, síndrome de Stale Fish, síndrome de piel escaldada estafilocócico, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Startle, estado epiléptico, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, enfermedad de cabello acerado, síndrome de Stein-Leventhal, enfermedad de Steinert, síndrome de Stengel, enfermedad de Stengel-Batten-Mayou-Spielmeyer-Vogt-Stock, colangitis estenosante, estenosis del canal vertebral lumbar, estenosis, deficiencia de esteroide sulfatasa, displasias ectodérmicas de Stevanovic, síndrome de Stevens Johnson, síndrome de Stevens-Johnson, STGD, síndrome de Stickler, síndrome de Stickler, síndrome de Stiff-Man, síndrome de Stiff Man, síndrome de Stiff Person, enfermedad de Still, síndrome de Stilling-Turk-Duane, enfermedad de Stillis, mioclonos estimulossensitivo, síndrome del hombre de piedra, hombre de piedra, anomalía de Streeter, degeneración estriatonigral del tipo autosómico dominante, calcinosis estriopalidodentada, estroma, membrana de Descemet, distrofia corneal estromal, estruma linfomatoso, síndrome de Sturge-Kalischer-Weber, síndrome de Sturge Weber, facomatosis de Sturge-Weber, encefalomiopatía necrotizante subaguda, encefalomiopatía necrotizante subaguda, encefalopatía espongiiforme subaguda, encefalopatía necrotizante subaguda, sarcoidosis subaguda, neuronopático subagudo, estenosis subaórtica, encefalopatía arteriosclerótica subcortical, esclerosis subendocardial, sensibilidad a succinilcolina, deficiencia de sucrasa-isomaltasa congénita, malabsorción de sucrosa-isomaltosa congénita, intolerancia a la sucrosa congénita, leucodistrofia sudanofílica ADL, leucodistrofia sudanofílica de tipo Pelizaeus-Merzbacher, leucodistrofia sudanofílica incluida, síndrome de muerte súbita del lactante, atrofia de Sudeck, síndrome de Sugio-Kajii, síndrome de Summerskill, acrocefalosindactilia de Summit, acrocefalosindactilia de Summit, síndrome de Summitt, síndrome de la vaina del tendón oblicuo superior, glándulas suprarrenales, estenosis aórtica supraválvular, taquicardia supraventricular, síndrome surdicardiaco, síndrome surdicardiaco, SVT, absceso de glándulas sudoríparas, síndrome de sudoración gustativa, síndrome de Sweet, síndrome de cartilago de queso suizo, oxi-cefalia sindactílica, sindactilia tipo I con microcefalia y retraso mental, hipoplasia ductular hepática sindrómica, siringomielia, reticuloendoteliosis aleucémica sistémica, amiloidosis sistémica, deficiencia de carnitina sistémica, elastorrhexis sistémica, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de mastocitos sistémica, mastocitosis sistémica, artritis juvenil de aparición sistémica, artritis juvenil de de aparición sistémica, esclerosis de aparición sistémica, bazo sistópico, deficiencia de linfocitos T, hipoglucemia de taquialimentación, taquicardia, síndrome de Takahara, enfermedad de Takayasu, arteritis de Takayasu, arteritis de Takayasu, talipes calcaneus, talipes equinovarus, talipes equinus, talipes varus, talipes valgus, estenosis espinal en tándem, enfermedad de Tangier, degeneración tapetoretiniana, síndrome de TAR, distonía tardía, distrofia muscular tardía, discinesia tardía, discinesia oral tardía, discinesia tardía, distonía tardía, parálisis cubital tardía, anemia de células diana, tarsomegalia, enfermedad de Tarui, defectos en la línea media TAS incluidos, defecto de la línea media TAS, enfermedad de Tay Sachs, esfingolipidosis de Tay Sachs, enfermedad de Tay Sachs, síndrome de Tay-ictiosis, esfingolipidosis de Tay Sachs, síndrome de Tay-ictiosis, síndrome de Taybi tipo I, síndrome de Taybi, TCD, TCOF1, TCS, TD, síndrome de TDO, TDO-I, TDO-II, TDO-III, telangiectasia, telacanto con anomalías asociadas, telacanto con anomalías asociadas, síndrome de telacanto-hipospadias, epilepsia del lóbulo temporal, arteritis termoral/arteritis de células gigantes, arteritis temporal, TEN, adherencia de la vaina del tendón superior oblicuo, migraja de tensión, delección terminal de 4q incluido, delección terminal de 4q- incluido, distrofia corneal de Terrian, síndrome de Teschler-Nicola/Killian, síndrome de médula espinal anclada, secuencia de malformación de médula anclada, síndrome de médula anclada, síndrome de médula espinal cervical anclada, deficiencias de tetrahidrobiopterina, deficiencias de tetrahidrobiopterina, tetralogía de Fallot, tetralogía de Fallot, síndrome de tetrafocomelia-trombocitopenia, tetrasomía del brazo corto del cromosoma 9, tetrasomía 9p, tetrasomía del brazo corto del cromosoma 18, síndrome talámico, síndrome de dolor talámico, anestesia hiperestésica talámica, talasemia intermedia, talasemia menor, talasemia mayor, deficiencia de tiamina, enfermedad de orina de jarabe de arce sensible a tiamina, nefropatía de membrana basal delgada, deficiencia de tiolasa, RCDP, acil-CoA dihidroxiacetonafofato aciltransferasa, síndrome de tercera y cuarta bolsa faríngea,

bloqueo cardíaco congénito de tercer grado (completo), enfermedad de Thomsen, distrofia torácica-pélvica-falángica, canal espinal torácico, síndrome toracoabdominal, síndrome toracoabdominal ectopia cordis, síndrome de tres M, nanismo de huesos delgados de tres-M, trombostenia de Glanzmann y Naegeli, trombocitemia esencial, síndrome de trombocitopenia-radio ausente, síndrome de trombocitopenia-hemangioma, síndrome de trombocitopenia-radios ausentes, trombofilia hereditaria debida a AT III, púrpura trombocitopénica trombótica, colitis trombocerosa, colitis trombocerosa, displasia tímica con inmunoglobulinas normales, agenesia tímica, aplasia tímica de tipo DiGeorge, hipoplasia tímica agammaglobulinemias primarias incluidas, hipoplasia tímica de tipo DiGeorge, aplasia congénita del tipo, tic doloroso, tics, síndrome de Tinel, síndrome de Tolosa Hunt, tortícolis espasmódica tónica, síndrome de pupilas tónicas, síndrome de dientes y uñas, síndrome de dientes y uñas, infección de Torch, síndrome de TORCH, distonía de torsión, tortícolis, tortícolis, lipodistrofia total, conexión venosa pulmonar anómala total, aftosis de Touraine, síndrome de Tourette, trastorno de Tourette, síndrome de Townes-Brocks, síndrome de Townes, anemia paralítica tóxica, necrosis epidérmica tóxica, toxoparquistosis diafisaria tibio-peroneal, toxoparquistosis, toxoplasmosis-otros agentes-rubeola-citomegalovirus-herpes simple, fístula traqueoesofágica con o sin atresia esofágica, fístula traqueoesofágica, miastenia grave neonatal transitoria, defecto del tabique auriculoventricular transicional, transposición de las arterias grandes, monitorización transtelefónica, amiloidosis de síndrome de triple X, síndrome de triple X, síndrome de trapezoidocefalia-sinostosis múltiple, síndrome de Treacher Collins, síndrome de Treacher Collins-Franceschetti 1, enfermedad de Trevor, corazón triauricular, síndrome trico-dento-óseo, síndrome trico-dento-óseo, tricopolidistrofia, síndrome tricorniofalángico, síndrome tricorniofalángico, atresia tricúspide, deficiencia de proteína trifuncional, neuralgia trigeminal, enfermedad de almacenamiento de triglicéridos-oxidación de ácidos grasos de cadena larga alterada, trigonitis, trigonocefalia, trigonocefalia, trigonocefalia, síndrome de trigonocefalia, síndrome de trigonocefalia "C", trimetilaminuria, pulgares trifalángicos-falanges distales hipoplásicas-oncodistrofia, síndrome de pulgares trifalángicos, complejo de síntomas triples de Behcet, síndrome de triple X, síndrome de triplo X, síndrome triploide, triploidía, síndrome de triploidía, síndrome de Trismus-pseudocamptodactilia, trisomía, síndrome de trisomía G, trisomía X, trisomía 6q parcial, síndrome de trisomía 6q parcial, mosaico de trisomía 9, síndrome de trisomía 9P (parcial) incluido, trisomía 11q parcial, mosaico de trisomía 14, síndrome de mosaicismo de trisomía 14, síndrome de trisomía 21, mosaico de trisomía 22, síndrome de mosaicismo de trisomía 22, TRPS, TRPS1, TRPS2, TRPS3, hermafroditismo verdadero, hermafroditismo verdadero, tronco arterioso, malabsorción de triptófano, deficiencia de triptófano pirrolasa, TS, TTP, TTTS, esclerosis tuberosa, ectasia tubular, síndrome de Turcot, síndrome de Turner, síndrome de Turner-Kieser, fenotipo de Turner con cromosomas normales (cariotipo), síndrome de Turner-varny, turricefalia, síndrome de transfusión de gemelo a gemelo, síndrome de transfusión de gemelo a gemelo, tipo A, tipo B, tipo AB, tipo O, diabetes tipo I, tipo I familiar incompleta masculina, pseudohermaphroditismo tipo I familiar incompleto masculino, enfermedad de Gaucher tipo I, tipo I (deficiencia de PCCA), tirosinemia tipo I, enfermedad de Gaucher tipo II, histiocitosis tipo II, tipo II (deficiencia de PCCB), tirosinemia tipo II, artrogriposis múltiple congénita distal tipo IIA, enfermedad de Gaucher tipo III, tiosinemia tipo III, dentinogénesis imperfecta tipo III, retinosquiasis típica, albinismo negativo para tirosinasa (tipo I), albinismo positivo para tirosinasa (tipo II), forma aguda de tirosinemia tipo 1, forma crónica de tirosinemia tipo 1, tirosinosis, UCE, colitis ulcerosa, colitis ulcerosa crónica no específica, síndrome cubital-mamario, síndrome cubital-mamario de Pallister, parálisis de nervio cubital, UMS, FOD no clasificadas, bilirrubinemia benigna no conjugada, baja actividad de la glándula paratiroides, eritroderma ictiosiforme unilateral con malformaciones ipsilaterales de las extremidades, condromatosis unilateral, defecto unilateral del músculo pectoral y sindactilia de la mano, hemidislipasia de tipo unilateral, megalencefalia unilateral, lipodistrofia parcial unilateral, agenesia renal unilateral, colon inestable, enfermedad de Unverricht, enfermedad de Unverricht-Lundborg, enfermedad de Unverricht-Lundborg-Laf, síndrome de Unverricht, síndrome de extremidades superiores-cardiovascular (Holt-Oram), enfermedad de neuronas motoras superiores, apnea de las vías respiratorias superiores, apnea de las vías respiratorias superiores, defectos o trastornos del ciclo de la urea, trastorno del ciclo de la urea de tipo arginasa, trastorno del ciclo de la urea de tipo arginino succinasa, trastornos del ciclo de la urea de tipo carbamilo fosfato sintetasa, trastorno del ciclo de la urea de tipo citrulinemia, trastornos del ciclo de la urea de tipo N-acrilito glutamato sintetasa, trastorno del ciclo de la urea de tipo OTC, síndrome uretral, síndrome uretro-oculo-articular, defecto grave de uridina difosfato glucuronosiltransferasa de tipo I, defectos del tracto urinario, síndrome urofacial, uroporfirinógeno III cosintasa, urticaria pigmentosa, síndrome de Usher, Usher tipo I, Usher tipo II, Usher tipo III, Usher tipo IV, sinequia uterina, uroporfirinógeno I-sintasa, uveítis, síndrome de uveomeningitis, V-CJD, asociación de VACTERL, asociación de VACTERL, síndrome de VACTERL, valgus calcaneus, deficiencia de valina transaminasa, valinemia, ácido valproico, exposición a ácido de valproato, exposición a ácido valproico, ácido valproico, enfermedad de Van Buren, síndrome de Van der Hoeve-Habertsma-Waardenburg-Gauldi, disgammaglobulinemia por deficiencia de inmunoglobulinas de aparición variable, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante (V-CJD), embriopatía por varicela, porfiria variegata, porfiria variegata, porfiria variegata, marcas de nacimiento vasculares, demencia vascular de tipo Binswanger, tumor eréctil vascular, hemofilia vascular, malformaciones vasculares, malformaciones vasculares del cerebro, vasculitis, ataxia vasomotora, diabetes insípida resistente a vasopresina, diabetes insípida sensible a vasopresina, asociación de VATER, síndrome de Vcf, Vcfs, síndrome velocardiocéfalo, síndrome velocardiocéfalo, artritis venérea, malformaciones venosas, fibrilación ventricular, defectos del tabique ventricular, defectos ventriculares congénitos, defecto del tabique ventricular, taquicardia ventricular, malformaciones venuales, VEOHD, aplasia de la vermis, agenesia cerebelar de la vermis, queratoconjuntivitis vernal, verruga, vertebral anal traqueoesofágica esofágica radial, hiperostosis anquilosante vertebral, enfermedad de Huntington de aparición muy temprana, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD), schwannoma vestibular, neurofibromatosis por schwannoma vestibular, vestibulocerebelar, oxicefalia de Virchow, xantogranulomatosis visceral, xantogranulomatosis visceral, miopatía visceral-oftalmoplegia externa, síndrome de visceromegalia-hernia

umbilical-macroglusia, amnesia visual, deficiencia de vitamina A, deficiencia de vitamina B-1, distrofia macular de vitelina, vitiligo, vitiligo, vitiligo capilar, distrofia vitreoretiniana, VKC, síndrome de VKH, VLCAD, VLCAD, síndrome de Vogt, cefalosindactilia de Vogt, síndrome de Vogt Koyanagi Harada, síndrome de Vogt Koyanagi Harada, síndrome de Vogt Koyanagi Harada, síndrome de Von Bechterew-Strumpell, paramiotonía congénita de Von Eulenburg, síndrome de Von Frey, enfermedad de Von Gierke, síndrome de Von Hippel-Lindau, síndrome de Von Mikulicz, enfermedad de Von Recklinghausen, enfermedad de Von Willebrandt, VP, enfermedad de Vrolik (tipo II), VSD, VSD, trastorno de cornificación de tipo vulgar, ictiosis de tipo vulgar, síndrome de W, síndrome de Waardenburg, síndrome de Waardenburg-Klein, síndrome de Waardenburg tipo I (WS1), síndrome de Waardenburg tipo II (WS2), síndrome de Waardenburg tipo IIA (WS2A), síndrome de Waardenburg tipo IIB (WS2B), síndrome de Waardenburg tipo III (WS3), síndrome de Waardenburg tipo IV (WS4), síndrome de Waelsch, complejo de WAGR, síndrome de WAGR, síndrome de WAGR, macroglobulinemia de Waldenstroem, púrpura de Waldenstrom, síndrome de Waldenstrom, enfermedad de Waldmann, síndrome de Walquer-Warburg, bazo errante, síndrome de Warburg, anemia hemolítica de anticuerpos calientes, enfermedad de anticuerpos de reacción calientes, síndrome de Wartenberg, WAS, agua en el cerebro, síndrome de Watson, síndrome de Watson-Alagille, síndrome de Waterhouse-Friderichsen, enfermedad cerosa, WBS, síndrome de Weaver, síndrome de Weaver-Smith, enfermedad de Weber-Cockayne, granulomatosis de Wegener, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Weil, síndrome de Weil, Weill-Marchesani, síndrome de Weill-Marchesani, síndrome de Weill-Reyes, síndrome de Weismann-Netter-Stuhl, síndrome de Weissenbacher-Zweymuller, síndrome de Wells, Wenckebach, enfermedad de Werdnig-Hoffman, enfermedad de Werdnig-Hoffmann, enfermedad de Werdnig-Hoffmann, parálisis de Werdnig-Hoffman, enfermedad de Werlhof, síndrome de Werner, síndrome de Wernicke (C) I, afasia de Wernicke, síndrome de Wernicke-Korsakoff, síndrome de West, beriberi húmedo, WHCR, enfermedad de Whipple, enfermedad de Whipple, síndrome de cara sibilante, síndrome de cara sibilante-mano de vano de molino de viento, enfermedad de White-Darier, síndrome de Whitnall-Norman, hipermelanosis nevoide de Whorled, WHS, síndrome de Wieacker, síndrome de Wieacker, síndrome de Wieacker-Wolff, síndrome de Wiedmann-Beckwith, síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch, síndrome de Wildervanck, enfermedad de Willebrand-Juergens, síndrome de Willi-Prader, síndrome de Williams, síndrome de Williams, síndrome de Williams-Beuren, tumor de Wilms, síndrome de tumor de Wilms-aniridia-gonadoblastoma-retraso mental, tumor de Wilms-aniridia-gonadoblastoma-retraso mental, síndrome de tumor de Wilms-aniridia-anomalías genitourinarias-retraso mental, tumor de Wilms-pseudohermafroditismo-nefropatía, tumor de Wilms y pseudohermafroditismo, tumor de Wilms-pseudohermafroditismo-glomerulopatía, enfermedad de Wilson, síndrome de Winchester, síndrome de Winchester-Grossman, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia de tipo Wiskott-Aldrich, displasias ectodérmicas de Witkop, síndrome de diente uña de Witkop, síndrome de Wittmaack-Ekbom, síndrome de WM, WMS, WMS, WNS, enfermedad de Wohlfart, enfermedad de Wohlfart-Kugelberg-Welander, síndrome de Wolf, región cromosómica de Wolf-Hirschhorn (WHCR), síndrome de Wolf-Hirschhorn, síndrome de Wolff-Parkinson-White, síndrome de Wolff-Parkinson-White, síndrome de Wolff Parkinson White, síndrome de Wolfram, enfermedad de Wolman (deficiencia de lipasa ácida lisosómica), enfermedad de Woody Guthrie, síndrome de WPW, síndrome de WPW, calambre del escritor, WS, WS, WS, WSS, WWS, síndrome de Wyburn-Mason, síndrome de Wyburn-Mason, enfermedad de Addison ligada al cromosoma X, adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (XALD), atrofia muscular espinobulbar de aparición en el adulto ligada al cromosoma X, atrofia muscular espinal del adulto ligada al cromosoma X, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X con deficiencia de hormona de crecimiento, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, síndrome ligado al cromosoma X linfoproliferativo, cardiomiopatía y neutropenia ligada al cromosoma X, miopatía centronuclear ligada al cromosoma X, deficiencia de cobre ligada al cromosoma X, malabsorción de cobre ligada al cromosoma X, síndrome de Conradi-Hunermann dominante ligado al cromosoma X, agenesia del cuerpo calloso de herencia dominante ligada al cromosoma X, distonía-parkinsonismo ligado al cromosoma X, ictiosis ligada al cromosoma X, ictiosis ligada al cromosoma X, agammaglobulinemia infantil ligada al cromosoma X, encefalopatía necrotizante infantil ligada al cromosoma X, retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X, lisencefalia ligada al cromosoma X, síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X, síndrome de retraso mental ligado al cromosoma X-pulgar en gancho, retraso mental ligado al cromosoma X con hipotonía, retraso mental ligado al cromosoma X y macroorquidismo, inmunodeficiencia variable combinada progresiva ligada al cromosoma X, síndrome de Conradi-Hunermann recesivo ligado al cromosoma X, inmunodeficiencia combinada grave recesiva ligada al cromosoma X, inmunodeficiencia combinada grave recesiva ligada al cromosoma X, retinosquiasis ligada al cromosoma X, displasia espondilopifisaria ligada al cromosoma X, deficiencia de xantina oxidasa (deficiencia de xantínuria, hereditaria), deficiencia de xantínuria, hereditaria (deficiencia de xantina oxidasa), xantogranulomatosis generalizada, xantoma tuberoso, xerodermia pigmentosa, xerodermia pigmentosa de tipo dominante, xerodermia pigmentosa tipo A I XPA forma clásica, xerodermia pigmentosa tipo B II XPB, xerodermia pigmentosa tipo E V XPE, xerodermia pigmentosa tipo C III XPC, xerodermia pigmentosa tipo D IV XPD, xerodermia pigmentosa tipo F VI XPF, xerodermia pigmentosa tipo G VII XPG, xerodermia pigmentosa variante tipo XP-V, xerodermia-pie zambo-y defecto del esmalte, idiocia xerodérmica, xeroftalmia, queratitis xerótica, XLP, síndrome de XO, XP, síndrome masculina XX, inversión del sexo, síndrome XXXXX, síndrome XXY, síndrome XYY, patrón cromosómico XYY, albinismo mutante amarillo, síndrome de uña amarilla, YKL, arteritis de mujeres jóvenes, síndrome de Yunis-Varon, síndrome YY, síndrome de Z-E, deficiencia de inhibidor de Z y proteasa, síndrome de Zellweger, síndrome de Zellweger, síndrome cerebro-hepato-renal de Zellweger, ZES, enfermedad de Ziehen-Oppenheim (distonía de torsión), síndrome de Zimmermann-Laband, deficiencia de zinc congénita, síndrome de Zinsser-Cole-Engman, ZLS, síndrome de Zollinger-Ellison.

Tal como se usa en el presente documento, un “cáncer” se refiere a un grupo de enfermedades y trastornos que se

caracterizan por crecimiento celular no controlado (por ejemplo formación de tumor) sin ninguna diferenciación de esas células en células especializadas y diferentes. Los cánceres que pueden tratarse usando los métodos de la presente invención incluyen, sin limitarse a, protooncogén ABL1, cánceres relacionados con SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenoquístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnógénica, alopecia, sarcoma de partes blandas alveolar, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres óseos, cáncer de intestino, glioma de células madre del cerebro, tumores cerebrales y del SNC, cáncer de mama, tumores del SNC, tumores carcinoides, cáncer del cuello del útero, tumores cerebrales infantiles, cáncer infantil, leucemia infantil, sarcoma de tejidos blandos infantil, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorrectales, linfoma de células T cutáneo, dermatofibrosarcoma-protuberante, tumor de células redondas pequeñas desmoplásico, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de conducto biliar extrahepático, cáncer ocular, melanoma ocular, retinoblastoma, cáncer de las trompas de Falopio, anemia de Fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor carcinoide gastrointestinal, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, tumores malignos hematológicos, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, papilomavirus humano, mola hidatiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, cáncer de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhan, cáncer laríngeo, leiomiomasarcoma, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno del riñón, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de Merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura de Nijmegen, cáncer de piel distinto de melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cánceres oculares, cáncer esofágico, cáncer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario de ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de glándula paratiroides, cáncer de pene, tumores neuroectodérmicos periféricos, cáncer de hipófisis, policitemia vera, cáncer de próstata, cánceres raros y trastornos asociados, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, cáncer de glándulas salivales, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales (vejiga), cáncer de células transicionales (renal-pelvis/-uréter), cáncer trofoblástico, cáncer de uretra, cáncer del sistema urinario, uroplaquinas, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Wilms.

Los compuestos de la invención pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto a un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable adecuado. El uso de los compuestos y los métodos descritos en el presente documento también puede ser útil profilácticamente.

Tal como se conoce en la técnica, un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La parte de base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la parte de azúcar del nucleósido. Para los nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato puede unirse al resto hidroxilo o bien en 2', 3' o bien en 5' del azúcar. En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato unen covalentemente nucleósidos adyacentes entre sí formando un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de este compuesto polimérico lineal pueden unirse adicionalmente formando un compuesto circular, sin embargo, se prefieren generalmente compuestos lineales. Además, los compuestos lineales pueden tener complementariedad de nucleótidos interna y por tanto pueden plegarse de una manera para producir un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Dentro de los oligonucleótidos. Se dice comúnmente que los grupos fosfato forman la estructura principal internucleosídica del oligonucleótido. La estructura principal o enlace normal de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'.

Los ejemplos específicos de compuestos antisentido o sentido preferidos útiles en los métodos descritos en el presente documento incluyen oligonucleótidos que contienen estructuras principales modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales. Tal como se define en esta memoria descriptiva, los oligonucleótidos que tienen estructuras principales modificadas incluyen los que conservan un átomo de fósforo en la estructura principal y los que no tienen un átomo de fósforo en la estructura principal. Para los fines de esta memoria descriptiva, y tal como se hace referencia algunas veces en la técnica, oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su estructura principal internucleosídica también puede considerarse que son oligonucleósidos.

Las estructuras principales de oligonucleótidos modificados preferidas que contienen un átomo de fósforo en las mismas incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo incluyendo fosfonatos de 3'-alquileo, fosfonatos de 5'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-aminofosforamidato y

aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos en 2'-5' de éstos y los que tienen polaridad invertida en los que uno o más enlaces internucleotídicos es un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden un único enlace 3' a 3' en el enlace internucleotídico más en 3', es decir, un único residuo de nucleósido invertido que puede ser abásico (falta el nucleótido o tiene un grupo hidroxilo en lugar del mismo). También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses número: 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.194.599; 5.565.555; 5.527.899; 5.721.218; 5.672.697 y 5.625.050.

Las estructuras principales de oligonucleótidos modificados preferidas que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen estructuras principales que se forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo y heteroátomos mixtos o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Éstos incluyen los que tienen enlaces de morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido), estructuras principales de siloxano; estructuras principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras principales de formaceto y tioformaceto; estructuras principales de metilenformaceto y tioformaceto; estructuras principales de riboaceto; estructuras principales que contienen alqueno; estructuras principales de sulfamato; estructuras principales de metiliminio y metilenhidrazino; estructuras principales de sulfonato y sulfonamida; estructuras principales de amida; y otras que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂ mixtas.

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses números: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439.

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico (es decir, la estructura principal) de las unidades de nucleótido se reemplazan por grupos novedosos. Las unidades de nucleótido se mantienen para la hibridación con un ácido nucleico diana apropiado. Un compuesto de este tipo, un mimético de oligonucleótido que se ha mostrado que tiene propiedades de hibridación excelentes, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el azúcar-estructura principal de un oligonucleótido se reemplaza por una estructura principal que contiene amida, en particular una estructura principal de aminoetilglicina. Se conservan los nucleótidos y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte de amida de la estructura principal. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses números: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Pueden encontrarse enseñanzas adicionales de compuestos de PNA en Nielsen *et al.*, Science 254: 1497-1500, 1991.

Se prefieren oligonucleótidos con estructuras principales de fosforotioato y oligonucleósidos con estructuras principales de heteroátomos, y en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [conocido como estructura principal de metileno (metiliminio) o MMI], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- [en los que la estructura principal de fosfodiéster nativa se representa como -O-P-O-CH₂-] de la patente estadounidense a la que se hizo referencia anteriormente número: 5.489.677, y las estructuras principales de amida de la patente estadounidense a la que se hizo referencia anteriormente número: 5.602.240. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras principales de morfolino de la patente estadounidense a la que se hizo referencia anteriormente número: 5.034.506.

Los oligonucleótidos modificados pueden contener también uno o más restos de azúcar. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueno y alquino puede ser alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno o alquino C₂ a C₁₀ sustituido o no sustituido. Se prefieren particularmente O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, en los que n y m son de desde 1 hasta aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl; Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxilo (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin *et al.*, Helv. Chim. Acta, 78: 486-504, 1995), es decir, un grupo alcocalcoxilo. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminooxietoxilo, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos a continuación en el presente documento, y 2'-

dimetilaminoetoxietoxilo (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetil-amino-etoxi-etilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂, también descrito en los ejemplos a continuación en el presente documento.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxilo (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxilo (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-alilo (2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-alilo (2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación en 2' puede ser en la posición arábica (arriba) o posición ribosa (abajo). Una modificación de 2'-arábica preferida es 2'-F. También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal en 3' o en oligonucleótidos unidos en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal en 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar de pentofuranosilo. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses números: 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747; y 5.700.920.

Una modificación preferida adicional del azúcar incluye ácidos nucleicos bloqueados (LNA) en los que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono en 3' o 4' del anillo de azúcar, formando de ese modo un resto de azúcar bicíclico. El enlace es preferiblemente un grupo metileno (-CH₂)_n que forma un puente entre el átomo de oxígeno en 2' y el átomo de carbono en 4' en el que n es 1 ó 2. Se describen LNA y la preparación de los mismos en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleótidos (a menudo denominados en la técnica simplemente como "base"). Tal como se usa en el presente documento, los nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen otros nucleótidos naturales y sintéticos tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C≡C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados de alquilo de bases de pirimidina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Los nucleótidos modificados adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazincitidina (1H-pirrimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazincitidina (1H-pirrimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), fijaciones G tales como una fenoxazincitidina sustituida (por ejemplo 9-(2-aminoetoxi)-H-pirrimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazolcitidina (2H-pirrimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindolcitidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Los nucleótidos modificados también pueden incluir aquellos en los que la base de purina o pirimidina se reemplaza por otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Los nucleótidos adicionales incluyen los dados a conocer en la patente estadounidense n.º 3.687.808, los dados a conocer en The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, los dados a conocer por Englisch *et al.*, Angewandte Chemie, edición internacional, 30: 613, 1991, y los dados a conocer por Sanghvi, Y.S., capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Determinados de estos nucleótidos son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos descritos en el presente documento. Éstos incluyen pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. También se ha mostrado que sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido en 0,6-1,2°C y son sustituciones de bases actualmente preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-O-metoxietilo.

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de determinados de los nucleótidos modificados indicados anteriormente así como otros nucleótidos modificados incluyen, pero no se limitan a, la patente estadounidense indicada anteriormente número: 3.687.808, así como las patentes estadounidenses números: 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; y 5.681.941.

Otra modificación de los oligonucleótidos descritos en el presente documento implica unir químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Tales grupos conjugados incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterolos, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación, y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Los grupos que potencian las

propiedades farmacocinéticas incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o excreción de los compuestos descritos en el presente documento. Se dan a conocer grupos conjugados representativos en la solicitud de patente internacional PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992 y la patente estadounidense número: 6.287.860.

Los restos conjugados incluyen pero no se limitan a restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolsterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanacético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos también pueden conjugarse con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses números: 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941, determinadas de las cuales son de propiedad común con la presente solicitud.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dato estén modificadas uniformemente, y de hecho más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente puede incorporarse en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido.

Los compuestos antisentido o sentido pueden ser compuestos quiméricos. Compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras", tal como se hace referencia en el presente documento son compuestos antisentido o sentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen normalmente al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado de modo que confiere al oligonucleótido resistencia aumentada a la degradación por nucleasas, captación celular aumentada, estabilidad aumentada y/o afinidad de unión aumentada para el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas que pueden escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la ARNasa H, por tanto, da como resultado la escisión de la diana de ARN, potenciando enormemente de ese modo la eficacia de la inhibición de la expresión génica mediada por oligonucleótido. La escisión de híbridos de ARN:ARN puede lograrse, de un modo similar, a través de las acciones de endorribonucleasas, tales como ARNasa L que escinde ARN tanto celular como viral. La escisión de la diana de ARN puede detectarse rutinariamente mediante electroforesis en gel y, si es necesario, técnicas de hibridación de ácido nucleico asociado conocidas en la técnica.

Pueden formarse compuestos antisentido o sentido quiméricos dados a conocer en el presente documento como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/o oligonucleótidos tal como se describió anteriormente. Tales compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gámperos. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses números: 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

Los compuestos descritos en el presente documento también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otra forma con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptores, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales formulaciones de ayuda para la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes estadounidenses números: 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

Los compuestos antisentido o sentido descritos en el presente documento abarcan cualquier sal, éster o sal de tales ésteres farmacéuticamente aceptable, o cualquier otro compuesto que, tras su administración a un animal, incluyendo un ser humano, puede proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o residuo biológicamente activo del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la descripción también se refiere a profármacos y sales

farmacéuticamente aceptables de los compuestos dados a conocer en el presente documento, a sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos y otros bioequivalentes.

El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, el fármaco) dentro del cuerpo o las células del mismo mediante la acción de enzimas endógenas u otros productos químicos y/o condiciones. En particular, se preparan versiones de profármacos de los oligonucleótidos descritos en el presente documento como derivados de SATE [fosfato de (S-acetil-2-tioetilo)] según los métodos dados a conocer en el documento WO 93/24510 concedido a Gosselin *et al.*, publicado el 9 de diciembre de 1993 o en el documento WO 94/26764 y la patente estadounidense número: 5.770.713 concedida a Imbach *et al.*

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en el presente documento: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto original y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para oligonucleótidos, se describen adicionalmente ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos en la patente estadounidense número: 6.287.860.

La presente invención también incluye formulaciones y composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos interactivos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de varios modos dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y de la zona que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas incluyendo administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. Los compuestos pueden modificarse para administración oral. Por ejemplo, oligonucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo son útiles para administración oral.

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables portadores farmacéuticos, bases acuosas, de polvo u oleosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles condones recubiertos, guantes y similares.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el/los portador(es) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente los principios activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, si es necesario, conformando el producto.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas formas farmacéuticas posibles tales como, pero sin limitarse a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender uno o más potenciadores de la penetración, portadores, excipientes u otros principios activos o inactivos.

Las emulsiones son normalmente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que superan habitualmente 0,1 μm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersadas, y el principio activo que puede estar presente como una disolución en o bien la fase acuosa, la fase oleosa o bien por sí mismo como una fase separada.

Se incluyen microemulsiones como una realización de la presente invención. Las emulsiones y sus usos se conocen bien en la técnica y se describen adicionalmente en la patente estadounidense número: 6.287.860.

Las formulaciones de la presente invención incluyen formulaciones liposomales. Tal como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada por un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que va a administrarse. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que se cree que interaccionan con moléculas de ADN cargadas negativamente formando un complejo estable. Se cree que los liposomas que están cargados negativamente o son

sensibles al pH atrapan el ADN en vez de complejarse con el mismo. Se han usado liposomas tanto catiónicos como no catiónicos para suministrar ADN a células.

Los liposomas también incluyen liposomas "estabilizados estéricamente", un término que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en liposomas, dan como resultado tiempos de vida en circulación potenciados en relación con liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los que parte de la parte lipídica que forma vesícula del liposoma comprende uno o más glicolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto polietilenglicol (PEG). Se describen adicionalmente liposomas y sus usos en la patente estadounidense número: 6.287.860, que se incorpora en el presente documento en su totalidad.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas de la presente invención también pueden incluir tensioactivos. El uso de tensioactivos en productos farmacológicos, formulaciones y en emulsiones se conoce bien en la técnica. Se describen adicionalmente tensioactivos y sus usos en la patente estadounidense número: 6.287.860.

Pueden usarse diversos potenciadores de la penetración para efectuar el suministro eficaz de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar a la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse según pertenezcan a una de cinco categorías amplias, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y tensioactivos no quelantes. Se describen adicionalmente potenciadores de la penetración y sus usos en la patente estadounidense número: 6.287.860.

Un experto en la técnica reconocerá que se diseñan formulaciones rutinariamente según su uso previsto, es decir, su vía de administración.

Las formulaciones preferidas para administración tópica incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos descritos en el presente documento están en mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo dioleoilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, distearoilfosfatidilcolina), negativos (por ejemplo dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo dioleiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoilfosfatidiletanolamina DOTMA).

Para administración tópica u otra, los oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los oligonucleótidos o las moléculas de interacción (por ejemplo anticuerpos) pueden complejarse con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Se describen adicionalmente ésteres y ácidos grasos preferidos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos en la patente estadounidense número: 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, materiales microparticulados, materiales nanoparticulados, suspensiones o disoluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes aromatizantes; diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Formulaciones orales preferidas son aquellas en las que los oligonucleótidos descritos en el presente documento se administran conjuntamente con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos.

Se describen adicionalmente ácidos biliares/sales y ácidos grasos preferidos y sus usos en la patente estadounidense número: 6.287.860. También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Los potenciadores de la penetración adicionales incluyen polioxietilen-9-lauril éter, polioxietilen-20-cetil éter. Pueden administrarse por vía oral oligonucleótidos o anticuerpos u otras moléculas de interacción descritas en el presente documento, en forma granular incluyendo partículas secadas por pulverización, o complejadas para formar micro o nanopartículas. Se describen adicionalmente agentes complejantes de oligonucleótidos y sus usos en la patente estadounidense número: 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitarse a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Determinadas realizaciones de la presente invención proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más otros agentes quimioterápicos. Los ejemplos de tales agentes quimioterápicos incluyen pero no se limitan a agentes quimioterápicos contra el cáncer tales como daunorubicina, daunomicina, dactinomomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, arabinósido de citosina, bis-cloroetilnitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina,

prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxíciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la invención, tales agentes quimioterápicos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido por MTX y oligonucleótido) o en combinación con uno o más otros agentes quimioterápicos de este tipo (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). También pueden combinarse fármacos antiinflamatorios, incluyendo pero sin limitarse a fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, incluyendo pero sin limitarse a ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, en composiciones de la invención. También se dan a conocer combinaciones de compuestos antisentido o sentido y otros fármacos no antisentido. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden contener uno o más compuestos antisentido o sentido, o una o más moléculas de interacción tales como anticuerpos dirigidos a una primera diana de ácido nucleico o proteína y uno o más compuestos adicionales dirigidos a una segunda diana de ácido nucleico o proteína. Alternativamente, las composiciones descritas en el presente documento pueden contener dos o más compuestos antisentido o sentido o dos o más compuestos de interacción dirigidos a diferentes regiones de la misma diana de ácido nucleico o proteína.

La formulación de composiciones terapéuticas y su administración posterior (dosificación) está dentro del conocimiento de los expertos en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y receptividad del estado patológico que va a tratarse, durando el ciclo de tratamiento desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúa una cura o se logra una disminución del estado patológico. Pueden calcularse programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos habituales en la técnica pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de compuestos individuales, y puede estimarse generalmente basándose en CE_{50} que se encuentra que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de desde 0,01 μ g hasta 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más al día, a la semana, al mes o al año, o incluso una vez cada de 2 a 20 años. Los expertos habituales en la técnica pueden estimar fácilmente tasas de repetición para la dosificación basándose en concentraciones y tiempos de residencia medidos del fármaco en tejidos o fluidos corporales. Tras el tratamiento satisfactorio, puede ser deseable que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición del estado patológico, en la que el compuesto se administra en dosis de mantenimiento, que oscilan entre 0,01 μ g y 100 g por kg de peso corporal, de una vez o más al día, a una vez cada 20 años. Los ejemplos de cantidades eficaces incluyen 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100 g/kg de peso corporal.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLO 1

Línea celular

Se obtuvo la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB 231 de la colección americana de cultivos tisulares (Rockville, EE.UU.) y se cultivó a 37°C en aire al 100% (v/v), y se mantuvo en medio Leibovitz L-15 (Sigma, St Louis, Mo., EE.UU.), complementado con suero de ternero fetal al 10% (CSL, Melbourne, Australia) y reactivos antibióticos/antimicóticos (Sigma, St Louis, Mo., EE.UU.).

EJEMPLO 2

Aislamiento del ADNc para la HAS2 humana y construcción de un vector de expresión antisentido

Se generó el ADNc para HAS2 humana diseñando cebadores específicos de gen a partir de la secuencia publicada de Watanabe y Yamaguchi (1996; n.º de registro de Genbank U54804) y consistían en los siguientes cebadores: sentido 5'-GAGCTGAACAAGATGCATTGTGAGAGC (SEQ ID NO: 1) y antisentido 5'-GACATGGTGCTT-GATGTATGATCTTCCAT (SEQ ID NO: 2). Se usó el ARN total recogido a partir de fibroblastos dérmicos humanos que se dividían exponencialmente como molde para RT-PCR para generar un fragmento de ADNc de 1,7 kb de HAS2, que se clonó directamente en el vector pGEM-T (Promega Corporation, Madison, EE.UU.). Posteriormente se subclonó el ADNc para HAS2 en el vector de expresión pCI-Neo (Promega Corporation, Madison, EE.UU.) y se identificaron clones aislados que contenían el inserto en la orientación antisentido mediante mapeo con

endonucleasas de restricción y secuenciación automatizada.

EJEMPLO 3

5 *Transfección de ASHAS2 humana y transfección simulada en células de cáncer de mama humano MDA-MB 231*

Se transfectaron el constructo ASHAS2-pCI-Neo y el vector pCI-neo en células de mama MDA-MB 231 humanas usando el reactivo Lipofectamine plus (Gibco life technologies, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Antes de comenzar estudios se seleccionaron células transfectadas durante al menos un mes en presencia de antibiótico G418 500 µg/ml. Se seleccionaron las células transfectadas durante al menos un mes en presencia de antibiótico G418 500 µg/ml. Entonces se recogieron colonias resistentes y se establecieron como líneas celulares estables.

EJEMPLO 4

15 *Detección de la incorporación de la transfección estable en el genoma*

Se realizó PCR con ADN genómico purificado aislado a partir de transfectantes ASHAS2-pCI-Neo para confirmar la incorporación del constructo antisentido en el genoma. En resumen, se usó un cebador específico de gen para pCI-Neo: 5'-GCACAGATGCGTAAGGAG-3' (SEQ ID NO: 3) en combinación con dos cebadores de HAS2 específicos de la siguiente secuencia: sentido de GSP2 5'-GCTGTGTACATGACCTCGCGCTTGCCGCC-3' (SEQ ID NO: 4) y sentido de GSP4 5'-GGCGGGAAGTAACTCGAC-3' (SEQ ID NO: 5). Cuando se usaron en la siguiente combinación; se amplificaron productos de tamaño esperado de pCI-neo/GSP2 y pCI-neo/GSP4 de 1443 y 2223 pb respectivamente.

EJEMPLO 5

25 *Cuantificación de ARNm para HAS1, 2 y 3*

Se usó PCR en tiempo real para cuantificar los niveles de ARNm relativos de HAS1, HAS2 y HAS3 en células originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2 usando cebadores específicos de gen y una sonda oligonucleotídica interna. En resumen, se purificó ARN total a partir de células experimentales usando Rneasy (Qiagen, Melbourne, Australia) que entonces se usó para generar ADNc monocatenario incubando 2 µg de ARN con cebadores al azar 0,5 µg/µl y transcriptasa inversa Superscript. Para la PCR en tiempo real cuantitativa, se usaron cebadores específicos de gen para cada isoforma de HAS y una sonda oligonucleotídica interna. En resumen, los cebadores consistían en lo siguiente: sentido de HAS1 5' CCTGCATCAGCGGTCTCTA 3' (SEQ ID NO: 6); antisentido de HAS1, 5' GCCGGTCA-TCCCCAAAAG 3' (SEQ ID NO: 7); sonda de HAS1, 5' AACCTCTTGCAGCAGTTTCTTGAGGCC 3' (SEQ ID NO: 8); sentido de HAS2, 5' CAGTCCTGGCTTCGAGCAG 3' (SEQ ID NO: 9); antisentido de HAS2, 5' TTGGGAGAAAAGTCTTTGGCT 3' (SEQ ID NO: 10); sonda de HAS2, 5' CCATTGAACCAG-AGACTTGAAACAGCCC 3' (SEQ ID NO: 11); sentido de HAS3, 5' TTGCACTGTGGTCGTCACACTT 3' (SEQ ID NO: 12), antisentido de HAS3, 5' GTCGAGGTCAAACGTTGTGAG 3' (SEQ ID NO: 13), sonda de HAS3, 5' TCAAATCAAAAACAGGCAGGTACAGGTAGTGG 3' (SEQ ID NO: 14); sentido de GAPDH, 5' AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC 3' (SEQ ID NO: 15), antisentido de GAPDH, 5' GAGTTAAAAGCAGCCCTGGTG 3' (SEQ ID NO: 16), sonda de GAPDH, 5' TTTGGTCGTATTGGGCGCCTGG3' (SEQ ID NO: 17). Para las sondas internas de HAS se marcaron el colorante indicador 6-carboxilfluoresceína (6-FAM) y el extintor 6-carboxitetrametil-rodamina (TAMRA) en 5' y 3' respectivamente. Para las sondas internas de GAPDH se sustituyó el indicador 6-FAM por VIC™ (Applied Biosystems California, EE.UU.). Se realizó la reacción de PCR en un volumen final de 30 µl y consistió en 1X mezcla de reacción Taqman, 6 µM de cebador directo e inverso de HAS, 1,5 µM de sonda, 1 µM de cada cebador de GAPDH y 500 nM de sonda de GAPDH. Se realizó la amplificación de PCR mediante desnaturalización durante 10 minutos a 95°C seguido por hibridación durante 2 minutos a 50°C seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Se realizaron el termociclado y la medición de fluorescencia en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, California, EE.UU.). Para permitir la comparación entre muestras se normalizaron las señales de hialuronano sintasa relativas con medidas de control de GAPDH interno.

EJEMPLO 6

55 *Caracterización de la expresión génica de hialuronidasa*

Para determinar el estado de expresión génica de hialuronidasa para HYAL1, 2 y 3, se realizó RT-PCR con ARN total extraído de células experimentales recogidas al 80 y al 100% de confluencia. Se diseñaron los conjuntos de cebadores específicos de gen a partir de secuencias recuperadas de GenBank y consistieron en: sentido de HYAL1 (n.º de registro de GenBank NM007312), 5'-GCACAGGGAAGTCACAGATGTATGTGC-3' (SEQ ID NO: 18); antisentido de HYAL1, 5'-CCACTGGTCACGTTTCAGGATGAAG-3' (SEQ ID NO: 19); sentido de HYAL2 (n.º de registro de GenBank NM003773) 5'-GATGTGTATCGCC-GGTTATCACGCC-3' (SEQ ID NO: 20); antisentido de HYAL2 5'-CGTAGACTGGGAG-TGCATGGTTGGC-3' (SEQ ID NO: 21); sentido de HYAL3 (n.º de registro de

GenBank NM003549), 5'-GCACTGATGGAGGATACGCTGCG-3' (SEQ ID NO: 22); antisentido de HYAL3, 5'-GCTGGTGAAGTGGAGGATACGCTGCG-3' (SEQ ID NO: 23). Se visualizaron las secuencias amplificadas mediante electroforesis en gel de agarosa que contenía bromuro de etidio y se confirmó la identidad mediante secuenciación de ADN automatizada.

EJEMPLO 7

Ensayo de proliferación celular

Se recogieron células originales, transfectantes simulados y transfectantes de ASHAS2 a aproximadamente el 80% de confluencia y se sembraron en placas de 24 pocillos a diferentes densidades celulares, que oscilaban entre 5×10^3 células y 9×10^4 células/pocillo. Entonces se siguió la tasa de crecimiento celular durante 24, 48, 72 y 96 horas tras la siembra en placas. Se determinaron todos los recuentos celulares usando un contador Coulter automatizado.

EJEMPLO 8

Inmunohistoquímica

Para permitir la inmunodetección y comparación entre células MDA-MB-231 originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2-pCNeo, el Dr Paraskevi Heldin y el Dr Robert Stem proporcionaron amablemente anticuerpos específicos frente a HAS2 y Hyal2 respectivamente. Se adquirió el clon DF1485 anti-CD44 humano de DAKO (Dinamarca) y se usó según las instrucciones del fabricante. Se sembraron células en portaobjetos de cámara de 8 pocillos a una densidad de 2×10^4 células/pocillo y se hicieron crecer durante 24 horas adicionales a 37°C. Se fijaron las células en Histochoice durante 15 minutos antes de bloquear las proteínas heterófilas mediante incubación en PBS que contenía FCS al 10%. Se diluyeron los anticuerpos primarios hasta (mencionar la concentración, NO la dilución) en diluyente de anticuerpo (PBS que contenía suero humano al 1% y FCS al 1%), después se incubaron sobre portaobjetos durante 60 min. a temperatura ambiente. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena mediante inmersión de portaobjetos en H_2O_2 al 0,3% en metanol durante 20 min. antes de la incubación con un antisuero secundario de conejo conjugado con peroxidasa anti-oveja durante 60 min. a TA. Se visualizaron los inmunocomplejos aplicando sustrato 3,3'-diaminobencideno (Sigma Fast DAB) durante 5-10 minutos, después se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron.

EJEMPLO 9

Análisis del ciclo celular mediante *citometría de flujo*

Se sembraron las células transfectadas y control a 2×10^5 células/frasco de 25 cm² en presencia de timidina 2 mM y se hicieron crecer hasta el 50% de confluencia. Se lavaron las células, después se devolvieron a medio de cultivo normal y se recogieron, mediante tripsinización, en los siguientes puntos de tiempo; 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h, 28 h, 32 h y 36 h, después se fijaron en etanol al 95% durante 2 h a 4°C. Se trataron previamente las células con ARNasa 100 µg/ml (Sigma) y yoduro de propidio 50 µg/ml (Sigma) durante 30 minutos a 37°C antes de determinar el estadio del ciclo celular en un instrumento analítico FACS-Calibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA).

EJEMPLO 10

Ensayo de migración

Se realizó el ensayo de quimioinvasión de cámara de Boyden tal como se describió anteriormente (Thompson *et al.*, 1992). Se secó Matrigel (50 µg) sobre filtros de policarbonato (12 µm de poro, libre de PVP, Nucleopore, Pleasanton, CA) y después se reconstituyeron a 37°C. Se usaron medios de crecimiento normales (medio L-15) que contenían albúmina sérica bovina al 0,1% (Miles Biochemicals, Kankakee, IL) como quimioatrayente. Se recogieron células en la fase de crecimiento logarítmico mediante tripsinización, se lavaron dos veces con medio L-15 libre de suero que contenía albúmina sérica bovina al 0,1%, después se sembraron a 300.000 células/cámara de 1 ml y 70.000 células/cámara de 0,2 ml. Cada experimento se realizó por triplicado. Se incubaron las cámaras en una incubadora humidificada a 37°C durante 6 horas. Para determinar la población de células que habían atravesado el Matrigel, se tiñeron los filtros con Diff-Quik (American Scientific Products, McGaw PK., IL), después se contaron.

EJEMPLO 11

Ensayo de exclusión de partículas y morfología celular

Se visualizó la matriz pericelular dependiente de HA alrededor de células de cáncer de mama a partir de cultivos de control y transfectados mediante la exclusión de eritrocitos humanos fijados descrita por Claris y Fraser (1968). Se fotografiaron diferencias morfológicas así como el ensayo de exclusión de partículas en las células MDA-MB 231 control y transfectadas en un microscopio de contraste de fase inversa Nikon Optiflot (Nikon Company, Japón) 24 h y 60 h tras la siembra en placas.

EJEMPLO 12

Efecto de la producción de HA

Se sembraron las células a $2,5 \times 10^5$ células en frascos de cultivo de 25 cm^2 y se incubaron a 37°C durante 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h y 144 h. En cada punto de tiempo, se tripsinizaron las células y se contaron usando un contador Coulter automatizado. Se determinó la concentración de HA en el medio de cultivo recogido usando un ensayo de proteína de unión a ácido hialurónico (HABP), con los patrones y el tampón de reacción proporcionados por Corgenix Inc (Colorado, EE.UU.).

EJEMPLO 13

Cromatografía de exclusión molecular para determinar el PM de HA sintetizado

Se sembraron las células a $7,5 \times 10^5$ células en frascos de cultivo de 75 cm^2 y se hicieron crecer durante 24 h en medio completo complementado con $5 \text{ }\mu\text{Ci}$ de clorhidrato de D-[6- ^3H]-glucosamina. Para determinar el PM de ^3H -HA en el medio, se sometieron muestras a cromatografía de exclusión molecular en un instrumento Sephacryl S-1000 SF. En resumen, se empaquetó columna de gel ($1,6 \text{ m} \times 90 \text{ m}$) según las instrucciones del fabricante, se equilibró y se eluyó con tampón fosfato que contenía TX-100 al 0,2% (v/v). Se calculó el peso molecular de HA en el medio de cultivo usando regresión lineal de K_{av} frente a HA de pesos moleculares conocidos que oscilaban entre $>1,67 \times 10^7$, $K_{av}=0$ y $4,4 \times 10^3$, $K_{av}=1$. Intervalo de fracciones de la columna S-1000 de 7×10^4 - $1,7 \times 10^7$ Da.

EJEMPLO 14

Inoculación en almohadilla adiposa mamaria de células MDA-MB 231

Se recogieron células originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2 en la fase de crecimiento logarítmico mediante raspado. Se resuspendieron las células hasta una densidad final de 2×10^6 células en medio L-15 complementado con glucosa al 0,1% +/- Matrigel (v/v ¿CUÁL ES EL PORCENTAJE?), después se inyectaron inmediatamente en la almohadilla adiposa mamaria de ratones desnudos CBA hembra de 5 semanas de edad ($n=11$ ¿consiste cada grupo de tratamiento en 11?). Se registró el crecimiento tumoral dos veces por semana midiendo tres diámetros perpendiculares (d_1 , d_2 , d_3). Entonces se calculó el volumen tumoral usando la fórmula: $(1/6)\pi(d_1d_2d_3)$. En el día 84 se sacrificaron los ratones con compasión y se extirparon el hígado, los riñones, el cerebro y los pulmones en la autopsia y se almacenaron a -20°C . Para el examen histológico se fijó la mitad del tumor primario en formaldehído al 4% y se incrustó en parafina, entonces se examinaron secciones de $5 \text{ }\mu\text{m}$ de este tejido mediante tinción con H&E. Se congeló la parte restante del tumor a -20°C hasta su análisis adicional.

EJEMPLO 15

Extracción de ADN a partir de órganos blandos y cuantificación de metástasis de MDA-MD 231

Se usó la PCR de Alu cuantitativa para detectar la metástasis de MDA-MD 231 desde el tumor primario hacia otros órganos extirpados en la autopsia. En resumen, se extrajo ADN triturando muestras en nitrógeno líquido y resuspendiendo en un tampón de lisis de ADN. Entonces se purificó el ADN usando metodología de fenol-cloroformo convencional seguido por precipitación en etanol y reconstitución en buffer TE. Se ajustó el ADN purificado hasta una concentración final de $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ en tampón TE pH 7,2, se extrajeron alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Para eliminar la contaminación de ADN humano exógeno, se trató la mezcla de reacción con nucleasa S7 17 U/ml (Roche) en presencia de CaCl_2 1 mM a 37°C durante 24 horas antes de la PCR. Entonces se realizó la PCR de Alu cuantitativa con muestras de ADN genómico purificado (10 ng) en un sistema de detección de secuencias GeneAmp 5700 (Applied Biosystems, Australia). En resumen, se sometió a prueba cada muestra por duplicado en un volumen de reacción final de $25 \text{ }\mu\text{l}$ que consistía en $0,625 \text{ U}$ de ADN polimerasa de Taq (Roche; Mannheim, Alemania), Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl_2 $1,5 \text{ mM}$, KCl 50 mM , dNTP $200 \text{ }\mu\text{M}$, DMSO al 8%, 6-carboxi-X-rodamina $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$ (Molecular Probes; Eugene, Oregon EE.UU.), dilución de 1 en 40000 de SYBR Green I (Molecular Probes) y 100 nM de cada cebador de Alu. Tras una incubación por desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, se produjo la amplificación a lo largo de 40 ciclos, que consistió en desnaturalización a 95°C durante 5 segundos, hibridación a 65°C durante 60 segundos y extensión a 75°C durante 15 segundos durante lo cual se midió la intensidad de fluorescencia. Entonces se generó una curva de disociación desde 60°C hasta 95°C . En cada placa de reacción de 96 pocillos, se preparó una curva patrón mediante dilución en serie de ADN humano en ADN de ratón, lo que permitió la cuantificación de la carga tisular de células tumorales humanas en los órganos de ratón extirpados en la autopsia.

EJEMPLO 16

Transfección de HAS2 antisentido en células transfectadas MDA-MB 231

Se confirmó la incorporación del constructo HAS2-pCI-Neo antisentido en el genoma de MDA-MB 231 mediante análisis por PCR con ADN altamente purificado extraído de las células transfectadas. Cuando se usaron en la siguiente combinación; se amplificaron de manera reproducible productos del tamaño esperado de pCI-neo/GSP2 y pCI-neo/GSP4 de 1443 y 2223 pb a partir de clones estables que albergaban el constructo de HAS2 antisentido. Las pruebas con ADN genómico aislado a partir de células originales y transfectadas de manera simulada dieron resultados negativos.

EJEMPLO 17

La transfección con HAS2 antisentido altera los perfiles de expresión de genes de HAS y hialuronidasa en MDA-MB 231

Se cuantificaron niveles endógenos de ARNm para HAS2 en células originales usando PCR en tiempo real y se compararon con los valores obtenidos a partir de células transfectadas de manera simulada y transfectadas con HAS2 antisentido. De manera simultánea a estos experimentos, también se cuantificaron los niveles de ARNm de HAS1 y HAS3 usando PCR en tiempo real con la expresión de HYAL1, 2 y 3 caracterizada mediante metodología de RT-PCR convencional. Para permitir la comparación de la expresión de HAS en tiempo real entre células transfectadas y originales, se normalizó el nivel de cada ARNm cuantificado con controles de GAPDH internos respectivos. El nivel endógeno de expresión de ARNm de HAS2 en células originales se muestra en la figura 1a, que disminuyó ligeramente en los transfectantes simulados. En cambio, la expresión de ARNm en células transfectadas con ASHAS2 aumentó de 3 a 4 veces y de 8 a 9 veces en comparación con células originales y transfectantes simuladas, respectivamente (figura 1a). También se detectó una expresión de HAS3 moderada y fue comparable en células originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con antisentido, figura 1b. La expresión de HAS1 en transfectantes de antisentido fue constante a lo largo de la totalidad de este estudio, lo que no pudo detectarse ni en células originales ni en transfectantes simulados (figura 1b).

Los cultivos de control tanto originales como transfectados de manera simulada presentaron una tinción positiva para el receptor de HA CD44 e Hyal-2. La tinción para detectar CD44 en ambos controles fue lo más evidente en la membrana plasmática con zonas de tinción de membrana focal intensa (figura 1, panel E). No pudo detectarse reactividad de epítipo de CD44 en transfectantes de ASHAS2 (figura 1, panel F). Se registró una observación similar para la reactividad con anticuerpo frente a Hyal-2 en la que los cultivos de control presentaron tinción positiva, que se localizó en la membrana plasmática y también apareció como vesículas citoplasmáticas mientras que no pudo detectarse ninguna reactividad en transfectantes de ASHAS2. Estos resultados indican que la perturbación de CD44 y Hyal-2 funcionales, tal como se observa en transfectantes de ASHAS2, altera el catabolismo de HA culminando en un aumento significativo en la cantidad de HA en el medio de cultivo.

EJEMPLO 18

Características de células de cáncer de mama MDA MB 231 en un modelo de xenoinjerto tumoral

De manera interesante, la inhibición antisentido de HAS2 alteró profundamente la expresión de Hyal-1, 2 y 3 en MDA-MD 231. No pudo detectarse Hyal-3 tanto en células originales como en transfectantes simulados, ambos de los cuales expresaron niveles comparables de ARNm para Hyal-1 y en mucha mayor medida Hyal-2, que también fue comparable entre estos dos controles (figura 2).

En cambio, la inhibición de la expresión de HAS2 dio como resultado la regulación por disminución de ARNm de Hyal-2 hasta el punto en el que no fue detectable ni siquiera tras 35 ciclos de PCR. La expresión de Hyal-1 en transfectantes de antisentido aumentó moderadamente en comparación con controles tanto original como simulado y también se detectó Hyal-3 en los transfectantes de antisentido. Por tanto al prevenir la producción de una proteína HAS2 funcional en la línea celular MDA-MD 231, se ha regulado por disminución la expresión génica de Hyal-2 de manera simultánea a la regulación por incremento de HAS1 y Hyal-3, genes que normalmente no se expresan en esta línea celular.

Se usó la inmunohistoquímica con un anticuerpo frente a HAS2 específico para determinar el grado de reactividad de superficie celular. Mientras que tanto las células originales como transfectadas de manera simulada presentaron tinción positiva para la proteína HAS2 (figura 1, panel B), que se localizó principalmente en la membrana plasmática, se demostró un bloqueo eficaz de la traducción en los transfectantes de HAS2 antisentido mediante la ausencia de inmunorreactividad con el anticuerpo frente a HAS2 (figura 1, panel C).

Se determinó la masa molecular de HA sintetizado por células originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con antisentido mediante cromatografía de exclusión molecular Sephacryl S-1000. La línea celular original sintetizó tres pesos moleculares diferenciados de HA que se estimó que eran de 3000 kDa, 40.000 y 100.000 Da respectivamente, lo que refleja los productos de las isoformas de HAS expresadas en la línea celular original, concretamente HAS2 y 3. Los transfectantes de HAS2 antisentido sintetizaron HA que se eluyó en el volumen inicial que corresponde a un peso molecular $>1,67 \times 10^7$. También se detectó otra fracción correspondiente

a un PM de 100.000 Da en el medio a partir de transfectantes de antisentido, pero el porcentaje de incorporación de precursor radiactivo fue mucho menor que el observado en la línea celular original (figura 2). Se mostró que estos perfiles de elución eran sensibles al 100% a la digestión con hialuronidasa de *Streptomyces*.

La inhibición antisentido de HAS2 da como resultado un metabolismo de hialuronano alterado. Debido a la expresión génica de HAS y HYAL alterada en transfectantes MDA-MB 231 de ASHAS2, se cuantificó la cantidad de hialuronano en el medio de cultivo en contacto con las células usando un ensayo de proteína ligado a enzimas específico para HA. Se cuantificó la producción de HA a partir de muestras recogidas por triplicado en los mismos puntos de tiempo establecidos para el ensayo de proliferación. Se trazaron gráficas con los datos recogidos como HA sintetizado (picogramos por célula: pg/célula/día). El medio en contacto con células a partir de transfectantes de HAS2 antisentido-MDA-MB 231 contenía una cantidad significativamente superior de hialuronano en comparación o bien con células originales o bien con transfectantes simulados (figura 3). En promedio, los cultivos de ASHAS2 sintetizaron 6,79 pg de HA/célula/día a lo largo de la duración del experimento con una excepción apreciable a las 48 horas cuando la síntesis aumentó hasta 12 pg/célula/día. En cambio, las células originales y los transfectantes simulados sintetizaron aproximadamente 1,1 y 1,4 pg de HA/célula/día respectivamente a lo largo de la duración del experimento. Se usó la exclusión de eritrocitos fijados para visualizar indirectamente la matriz pericelular con HA en los transfectantes de ASHAS2, que se comparó entonces con la observada en las células originales o transfectantes simulados. En estos experimentos no hubo ninguna evidencia que sugiere ninguna diferencia a simple vista en el grosor de la matriz pericelular, que fue comparable al observado en cultivos de control (figura 3b).

A lo largo de la totalidad de los experimentos, se comparó la morfología de las células transfectadas con antisentido con la de células control. Los transfectantes de ASHAS2 podían distinguirse fácilmente por su morfología, que era similar a la de células que experimentan mitosis y/o migración, es decir, pequeñas células redondeadas que se adhirieron de manera suelta a la superficie de crecimiento. De manera constante a lo largo de estas observaciones hubo una disminución en el número de células en transfectantes de ASHAS2 en comparación con cultivos de control.

EJEMPLO 19

La inhibición de HAS2 disminuye la proliferación y migración de células de cáncer de mama in vitro

Para comparar el efecto de la inhibición antisentido de HAS2 durante el crecimiento celular activo, se sembraron células originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2 a densidades subconfluentes idénticas y se recogieron en momentos definidos y se estimó el recuento celular total usando un contador Coulter. En ambos cultivos de control, se observó una duplicación del número de células cada 24 horas hasta el punto de muestra a las 72 horas en el que los cultivos alcanzaron la confluencia (figura 4). En cambio, el crecimiento celular de transfectantes estables que albergaban ASHAS2 se vio profundamente afectado por la ausencia de una proteína HAS2 funcional. Específicamente, los transfectantes de ASHAS2 presentaron un periodo de latencia de aproximadamente 24 horas para alcanzar densidades similares a las observadas en cultivos de control en todos los puntos de tiempo posteriores en los que se indicó el número de células (figura 4). La confluencia en cultivos de ASHAS2 se produjo aproximadamente a de 96 a 120 horas de crecimiento celular tras la siembra en comparación con las 72 horas en ambos cultivos de control. Por tanto, estas observaciones destacan la importancia de la expresión coordinada de una HAS2 funcional en la proliferación celular.

De manera simultánea a estas observaciones, también se realizó un análisis de citometría de flujo con células originales, transfectantes simulados y transfectantes de ASHAS2 para determinar el contenido de ADN relativo en puntos de tiempo definidos tras sembrar en placa a densidades subconfluentes (figura 5). El porcentaje de las células transfectadas con ASHAS2 en las fases G₀/G₁, S y G₂/M del ciclo celular 28 horas tras la siembra en placas fue del 80%, el 0% y el 9% respectivamente (figura 5). En cambio, las cifras correspondientes en las células originales para las fases G₀/G₁, S y G₂/M del ciclo celular fueron del 4%, el 75% y el 15% respectivamente (figura 5). Estos resultados concuerdan con la observación en el periodo de "latencia" de 24 horas en el ensayo de proliferación en el que la inhibición antisentido indujo un retraso transitorio de entrada en la fase S de aproximadamente 24 horas (figura 5) reforzando así la importancia de la expresión de HAS2 durante la proliferación celular en cultivos de MBA-MD-231.

La capacidad de células cancerosas para migrar es una característica fundamental en células cancerosas altamente metastásicas. Para caracterizar las características altamente invasivas de MDA MB-231 se usó el ensayo de quimioinvasión usando la cámara de Boyden. Entonces se compararon tasas migratorias entre MDA MB-231 originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2. Tanto las células originales como los transfectantes simulados presentaron un comportamiento migratorio típico invadiendo el 100% de la población celular el Matrigel sobre el filtro subyacente (figura 6). En cambio, los transfectantes estables que albergaban HAS2 antisentido dieron como resultado una inhibición de la migración del 93% en comparación con cualquier control sometido a prueba (figura 6).

EJEMPLO 20

La inhibición de HAS2 inhibe totalmente el crecimiento y la progresión de cáncer de mama primario y secundario

Para examinar los efectos de la inhibición antisentido de HAS2 sobre el crecimiento tumoral, se inocularon células originales, transfectantes simulados y transfectantes de ASHAS2 en la almohadilla adiposa mamaria de ratones desnudos. Se siguió el crecimiento del tumor primario a lo largo de un periodo de 12 semanas tras la implantación tras lo cual se detectó el grado de metástasis a otros órganos usando PCR de Alu. Los ratones inoculados con MDA MB 231 originales o transfectadas de manera simulada establecieron fácilmente tumores primarios que fueron comparables en cuanto a su crecimiento a lo largo de la duración del experimento de 12 semanas (figura 7). Sin embargo, en cambio, los ratones inoculados con transfectantes de ASHAS2 no establecieron tumores primarios (figura 7). En otros experimentos también se incluyó Matrigel en el medio de inoculación usado para garantizar la viabilidad de los transfectantes de ASHAS2 inyectados. De nuevo, no pudo detectarse ningún tumor primario a lo largo de la duración del experimento de 12 semanas (datos no mostrados). Según se evaluó mediante PCR de Alu, la metástasis fue lo más prevalente en el cerebro y el pulmón, pero también se detectó en riñones y en el hígado en muestras preparadas a partir de ratones a los que se les inyectaron células MDA-MD 231 o bien originales o bien transfectadas de manera simulada (figura 7b). A pesar de la sensibilidad notificada de este ensayo, que podía detectar 1 célula humana/1 X 10⁶ células de ratón, no pudo encontrarse metástasis en los órganos mencionados anteriormente en ratones a los que se les inyectaron transfectantes de ASHAS2 (figura 7) se determinaron para encontrar cualquier metástasis en órganos blandos, sin embargo, no hubo metástasis detectables con el antisentido de HAS2 y se encontraron niveles significativamente altos de metástasis en el cerebro y el pulmón en comparación con el riñón y el hígado en los grupos de ratones originales (figura 7b).

EJEMPLO 21

La sobreexpresión de HAS2, HYAL2 y CD44 se correlaciona con la invasividad de cáncer de mama

Cultivo de células de cáncer de mama humano

Se obtuvieron líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano aneuploides, MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-468, MDA-MB-453, MDA-MB-361, T47D, MCF-7A, BT-549, ZR-75-1 y Hs578T, de la Colección Americana de Cultivos Tisulares, Rockville, EE.UU. Todos los reactivos de propagación de cultivo celular se obtuvieron de Sigma, St Louis, Mo, EE.UU. Se hicieron crecer de manera rutinaria las líneas celulares, MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-468, MDA-MB-453 y MDA-MB-361 y se subcultivaron como monocapa en frascos de cultivo de 175 cm² en medio Leibovitz L-15 complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 10% a 37°C en aire al 100% (v/v). Se hizo crecer la línea celular ZR-75-1 en medio RPMI complementado con FCS al 10%, L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 1,5 g/l, glucosa 4,5 g/l, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM a 37°C en una incubadora con humedad controlada en CO₂ al 5% (v/v). Se mantuvo la línea celular T47D en una incubadora humidificada a 37°C en CO₂ al 5% en RPMI complementado con FCS al 10%, 4,5 g/l de glucosa, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, 7,1 µg/ml de insulina. Se mantuvo la línea celular BT-549 en una incubadora humidificada a 37°C en CO₂ al 5% en RPMI complementado con FCS al 10% y 0,8 µg/ml de insulina. Se cultivó la línea celular Hs578T en una incubadora humidificada a 37°C en CO₂ al 5% en DMEM complementado con FCS al 10% y 10 µg/ml de insulina. Se cultivó la línea celular MCF-7 en una incubadora humidificada a 37°C en CO₂ al 5% en MEM complementado con FCS al 10%, piruvato de sodio 1 mM y 10 µg/ml de insulina. Todos los cultivos celulares se mantuvieron rutinariamente en medios que contenían reactivos antibióticos/antimicóticos.

Cuantificación de ARNm para HAS1, 2 y 3

Se usaron PCR en tiempo real y por transcriptasa inversa comparativa respectivamente para cuantificar los niveles de ARNm relativos de las HAS sintasas (HAS1-3) en las diez líneas celulares de cáncer de mama humano usando cebadores específicos de gen y una sonda oligonucleotídica interna (tabla 2). Se extrajo ARN de cultivos por triplicado de células que se hicieron crecer hasta la fase tanto exponencial como de meseta usando kits RNeasy Mini (QIAGEN, Basel, Suiza). En resumen, se purificó ARN total a partir de células que crecían de manera exponencial usando reactivo TRI (Sigma) que se usó para generar ADNc monocatenario incubando 2 µg de ARN con cebadores al azar 0,5 µg/ml y transcriptasa inversa Superscript (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Para la PCR en tiempo real cuantitativa se usaron cebadores específicos de gen para cada isoforma de HAS y una sonda oligonucleotídica interna. Para sondas internas de HAS se marcaron el colorante indicador 6-carboxifluoresceína (6-FAM) y el extintor 6-carboxitetrametil-rodamina (TAMRA) en 5' y 3' respectivamente. Para sondas internas de GAPDH se substituyó el indicador 6-FAM por VICTM (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Se realizó la reacción de PCR en un volumen final de 30 µl y consistió en 1 x mezcla de reacción Taqman, 6 µM de cebador directo e inverso de HAS, 1,5 µM de sonda, 1 µM de cada cebador de GAPDH y 500 nM de sonda de GAPDH. Se realizó la amplificación por PCR mediante desnaturalización durante 10 min. a 95°C seguido por hibridación durante 2 min. a 50°C seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min. a 60°C. Se realizaron el termociclado y la medición de fluorescencia en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). Se realizó una cuantificación relativa normalizando valores de ciclo umbral (Ct) de cada gen de muestra con valores de Ct de GAPDH. ΔCt corresponde a la diferencia entre el Ct de los genes de HAS de interés y el Ct de GAPDH. Los datos se presentan como diferencia de cambio en veces con respecto a lo original (fijado arbitrariamente a 100) calculada según la fórmula que describe

la cuantificación por PCR relativa $2^{-(\Delta C_{T\text{HAS}} - \Delta C_{T\text{GAPDH}})}$.

Caracterización de la expresión génica de hialuronidasa

- 5 Para determinar la expresión génica de hialuronidasa para HYAL-1, 2 y 3, se realizó la RT-PCR con ARN total extraído de células en fases de crecimiento tanto exponencial como detenido. Se diseñaron los conjuntos de cebadores específicos de gen a partir de secuencias recuperadas de GenBank (véase la tabla 2). Se visualizaron secuencias amplificadas mediante electroforesis en gel de agarosa que contenía bromuro de etidio y se confirmó su identidad mediante secuenciación de ADN automatizada. Para cuantificar la abundancia relativa de cada producto de PCR, se sometieron geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio que contenían fragmentos amplificados a análisis densitométrico usando ProXpress™ Imager (Perkin Elmer, Boston, MA, EE.UU.) y se analizaron los datos usando el software Phoretix 1D (Phoretix International, Newcastle, R.U.).

Cuantificación de la síntesis y del catabolismo de hialuronano liberado y asociado a célula

- 15 Se sembraron cultivos por triplicado de las líneas celulares de cáncer de mama humano a $7,5 \times 10^5$ células/frasco de cultivo de 75 cm² y se hicieron crecer con 400 µg/ml de sulfato de dextrano (M_r de 500 kDa y sustituido con azufre al 17%; Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) como medio para inhibir la actividad hialuronidasa endógena y permitir la caracterización de productos de digestión de hialuronidasa (Udabage *et al*, 2004). Se hicieron crecer los cultivos durante 24 h, tiempo durante el cual los cultivos celulares alcanzaron el 85% de confluencia y después durante 24 h adicionales hasta que se observó detención del crecimiento. Al final del periodo de incubación, se recogieron las células mediante tripsinización y se contaron usando un contador Coulter. Se usaron los medios para la cuantificación del HA liberado. Se obtuvo el HA extracelular asociado a célula mediante centrifugación de la fracción de célula/tripsina a 400 g_{av} en una centrífuga Beckman TJ-6 en la que se cuantificó el sobrenadante para detectar HA. Se determinó la concentración de HA intracelular mediante tratamiento del sedimento celular tal como sigue: se lisó el sedimento celular en condiciones hipotónicas resuspendiendo en HEPES 10 mM pH 7,2 seguido por alteración en un homogeneizador Dounce usando 20 recorridos cada 15 min. Se confirmó la lisis celular mediante tinción de Giemsa y examen mediante microscopía óptica. Para disociar el HA de proteínas de unión, se calentó el lisado celular hasta 37°C con Triton X-114 al 0,5% v/v en tampón HEPES 10 mM pH 7,2 (Prehm, 1990). Se centrifugaron las micelas de HA/detergente a 1500 g_{av} durante 5 min. y se analizó la fase acuosa superior para detectar HA. Los análisis individuales de las fracciones de HA intra y extracelular no estaban dentro de los límites de detección del ELISA de HA (>50 ng/ml), por tanto se combinaron las fracciones extracelular e intracelular y se caracterizaron para las concentraciones de HA.
- 35 Se cuantificó la producción de hialuronano usando un ensayo de proteína de unión a HA ligado a enzimas (Corgenix Inc, Colorado, EE.UU.). Se realizó el ensayo tal como se indica por las instrucciones del fabricante. En resumen, se colocaron alícuotas por duplicado de 100 µl de muestras y los patrones de HA (0 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml y 800 ng/ml) en una placa de 96 pocillos recubierta con proteína de unión a HA (HABP), se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente (TA) seguido por cuatro lavados con PBS. Se añadieron cien µl de HABP conjugado con peroxidasa del rábano y se incubaron durante 30 minutos a TA. Tras lavados con PBS adicionales, se visualizó la reacción con 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) tras una incubación de 30 min. a TA. Se detuvo la reacción con 100 µl de ácido sulfúrico 0,36 N y se leyó a 450 nm (referencia de 650 nm) en un lector de microplacas BioRad 350. Se usaron medios de crecimiento que no se habían expuesto a células para determinar el fondo de HA endógeno, se restó esta cifra de todos los resultados.

Visualización del glicocaliz de hialuronano

- 50 Se visualizó la matriz pericelular dependiente de HA alrededor de las células de cáncer de mama mediante la adición de eritrocitos humanos fijados tal como se describe por Clarris y Fraser (1968). En resumen, se fijaron eritrocitos humanos durante la noche en formaldehído al 1,5% v/v en PBS a TA y entonces se lavaron exhaustivamente en PBS. En el último lavado se añadió azida sódica hasta una concentración final del 0,1% v/v y se almacenaron las células a 4°C. Se lavaron monocapas de cáncer de mama dos veces en PBS, a 37°C y después se incubaron con 5 ml de PBS a los que se les añadieron 50 µl de eritrocitos fijados ($\sim 10^8$ células/ml). Se dejaron sedimentar las partículas durante 15-30 min. tras lo cual se registró la matriz pericelular dependiente de HA mediante fotografía con un microscopio de contraste de fase inversa Nikon Optiflot. Se demostró la especificidad de este método mediante incubación de los cultivos de cáncer de mama con hialuronidasa de *Streptomyces*, en el que se cubrieron las células con 10 unidades/ml de hialuronidasa seguido por incubación a 37°C durante 15-30 min. Se lavaron las monocapas dos veces en PBS, a 37°C y se cubrieron con una suspensión de 5 ml de eritrocitos fijados tal como se describió anteriormente. Se dejaron sedimentar las partículas durante 15-30 min., se observaron y se fotografiaron tal como se describió anteriormente.

Caracterización del peso molecular de hialuronano producido por células de cáncer de mama humano

- 65 Se sembraron las células a $7,5 \times 10^5$ células/frasco de cultivo de 75 cm² y se hicieron crecer durante 24 h en medios de crecimiento que contenían DS 400 µg/ml y clorhidrato de D-[6-³H]glucosamina 250 µCi (Perkin Elmer, Boston,

MA, EE.UU.). Al final del periodo de incubación de 24 h, se retiraron los medios y se dializaron exhaustivamente (exclusión de M_r de 6 kDa) frente a Tris-HCl 10 mM/cloruro de sodio 0,15 M/azida sódica al 0,02% pH 7,4 a 4°C. Se analizaron mediante cromatografía el dializado y el fluido de diálisis para la identificación de [3 H]HA y sus productos de degradación. Se sometió [3 H]HA de >5 kDa a cromatografía de exclusión molecular en un gel Sephacryl S-1000 eluido en NaCl 0,15 M/fosfato pH 7,25 que contenía NaH_2PO_4 19 mM, Na_2HPO_4 38 mM y NaCl 94 mM a 13,6 ml/h. Se sometió el fluido de diálisis (moléculas <5 kDa) a cromatografía de exclusión molecular en un gel Superose 12 eluido en el tampón mencionado anteriormente a una velocidad de elución de 20 ml/h. Se calcularon estimaciones de peso molecular usando datos de calibración para HA en datos de Sephacryl S-1000 y Superose 12 generados a partir de fracciones de HA adquiridas comercialmente de alta monodispersidad que oscilaba entre 10 k y 5000 kDa (CPN, República Checa y Pharmacia). Para determinar el porcentaje de incorporación de clorhidrato de D-[6- 3 H]glucosamina en macromoléculas de HA, se sometió el dpm no dializable (moléculas >5 kDa) a digestión mediante 10 TRU de hialuronidasa de *Streptomyces* a pH 6, a 37°C durante 24 h. Se sometió el material digerido a cromatografía tanto en Sephacryl S-1000 como en Superose 12 en la que se compararon los perfiles con una muestra no digerida equivalente. Se excluyó cualquier material de [3 H] no digerido por hialuronidasa de los perfiles de cromatografía. Para el cálculo de recuperaciones de columna, los recuentos en cada fracción se consideraron significativos cuando fueron >3 D.E. superiores a dpm de fondo medio, tomando el fondo determinado un número igual de puntos de muestra antes y después de V_0 y V_t , en los que el número promedio tomado fue 20.

Evaluación de la invasividad de la línea celular de cáncer de mama: ensayo de migración de cámara de Boyden

Se realizaron ensayos de invasión usando cámaras de Boyden modificadas con membrana Nucleopore de policarbonato (Coming, Coming, NY, EE.UU.). Se rehidrataron filtros previamente recubiertos (6,5 mm de diámetro, 12 μm de tamaño de poro, Matrigel 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) con 100 μl de medios Leibovitz L-15 complementados con BSA al 0,1% p/v (Sigma). Se recogieron células que crecían exponencialmente con tripsina/EDTA (Sigma), se lavaron dos veces con medio de crecimiento libre de suero que contenía BSA al 0,1% p/v, después se añadieron a la cámara superior (3×10^5 células/cámara de 1 ml). Se usaron medios de crecimiento normales que contenían FCS al 10% v/v como quimioatrayente. Tras la incubación durante 6 h a 37°C, se eliminaron las células no invadidas sobre la superficie superior del filtro con un hisopo de algodón, y se fijaron las células que migraron sobre la superficie inferior del filtro y se tiñeron con kit Diff-Quick. Se determinó la invasividad contando células en cinco campos microscópicos por pocillo, y se expresó el grado de invasión como número promedio de células por campo microscópico. Se realizó cada experimento por triplicado en dos días separados en los que se representan los datos como % de células que migran en comparación con la línea celular original.

Cuantificación de receptores de hialuronano, RHAMM y CD44

Se obtuvieron extractos celulares mediante lisis hipotónica de células que crecían exponencialmente en HEPES 10 mM pH 7,2 seguido por alteración en un homogeneizador Dounce usando 20 recorridos cada 15 minutos. Se confirmó la lisis celular mediante tinción de Giemsa de lisado celular y examen mediante microscopía óptica. Se desnaturalizaron preparaciones de lisado celular a 65°C durante 5 min. y se cargaron (15-30 μg de proteína por carril) sobre un gel de poliacrilamida al 10%. Se realizó la electroforesis con un aparato de minigel de Bio-Rad. Se transfirieron proteínas a membranas de nitrocelulosa y se bloquearon durante 1 h con solución salina tamponada con Tris que contenía leche en polvo desnatada al 5% y Tween-20 al 0,1%. Entonces se lavaron las membranas y se analizaron con sonda con el anticuerpo apropiado diluido en solución salina tamponada con Tris que contenía albúmina sérica bovina al 5% (para anticuerpos policlonales) o leche en polvo desnatada al 5% (para anticuerpos monoclonales). Los anticuerpos usados para la detección fueron 50 μg de anticuerpo monoclonal frente a CD44 (Hybridoma Bank, EE.UU.) o 25 μg de RHAMM (amablemente donado por R. Savani, University of Pennsylvania School of Medicine, EE.UU.). Los anticuerpos secundarios usados fueron IgG anti-conejo (New England Bio-labs) e IgG de conejo anti-rata (Bio-Rad), que se conjugaron con peroxidasa del rábano. Se detectaron bandas inmunorreactivas mediante quimioluminiscencia potenciada, y se estimaron los tamaños de proteínas usando patrones de peso molecular previamente teñidos. Se cuantificaron las bandas inmunorreactivas mediante análisis de densitometría usando ProXpress™ Imager (Perkin Elmer, Boston, MA, EE.UU.) y se analizaron los datos usando el software Phoretix 1D (Phoretix International, Newcastle, R.U.).

Las células de cáncer de mama altamente invasivas expresan de manera preferencial HAS2

Se cuantificaron los niveles endógenos de ARNm para las diversas isoformas de HA sintasa en 10 líneas celulares de cáncer de mama humano diferentes usando PCR en tiempo real y RT-PCR comparativa (véase la tabla 3). No se detectó ARNm de HAS1 en ninguna de las diez líneas celulares de cáncer de mama. Se detectó ARNm de HAS2 en todas las líneas celulares de cáncer de mama que demostraron una invasividad de >80% en las que las líneas celulares altamente invasivas BT-549 y Hs578T expresaron hasta 205 veces más ARNm de HAS2 que la línea celular no invasiva MDA-MB 453. Se observaron diferencias despreciables en el ARNm de HAS2 entre células que crecían exponencialmente y células con el crecimiento detenido. Todas las líneas celulares expresaron niveles bajos de ARNm de HAS3, pero fue interesante observar que en células con un bajo potencial invasivo (<26%) no se detectó ARNm de HAS3 en las células con el crecimiento detenido, mientras que en las líneas celulares altamente invasivas continuó la transcripción de este gen. La expresión de HAS3 en todas las líneas celulares de cáncer de mama, más particularmente en las líneas celulares menos invasivas, sugiere que esta isoforma de HAS es

principalmente responsable de la síntesis de niveles basales de producción de HA necesaria para la función celular normal y se requiere HAS2 para la síntesis rápida de grandes cantidades de HA requeridas para la invasión cancerosa.

- 5 El glicocaliz en células que crecen exponencialmente de cáncer de mama se genera por HAS2

Usando la cuantificación de HA y el ensayo de exclusión de partículas, fue posible demostrar de manera única que cuando las células de cáncer de mama están en fase de crecimiento exponencial, cualquier HA asociado a célula sólo se detecta en células que expresan HAS2 (tabla 3). En el fenotipo de cáncer de mama menos invasivo, de crecimiento exponencial, que expresó de manera preferencial HAS3, no se conservó nada del HA sintetizado como parte del glicocaliz, la retención del HA en la matriz pericelular sólo se produjo tras haber alcanzado las células la detención de crecimiento. Este hallazgo es contrario a estudios en otros tipos de células en los que se sugirió que la expresión de HAS3 daba como resultado la retención de una matriz pericelular (Itano *et al*, 1999a; Liu *et al*, 1996). Durante la senescencia, en general, la cantidad de HA liberado en los medios por líneas celulares que expresan HAS3 de manera significativa, en algunos casos se observó inhibición total de la liberación de HA, seguido por la retención del HA en la fracción asociada a célula. Durante la senescencia, las líneas celulares altamente invasivas liberaron un 40-60% menos de HA en el entorno extracelular, pero conservaron 2-22 veces más HA en la matriz pericelular. La cuantificación del HA asociado a célula se confirmó mediante el ensayo de exclusión de glóbulos rojos que sólo demostró la presencia de un recubrimiento pericelular en las líneas celulares MDA-MB 231, BT-549 y Hs578T que crecían exponencialmente.

HAS2 y HAS3 liberan hialuronano de alto peso molecular que se despolimeriza rápidamente

La caracterización cromatográfica del HA liberado ($\pm$ digestión con hialuronidasa de *Streptomyces*) a partir de células que habían experimentado tanto proliferación exponencial como detención del crecimiento demostró que el 80-98% de la [3 H]-glucosamina se incorporó en [3 H]HA, identificándose el [3 H]-dpm restante como una macromolécula digestible por pronasa de aproximadamente 50 kDa (véase la tabla 4). En todas las gráficas representadas en las figuras 8A-H se han eliminado del perfil todos los picos asociados con material resistente a hialuronidasa de *Streptomyces*. La línea celular menos invasiva, MDA-MB 453, que sólo expresó HAS3, liberó HA monodisperso de 10000 kDa, mientras que la muestra equivalente a partir de células que se hicieron crecer sin inhibición de la hialuronidasa endógena (cultivo DxS) mostró despolimerización del 22% del HA liberado, para dar de 60 kDa a 6000 kDa con el 78% degradado hasta 30 kDa (figura 8A). Las líneas celulares más invasivas, BT-549 y Hs578T, que expresaban ambas HAS2 y una expresión muy baja de HAS3, liberaron ambas grandes cantidades de HA de 10000 kDa que, en presencia de hialuronidasas activas, se degradó rápidamente para dar los fragmentos de HA de 10, 20 y 40 kDa (figura 8E y G). MDA MB-231, que expresó niveles moderados de HAS2 y niveles muy bajos de HAS3, produjo un HA polidisperso que tenía varios picos con la M_r modal de 600 a 10000 kDa y fracciones menores a 60 y 200 kDa, mientras que tras la exposición a procesos de degradación endógenos estas macromoléculas se degradaron hasta 20, 40 y 500 kDa (figura 8B).

El análisis de HA asociado a célula demostró que cuando se inhibieron los procesos de degradación de HA normales mediante sulfato de dextrano pudo detectarse un HA de M_r muy alto así como oligómeros de M_r intermedio, que oscilaba entre 20 y 200 kDa. Cuando se inhibieron la hialuronidasa y otros posibles procesos degradantes mediante sulfato de dextrano, sólo se encontraron fragmentos pequeños de HA que oscilaban entre 10 y 70 kDa asociados con la fracción celular (tabla 5).

La expresión aumentada de Hyal-1 e Hyal-2 induce invasividad en líneas celulares de cáncer de mama humano

Usando reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa (RT-PCR) competitiva, se detectaron Hyal-1, 2 y 3 en diversas cantidades en todas las líneas celulares, mientras que no se detectó PH-20 usando estas condiciones de amplificación. Cuando se comparó la expresión de Hyal-1 y la expresión de Hyal-2 en las líneas celulares menos invasivas ($\leq 30\%$ de una población celular que demuestra migración) el ARNm para ambas de las enzimas presentaron una expresión aproximadamente igual. A medida que las células se volvieron más invasivas, la expresión de ARNm tanto de Hyal-1 como de Hyal-2 aumentó, en la que Hyal-2 se expresó con frecuencia a niveles 5-7 veces superiores al ARNm de Hyal-1. En las líneas celulares menos invasivas, se inhibió la transcripción de Hyal-1 y 2 durante la senescencia, mientras que en las líneas celulares altamente invasivas se mantuvo el nivel de expresión de ARNm o se aumentó ligeramente durante la detención del crecimiento.

La renovación celular de hialuronano disminuye con el aumento de la invasión celular

Tal como se observa en la tabla 4, a medida que aumentó el potencial invasivo de las células de cáncer de mama, la tasa de renovación de HA liberado disminuyó, lo que indica que las células altamente invasivas pueden requerir un entorno extracelular rico en HA o que las rutas degradantes de las células habían alcanzado la máxima capacidad de funcionamiento. Este estudio ha identificado de manera única la expresión de Hyal-3 en el cáncer de mama en el que hay una relación inversa entre la invasividad celular y la expresión de Hyal-3. La identificación de Hyal-3 en células de cáncer de mama fue inesperada ya que se había notificado este gen en médula ósea y testículos de mamífero (Csoka *et al*, 2001), pero aún falta demostrar la actividad en ensayos de hialuronidasa convencionales

(Stem, 2003).

Altos niveles de epítipo CD44 se correlacionan con invasividad celular aumentada, expresión de HAS2, Hyal-1 e Hyal-2 elevada

5 La cuantificación del receptor RHAMM no mostró una fuerte correlación con ninguna isoforma de HAS particular o la expresión prevalente de hialuronidasa o invasividad celular, sin embargo sí que pareció haber una relación inversa entre la expresión de CD44 y RHAMM (figuras 9A y B). Con la excepción de la línea celular moderadamente invasiva, MDAMB 468, hubo una relación proporcional entre HAS2, Hyal-1 Hyal-2, CD44 y la invasividad celular de

10 cáncer de mama (tablas 3 y 4). Cuando se examinó el potencial catabólico de una célula de cáncer de mama; cuanto mayor fue la expresión de CD44 y de Hyal-2, mayor fue la capacidad de las células para degradar grandes cantidades de HA (tabla 4).

Tabla 2

Gen	Cebador sentido	Cebador inverso	Sonda de hibridación
HAS1	5'CCTGCATCAGCGGTCTCTA 3' (SEQ ID NO: 27)	5' GCCGGTCA-TCCCCAAAAG3' (SEQ ID NO: 34)	5'AACCTCTTGCAGCAGTTTCTTGAGGCC 3' (SEQ ID NO: 41)
HAS2	5' CAGTCCTGGCTTCGAGCAG 3' (SEQ ID NO: 28)	5' TTGGGAGAAAAGTCTTTGGCT 3' (SEQ ID NO: 35)	5'CCATTGAACCAGAGACTTGARACAGCCC 3' (SEQ ID NO: 42)
HAS3	5' TTGCACTGTGGTCGTCAACTT 3' (SEQ ID NO: 29)	5' GTCGAGGTCAAACGTTGTGAG 3' (SEQ ID NO: 36)	5'TCAAATCAAAAACAGGCAGGTACAGGTAGTGG 3' (SEQ ID NO: 43)
GAPDH	5' AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC 3' (SEQ ID NO: 30)	5' GAGTTAAAA-GCAGCCCTGGTG 3' (SEQ ID NO: 37)	5' TTTGGTCGTATTGGGCGCCTGG3' (SEQ ID NO: 44)
Hyal-1	5'GCACAGGGAAGTCACAGATGTATGTGC 3' (SEQ ID NO: 31)	5'CCACTGGTCACGTTTCAGGATGAAG-3' (SEQ ID NO: 38)	
Hyal-2	5'GATGTGTATCGCC-GGTTATCACGCC 3' (SEQ ID NO: 32)	5'CGTAGACTGGGAGTGCATGGTTGGC 3' (SEQ ID NO: 39)	
Hyal-3	5' GCACTGATGGAGGATACGCTGCG 3' (SEQ ID NO: 33)	5' GCTGGTGACTGCAGGCCATCGCTGC 3' (SEQ ID NO: 40)	

Tabla 3

Línea celular de cáncer de mama	Potencial invasivo (% de células migratorias)	Expresión de CD44 (unidades de densitometría / µg de proteína)	Expresión de hialuronano sintasa*				Producción de hialuronano (fg/célula/24 h)			
			HAS2		HAS3		Liberado		Asociado a célula	
			Fase exp.	Fase mes.	Fase exp.	Fase mes.	Fase exp.	Fase mes.	Fase exp.	Fase mes.
MDA-MB-453	1	0	0	0	1	0	594	139	0	64
MDA-MB-361	2	0	0	0	1	0	255	46	0	80
MDA-MB-468	23	1,9	0	0	3	0	616	0	0	38
ZRL-75-1	26	0	0	0	0,5	0	637	627	0	26
T47D	26	0,1	0	0	2	0	1523	0	0	71
MCF-7A	31	0,1	0	0	1	1	1623	313	0	64
MDA-MB-435	48	0,9	0	0	0,5	0,5	376	92	0	44
MDA-MB-231	80	1,1	14	16	1	1	6450	1137	250	351
BT-549	92	1,5	92	91	8	8	13087	5278	125	2793
Hs578T	100	3,6	208	205	0,2	0,2	12711	4567	52	102

* Expresión de HAS determinada mediante RT-PCR en tiempo real en la que las cifras se expresan como diferencia en veces como porcentaje de la línea celular menos invasiva MDA-MB 453

0 indica cuando no se detectó el gen o hialuronano

Tabla 4

Línea celular de cáncer de mama	Potencial invasivo (% de células migratorias)	Expresión de CD44 (unidades de densitometría / µg de proteína)	Expresión génica de hialuronidasa*						Renovación de hialuronano (fg/célula/24 h)			
			Hyal-1		Hyal-2		Hyal-2		Liberado		Asociado a célula	
			Fase exp.	Fase mes.	Fase exp.	Fase mes.	Fase exp.	Fase mes.	Fase exp.	Fase mes.	Fase exp.	Fase mes.
MDA-MB-453	1	0	1	0	1	0	1	1	594 (100%)	139 (100%)	0	6 (9%)
MDA-MB-361	2	0	1	0	1	0	5	2	255 (100%)	46 (100%)	0	44 (55%)
MDA-MB-468	23	1,9	5	0	5	0	10	10	616 (100%)	0	0	6 (16%)
ZRL-75-1	26	0	10	0	11	0	14	0	594 (93%)	367 (59%)	0	0,8 (3%)
T47D	26	0,1	16	0	17	0	5	30	1308 (66%)	0	0	17 (24%)
MCF-7A	31	0,1	5	0	5	0	25	5	1623 (100%)	313 (100%)	0	35 (30%)
MDA-MB-435	48	0,9	14	16	103	105	75	76	376 (100%)	92 (100%)	0	19 (43%)
MDA-MB-231	80	1,1	30	30	155	158	35	0	2020 (31%)	880 (77%)	0	46 (13%)
BT-549	92	1,5	28	30	180	192	5	0	1476 (11%)	914 (17%)	61 (49%)	1405 (50%)
Hs578T	100	3,6	29	35	201	205	0	0	2990 (24%)	1756 (38%)	34 (65%)	41 (40%)

* Expresión de Hyal determinada mediante RT-PCR y digitalización de bandas en las que figura la diferencia en veces en la expresión en comparación con la línea celular menos invasiva MDA-MB 453

0 indica cuando no se detectó el gen o hialuronano

() Las cifras entre paréntesis representan el % de HA que se degradó/célula/24 h

Tabla 5

Línea celular de cáncer de mama	Potencial invasivo (% de células migratorias)	Expresión génica ^a de HAS		Expresión génica ^b de <i>Hyal</i>			Caracterización de HA liberado				Caracterización de HA asociado a célula			
		HAS2	HAS3	<i>Hyal-1</i>	<i>Hyal-2</i>	<i>Hyal-3</i>	M _r modal (kDa)	% de HA	M _r de productos de degradación de HA (kDa)	% de HA	M _r modal (kDa)	% de HA	M _r de productos de degradación de HA (kDa)	% de HA
MDAMB-453	1	0	1	1	1	1	10000	100	25 70 800 3000 6000	67 11 3 7 12	60 100 10000	23 24 53	10 20	22 78
MDA-MB 231	80	14	1	30	155	35	60 200 de 600 a 10000	36 36 28	20 40 500	37 41 22	200 500 660	39 38 23	20 40 70	23 33 44
BT-549	92	92	8	28	180	5	10000	100	10 20 40	66 11	20 60 10000	21 41 38	10 20 40 60	9 26 46 8
Hs578T	100	208	0,2	29	201	0	10000	100	10 20 40	9 28 41	10000	100	10 20	27 36

^a Expresión de HAS determinada mediante RT-PCR en tiempo real en la que las cifras se expresan como diferencia en veces como porcentaje de la línea celular menos invasiva MDA-MB 453

^b Expresión de Hyal determinada mediante RT-PCR y digitalización de bandas en las que figura la diferencia en veces de la expresión en comparación con la línea celular menos invasiva MDA-MB 453

EJEMPLO 22

La supresión mediada por antisentido de hialuronano sintasa 2 inhibe la génesis tumoral y la progresión de cáncer de mama

5

Cultivo celular.

10

Se seleccionó la línea celular de adenocarcinoma de mama humano aneuploide MDA-MB 231 (Colección americana de cultivos tisulares, Rockville, MD, EE.UU.) basándose en la expresión de HAS2. Se propagaron células en cultivo en monocapa en medio Leibovitz L-15 (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.), complementado con FCS al 10%, penicilina 100 unidades/ml y estreptomycin 100 mg/ml.

Construcción de vector de expresión antisentido.

15

Se generó el marco de lectura abierto de ADNc para HAS2 humana diseñando cebadores específicos de gen a partir de la secuencia publicada de Watanabe y Yamaguchi y consistieron en los siguientes cebadores: sentido, 5'-GAGCTGAACAAGATGCATTGTGAGAGC-3' (SEQ ID NO: 45) y antisentido, 5'-GACATGGTGCTTGATGTATGATCTTCCAT-3' (SEQ ID NO: 46). Se usó ARN total recogido a partir de fibroblastos dérmicos humanos que se dividían exponencialmente como molde para RT-PCR, generando un fragmento de ADNc de HAS2 de 1,7 kb, que se clonó directamente en el vector pGEM-T (Promega, Madison, EE.UU.). Posteriormente se subclonó el ADNc para dar HAS2 en el vector de expresión pCI-neo (Promega) y se identificaron clones aislados que contenían el inserto en la orientación antisentido (constructo de ASHAS2) mediante mapeo con endonucleasas de restricción y secuenciación automatizada.

20

25

Transfección y validación de células de cáncer de mama humano MDA-MB 231 con ASHAS2 y constructos simulados.

30

Se transfectaron el constructo ASHAS2-pCI-Neo y control simulado (vector pCI-neo sin inserto) en células de cáncer de mama humano MDA-MB 231 usando reactivo Lipofectamine plus (Gibco Life Technologies, Melbourne, Victoria, Australia) según las instrucciones del fabricante. Durante al menos un mes, antes de comenzar los estudios, se seleccionaron las células transfectadas en presencia de antibiótico G418 500 µg/ml (Promega). Se estabilizaron líneas celulares estables recogiendo y combinando colonias resistentes a antibiótico. Se realizó la confirmación de la incorporación estable del constructo de HAS2 antisentido en el genoma usando PCR con ADN genómico purificado. En resumen, se usó un cebador específico de gen para pCI-neo: 5'-GCACAGATGCGTAAGGAG-3' (SEQ ID NO: 47) en combinación con dos cebadores de HAS2 específicos de la siguiente secuencia: sentido de GSP2 5'-GCTGTGTACATGACCTCGCGCTTGCCGCC-3' (SEQ ID NO: 48) y sentido de GSP4 5'-GGCGGGAAGTAACTCGAC-3' (SEQ ID NO: 49). Cuando se usaron en la siguiente combinación; se amplificaron productos de tamaño esperado de pCI-neo/GSP2 y pCI-neo/ GSP4, de 1443 pb y 2223 pb respectivamente. Se identificaron los productos de PCR mediante mapeo con endonucleasas de restricción y secuenciación automatizada.

35

40

Cuantificación de ARNm para HAS1, 2 y 3.

45

Se usó PCR en tiempo real usando cebadores específicos de gen y una sonda oligonucleotídica interna para cuantificar los niveles de ARNm relativos de HAS1, HAS2 y HAS3 en células originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2 (tabla 2). En resumen, se purificó ARN total a partir de células que crecían exponencialmente usando reactivo TRI (Sigma). Se usó el ARN total para generar ADNc monocatenario incubando 2 µg de ARN con cebadores al azar 0,5 µg/ml y transcriptasa inversa Superscript (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Para la PCR en tiempo real cuantitativa, se usaron cebadores específicos de gen para cada isoforma de HAS y una sonda oligonucleotídica interna. Para sondas internas de HAS se marcaron el colorante indicador 6-carboxilfluoresceína (6-FAM) y el extintor 6-carboxitetrametil-rodamina (TAMRA) en 5' y 3' respectivamente. Para las sondas internas de GAPDH se sustituyó el indicador 6-FAM por VIC™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Se realizó la reacción PCR en un volumen final de 30 µl y consistió en 1X mezcla de reacción Taqman, 6 µM de cebador directo e inverso de HAS, 1,5 µM de sonda, 1 µM de cada cebador de GAPDH y 500 nM de sonda de GAPDH. Se realizó la amplificación por PCR mediante desnaturalización durante 10 min. a 95°C seguido por hibridación durante 2 min. a 50°C seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min. a 60°C. Se realizaron el termociclado y la medición de fluorescencia en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). Se realizó la cuantificación relativa mediante normalización de los valores de ciclo umbral (Ct) de cada gen de muestra con valores de Ct de GAPDH. ΔCt corresponde a la diferencia entre el Ct de los genes de HAS de interés y el Ct de GAPDH. Los datos se presentan como diferencia de cambio en veces con respecto a lo original (fijado arbitrariamente a 100) calculada según la fórmula que describe la cuantificación por PCR relativa $2^{-(\Delta Ct_{HAS} - \Delta Ct_{GAPDH})}$.

50

55

60

Caracterización de la expresión génica de hialuronidasa.

65

Para determinar la expresión génica de hialuronidasa para HYAL1, 2 y 3, se realizó RT-PCR con ARN total extraído a partir de células en fases de crecimiento tanto exponencial como detenido. Se diseñaron los conjuntos de cebadores específicos de gen a partir de secuencias recuperadas de GenBank (véase la tabla 2). Se visualizaron secuencias amplificadas mediante electroforesis en gel de agarosa que contenía bromuro de etidio y se confirmó su identidad mediante secuenciación de ADN automatizada. Para cuantificar la abundancia relativa de cada producto de PCR, se sometieron geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio que contenían fragmentos amplificados a análisis densitométrico usando ProXpress™ Imager (Perkin Elmer, Boston, MA, EE.UU.) y se analizaron los datos usando el software Phoretix 1D (Phoretix International, Newcastle, R.U.).

Ensayo de proliferación celular.

Se sembraron en placa células originales, transfectantes simulados y transfectantes de ASHAS2 que crecían exponencialmente en placas de 24 pocillos (2,5 cm²/pocillo) a densidades celulares que oscilaban entre 5X10³ y 9X10⁴ células/pocillo. Se estudió el efecto de la inhibición de HAS2 sobre la proliferación celular durante 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h. Tras un periodo de crecimiento definido, se desprendieron células usando tripsina al 0,25% p/v y se determinó el número de células usando un contador Coulter (Beckman, Coulter, Australia).

Identificación inmunohistoquímica de hialuronano sintasa, hialuronidasas y CD44

Se realizó el efecto comparativo de la inhibición de HAS2 sobre la expresión de HA sintasa, hialuronidasa y receptores de HA con células MDA-MB 231 originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2. Se sembraron portaobjetos de cámara de ocho pocillos a una densidad de 2X10⁴ células/pocillo y se adhirieron las células durante 24 h. Se fijaron las células en Histochoice (Sigma) durante 15 min., después se lavaron 3x5 min. en PBS. Se bloquearon proteínas heterófilas mediante incubación con FCS al 10% durante 10 min., seguido por un aclarado con PBS. Se diluyeron los antisueros o anticuerpos contra CD44H (DAKO, Copenhagen, Dinamarca) HYAL1, HYAL2, (amablemente donados por R. Stem, University of San Francisco, EE.UU.), HAS2 (amablemente donado por P. Heldin, Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Suecia) en PBS que contenía suero humano al 1%/FCS al 1% en el que se aplicaron anticuerpos de detección durante 60 min. a 25°C. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena mediante inmersión en H₂O₂ al 0,3% en metanol durante 20 min. Tras un lavado con PBS adicional, se aplicó antisuero secundario conjugado con peroxidasa porcino anti-conejo o de rata anti-ratón (DAKO) durante 60 min. a TA, seguido por 3 x lavados de 5 min. en PBS. Se visualizó el epítipo con Sigma Fast DAB (3,3'-diaminobencidina, Sigma) tras la aplicación durante 5-10 min. a TA. Se lavaron los portaobjetos en agua corriente durante 10 min., se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron.

Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.

Se sembraron las células transfectadas y control a 2x10⁵ células/25 cm² y se hicieron crecer con timidina 2 mM hasta el 50% de confluencia. Tras alcanzar el 50% de confluencia, se hicieron crecer las células en medio de cultivo libre de timidina. Se recogieron las células mediante tripsinización a 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 h seguido por fijación en etanol al 95% durante 2 h a 4°C. Se trataron previamente las células con ARNasa (100 µg/ml) (Sigma) y yoduro de propidio 50 µg/ml (Sigma) durante 30 min. a 37°C antes de determinar el estadio del ciclo celular usando un instrumento analítico FACS-Calibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.).

Ensayo de migración celular.

Se realizaron ensayos de invasión usando cámaras de Boyden modificadas con membranas Nucleopore de policarbonato (Coming, Coming, NY, EE.UU.). Se rehidrataron filtros previamente recubiertos (6,5 mm de diámetro, 12 µm de tamaño de poro, Matrigel 100 µg/cm²) con 100 µl de medios Leibovitz L-15 complementados con BSA al 0,1% p/v (Sigma). Se recogieron células que crecían exponencialmente con tripsina/EDTA (Sigma). Antes de la adición a la cámara superior del aparato de Boyden, se lavaron 3x10⁵ células/cámara de 1 ml dos veces con medio de crecimiento libre de suero que contenía BSA al 0,1% p/v. Se usó medio de crecimiento normal que contenía FCS al 10% v/v como quimioatrayente. Tras la incubación durante 6 h a 37°C, se eliminaron células no invadidas sobre la superficie superior del filtro con un hisopo de algodón, y se fijaron las células que migraron sobre la superficie inferior del filtro y se tiñeron con kit Diff-Quick. Se determinó la invasividad contando las células en cinco campos microscópicos por pocillo, y se expresó el grado de invasión como número promedio de células por campo microscópico. Se realizó cada experimento por triplicado en dos días separados en los que se representan los datos como % de células que migran en comparación con la línea celular original.

Ensayo de exclusión de partículas y morfología celular.

Se visualizó la matriz pericelular dependiente de HA alrededor de células de cáncer de mama a partir de cultivos control y transfectados mediante la exclusión de eritrocitos humanos fijados tal como se describió anteriormente por Clarris y Fraser. Se fotografiaron diferencias morfológicas así como el ensayo de exclusión de partículas en las células MDA-MB 231 control y transfectadas con un microscopio de contraste de fase inversa Nikon Optiflot (Nikon) 24 y 60 h tras la siembra.

Cuantificación de HA liberado.

Se sembraron cultivos por triplicado de células MDA-MB 231 de cáncer de mama humano originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con ASHAS2 a $2,5 \times 10^5$ células/25 cm² y se incubaron durante 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h. Al final del periodo de incubación, se recogieron células mediante tripsinización y se contaron usando un contador Coulter. Se usaron medios para la cuantificación de HA liberado. Se cuantificó el HA liberado usando un ensayo de proteína de unión a HA ligado a enzimas (HABP) (Corgenix Inc, Westminster, CO, EE.UU.). Se realizó el ensayo según las instrucciones del fabricante. En resumen, se colocaron alícuotas por duplicado de 100 µl de muestras y los patrones de HA (0, 50, 100, 200, 500 y 800 ng/ml) en una placa de 96 pocillos recubierta con HABP, y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 60 min. Se lavaron las muestras cuatro veces con PBS. Se añadieron cien µl de HABP conjugado con peroxidasa del rábano y se incubaron a TA durante 30 min. Tras lavados con PBS adicionales, se visualizó la reacción con 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) tras una incubación de 30 min. a TA. Se detuvo la reacción con 100 µl de ácido sulfúrico 0,36 N y se leyó a 450 nm (referencia de 650 nm) en un lector de microplacas BioRad 350. Se usaron medios de crecimiento que no se habían expuesto a células para determinar los niveles de HA endógenos. Se restaron los niveles de HA endógenos de todos los resultados de estimación de HA.

Caracterización del peso molecular de hialuronano usando cromatografía de exclusión molecular.

Se sembraron las células a $7,5 \times 10^5$ células/frasco de cultivo de 75 cm² y se hicieron crecer durante 24 h en medios de crecimiento que contenían clorhidrato de D-[6-³H]glucosamina 250 µCi (Perkin Elmer). Al final del periodo de incubación de 24 h, se retiraron los medios y se dializaron exhaustivamente (exclusión de M_r de 6 kDa) frente a Tris-HCl 10 mM/cloruro de sodio 0,15 M/azida sódica al 0,02% pH 7,4 a 4°C. Se analizaron mediante cromatografía el dializado y el fluido de diálisis para la identificación de [³H]HA y sus productos de degradación. Se sometió [³H]HA de >5 kD a cromatografía de exclusión molecular en un gel Sephacryl S-1000 eluido en NaCl 0,15 M/fosfato pH 7,25 que contenía NaH₂PO₄ 19 mM, Na₂HPO₄ 38 mM y NaCl 94 mM a 13,6 ml/h. Se sometió el fluido de diálisis (moléculas <5 kDa) a cromatografía de exclusión molecular en un gel Superose 12 eluido en el tampón mencionado anteriormente a una velocidad de elución de 20 ml/h. Se calcularon las estimaciones de peso molecular usando datos de calibración para HA en Sephacryl S-1000 y Superose 12, en el que los datos se generaron a partir de diversos PM de HA que oscilaban entre 800 Da y 10.000 kDa (CPN, República Checa y Pharmacia). Para garantizar que se usó el clorhidrato de D-[6-³H]glucosamina como único precursor para la producción de HA, se sometió el Dpm no dializable (moléculas >5 kDa) a digestión mediante 10 TRU de hialuronidasa de *Streptomyces* (Calbiochem, Alemania) a pH 6, a 37°C durante 24 h. Se sometió el material digerido a cromatografía tanto en Sephacryl S-1000 como en Superose 12 en los que se compararon los perfiles con muestras no digeridas equivalentes.

Generación de tumores subcutáneos de tejido adiposo mamario.

Se realizaron estudios con animales con la completa aprobación ética del comité ético de investigación clínica relevante, y según las directrices del Australian National Health and Medical Research Council para el cuidado y el uso de animales de laboratorio. Se dividieron al azar ratones desnudos CBA de cinco semanas de edad (Walter y Eliza Hall, Melbourne, Victoria, Australia) en tres grupos (n=11/grupo) para la generación de tumores originales, simulados y de ASHAS2. Se recogieron las células en la fase de crecimiento logarítmico mediante raspado, se resuspendieron hasta una densidad final de 2×10^6 células en medio L-15 complementado con glucosa al 0,1% ± Matrigel 5 mg/ml seguido por inyección inmediata en el tejido adiposo mamario. Se registró el crecimiento tumoral dos veces por semana midiendo tres diámetros perpendiculares (d1, d2, d3). Entonces se calculó el volumen tumoral usando la fórmula: $(1/6)\pi(d1d2d3)$. En el día 84 tras el inicio de los tumores se sacrificaron los ratones con compasión. Se extirparon el hígado, los riñones, el cerebro y los pulmones en la autopsia y se almacenaron a -20°C hasta que se realizó el análisis mediante PCR de Alu. Para la evaluación patológica se fijó la mitad se fijó la mitad de los tumores primarios en formaldehído al 4% y se incrustó en parafina, se examinaron secciones de 5 µm tras la tinción con hematoxilina y eosina.

Inoculación intracardiaca de células de cáncer de mama.

Antes de la inoculación de tumor intracardiaca, se anestesiaron los ratones con una mezcla intraperitoneal de ketamina (50 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg). Se prepararon las células MDA-MB 231 tal como se describió anteriormente y se resuspendieron hasta 1×10^5 células/0,1 ml. Se extrajo la suspensión celular en una jeringa de 1 ml equipada con una aguja de calibre 25 y se inyectaron 0,1 ml en el ventrículo izquierdo. Se colocaron los ratones sobre un lecho calentado para su recuperación antes de devolverlos a las jaulas. Periódicamente, se realizaron análisis radiográficos para determinar la osteolisis de los huesos. Para ello, se anestesiaron los ratones (tal como se describió anteriormente) y se analizaron con rayos X en una posición boca abajo contra una película X-Omat (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EE.UU.) y se expusieron a rayos X de 35 kV durante 30 s usando un sistema de rayos X en cabina de la serie Faxitron, Hewlett-Packard Co. (modelo MX20 con una fuente focal de 20 µm; Faxitron x-ray Corp., Illinois, EE.UU.). Se observó la tasa de supervivencia y la salud de los animales hasta el sacrificio debido a uno de los siguientes motivos médicos; pérdida de peso grave, hiperventilación, parálisis o fractura de hueso. Órganos recogidos: se extrajeron el hígado, los riñones, el cerebro y los pulmones y se

almacenaron a -20°C hasta que se realizó el análisis mediante PCR de Alu. Para determinar la mediana del tiempo de supervivencia, se trazó una curva de supervivencia usando un programa de estadística Prism (supervivencia de Kaplan-Meier) con los días transcurridos tras las inoculaciones intracardiacas. Se calculó el valor de p para cada comparación de las curvas de supervivencia.

Cuantificación de la metástasis mediante PCR de Alu.

Se usó PCR de Alu cuantitativa para detectar la metástasis de MDA-MB 231 desde el tumor primario hasta órganos secundarios. En resumen, se extrajo ADN triturando muestras en nitrógeno líquido y resuspendiendo en un tampón de lisis de ADN (NaCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, EDTA 20 mM pH 8,0, SDS al 0,4% (v/v)). Se purificó ADN usando metodología de fenol-cloroformo seguido por precipitación en etanol y reconstitución en tampón TE. Se ajustó el ADN purificado hasta una concentración final de 10 ng/μl en tampón TE pH 7,2, se extrajeron alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Para eliminar contaminación de ADN humano exógeno se trató la mezcla de reacción, antes de la adición de cebadores, con nucleasa S7 17 U/ml (Roche Diagnostics, Alemania) en presencia de CaCl₂ 1 mM a 37°C durante 24 h antes de la PCR. Entonces se inactivó la nucleasa S7 a 90°C durante 30 min. tras la adición de EGTA 4 mM. Entonces se realizó la PCR de Alu cuantitativa con muestras de ADN genómico purificado (10 ng) en un sistema de detección de secuencias GeneAmp 5700 (Applied Biosystems). Se sometió a prueba cada muestra por duplicado en un volumen de reacción final de 25 μl que consistía en 0,625 U de ADN polimerasa de Taq (Roche; Mannheim, Alemania), Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, dNTP 200 μM, DMSO al 8%, 6-carboxi-X-rodamina 1 μg/ml (Molecular Probes; Eugene, Oregon EE.UU.), dilución de 1 en 40000 de SYBR Green I (Molecular Probes) y 100 nM de cada cebador de Alu (Alu sentido 5'-GTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAA-3' (SEQ ID NO: 50); Alu antisentido 5'-GCGATCTCGGCTCACTGCAA-3' (SEQ ID NO: 51)). Tras la incubación con desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min., se produjo la amplificación a lo largo de 40 ciclos, que consistió en la desnaturalización a 95°C durante 5 segundos, hibridación a 65°C durante 60 segundos, y extensión a 75°C durante 15 segundos durante la cual se midió la intensidad de fluorescencia. Entonces se generó una curva de disociación desde 60°C hasta 95°C. En cada placa de reacción de 96 pocillos, se preparó una curva patrón diluyendo en serie ADN humano en ADN de ratón que permitió la cuantificación de la carga tisular de células tumorales humanas en los órganos de ratón extirpados en la autopsia.

Conformación de la transfección estable de HAS2 antisentido en células MDA-MB 231

Se confirmó la incorporación del constructo HAS2-pCI-neo antisentido en el genoma de MDA-MB 231 mediante análisis por PCR de ADN genómico altamente purificado extraído de células transfectadas. Cuando se usaron en la siguiente combinación; pCI-neo/GSP2 y pCI-neo/GSP4 se amplificaron de manera reproducible productos de tamaño esperado de 1443 pb y 2223 pb a partir de clones estables que albergaban el constructo de HAS2 antisentido. El ADN genómico aislado de células originales y transfectadas de manera simulada dio negativo en las pruebas.

La transfección de células de cáncer de mama MDA-MB 231 con HAS2 antisentido reduce el ARNm de HAS e inhibe totalmente la expresión de la proteína HAS2

Se cuantificaron los niveles endógenos de ARNm para HAS2 en células originales usando RT-PCR en tiempo real y se compararon con los valores obtenidos a partir de transfectantes de HAS2 antisentido y simulados. De manera simultánea a estos experimentos, también se cuantificaron los niveles de ARNm de HAS1 y HAS3 usando PCR en tiempo real con expresión de HYAL1, 2 y 3 caracterizada mediante metodología de RT-PCR convencional. Para permitir la comparación de la expresión de HAS en tiempo real entre células originales y transfectadas, se normalizó el nivel de cada ARNm cuantificado con respecto a sus controles de GAPDH internos. Cuando se comparó el nivel endógeno de expresión de ARNm de HAS2 en células originales y transfectantes, no se observaron diferencias entre las líneas celulares originales y transfectadas de manera simulada. En cambio, la expresión de ARNm en células transfectadas de manera estable con ASHAS2 disminuyó en un 50% en comparación con células originales y transfectantes simulados respectivamente (p=0,008) (figura 10A). También se detectó expresión de HAS3 moderada y era comparable en células originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con antisentido, donde no pudo detectarse HAS1 en ninguno de los grupos de tratamiento (datos no mostrados). La detección inmunohistoquímica de HAS2 con anticuerpo monoclonal específico de isoforma demostró que la transfección estable con ASHAS2 daba como resultado el bloqueo eficaz de la traducción de la proteína HAS2 (figura 10B). Mientras que células tanto originales como transfectadas de manera simulada presentaban un alto grado de expresión de HAS2 tal como se indica por la tinción de epítomos positiva (figura 10C).

La inhibición de HAS2 altera la expresión de hialuronidasa

La inhibición antisentido de HAS2 alteró significativamente la expresión de HYAL1, 2 y 3 (figura 11). No pudo detectarse HYAL3 en células originales ni transfectantes simulados, pero la inhibición de HAS2 dio como resultado la expresión de HYAL3 (figura 11). Sin embargo, la inhibición de la expresión de HAS2 dio como resultado la regulación por disminución de la expresión génica para el ARNm de HYAL2 hasta el punto de que no era detectable incluso tras 35 ciclos de PCR. Esta observación se ve reforzada por la falta de inmunoreactividad de transfectantes estables de MDA-MB 231 con ASHAS2 con el anticuerpo frente a HYAL2 en los que la tinción se localiza en la

membrana plasmática y también aparece como vesículas citoplasmáticas. La expresión de HYAL1 en transfectantes de antisentido estaba moderadamente regulada por incremento en comparación con controles tanto originales como simulados. Estas observaciones concordaban con el ARN total extraído de cultivos o bien subconfluentes o bien confluentes.

CD44 se reguló por disminución mediante la inhibición de HAS2

La expresión del receptor de HA, CD44, estaba regulada por disminución en las células con ASHAS2 (figura 12A) en comparación con células originales y transfectantes simulados (figura 12B). La tinción para CD44 en ambos controles era lo más evidente en la membrana plasmática con zonas de tinción de membrana focal intensa.

La inhibición antisentido de HAS2 altera el metabolismo del hialuronano

Debido a la expresión de HAS e HYAL alterada en transfectantes de MDA-MB 231 con ASHAS2, se cuantificó la cantidad de HA liberada. Los transfectantes de MDA-MB 231 con ASHAS2 liberaron cantidades significativamente mayores de HA en comparación con o bien la línea celular original o bien transfectantes simulados (figura 13). A lo largo de la duración del experimento, los cultivos con ASHAS2 sintetizaron un promedio de 6,94 pg de HA/célula/día con una excepción perceptible a las 24 h tras la siembra en placa, cuando la síntesis aumentó hasta aproximadamente 15,4 pg/célula/día, en contraposición a células originales y transfectantes simulados que sintetizaron aproximadamente 2 y 1,6 pg de HA/célula/día, respectivamente.

La inhibición antisentido de HAS2 no afectó al hialuronano asociado a células

Se usó la exclusión de eritrocitos fijados para visualizar indirectamente la matriz pericelular de HA. En comparación con células originales y transfectantes simulados, la inhibición de HAS2 no dio como resultado ninguna diferencia macroscópica en el grosor de la matriz pericelular de HA y el HA asociado a células posterior.

La modulación de la expresión de HAS2 altera el peso molecular de hialuronano producido por células de cáncer de mama MDA-MB 231

Los medios retirados de los transfectantes de MDA-MB 231 con ASHAS2 eran altamente viscosos en comparación con líneas celulares control. La digestión de los medios con hialuronidasa de *Streptomyces* demostró que >98% de la [³H] glucosamina se había incorporado en [³H] HA, estando el 2% restante de la [³H] dpm asociado con macromoléculas digeribles con Pronase de ~50 kDa. Todas las figuras representan datos en los que se había eliminado la reactividad. Se determinó el PM del HA sintetizado por células originales, transfectadas de manera simulada y transfectadas con antisentido mediante cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-1000. La línea celular original sintetizó tres PM distintos de HA que se estimó que eran de 100, 400 y 3000 kDa, lo que refleja posiblemente los productos sintéticos de las isoformas de HAS expresadas prevalentemente, HAS2 y 3 respectivamente (figura 14). En cambio, transfectantes de HAS2 antisentido sintetizaron HA correspondiente a un PM de >10.000 kDa en los que también se detectó una fracción minoritaria (5,2%) correspondiente a un peso molecular 100 kDa.

La inhibición de HAS2 disminuye la proliferación de células de cáncer de mama y detiene el ciclo celular en G₀/G₁

La comparación del efecto de la inhibición antisentido de HAS2 sobre la proliferación celular y la progresión del ciclo celular durante periodos de crecimiento celular activo demostró que en células tanto originales como transfectadas de manera simulada, se producía una duplicación del número de células cada 24 h alcanzándose una fase de crecimiento de meseta a las 72 h (figura 15A). En transfectantes estables de ASHAS2, la falta de una HAS2 funcional alteró la proliferación celular presentando un periodo de latencia de aproximadamente 24 h, alcanzando la detención del crecimiento en de 96 a 120 h (figura 15A). De manera simultánea a estas observaciones, se realizó también un análisis citométrico de flujo sobre células originales, transfectantes simulados y transfectantes de ASHAS2 para determinar el contenido en ADN relativo a puntos de tiempo definidos tras la siembra en placa a densidades subconfluentes. El porcentaje de las células transfectadas con ASHAS2 en las fases del ciclo celular G₀/G₁, S y G₂/M 20 h tras la siembra en placa era del 79%, el 4% y el 5% tal como se observa en las figuras 15B, C y D respectivamente. En cambio, las cifras correspondientes en la línea celular original para las fases del ciclo celular G₀/G₁, S y G₂/M eran aproximadamente del 10%, el 84% y el 13% respectivamente (figura 15B, C y D). Los transfectantes simulados eran comparables a la línea celular original. En cambio, la inhibición antisentido de HAS2 provocó un retraso transitorio (aproximadamente 24 h) de la entrada en la fase S (figura 15C). Estos resultados concuerdan con la observación del periodo de latente de 24 h en la tasa de crecimiento observado en el ensayo de proliferación.

La supresión de HAS2 reduce la migración de cáncer de mama humano

Se mejoró la migración de las células de cáncer de mama mediante la inhibición de HAS2 tal como se indica por la incapacidad de los transfectantes de ASHAS2 para migrar a través de una membrana de Matrigel (figura 16). La comparación de las tasas migratorias celulares demostró que tanto las células originales como los transfectantes

simulados presentaban fenotipos invasivos típicos permeando el 100% de las poblaciones celulares el Matrigel, en cambio, sólo el 7% de los transfectantes estables de HAS2 mantenían la capacidad para invadir la membrana de Matrigel.

5 La inhibición de HAS2 inhibe totalmente el inicio y la progresión del cáncer de mama primario *in vivo*

10 Ratones a los que se les inocularon por vía intradérmica células originales o MDA-MB 231 transfectadas de manera simulada establecieron fácilmente tumores primarios que eran comparables en crecimiento a lo largo de la duración del experimento de 12 semanas (figura 17A). Sin embargo, en cambio, ratones a los que se les inoculó transfectantes de ASHAS2 no establecieron tumores primarios (figura 17A). Para garantizar que la falta de crecimiento tumoral no era un resultado de una escasa viabilidad celular del inóculo celular, en un conjunto de experimentos, también se incluyó Matrigel en el medio de inoculación. De nuevo, no pudieron detectarse tumores primarios a lo largo de la duración del experimento de 12 semanas. Cuando se cuantifica la diseminación del cáncer primario, el ensayo de PCR de Alu altamente sensible demostró que la metástasis en animales a los que se les inocularon células originales y transfectadas de manera simulada era lo más prevalente en cerebro y pulmón, pero también se detectó en transfectantes de riñones e hígado. Los ratones a los que se les inyectaron MDA-MB 231 con ASHAS2 no presentaron metástasis en ningún órgano (figura 17B).

20 La modulación de HAS2 inhibió la formación de tumores secundarios y aumentó la supervivencia de los animales

25 Cuando se cuantifica la metástasis del cáncer de mama tras la inoculación intracardiaca, los animales a los que se les inocularon células originales y transfectadas de manera simulada demostraron una diseminación prevalente del cáncer al cerero, hígado, riñones, pulmón y hueso mientras que los ratones a los que se les inyectaron MDA-MB 231 con ASHAS2 no presentaban metástasis en ningún órgano (figura 18A). Se observaron lesiones óseas en varios ratones de los grupos control mientras que los ratones a los que se les inocularon ASHAS2 no presentaban ninguna lesión ósea. Los ratones a los que se les inocularon células MDA-MB 231 originales o transfectadas de manera simulada demostraron un periodo de supervivencia significativamente más corto, 72 días y 77 días en comparación con los animales con ASHAS2 que tenían un tiempo de supervivencia medio de 124 días ($p=0,0001$) (figura 18B).

30 EJEMPLO 23

Producción de antisuero frente a HAS

35 Basándose en la secuencia de aminoácidos pronosticada para hHAS1, se diseñaron tres péptidos antigénicos cortos y se sintetizaron mediante síntesis de aminoácidos en fase sólida y se purificaron mediante cromatografía de alta resolución en fase inversa. Se determinó que los péptidos eran el 99,9% puros tal como se mostró mediante espectrometría de masas. La producción, purificación, conjugación con toxoide diftérico (DT) y pruebas de pureza de los péptidos se realizaron por Chiron Mimitopes (Melbourne, Australia). La secuencia de cada péptido de inmunización se muestra en la tabla 7.

40

Tabla 7

Características de los péptidos de inmunización usados para generar anticuerpos policlonales frente a HA sintasa

Péptido de inmunización	Secuencia de aminoácidos	Reactividad cruzada de especie planteada como hipótesis	
		ratón	ser humano
HAS418	AARGPLDAATCRALLYPRARV (SEQ ID NO:24) 49→58 'Cys' 94→103	-ve	+ve
HAS419	GGLVRSVAHEA (SEQ ID NO: 25) 480→490	-ve	+ve
HAS421	GAYREVEAEDPGRLAVE (SEQ ID NO:26) 146→162	+ve	+ve

45

Se seleccionaron los péptidos de inmunización de HAS 418 y 419 en zonas de heterogeneidad entre especies, lo que indica que serían específicos de ser humano, mientras que HAS421 era homólogo a tanto ratón como ser humano.

50 Se inyectaron los péptidos por vía intramuscular en dos sitios en ovejas cruzadas Border Leicester Merino (0,2-0,5 mg) disueltos en adyuvante completo de Freund y de nuevo dos semanas después en adyuvante incompleto de Freund. En el día 35, se extrajo sangre de las ovejas, y se separó el suero mediante centrifugación, y se almacenó a -20°C. Se sometió a prueba todo el suero recogido con un ensayo inmunoabsorbente ligado enzimas para detectar anticuerpos específicos para el péptido y la proteína portadora. Se acopló el péptido de inmunización a un gel de

tiopropil-Sepharose 6B (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) mediante activación con bromuro de cianógeno y se extrajeron los anticuerpos específicos del antisuero frente a HAS de oveja policlonal mediante cromatografía de afinidad. En resumen, se mezclaron 5 ml de suero con 3 ml de PBS y se mezclaron con resina de afinidad/ligando durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por tres lavados de 5 ml de PBS. Se eluyeron los anticuerpos en glicina 0,1 M pH 2,8 y se neutralizaron inmediatamente hasta pH 7,2 mediante la adición de NaOH 0,1 M.

Entonces se concentraron los anticuerpos policlonales frente a HAS en un concentrador celular Amicon equipado con un filtro YM30 Diaflo. Se determinó la concentración de proteína de cada anticuerpo purificado por afinidad mediante el ensayo de BCA (Pierce, EE.UU.). Se garantizó la esterilidad de los anticuerpos usados en inmunohistoquímica o inmunotransferencia mediante la adición de azida de sodio al 0,1% p/v, antes del almacenamiento a -20°C en alícuotas. Se almacenaron los anticuerpos destinados para su adición a cultivos celulares a 20°C sin azida.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Debe entenderse que la invención incluye todas de tales variaciones y modificaciones en la medida en que están abarcadas por las reivindicaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos a los que se hace referencia o indicados en esta memoria descriptiva individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones de cualesquiera dos o más etapas o características en la medida en que estén abarcadas por las reivindicaciones.

Bibliografía

Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. : 215,430-410,1990

Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988)

Banerji *et al.*, J. Cell Biol.: 144, 789-801, 1999

Bird, Science 242: 423, 1988

Bourguignon *et al.*, Biol. Chem.: 272, 27913-27918, 1997

Brazma y Vilo, FEBS Lett.: 480, 17-24, 2000

Camenisch *et al.*, J. Clin. Invest.: 106, 349-360, 2000

Caulli *et al.*, J. Cell Biochem. Supl.: 31, 286-296, 1998

Celis *et al.*, FEBS Lett.: 480, 2-16, 2000

Clackson *et al.*, Nature 352:624-628, 1991

Clarris *et al.*, On the pericellular zone of some mammalian cells *in vitro*. Exp Cell Res 49:181-193, 1968

Csoka *et al.*, The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. Matrix Biol 20: 499-508, 2001

Culty *et al.*, J. Cell Physiol.: 160, 275-286, 1994

Elbashir *et al.*, Nature: 411, 494-498, 2001

Elbashire *et al.*, Genes Dev.: 15, 188-120, 2001

Entwistle *et al.*, J Cell. Biochem.: 61, 569-577, 1996

Erickson *et al.*, Science 249: 527-533, 1990

Fire *et al.*, Nature: 391, 806-811, 1998

Fries *et al.*, Virchows. Archiv.: 424: 7-12, 1994

Fuchs *et al.*, Anal. Biochem.: 286, 91-98, 2000

Going y Gusterson, Eur. J. Cancer.: 35, 1895-1904, 1999

- Gunthert *et al.*, Cell.: 65, pp. 13-24, 1991
- 5 Guo y Kempheus, Cell: 81,611-620, 1995
- Hodgson (Bio/Technology 9: 19-21, 1991)
- Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879, 1988
- 10 Itano *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm.: 222, 816-821, 1996
- Itano *et al.*, Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. J Biol Chem 274: 25085-25092, 1999
- 15 Itano *et al.*, Cancer Res.: 59, 2499-2504, 1999
- Itano *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci.: 99, 3609-3614, 2002
- 20 Johnson *et al.*, "Peptide Turn Mimetics" in Biotechnology and Pharmacy
- Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986
- Jungblut *et al.*, Electrophoresis: 20, 2100-2110, 1999
- 25 Jurecic y Belmont, Curr. Opin. Microbiol.: 3, 316-321, 2000
- Kabat *et al.* en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, publicación de los NIH n.º 91-3242, 1991
- 30 Kennet *et al.* (eds.), Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet *et al.* (eds.), Plenum Press, Nueva York (1980); y Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).
- 35 Knudson y Knudson, FASEB. 7: págs. 1233-1241, 1993
- Knudson y Knudson, The hyaluronan receptor, CD44, 1999
- Knudson *et al.*, The role and regulation of tumor-associated hyaluronan. En: The Biology of Hyaluronan. (Editors: Evered, D. & Whelan, J) Ciba foundation symposium 143. J Wiley and Sons, Chichester: págs. 150-169, 1989
- 40 Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975)
- Kojima *et al.*, Cancer Res.: 35, 542-547, 1975
- 45 Kortt *et al.*, Protein Engineering 10: 423, 1997
- Kosaki *et al.*, Cancer Res.: 59, 1141-1145, 1999
- 50 Larrick *et al.*, BioTechnology 7: 934, 1989
- Larson *et al.*, Cytometry: 41, 203-208, 2000
- Larsson *et al.*, J Biotechnol.: 80, 143-157, 2000
- 55 Laurent y Fraser, Hyal. FASEB J.: 6, 2397-2404, 1992
- Laurent y Killander, J. Chromatogr.: 14, págs. 317-330, 1964
- 60 Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439, 1987
- Liu *et al.*, Cancer Res. 61, 5207-5214, 2001
- Madden *et al.*, Drug Disc. Today: 5, 415-423, 2000
- 65 Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991

- Mathew y Dorfman, *Physiol. Rev.*: 35, 381-402, 1955
- McKee, *et al.*, *J. Biol. Chem.*: 272; 8013-8018, 1997
- 5 Montgomery *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*: 95,15502-15507, 1998
- Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855, 1984
- Munder *et al.* (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52(3): 311-320, 1999
- 10 Ng y Schwartz, *J. Biol. Chem.*: 264, 11776-11783, 1989
- Oksala *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.*: 43, 125-135, 1995
- 15 Pauli y Knudson, *Human Path.*: 19, 628-639, 1988
- Pezzuto *et al.*, Eds., Chapman and Hall, Nueva York, 1993
- Philipson y Schwartz, *J. Biol. Chem.*: 259, págs. 5017-5023, 1984
- 20 Philipson *et al.*, *Biochem.*: 24, 7899-7906, 1985
- Prashar y Weissman, *Meth-Enzymol.*: 303, 258-272, 1999
- 25 Prehm, P y Mausolf, *Biochem. J.*: 235, 887-889, 1986
- Prehm, P, *Biochem. J.*: 220, págs. 597-600, 1984
- Prehm P, Release of hyaluronate from eukaryotic cells. *Biochem J* 267: 185-189, 1990
- 30 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596, 1992
- Reichmann *et al.*, *Nature* 332:323-329, 1988
- 35 Rilla *et al.*, *J. cell Sci.*: 115, 3633-3643, 2002
- Shyjan *et al.*, *J. Biol. Chem.*: 271, págs. 23395-23399, 1996
- Simpson *et al.*, *American J. Path.*: 161, págs. 849-857, 2002
- 40 Spicer y McDonald, *J. Biol. Chem.*: 273, 1923-1932, 1998
- Spicer y Nguyen, *Biochem. Soc. Trans.*: 27, 109-115, 1999
- 45 Spicer *et al.*, *Genomics.*: 41, 493-497, 1997
- Spicer *et al.*, *J. Biol. Chem.*: 272, 8957-8961, 1997
- Stem R, Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 13:105R-115R, 2003
- 50 Sutcliffe *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*: 97, 1976-1981, 2000
- Sy *et al.*, *J. Exp. Med.*: 174, pp. 859-866, 1991
- 55 Tabara *et al.*, *Sci.*: 282, 430-431, 1998
- Tester *et al.*, *Clin. & Exp. Metast.*: 0, 1-7, 2002
- Thompson *et al.*, *J. Cell Physiol.*: 150, 534-544, 1992
- 60 Tijsterman *et al.*, *Science*: 295, 694-697, 2002
- Timmons y Fire, *Nature*: 395, 854, 1998
- 65 Timmons *et al.*, *Gene*: 263, 103-112, 2001

Tool, B., Glycosaminoglycans in morphogenesis. En: Cell Biology of the extracellular matrix. (Editor. Hay, E.D.) Plenum Press, Nueva York.: págs. 259-294, 1981

Toole, B.P., Current Opin. in Cell Biol.: 2, 839-844, 1990

Toole, B.P., J. Inter. Med.: 242, 35-40, 1997

Turley y Torrance, Exp. Cell. Res.: 161, 17-28, 1985

Tuschl *et al.*, Genes Dev.: 13, 3191-3197, 1999

Patente estadounidense n.º 4.816.567

Patente estadounidense n.º 4.946.778

Udabage *et al.*, Inhibition of hyaluronan degradation by dextran sulphate facilitates characterisation of hyaluronan synthesis: an *in vitro* and *in vivo* study Glycoconjugate J (en prensa), 2004

Victor *et al.*, J Cancer: 82, 77-83, 1999

Ward *et al.*, Nature 334: 544, 1989

Watanabe y Yamaguchi, J. Biol. Chem.: 271, 22945-22948, 1996

Weissmann y Meyer, J. Am. Chem. Soc.: 76, págs. 1753, 1954

Wells, Methods Enzymol. 202: 2699-2705, 1991

Winter y Harris, TIPS 14: 139, 1993

Young *et al.*, Nat. Biotechnol. 16(10): 946-950, 1998

Xing *et al.*, Oral Diseases: 4, 241-247, 1998

Zhang y Madden, Genome Res.: 7,649-656, 1997

Zhang *et al.*, Cancer Res.: 55, 428-433, 1995

Lista de secuencias

<110> Mediatech Research Limited
Brownlee (EE.UU. sólo), Gary Russell
Brown (EE.UU. sólo), Tracey Jean

<120> LA MODULACIÓN DE HIALURONANO SINTASA Y SU DEGRADACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD

<130> 12509900/EJH/HPM

<150> AU 2003905551
<151> 10-10-2003

<150> AU 2003906658
<151> 01-12-2003

<160> 51
<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 27
<212> ADN
<213> ser humano

<400> 1

gagctgaaca agatgcattg tgagagc

	<210> 2	
	<211> 29	
	<212> ADN	
5	<213> ser humano	
	<400> 2	
10	gacatgggtgc ttgatgtatg atcttccat	29
	<210> 3	
	<211> 18	
	<212> ADN	
15	<213> ser humano	
	<400> 3	
	gcacagatgc gtaaggag	18
20	<210> 4	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
	<400> 4	
25	gctgtgtaca tgacctcgcg ctgcccgc	29
	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> ADN	
30	<213> ser humano	
	<400> 5	
	ggcgggaagt aaactcgac	19
35	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
40	<400> 6	
	cctgcatcag cggctctcta	20
	<210> 7	
	<211> 18	
45	<212> ADN	
	<213> ser humano	
	<400> 7	
50	gccggtcatc cccaaaag	18
	<210> 8	
	<211> 27	
	<212> ADN	
55	<213> ser humano	
	<400> 8	
	aacctcttgc agcagtttct tgaggcc	27
60	<210> 9	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
	<400> 9	
65	cagtctctggc ttcgagcag	19

	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
5		
	<400> 10	
	ttgggagaaa agtctttggc t	21
10		
	<210> 11	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
15		
	<400> 11	
	ccattgaacc agagactga aacagccc	28
20		
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
	<400> 12	
	ttgcactgtg gtcgtcaact t	21
25		
	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
30		
	<400> 13	
	gtcgagggtca-aacgttgtga g	21
35		
	<210> 14	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
	<400> 14	
	tcaaatcaaa aacaggcagg tacaggtagt gg	32
40		
	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
45		
	<400> 15	
	aaggtgaagg tcggagtcaa c	21
50		
	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
55		
	<400> 16	
	gagttaaaag cagccctggt g	21
60		
	<210> 17	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
	<400> 17	
	tttggtcgta ttgggcgcct gg	22
65		
	<210> 18	
	<211> 27	

	<212> ADN <213> ser humano	
5	<400> 18 gcacagggaa gtcacagatg tatgtgc	27
10	<210> 19 <211> 24 <212> ADN <213> ser humano	
15	<400> 19 ccactggtca cggtcaggat gaag	24
20	<210> 20 <211> 25 <212> ADN <213> ser humano	
25	<400> 20 gatgtgtatc gccggttatc acgcc	25
30	<210> 21 <211> 25 <212> ADN <213> ser humano	
35	<400> 21 cgtagactgg gagtgcattg ttggc	25
40	<210> 22 <211> 23 <212> ADN <213> ser humano	
45	<400> 22 gcactgatgg aggatacgtc gcg	23
50	<210> 23 <211> 25 <212> ADN <213> ser humano	
55	<400> 23 gctggtgact gcaggccatc gctgc	25
	<210> 24 <211> 21 <212> PRT <213> ser humano	
	<400> 24 Ala Ala Arg Gly Pro Leu Asp Ala Ala Thr Cys Arg Ala Leu Leu Tyr	
	1 5 10 15	
	Pro Arg Ala Arg Val	
	20	
55	<210> 25 <211> 11 <212> PRT	

ES 2 437 491 T3

<213> ser humano

<400> 25

Gly Gly Leu Val Arg Ser Val Ala His Glu Ala

1 5 10

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> ser humano

<400> 26

Gly Ala Tyr Arg Glu Val Glu Ala Glu Asp Pro Gly Arg Leu Ala Val

1 5 10 15

Glu

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> ser humano

<400> 27

Cys Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Gly Gly Thr Cys Cys

1 5 10 15

Thr Cys Thr Ala

20

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> ser humano

<400> 28

Cys Ala Gly Thr Cys Cys Thr Gly Gly Cys Thr Thr Cys Gly Ala Gly

1 5 10 15

Cys Ala Gly

<210> 29

<211> 21

<212> PRT

<213> ser humano

<400> 29

Thr Thr Gly Cys Ala Cys Thr Gly Thr Gly Gly Thr Cys Gly Thr Cys
1 5 10 15

Ala Ala Cys Thr Thr
20

5 <210> 30
<211> 21
<212> PRT
<213> ser humano

<400> 30
Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr Cys Gly Gly Ala Gly
1 5 10 15

10 Thr Cys Ala Ala Cys
20

<210> 31
<211> 27
<212> PRT
<213> ser humano

15 <400> 31
Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Gly Thr Cys Ala Cys Ala
1 5 10 15

Gly Ala Thr Gly Thr Ala Thr Gly Thr Gly Cys
20 25

20 <210> 32
<211> 27
<212> PRT
<213> ser humano

<400> 32
Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Gly Thr Cys Ala Cys Ala
1 5 10 15

25 Gly Ala Thr Gly Thr Ala Thr Gly Thr Gly Cys
20 25

30 <210> 33
<211> 27
<212> PRT
<213> ser humano

<400> 33

Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Gly Thr Cys Ala Cys Ala

1

5

10

15

Gly Ala Thr Gly Thr Ala Thr Gly Thr Gly Cys

20

25

<210> 34

<211> 18

<212> PRT

<213> ser humano

<400> 34

Gly Cys Cys Gly Gly Thr Cys Ala Thr Cys Cys Cys Cys Ala Ala Ala

1

5

10

15

,

10 Ala Gly

<210> 35

<211> 21

<212> PRT

15 <213> ser humano

<400> 35

Thr Thr Gly Gly Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Thr Cys Thr Thr

1

5

10

15

Thr Gly Gly Cys Thr

- 20

20 <210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> ser humano

25 <400> 36

Gly Thr Cys Gly Ala Gly Gly Thr Cys Ala Ala Ala Cys Gly Thr Thr

1

5

10

15

Gly Thr Gly Ala Gly

20

<210> 37

<211> 21

<212> PRT

30 <213> ser humano

<400> 37

Gly Ala Gly Thr Thr Ala Ala Ala Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys

1 5 10 15

Thr Gly Gly Thr Gly

20

<210> 38

<211> 24

5 <212> PRT

<213> ser humano

<400> 38

Cys Cys Ala Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Gly Thr Thr Cys Ala

1 5 10 15

Gly Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly

20

10

<210> 39

<211> 25

<212> PRT

<213> ser humano

15

<400> 39

Cys Gly Thr Ala Gly Ala Cys Thr Gly Gly Gly Ala Gly Thr Gly Cys

1 5 10 15

Ala Thr Gly Gly Thr Thr Gly Gly Cys

20

25

20

<210> 40

<211> 25

<212> PRT

<213> ser humano

<400> 40

Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys

1 5 10 15

Cys Ala Thr Cys Gly Cys Thr Gly Cys

25

20

25

<210> 41

<211> 27

<212> PRT

30 <213> ser humano

<400> 41

Ala Ala Cys Cys Thr Cys Thr Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr
1 5 10 15

Thr Thr Cys Thr Thr Gly Ala Gly Gly Cys Cys
20 25

<210> 42
<211> 28
<212> PRT
<213> ser humano

<400> 42
Cys Cys Ala Thr Thr Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys
1 5 10 15

Thr Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Cys Cys Cys
20 25

<210> 43
<211> 32
<212> PRT
<213> ser humano

<400> 43
Thr Cys Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala Ala Ala Cys Ala Gly Gly
1 5 10 15

Cys Ala Gly Gly Thr Ala Cys Ala Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gly Gly
20 25 30

<210> 44
<211> 22
<212> PRT
<213> ser humano

<400> 44
Thr Thr Thr Gly Gly Thr Cys Gly Thr Ala Thr Thr Gly Gly Gly Cys
1 5 10 15

Gly Cys Cys Thr Gly Gly
20

<210> 45
<211> 27
<212> PRT
<213> ser humano

<400> 45

Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala Cys Ala Ala Gly Ala Thr Gly Cys
1 5 10 15

Ala Thr Thr Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Cys
20 25

<210> 46
<211> 29
<212> PRT
<213> ser humano

<400> 46
Gly Ala Cys Ala Thr Gly Gly Thr Gly Cys Thr Thr Gly Ala Thr Gly
1 5 10 15

Thr Ala Thr Gly Ala Thr Cys Thr Thr Cys Cys Ala Thr
20 25

<210> 47
<211> 18
<212> PRT
<213> ser humano

<400> 47
Gly Cys Ala Cys Ala Gly Ala Thr Gly Cys Gly Thr Ala Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Gly

<210> 48
<211> 29
<212> PRT
<213> ser humano

<400> 48
Gly Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Cys Ala Thr Gly Ala Cys Cys Thr
1 5 10 15

Cys Gly Cys Gly Cys Thr Thr Gly Cys Cys Gly Cys Cys
25 20 25

<210> 49
<211> 19
<212> PRT
<213> ser humano

<400> 49

ES 2 437 491 T3

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Cys Thr Cys

1 5 10 15

Gly Ala Cys

5 <210> 50
<211> 30
<212> PRT
<213> ser humano

<400> 50
Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Cys Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Thr

1 5 10 15

Ala Cys Thr Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Cys Ala Ala Ala

10 20 25 30

15 <210> 51
<211> 20
<212> PRT
<213> ser humano

<400> 51
Gly Cys Gly Ala Thr Cys Thr Cys Gly Gly Cys Thr Cys Ala Cys Thr

1 5 10 15

Gly Cys Ala Ala

20

REIVINDICACIONES

1. Compuesto aislado que reduce el nivel de actividad hialuronano sintasa (HAS)1, siendo dicho compuesto un anticuerpo específico para una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 25 ó 26.
2. Compuesto aislado según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal y un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo desimmunizado.
3. Compuesto aislado según la reivindicación 1 ó 2, para su uso en terapia.
4. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1 ó 2 y uno o más portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
5. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 ó 2 en la fabricación de un medicamento para su administración a un sujeto en una cantidad eficaz para reducir el nivel y/o la actividad de HAS.
6. Uso según la reivindicación 5, en el que el sujeto es un ser humano.
7. Uso según la reivindicación 5 ó 6, para tratar cáncer.
8. Compuesto para su uso en la reducción del nivel y/o la actividad de HAS en un sujeto, siendo dicho compuesto tal como se define en la reivindicación 1 ó 2.
9. Compuesto según la reivindicación 8, en el que el sujeto es un ser humano.
10. Compuesto según la reivindicación 8 ó 9, para su uso en el tratamiento de cáncer.

FIGURA 1

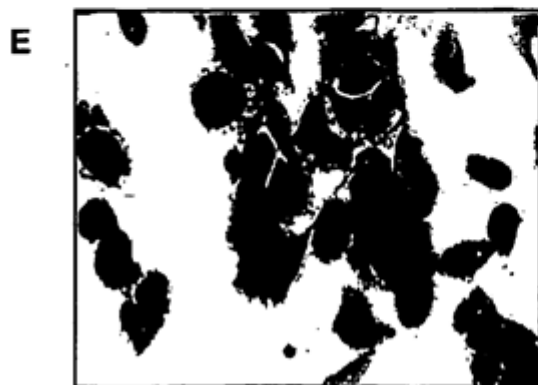
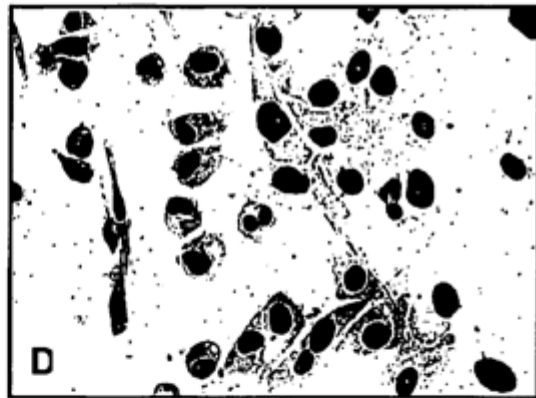
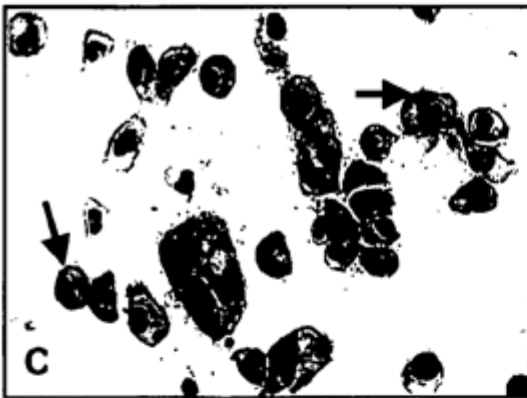
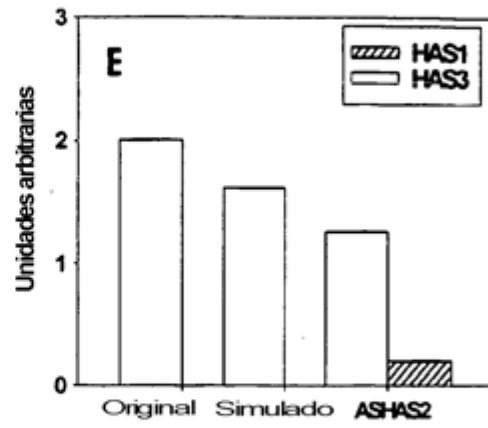
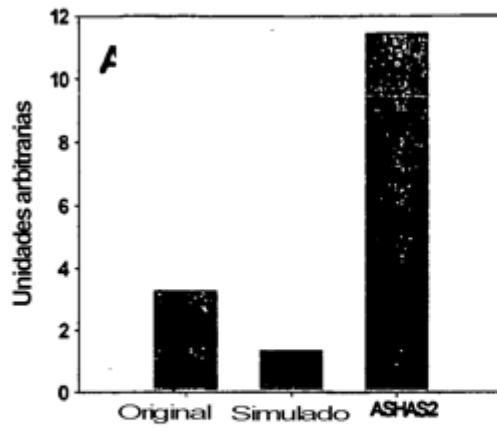


FIGURA 2

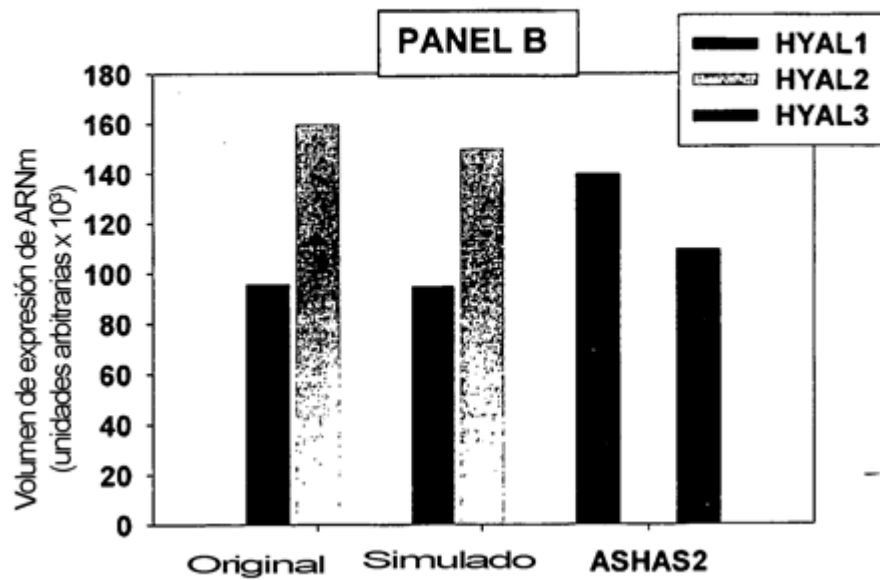
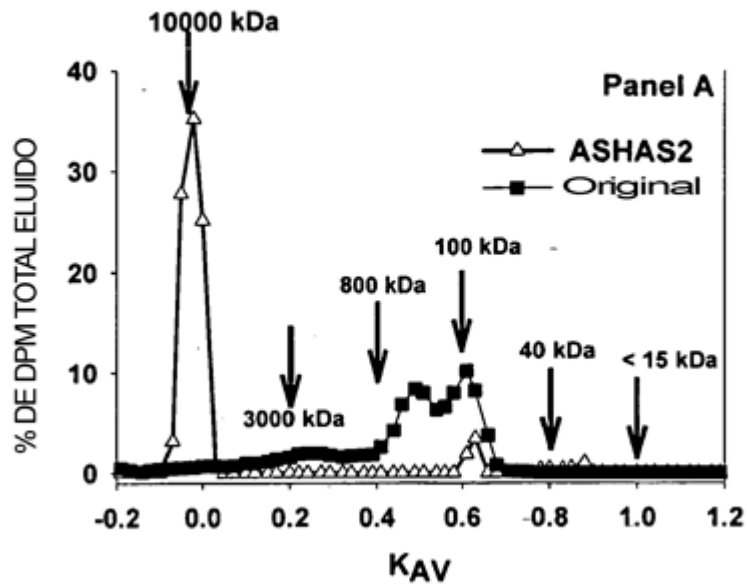


FIGURA 3

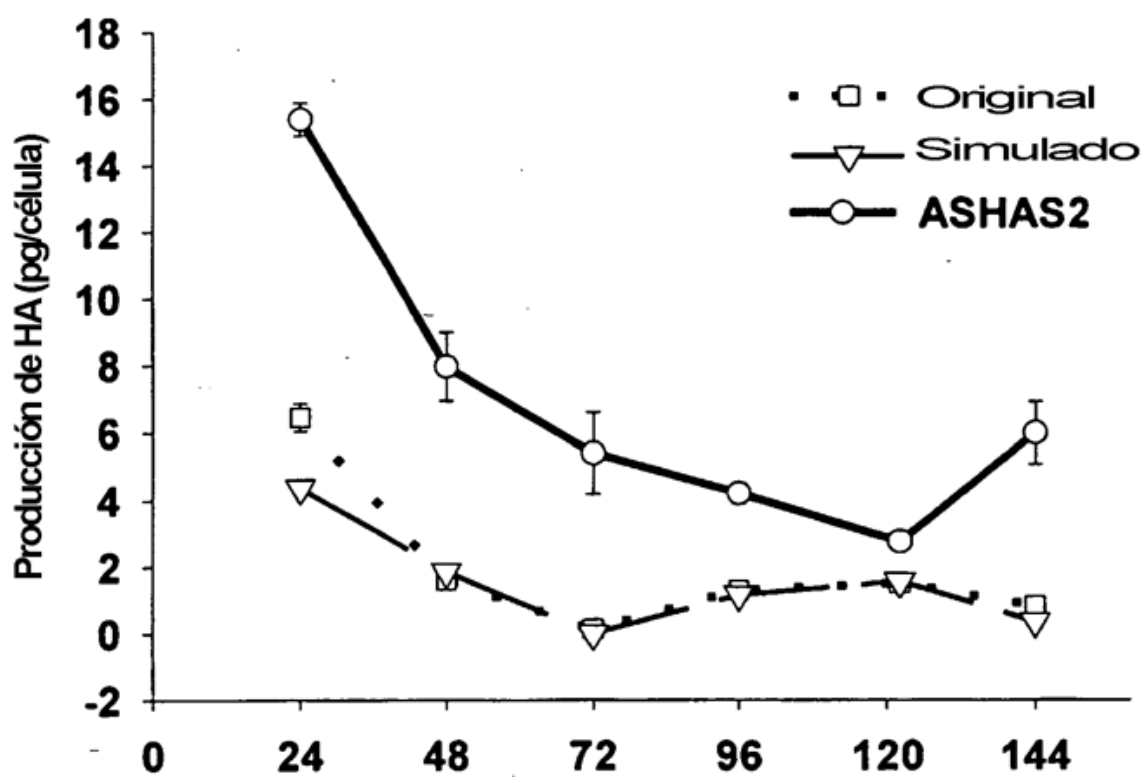


FIGURA 4

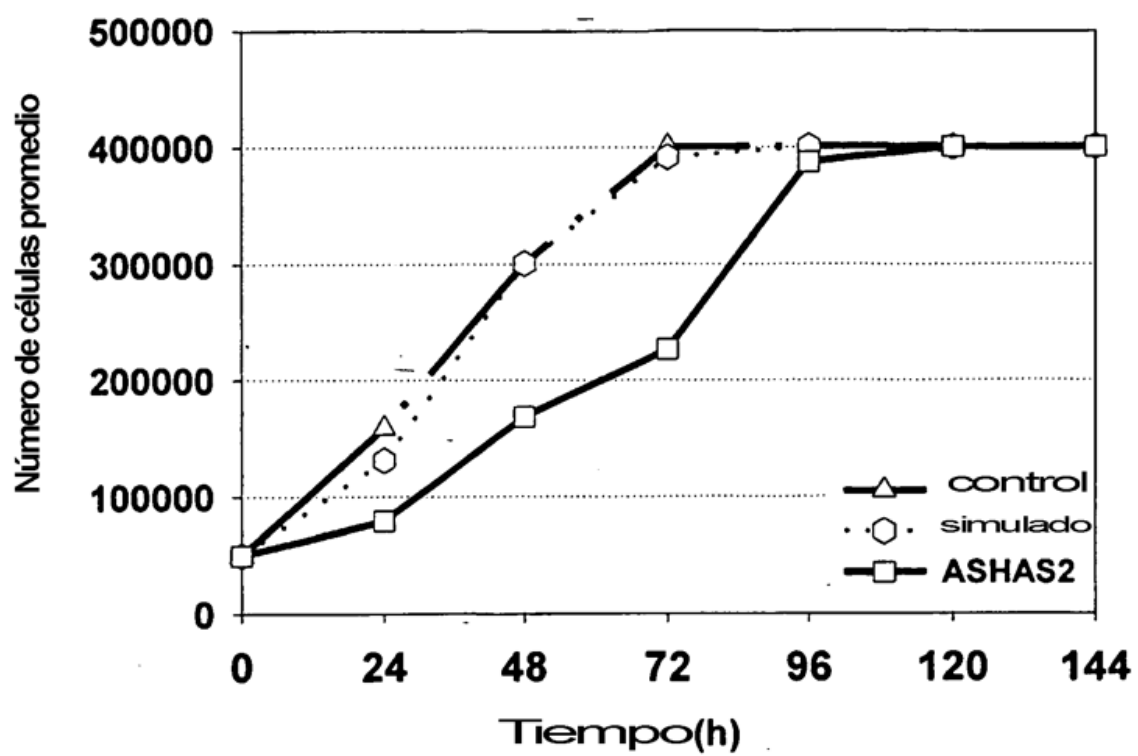
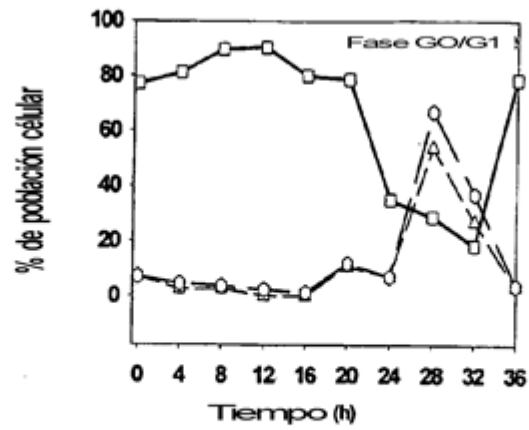
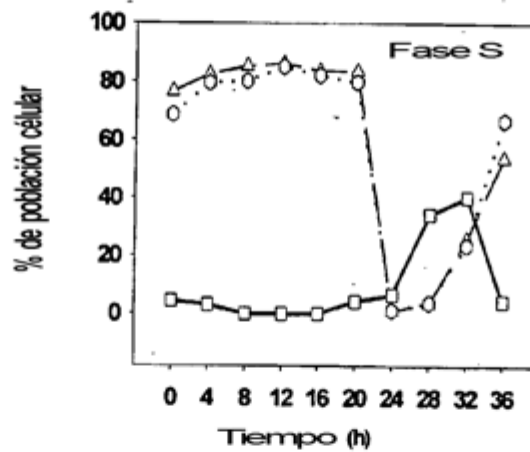


FIGURA 5

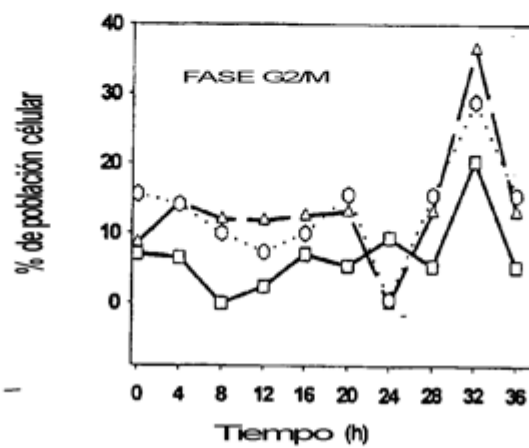


PANEL A



PANEL B

△ - Control
○ - Simulado
□ - ASHAS2



PANEL C

FIGURA 6

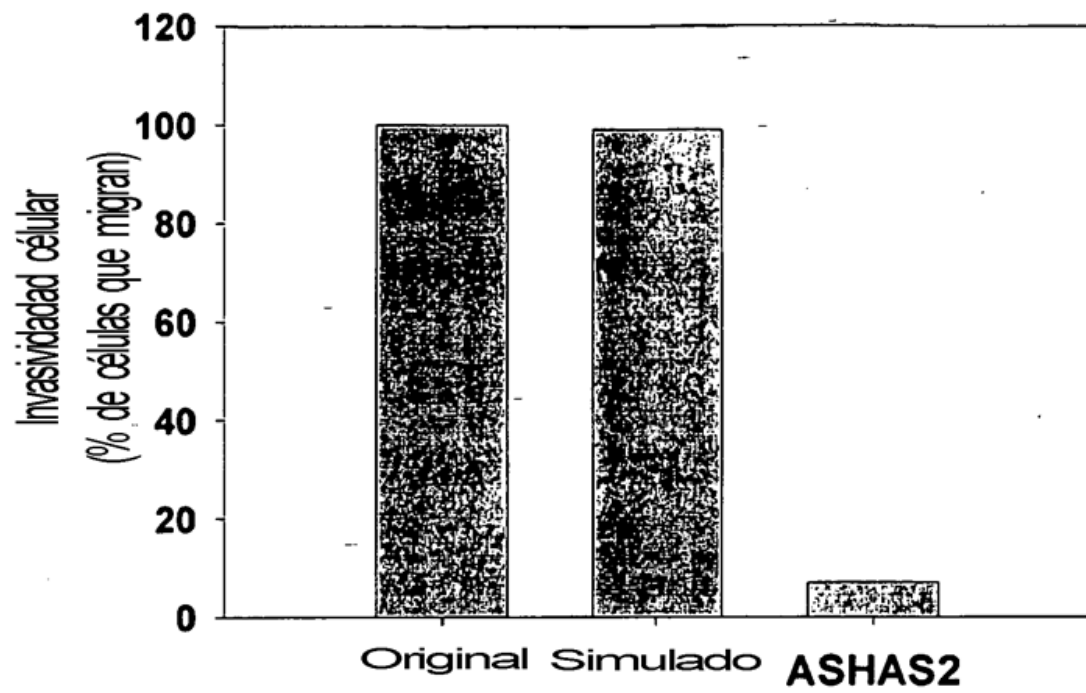


FIGURA 7

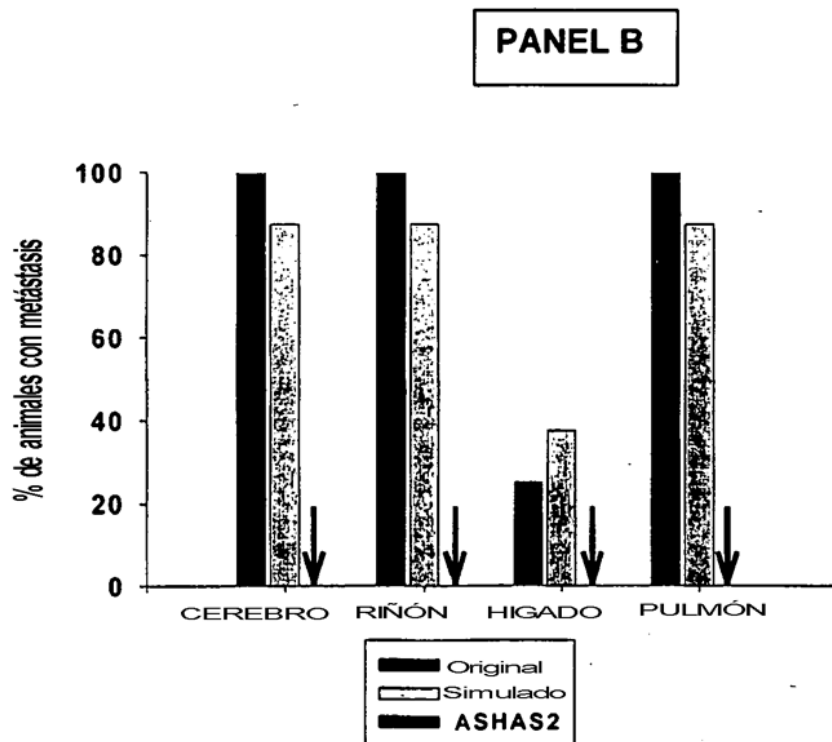
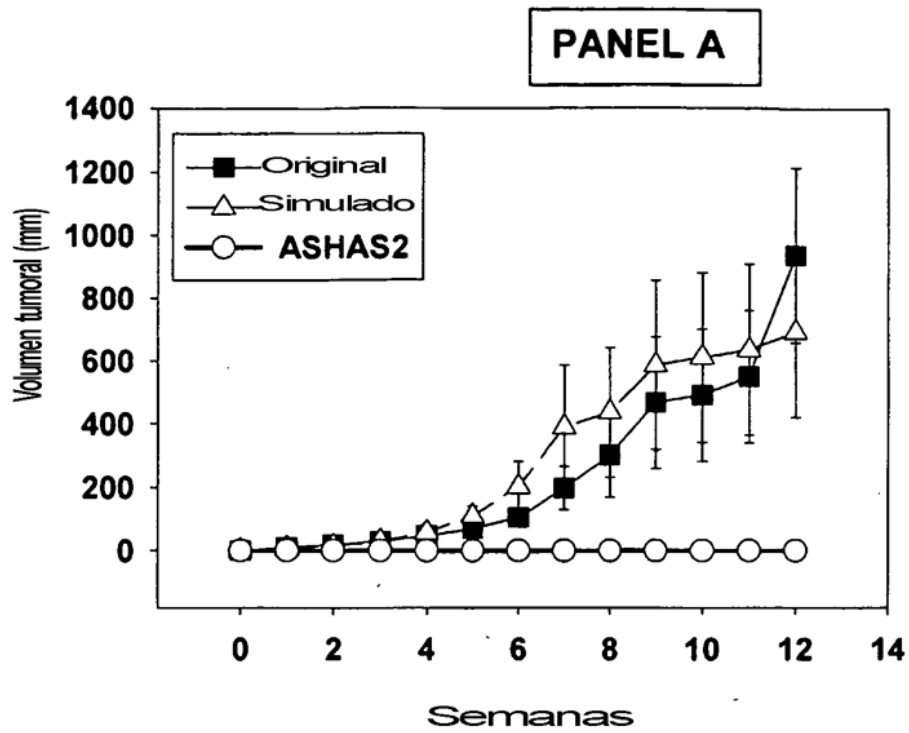


FIGURA 8

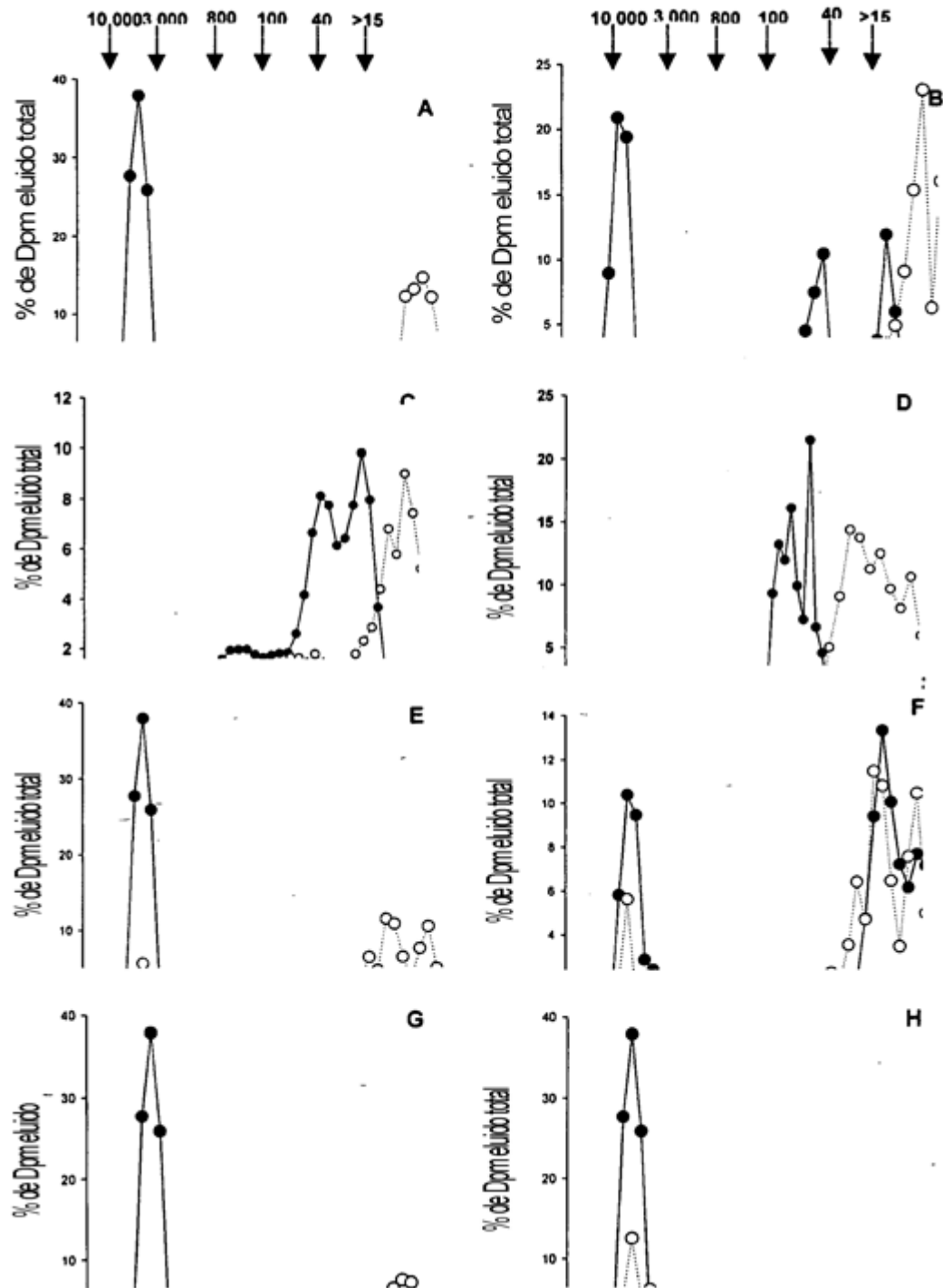
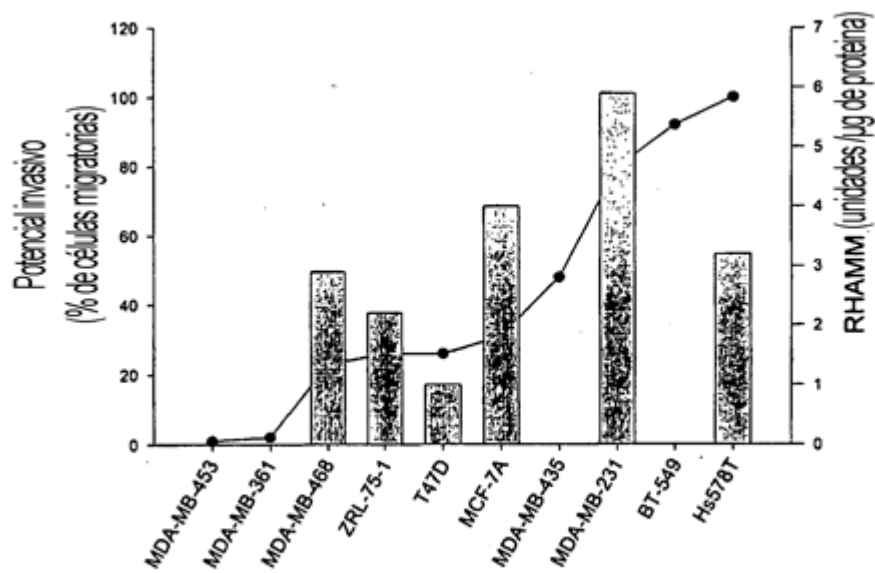
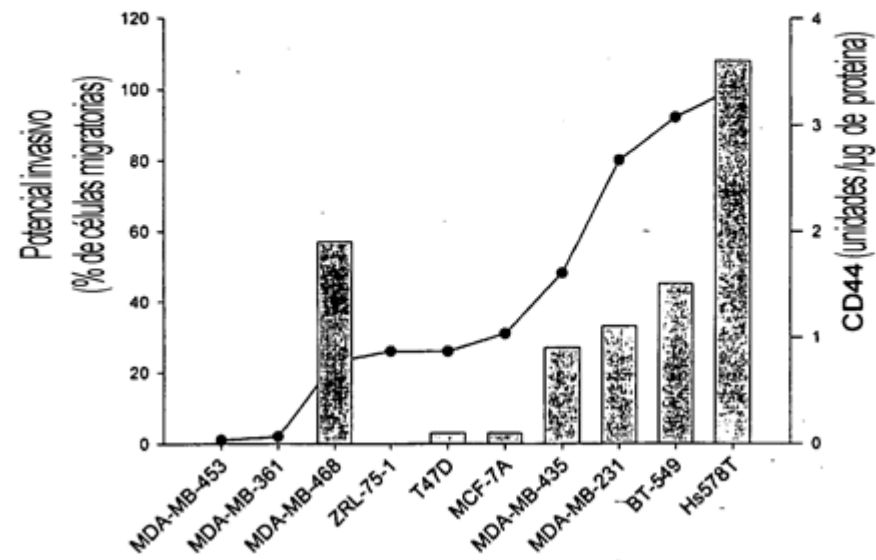


FIGURA 9



Líneas celulares de cáncer de mama

FIGURA 10

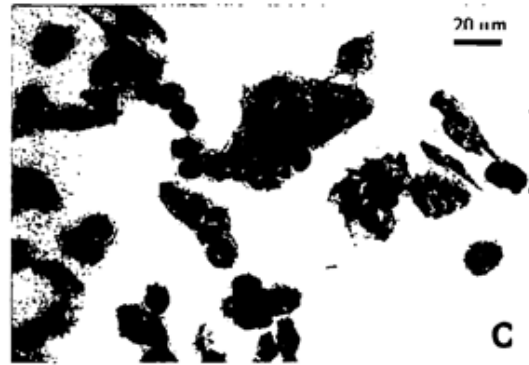
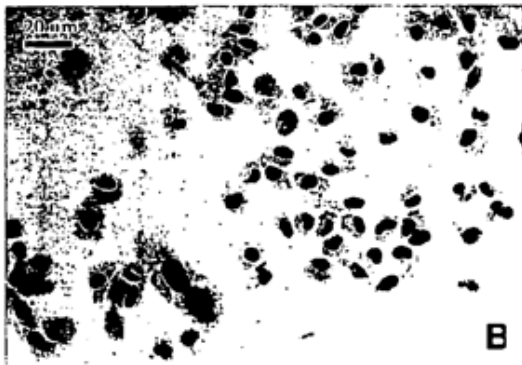
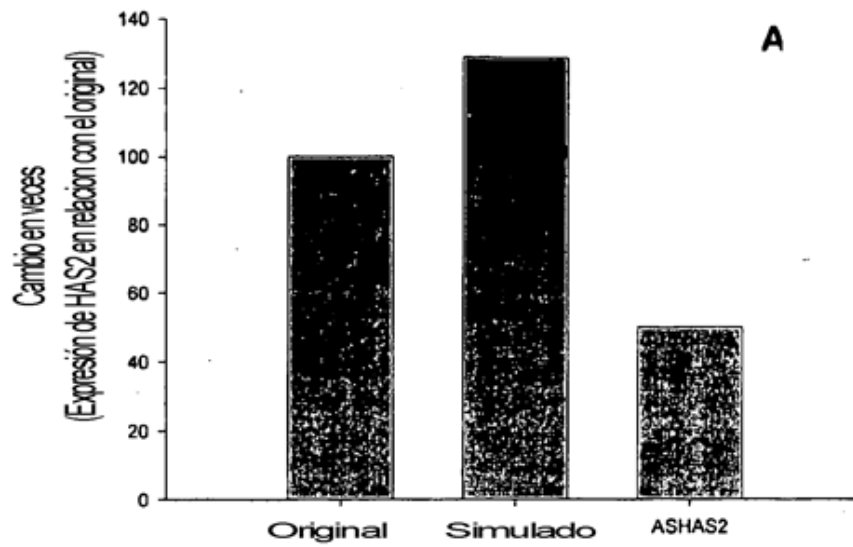


FIGURA 11

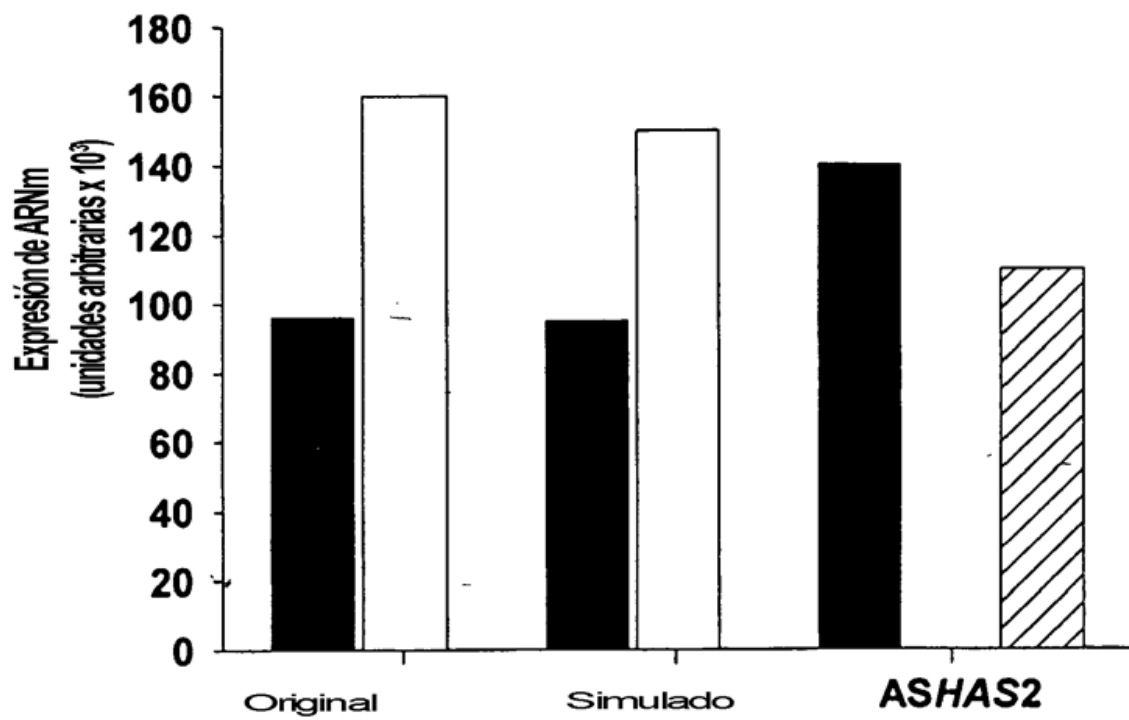


FIGURA 12



FIGURA 13

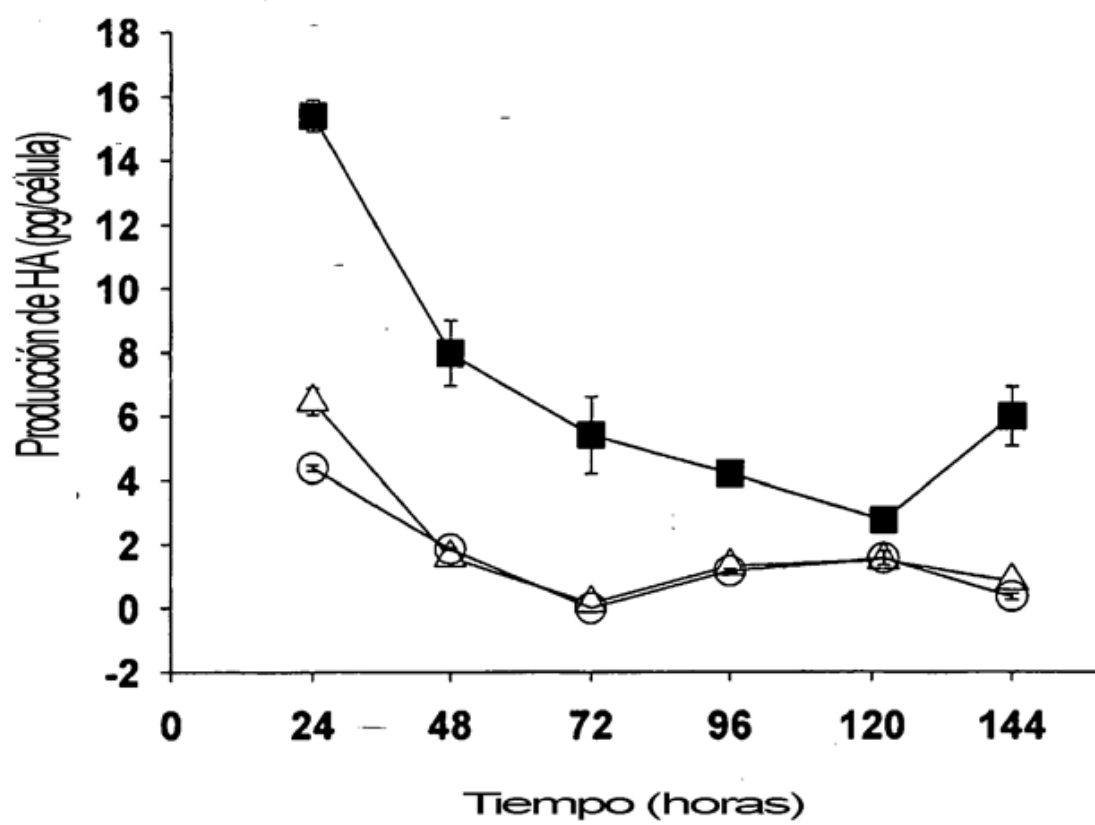


FIGURA 14

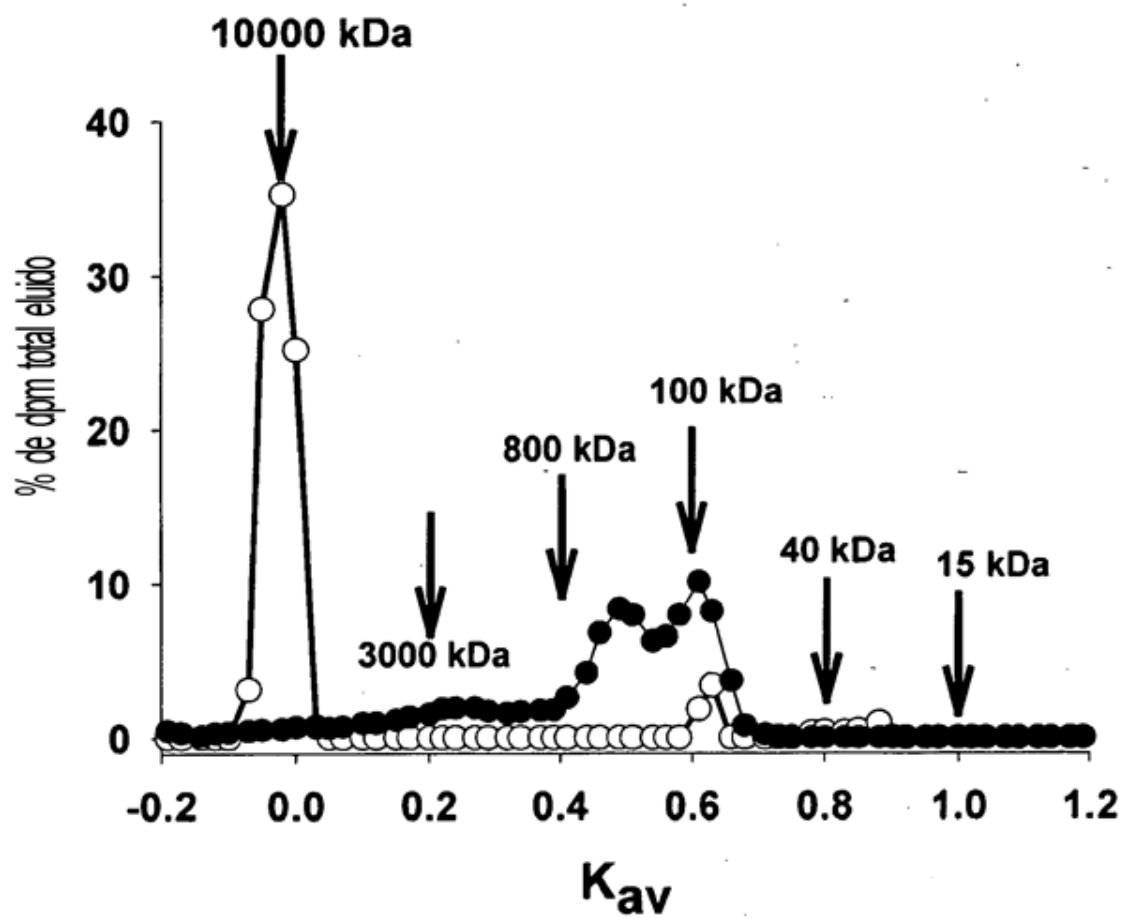


FIGURA 15

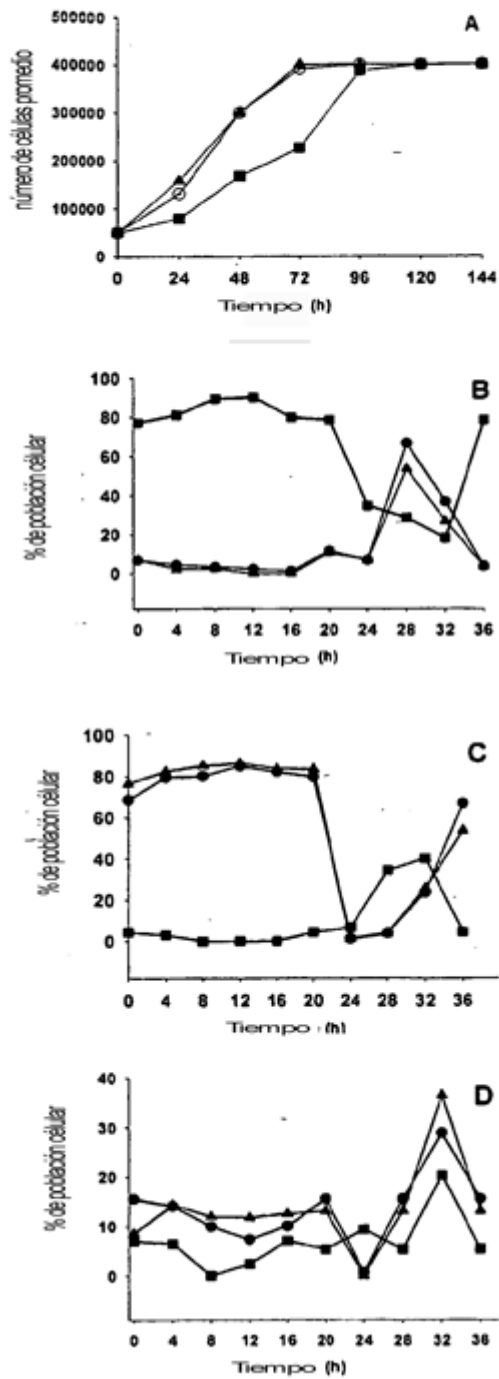


FIGURA 16

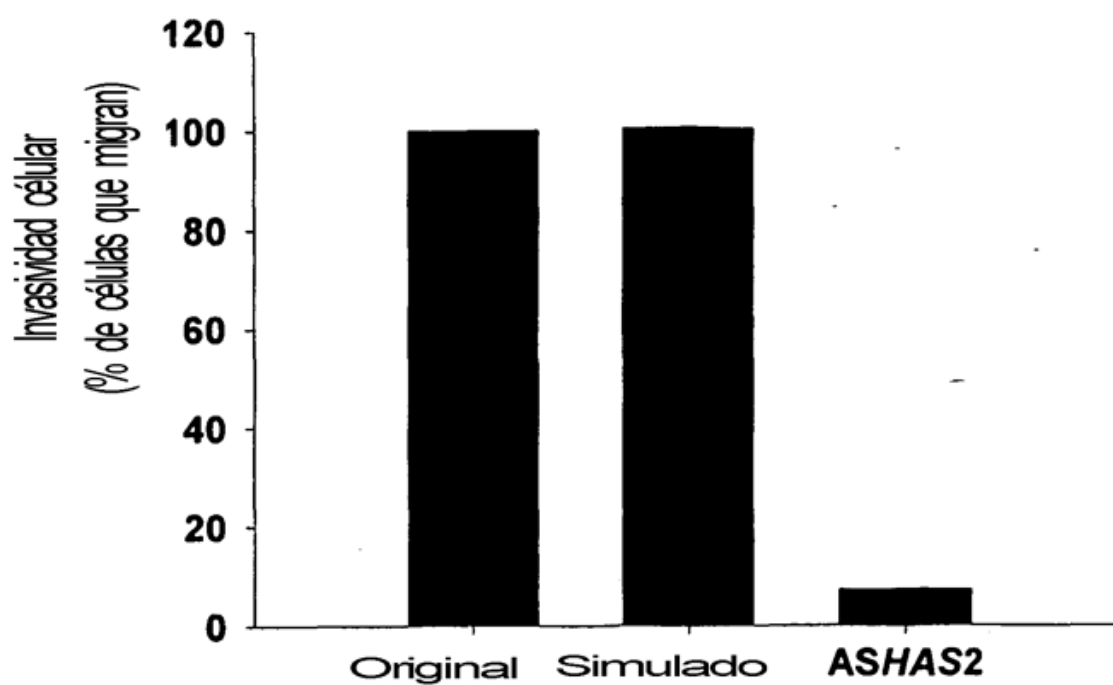


FIGURA 17

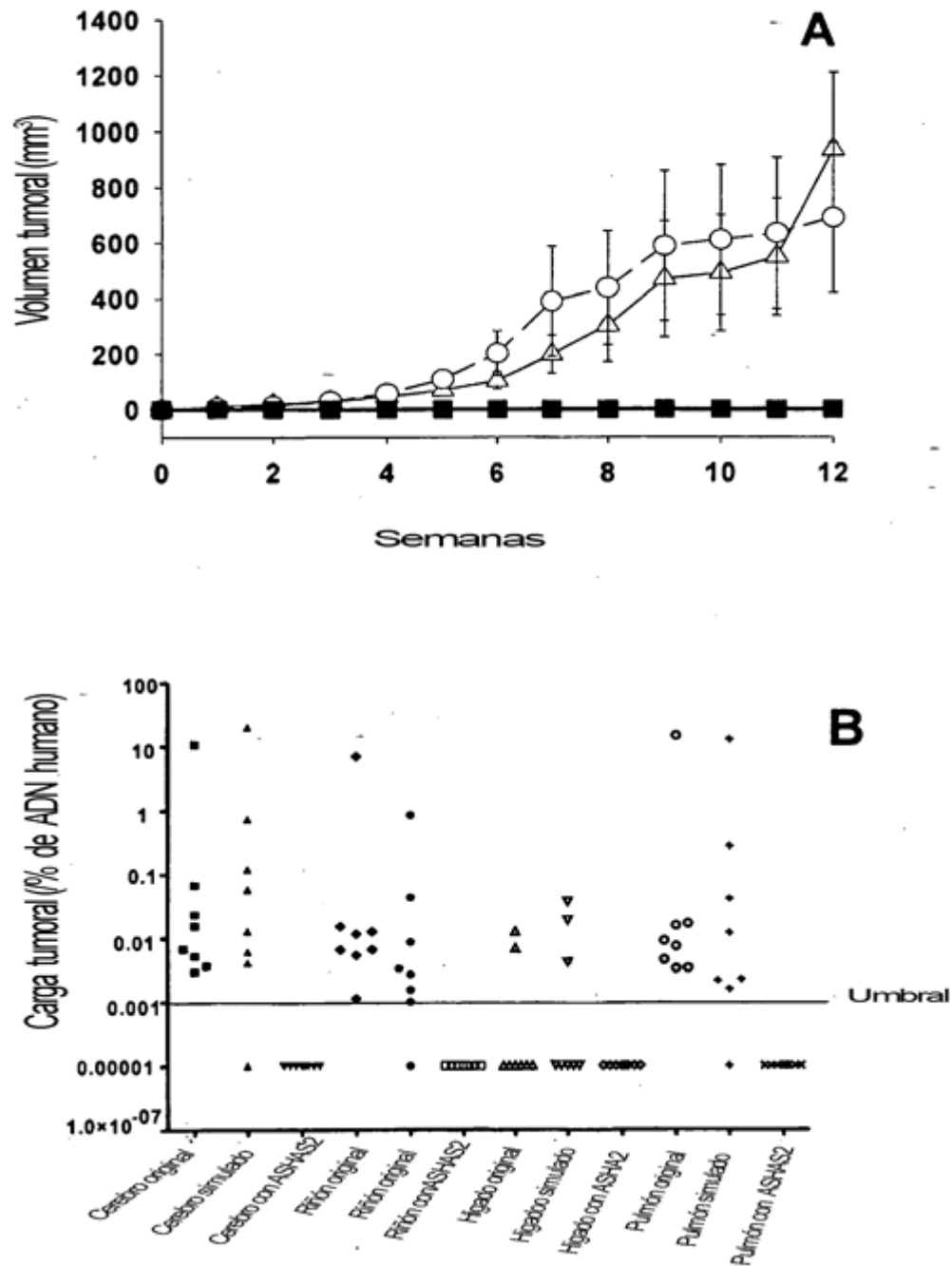


FIGURA 18

