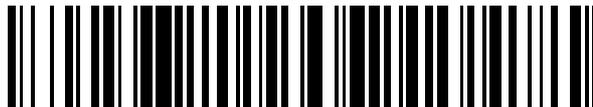


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 963**

51 Int. Cl.:

A61P 17/02 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2008** **E 08846548 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015** **EP 2217062**

54 Título: **Terapéutica con ARNi multidirigidos para la cicatrización de heridas de la piel sin cicatriz**

30 Prioridad:

06.11.2007 US 985820 P

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

17.09.2015

73 Titular/es:

**SIRNAOMICS, INC. (100.0%)
401 PROFESSIONAL DRIVE, SUITE 130
GAITHERSBURG, MD 20879, US**

72 Inventor/es:

**LU, PATRICK Y.;
LI, LING y
SIMONENKO, VERA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 545 963 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

Terapéutica con ARNi multidirigidos para la cicatrización de heridas de la piel sin cicatriz

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para mejorar la cicatrización de heridas de la piel y otras dolencias de la piel sin cicatriz, tales como soriasis y lesiones cutáneas producidas por lupus, usando composiciones de moléculas de ARN de interferencia pequeño (ARNip) con múltiples secuencias de oligonucleótidos dirigidas a múltiples genes causantes de enfermedad.

Antecedentes

La piel, el mayor órgano del cuerpo, está constituido por una capa mesenquimatosa (dermis) subyacente y una capa epitelial (epidermis) externa. La función principal de la piel es servir como barrera de protección contra el medio ambiente. La pérdida de integridad de grandes porciones de la piel como resultado de lesiones o enfermedad puede dar lugar a una discapacidad importante o incluso a la muerte. Anualmente en EE.UU., más de 1,25 millones de personas sufren quemaduras y 6,5 millones padecen úlceras cutáneas crónicas causadas por presión, estasis venosa o diabetes mellitus. Los principales objetivos del tratamiento de las heridas son un rápido cierre de la herida y una cicatriz funcional y estéticamente satisfactoria (1). Los recientes avances en biología celular y molecular han expandido considerablemente nuestros conocimientos sobre los procesos biológicos implicados en la reparación de heridas y en la regeneración tisular, y han dado lugar a mejoras en el cuidado de heridas (2).

Cicatrización de heridas: una respuesta a la lesión cutánea

La respuesta a las lesiones es una respuesta inmunitaria esencial del huésped filogenéticamente primitiva aunque innata para restablecer la integridad tisular. La rotura de los tejidos en los vertebrados superiores, al contrario que en los vertebrados inferiores, no da lugar a regeneración tisular sino un rápido proceso de reparación que produce una cicatriz fibrótica. La cicatrización de heridas, iniciada por un traumatismo, microbios o materiales extraños, procede a través de un patrón solapante de acontecimientos en los que se incluyen coagulación, inflamación, epitelización, formación de tejido de granulación, remodelación de matriz y tejido. El proceso de reparación está mediado, en gran parte, por la interacción de señales moleculares, principalmente citocinas, que motivan y orquestan las diversas actividades celulares que destacan inflamación y cicatrización. La respuesta a las lesiones con frecuencia se modeliza en la piel (1), pero en la mayoría de los tejidos después de la lesión se producen en paralelo patrones de mediadores y acontecimientos celulares coordinados y regulados temporalmente. La lesión inicial desencadena la coagulación y una respuesta de inflamación local aguda, seguida de reclutamiento de células mesenquimatosas, proliferación y síntesis de matriz. El fracaso en la resolución de la inflamación puede producir heridas crónicas que no cicatrizan, mientras que la acumulación incontrolada de la matriz, que a menudo implica vías de citocinas aberrantes, conduce a un exceso de cicatrización y secuelas fibróticas. El progreso continuo en descifrar el papel de las citocinas en la cicatrización de heridas proporciona oportunidades para explorar vías para inhibir/potenciar que las citocinas adecuadas controlen o modulen la cicatrización patológica.

Las heridas fetales cicatrizan más rápido y sin cicatriz

La cicatrización de heridas es un proceso interactivo y dinámico que implica a mediadores solubles, células sanguíneas, matriz extracelular y células parenquimatosas. La cicatrización de heridas tiene tres fases, inflamación, formación de tejido y remodelación tisular, que se solapan en el tiempo (1,2). Durante el desarrollo embrionario de la piel, los queratinocitos se originan a partir de una capa basal monocelular en proliferación, sufren detención del crecimiento y migran hacia arriba en un programa estrechamente controlado de diferenciación para producir las capas morfológicamente distintas de la epidermis. Usando un programa similar, la epidermis se renueva de forma constante durante la vida del organismo. La piel del mamífero adulto también tiene tremendas capacidades para reparar la siguiente lesión. No obstante, las respuestas que se han optimizado para un cierre rápido de la herida y la prevención de infecciones tienen como resultado un restablecimiento imperfecto de la piel, como muestra la cicatrización epidérmica y dérmica.

En contraste con la reparación de la piel de adulto, las heridas cutáneas en el feto de mamífero producidas al principio de la gestación cicatrizan mediante un proceso de regeneración en el que las capas epidérmica y dérmica se reconstituyen perfectamente sin formación de cicatriz (1,2). Existen varios contrastes importantes en la evolución de la cicatrización de heridas en el feto frente al adulto. Las heridas del feto se cierran más rápido, muestran poca o ninguna respuesta inflamatoria (3) y exhiben un perfil diferente de expresión de citocinas/factor de crecimiento, generalmente con niveles menores (4).

El anticuerpo frente al TGF-β redujo parcialmente la cantidad de cicatrización

Las pruebas demuestran que la cicatrización de heridas está regulada por un grupo de citocinas, factores de crecimiento y sus receptores (5-7). Influyen sobre la migración celular, el crecimiento y la proliferación de un modo

complejo y orquestado, y están implicados en la infiltración de neutrófilos y macrófagos, la angiogénesis, la fibroplasia, el depósito de matriz, la cicatrización y la reepitelización. Además de las plaquetas y los macrófagos, los fibroblastos son la principal fuente celular de citocinas o factores de crecimiento durante la cicatrización de heridas. La cicatrización de heridas sin cicatriz en la piel fetal al principio de la gestación es el resultado del único perfil de citocina y factor de crecimiento.

De estos, el factor transformante de crecimiento beta (TGF- β) ha sido el más estudiado, ya que está implicado en la transición entre la cicatrización sin cicatriz y la reparación con formación de cicatriz. Denominados factores de crecimiento por motivos históricos, su principal función es controlar la proliferación y diferenciación celular, y estimular la síntesis de matriz extracelular, tal como colágeno. Mediante inmunohistoquímica se ha descubierto TGF- β en piel fetal no dañada y se expresan niveles elevados de TGF- β a edades gestacionales asociadas con la reparación sin cicatriz. La aplicación exógena de TGF- β a heridas fetales normalmente sin cicatriz dio lugar a la formación de cicatriz y se observó una respuesta inflamatoria como la del adulto. La naturaleza profibrótica del TGF- β se confirmó en heridas de raras adultas, dado que los anticuerpos neutralizantes del TGF- β redujeron parcialmente la cantidad de cicatrización. El TGF- β estimula la producción de colágeno I, que es el tipo de colágeno que predomina en la piel de adulto. Por otro lado, los anticuerpos neutralizantes del TGF- β no previenen completamente la cicatrización en la piel adulta y en estudios recientes se ha cuestionado la eficacia de TGF- β como factor dominante de formación de cicatriz (8-15).

En estudios también se ha encontrado la expresión disminuida y rápidamente eliminada de TGF-beta 1 and -beta 2, acompañada de un incremento y prolongación de los niveles de TGF-beta 3 en animales E16 heridos se correlaciona con el depósito organizado de colágeno. Por el contrario, la expresión incrementada y prolongada de TGF-beta 1 y -beta 2, acompañada de una disminución y un retraso de la expresión de TGF-beta 3 en animales E19 heridos se correlaciona con una arquitectura desorganizada del colágeno. Esto significa que el incremento de la expresión de TGF-beta 1, -beta 2, y la disminución de la de TGF-beta 3 son responsables de la formación de cicatrices en el feto al final de la gestación. Estas observaciones tienen amplias implicaciones en la comprensión del papel del TGF- β en la respuesta de cicatrización endógena de heridas, en cuanto a que un exceso de TGF- β puede ser un constituyente normal de la respuesta para una protección rápida y óptima del huésped. En ausencia de infección, la reducción de este hiperexuberante reclutamiento, la inflamación y la supresión de queratinocitos puede tener como resultado una cicatriz estéticamente más aceptable.

El inhibidor de la COX-2 reduce la formación de tejido cicatricial y potencia la resistencia a la tracción

Aunque las interleucinas IL-6, IL-8, and IL-10 se han estudiado en la reparación de heridas fetales, la COX-2 también ha recibido gran atención recientemente por su implicación en enfermedades asociadas con afecciones inflamatorias de regulación alterada, tales como artritis reumatoide y artrosis, enfermedad cardiovascular, y el proceso de carcinogénesis (16-20). La COX-2 sufre una regulación por aumento inmediata-temprana en respuesta a un estímulo inflamatorio (20, 21), tal como una herida. Funciona produciendo prostaglandinas que controlan muchos aspectos de la inflamación resultante, incluyendo la inducción de permeabilidad vascular y la infiltración y activación de células inflamatorias (22). El interés en el papel de la vía de la COX-2 y otros aspectos de la inflamación en el proceso de reparación de heridas en el adulto es cada vez mayor (35), ya que se ha demostrado que estos acontecimientos tempranos regulan el resultado de la reparación. Basándose en la participación de la COX-2 en la inflamación y la reciente demostración de que contribuye a varios aspectos de la reparación de heridas en el adulto (23-25), se ha estudiado el papel de la COX-2 en el proceso de cicatrización de heridas en fetos. Estos estudios demuestran la existencia de una expresión diferencial de la enzima COX-2 en las heridas en el feto producidas de forma temprana y tardía en la gestación.

Adicionalmente, la PGE₂, un producto de la COX-2 que se ha demostrado que participa en muchos procesos en la piel, produjo un retraso en la cicatrización y la producción de cicatriz cuando se introdujo en heridas tempranas en el feto. La participación de la vía de la COX-2 en la formación de cicatrices se destaca adicionalmente por el hecho de que el incremento de los niveles de PGE₂ en heridas sin cicatriz tiene como resultado la conversión de un proceso de cicatrización sin cicatriz en uno de reparación con generación de una cicatriz. La introducción de PGE₂ indujo inflamación en cicatrices fetales ("6), aunque su efecto sobre el depósito de colágeno o la fibrosis no se examinó. Si la PGE₂ muestra propiedades inmunosupresoras o antiinflamatorias o en su lugar actúa como molécula proinflamatoria, con mayor probabilidad es el resultado de las diferencias en la expresión o actividad de los receptores por la PGE₂. Existen varios mecanismos plausibles por los cuales la PGE₂ podría estar induciendo la formación de cicatrices en heridas fetales. La PGE₂ podría potenciar la inflamación aguda, que ya se sabe que interfiere en la cicatrización sin cicatriz, de modo que de forma indirecta estimula la formación de cicatriz a través del reclutamiento y la activación de células inflamatorias. El tratamiento con PGE₂ podría retrasar la cicatrización y estimular el depósito de tejido cicatricial mediante incrementos del TGF β 1 profibrótico (27). Se ha demostrado que la alteración de la vía de señalización del TGF β en ratones deficientes en smad3 acelera la velocidad de cicatrización y gran cantidad de datos demuestran que niveles restringidos de TGF β 3 son cruciales para la cicatrización sin cicatriz. Por último, no hay datos que demuestren que un incremento de la proliferación de fibroblastos en respuesta a la PGE₂ sugiere que la PGE₂ podría estimular directamente la proliferación de fibroblastos, amplificación de la producción de colágeno y cicatrización. Esta idea también está apoyada por estudios anteriores en los que se demuestra la existencia de un incremento en el depósito de colágeno y la proliferación mediante fibroblastos tras la

exposición a PGE₂. La considerable cantidad de datos sugirió que los niveles bajos de expresión de COX-2 y PGE₂ pueden ser necesarios para la reparación sin cicatriz de la piel fetal. El hecho de que la PGE₂ induce formación de cicatriz en la piel fetal avala adicionalmente un papel de la vía de la COX-2 en la formación de cicatriz. Usando un inhibidor de la COX-2, celecoxib, para tratar heridas por incisión, se investigó el papel de la COX-2 en el proceso de cicatrización de heridas, con una inhibición significativa de varios parámetros de inflamación en el lugar de la herida (28). Esta disminución en la fase inflamatoria temprana de la cicatrización de heridas tuvo un profundo efecto sobre acontecimientos posteriores en el proceso de cicatrización de heridas, es decir una reducción en la formación de tejido cicatricial sin alterar la reepitelización ni disminuir la resistencia a la tracción.

10 Las heridas cutáneas de ratón defectivo para HoxB13 cicatrizan más rápido con menos formación de tejido cicatricial

Las familias conservadas en la evolución de los factores de transcripción Hox se han considerado candidatos atractivos para la regulación de la regeneración de la piel fetal debido a sus papeles cruciales para dirigir la diferenciación durante la organogénesis. En estudios se ha identificado un miembro concreto de la familia de proteínas Hox, *HoxB13*, como gen *Hox* predominante expresado en cultivos primarios de fibroblastos de piel procedente del segundo trimestre (29). Los posteriores estudios de cicatrización de heridas usando piel fetal del Segundo trimestre (que cicatriza sin cicatriz) y piel adulta humana demostraron que *HoxB13* se expresa de forma diferencial en heridas de feto frente a heridas de adulto. Es interesante el hecho de que la expresión de *HoxB13* estaba regulada por disminución en las heridas fetales frente a los controles sin heridas. Por el contrario, no hubo ningún cambio significativo en la expresión de *HoxB13* en heridas de adulto en comparación con los controles sin heridas. En conjunto, estos resultados sugieren que la regulación por disminución de la expresión de *HoxB13* puede ser necesaria para la cicatrización de heridas fetales sin cicatriz. También plantea la posibilidad de que reduciendo o eliminando el *HoxB13* de la piel adulta se podría mejorar la cicatrización de heridas.

Los estudios sobre cicatrización de heridas cutáneas producidas por escisión y por incisión en ratones defectivos (KO) en *HoxB13* demostraron que las heridas de KO *HoxB13* exhiben varias características de las heridas fetales producidas en fases tempranas de la gestación, como el cierre más rápido, un incremento de la resistencia a la tracción y menos cicatrización dérmica en comparación con las heridas de sus homólogos salvajes (SV). La evaluación bioquímica reveló que los niveles de HA en la epidermis y en la dermis son significativamente mayores en la piel de KO *HoxB13* adultos sin heridas en comparación con la piel SV. Usando una comparación histológica, las heridas producidas por incisión en KO *HoxB13* exhiben una mayor cicatrización con integridad dérmica mejor restablecida de las heridas en KO *HoxB13* que en las heridas SV. Las heridas por escisión producidas en ratones KO *HoxB13* adultos se cierran más rápido que las heridas producidas por escisión en SV. En las heridas producidas en ratones KO *HoxB13*, la agregación de colágeno es más laxa y más reticulada, lo que indica que el remodelado del colágeno en heridas producidas en ratones KO *HoxB13* está reconstituyendo una arquitectura dérmica más normal. Los análisis en micromatrices de la expresión génica en piel entera de ratones SV adultos o KO en *HoxB13* revelaron que los niveles de expresión de varios marcadores de la diferenciación epidérmica estaban significativamente reducidos en la piel de ratones adultos KO en *HoxB13* sin heridas en comparación con la piel de adultos SV sin heridas. Los estudios en ratones KO en *Hoxb 13* de cicatrización de heridas confirmaron que *Hoxb 13* era una potencial diana para la mejora de la cicatrización de heridas sin cicatriz (29-31).

Otros factores implicados en el proceso de cicatrización de heridas en la piel

La respuesta fetal a lesiones cutáneas difiere considerablemente de la del adulto, y procede únicamente con una inflamación mínima, mínima proliferación de fibroblastos y depósito de colágeno solo esencial. El efecto del *factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)* sobre acontecimientos en la matriz tanto celulares como extracelulares en un lugar de una herida fetal se ha investigado porque se sabe que el *PDGF* desempeña un papel importante en la regulación de la cicatrización de heridas en el adulto. Los implantes de heridas SILASTIC se recogieron después de 1, 3 o 5 días en el útero. Las muestras sufrieron procesamiento histológico estándar y se evaluaron. Los implantes tratados con *PDGF* tenían un marcado incremento de la inflamación aguda, el reclutamiento de fibroblastos y el depósito de colágeno y ácido hialurónico. Estas diferencias parecían depender considerablemente del tiempo y de la dosis de *PDGF*, y los datos sugieren que la reparación fetal procede en ausencia de *PDGF*.

Una característica fundamental de la cicatrización fetal sin cicatriz parecer ser una ausencia de inflamación en respuesta al acontecimiento de la formación de heridas. Por el contrario, las primeras fases de la cicatrización de heridas en la piel fetal tardía y adulta se caracterizan por una sólida respuesta inflamatoria y, en última instancia, una cicatriz permanente en la zona de la herida. Aunque las interleuquinas *IL-6* y *IL-8* se han estudiado en la reparación de heridas fetales, el papel de otros mediadores clásicos de la inflamación en la cicatrización sin cicatriz no se conoce. La proteína *Smad3* está implicada en la mediación de la señalización intracelular por miembros de la superfamilia del factor transformante de crecimiento beta y desempeña un papel crucial en la proliferación, diferenciación y migración celular y la elaboración de matriz fundamental para la cicatrización de heridas cutáneas. La comunicación entre *Smad3* y la señalización hormonal *in vitro* se ha sugerido como un importante mecanismo de control que regula las actividades celulares; no obstante, su relevancia *in vivo* se desconoce. Ashcroft GS *et al.* notificaron que *Smad3* desempeña un papel en la inhibición mediada por andrógenos de la cicatrización de heridas, pero no en las respuestas a la modulación de estrógenos *in vivo*. Ratones hembra con mutación completa de *Smad3*

y de tipo salvaje exhibieron una cicatrización retardada tras una ovariectomía, lo que podría invertirse mediante sustitución de estrógenos. Por el contrario, la castración aceleró la cicatrización en ratones macho de tipo salvaje y fue reversible mediante tratamiento con andrógenos exógenos. Es intrigante el hecho de que la modulación de los niveles de andrógenos no tuvo como resultado una alteración distinguible en la respuesta de cicatrización en los ratones con mutación completa de *Smad3*. Se podía estimular a monocitos mutantes con lipopolisacárido para producir agentes proinflamatorios específicos (factor inhibidor de macrófagos monocitos) de un modo similar a las células de tipo salvaje, pero exhibían una respuesta débil a la estimulación mediada por andrógenos al tiempo que mantenían una respuesta normal a la inhibición por el factor inhibidor de macrófagos inducida por estrógenos. Estos datos sugieren que *Smad3* desempeñan un papel en la mediación de la señalización de andrógenos durante la respuesta de cicatrización de heridas normal e implican a *Smad3* en la modulación de la actividad de las células inflamatorias por los andrógenos.

La *fibronectina* (FN) es una proteína de adhesión multifuncional implicada en varias etapas del proceso de cicatrización de heridas. Hay pruebas importantes que sugieren que la diversidad de la proteína FN está controlada por corte y empalme alternativo del ARN; una transcripción y un procesamiento de ARN coordinados que está regulado por el desarrollo, la edad y el tipo de tejido/célula. La expresión, la regulación y la función biológica del gen de la FN y varias formas de corte y empalme en este modelo se desconocen. Se efectuaron heridas producidas por incisión en las vías respiratorias y la piel en fetos de conejos (días de gestación 21-23), en destete (4-6 semanas) y adultos (> 6 meses). Los perfiles de expresión se obtuvieron usando expresión diferencial de ARNm y se clonaron ADNc de interés y se secuenciaron y validaron mediante PCR en tiempo real. Los mayores niveles de transcritos tanto de *Fn1* como de *Sfrs3* se mantuvieron hasta 48 horas en las heridas en las mucosas de las vías respiratorias. Los aumentos de los dos genes en las heridas en las mucosas de las vías respiratorias posnatales fueron más prominentes que en las heridas en la piel, lo que indica la implicación de los genes *Sfrs3* y *Fn1* en las mucosas de las vías respiratorias posnatales es específica de tejido. Existen pruebas de que SRp20 está, de hecho, implicada en el corte y empalme alternativo de FN y que las variantes embrionarias de la FN reaparecen durante la cicatrización de heridas en adultos. Se propuso la existencia de una relación entre la actividad molecular potenciada de *Sfrs3* y la regulación de la expresión del gen de la FN a través de corte y empalme alternativo durante los primeros acontecimientos de la cicatrización de heridas en las mucosas de las vías respiratorias posnatales.

30 Composiciones de ARNip multidirigidos

El ARN de interferencia (ARNi) es un proceso de degradación del ARN específico de secuencia que proporciona una forma relativamente fácil y directa para inactivar, o silenciar, en teoría cualquier gen (33, 34). En el ARN de interferencia de origen natural, un ARN bicatenario es escindido por una proteína ARNasa III/helicasa, Dícer, en moléculas pequeñas de ARN de interferencia (ARNip), un ADNbc de 19-23 nucleótidos (nt) con salientes de 2 nucleótidos en los extremos 3'. Estos ARNip se incorporan en una ribonucleasa de múltiples componentes denominada complejo de silenciamiento inducida por ARN (RISC). Una hebra del ARNip permanece asociada con el RISC y guía al complejo hacia el ARN afín que tiene una secuencia complementaria al ARNss-ip guía en el RISC. Esta endonucleasa dirigida al ARNip digiere el ARN y, de este modo, lo inactiva. Los estudios han revelado que el uso de ARNip de 21-25 nucleótidos sintetizados químicamente exhibe efectos de ARNi en células de mamífero y la estabilidad termodinámica de la hibridación del ARNip (En los extremos o en el centro) desempeña un papel central en la determinación de la función de la molécula (33, 36, 37).

Es importante el hecho de que en la actualidad no es posible predecir con grado de confianza alto cuál de las muchas posibles secuencias de ARNip candidatas potencialmente dirigidas a una secuencia de ARNm de un gen de enfermedad exhibe de hecho actividad ARNi eficaz. En su lugar, se deben generar secuencias de polinucleótidos o de oligonucleótidos de ARNip candidatas específicas individualmente y se deben analizar en el cultivo de células de mamífero para determinar si se ha producido la interferencia prevista con la expresión de un gen diana. La ventaja única del ARNip hace posible combinar con múltiples dúplex de ARNip con múltiples genes diana causantes de enfermedad en el mismo tratamiento, ya que todos los dúplex de ARNip son químicamente homogéneos con la misma fuente de origen y el mismo proceso de fabricación ((33, 36-40).

En resumen, las dianas moleculares implicadas en la cicatrización de heridas sin cicatriz de piel adulta están bien definidas y evaluadas. No obstante, existe una necesidad urgente de proporcionar potentes dúplex de ARNip dirigidos al factor proinflamatorio TGF- β , al promotor de la inflamación COX-2 y al regulador de la diferenciación *HoxB13*. También existe la necesidad de formular dichos dúplex de ARNip en composiciones de ARNip multidirigidos. Sigue habiendo la necesidad de proporcionar un abordaje terapéutico para mejorar los resultados de cicatrización de pacientes que sufren heridas cutáneas causadas por lesiones y muchas enfermedades. Por tanto, existe una fuerte necesidad de terapéuticas de ARNi multidirigidos en el tratamiento de la cicatrización de heridas para su uso en pacientes que sufren varias afecciones cutáneas.

Resumen

La invención se refiere a una composición que comprende moléculas de ARNip como se establece en las reivindicaciones útiles en el tratamiento de heridas cutáneas.

Las moléculas se añaden a un vehículo farmacéuticamente aceptable como se establece en las reivindicaciones para proporcionar composiciones para administrar a un sujeto. La composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos tres moléculas de ARNip, como se establece en las reivindicaciones.

5 La invención también proporciona la composición de la invención para su uso en el tratamiento de heridas dérmicas o epidérmicas en un sujeto, en la que la herida se caracteriza, al menos en parte, por inflamación y neovascularización. Las composiciones de la presente invención son útiles para mejorar la cicatrización de heridas cutáneas y otras afecciones cutáneas.

10 **Breve descripción de las figuras**

Figura ARNip de nanopartícula-TGFβ-1 para la cicatrización de heridas. De entre cuatro grupos, el grupo 2 demostró heridas más pequeñas al 5º día y alcanzó un cierre completo al 9º día.

15 El único ARNip de TGFβ1 activo sin nanopartícula del polímero HK (grupo 3) mostró un efecto más débil y el ARNip control no mostró efectos incluso empaquetado con el polímero HK.

Figura 1. Tinción con hematoxilina y eosina de piel de labios y de la espalda de tipo salvaje.

20 **Figura 2.** Organización del colágeno en biopsias de heridas producidas en SV y KO para Hoxb13.

Figura 3. Ensayos de heridas por raspado usando fibroblastos dérmicos primarios aislados de ratones SV y KO en Hoxb13.

25 **Figura 4.** Tasa de proliferación reducida en queratinocitos epiteliales de ratas que expresan HOXB13 (REK).

Figura 5. La sobreexpresión de HOXB13 tiene como resultado la diferenciación aberrante en cultivos de 5 días.

Figura 6. La proteína GFP-HOXB13 se localiza en el núcleo en células REK y 293 (células epiteliales humanas).

30 **Figura 7.** A. Localizaciones de secuencias diana en ARNm de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 de ratón. B. Determinaciones de la disminución del ARNm tras la transfección de ARNip *in vitro*. **Figura 8.** La liberación local de ARNip dirigidos a genes de la vía del VEGF inhibe la angiogénesis inducida por CpG ODN.

35 **Figura 9.** El ARNip de Raf-1 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* después de la liberación intratumoral mediada por el polímero HK.

Figura 10. Detección de secuencias de las tres especies de ARNm en muestras de ARN total de células PC3.

40 **Figura 11.** El ARNip de TGF-beta-1 puede disminuir significativamente la expresión del gen diana en las células PC3.

Figura 12. El ARNip de Cox1 puede disminuir significativamente la expresión del gen diana en las células PC3.

45 **Figura 13.** El ARNip de Hoxb13 puede disminuir significativamente la expresión del gen diana en las células PC3.

Figura 14. Análisis de RT-PCR para la selección de potentes oligos de ARNip. Las actividades de silenciación de tres oligos de ARNip dirigidos al gen correspondiente se demostraron mediante análisis de electroforesis en gel. A Se identificó un potente oligo de ARNip de TGFβ-1 dirigido a TGFβ según las actividades de silenciación en células tanto humanas como de ratón. B. Se identificó un potente oligo de ARNip de CXsi-A dirigido a Cox-2 según la actividad de silenciación en células humanas. C. Se identificó un potente oligo de ARNip de Hxsi-A dirigido a Hoxb13 según la actividad de silenciación en células humanas

55 **Figura 15. Modelo de herida por escisión en piel de ratón.** A. Comparación del grupo control y el grupo de tratamiento los días 1, 3 y 5. B. Observación el día 5 de heridas en la piel producidas por escisión de espesor completo de 5 mm de diámetro pareadas creadas en ambos lados de la línea media dorsal de un ratón C57. C. Detección mediante RT-PCR de la expresión del gen diana a partir del ARN total aislado de muestras de piel de ratón.

60 **Figura 16.** Polímero HK para la liberación *in vivo* de ARNip. Cuando el HJP se mezcló con ARNip en la solución acuosa se formó una nanopartícula como se ve en el panel izquierdo, observada con microscopia electrónica de barrido (SEM). Para la liberación de ARNip en la herida cutánea se usaron dos especies de polímero HK.

65 **Figura 17. Modelo de piel animal para cicatrización de heridas.** Uso del modelo de herida por escisión en la

piel de ratón para analizar el beneficio terapéutico de la administración tópica potenciada por nanopartículas-mejorada de ARNip de TGF β -1. Se usaron diez ratones con dos heridas en la piel de la espalda. El diámetro de cada herida se midió y las imágenes de cada herida también se registraron con imágenes fotográficas.

5 **Figura 18. El beneficio terapéutico de la nanopartícula-ARNip de TGF-1 fue el resultado de la disminución del gen diana.** El análisis RT-PCR demostró la disminución específica de TGF-1 con ARNip específico o un cóctel de ARNip contiene ARNip específico de TGF β -1. La fila inferior muestra la expresión génica doméstica.

10 **Figura 19. ARNip de nanopartícula-TGF β -1 para la cicatrización de heridas.** De entre cuatro grupos, el grupo 2 demostró heridas más pequeñas al 5^o día y alcanzó un cierre completo al 9^o día. El único ARNip de TGF β -1 activo sin nanopartícula del polímero HK (grupo 3) mostró un efecto más débil y el ARNip control no mostró efectos incluso empaquetado con el polímero HK. **Figura 20. Efectos similares del ARNip de Hoxb13 sobre el cierre de heridas.** Usando ARNip de Hoxb13 empaquetado en nanopartícula se puede observar los resultados cuantificados en relación con el cierre de heridas al 4^o día y al 7^o día. El ARNip de Hoxb13 empaquetado con polímero HK presentó un cierre mejor y más rápido de la muestra.

15 **Figura 21. Nanopartícula para la liberación de ARNip de TGF β -1, Hoxb13 y Cox-2.** La liberación en la piel de dúplex de ARNip de TGF-1, HOXB13 y Cox-2 empaquetado en nanopartícula mostró una mejor cicatrización de la herida utilizando herida en la piel del ratón.

20 **Figura 22. Organización del colágeno en biopsias de heridas producidas en ratón SV.** Columna A: aumento bajo (10x o 20x) de biopsias de heridas de ratón SV; columna B: aumento alto (100x) de biopsias de heridas de ratón SV; columna C: aumento bajo (10x o 20x) de biopsias de heridas de ratón KO de Hoxb13; columna D: aumento alto (100x) de biopsias de heridas de ratón. Fila 1: piel sin heridas; fila 2: biopsias de heridas el día 20; fila 3: biopsias de heridas el día 30; fila 4: biopsias de heridas el día 60. Las flechas identifican la ubicación de la tinta china.

25 **Figura 23. El tratamiento con ARNip de nanopartícula/Cox-2 en estructuras tisulares similares.** La neodermis en heridas tratadas se parece más a la dermis normal; el colágeno tiene una estructura laxa entretrejida. Por el contrario, las fibras de colágeno en los neodermis de heridas de control simuladas y de heridas tratadas con nanocomplejos-ARNip de control se colocan en un patrón paralelo anormal.

30 **Figura 24. H2K4b demostró una potente actividad antifúngica.** Varias dosis de H2K4b o histatina 5 que varían hasta 100 mg / ml se añadieron a medio YM (levadura maltosa) que contiene *C. albicans*. Después, los hongos se rotaron a temperatura ambiente durante 24 horas y se determinó la inhibición del crecimiento por el polímero como se indica en la Figura 2. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se representan como medias \pm error estándar. *, P<0.001, **, P<0.01; H2K4b frente a Histatina 5.

35 **Figura 25. Estudio de citotoxicidad de los polímeros HK.** Ensayo de LDH-citotoxicidad de péptidos BHKP (H3K4b, H3 (G) K4b (PT73) y H2K4b) se añadieron a medio de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF), células endoteliales bovinas (BAEC) o células endoteliales de la vasculatura umbilical humana (HUVEC). La citotoxicidad se evaluó mediante el kit de ensayo de citotoxicidad-LDH. Los valores experimentales representan la media de tres experimentos.

45 Descripción de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que contienen moléculas de ARNip y composiciones para su uso, que están dirigidas a la estimulación de la cicatrización de heridas en la piel, tal como se establece en las reivindicaciones.

50 La invención hace uso de una molécula pequeña de ARN de interferencia (ARNip) que comprende un oligonucleótido bicatenario (dúplex), en el que el oligonucleótido está dirigido a una secuencia de nucleótidos complementaria en una molécula de ARN monocatenario (ss) diana tal como se establece en las reivindicaciones. La molécula de ARNm diana codifica un gen seleccionado del HOXB13, TGF- β 1, y COX-2. Las secuencias de ARNip se preparan de tal manera que cada dúplex pueda dirigirse a e inhibir el mismo gen a partir de, al menos, seres humanos y ratón o primates no humanos. Las moléculas de ARNip se construyen con referencia a las secuencias de codificación de ARNm diana enumeradas en las Tablas 2, 4 y 5.

60 En una realización, la molécula de ARNip tiene una longitud de 19-27 pares de bases. La molécula puede tener extremos romos en ambos extremos o extremos cohesivos en ambos extremos, o uno de cada. La molécula de ARNip puede incluir una modificación química a nivel de nucleótidos individuales o a nivel de la estructura básica del oligonucleótido, o puede no tener ninguna modificación.

65 Las moléculas se añaden a un vehículo farmacéuticamente aceptable para proporcionar composiciones para su administración a un sujeto. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

La composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos tres moléculas de ARNip, como se establece en las reivindicaciones. Cada cóctel de ARNip contiene al menos tres dúplex de ARNip dirigidos a por lo menos tres diferentes secuencias génicas tal como se establece en las reivindicaciones. Una composición que es una mezcla de moléculas de ARNip puede denominarse un "cóctel".

5 Una mezcla de cóctel se elige a partir de una mezcla que figura en la Tabla A. Una forma de realización particular se divulga en la Tabla A, en la que un ARNip (sentido: 5'-caaggauaucgaagguucgugga -3', antisentido: 5'-uccagcaagccuucgauauccuug-3') se une a las moléculas de ARNm que codifican la proteína HOXB13, de ser humano y de ratón, una molécula de ARNip (sentido: 5'-gucuuuggucuggugccuggucuga -3', antisentido: 5'-ucagaccaggcaccagaccaagac-3') se une a las moléculas de ARNm que codifican la proteína COX-2, de ser humano y de ratón, una molécula de ARNip (sentido: 5'-ccccggaggugauuuccaucuaca - 3', antisentido: 5'-uuguagauggaaucaccuccgggg-3') se une a las moléculas de ARNm que codifican TGF- β 1 de ser humano y de ratón. En otras formas de realización particulares divulgadas en la Tabla A, un ARNip (sentido: 5'-GGUGGCUGGAACAGCCAGAUGUGUU-3', antisentido: 5'-AACACAUCUGGCUGUUCAGCCACC-3') se dirige a una molécula de ARNm que codifica la proteína Hoxb13 de ser humano y de ratón, al menos una molécula de ARNip (sentido: 5'-GGUCUGGUGCCUGGUCUGAUGAUGU-3', antisentido: 5'-ACAUCAUCAGACCAGGC ACCAGACC-3') se dirige a una molécula de ARNm que codifica la proteína Cox-2 de ser humano y de ratón, y al menos una molécula de ARNip (sentido: 5'-CCCAAGGGCUACCAUGCCAACUUCU-3', antisentido: 5'-AGAAGUUGGCAUGGUAGCCCUUGGG-3') se dirige a una molécula de ARNm que codifica TGF- β 1 de ser humano y de ratón.

En todavía otras realizaciones, el cóctel de ARNip contiene al menos tres dúplex de ARNip en una proporción de 1: 1: 1, o 1: 1,5: 0,5 o una proporción de 0,5: 0,5: 2, u otras proporciones de acuerdo con la potencia de cada dúplex de ARNip y los requisitos terapéuticos para la aplicación.

La invención proporciona además vehículos farmacéuticamente eficaces para mejorar la liberación del cóctel de ARNip en los tejidos y las células enfermas tal como se establece en las reivindicaciones.

En diversas realizaciones de la composición, el vehículo puede comprender uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en una solución salina, una solución de azúcar, un polímero, un lípido, una crema, un gel y un material micelar. Otros componentes o excipientes incluyen un agente aglutinante policatiónico, lípido catiónico, micela catiónica, polipéptido catiónico, polímero injertado con polímero hidrófilo, polímero catiónico no natural, poliactal catiónico, poliactal injertado con polímero hidrófilo, polímero catiónico funcionalizado con ligando y polímero injertado con polímero hidrófilo funcionalizado con ligando, poliésteres biodegradables, tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), y poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), PEG-PEI (polietilenglicol y polietilenimina), poli-espermina (espermidina) y dendrímeros de poliamidamina (PAMAM). El vehículo es un copolímero de histidina - lisina que se cree que forma una nanopartícula que contiene una molécula de ARNip, en el que la nanopartícula tiene un tamaño de aproximadamente 100 -400 nm de diámetro formulada con gel de metilcelulosa para la administración tópica.

Las moléculas de ARNip pueden identificarse mediante las etapas siguientes: 1) crear una colección de dúplex de ARNip diseñados para apuntar a una secuencia de nucleótidos complementaria en la molécula diana de ARN ss, en la que las hebras diana de dichas moléculas de ARNip comprenden varias secuencias de nucleótidos; 2) seleccionar las moléculas de ARNip que muestran el mayor efecto deseado contra dichas moléculas diana *in vitro*; 3) evaluar las moléculas ARNip seleccionadas en un modelo animal de la herida; y 4) seleccionar las moléculas de ARNip que muestran la mayor eficacia en el modelo. Un vehículo farmacéuticamente aceptable se puede añadir a cada una de las moléculas de ARNip seleccionadas mediante la etapa (2) para formar composiciones farmacéuticas, cada una de las cuales se evalúa en el modelo de herida animal. Preferentemente, el modelo de herida animal es un modelo de herida en el labio por escisión en un ratón defectivo para Hoxb13 o un modelo de herida por escisión en la espalda en un ratón defectivo para Hoxb13. Más preferentemente, las moléculas de ARNip se evalúan en ambos modelos animales. Dado que los genes diana pueden expresarse en diferentes tipos de células en los tejidos enfermos, la eficacia del cóctel de ARNip particular se analiza y se confirma no solo en el cultivo celular, sino también en modelos de enfermedad animal. Preferentemente, se seleccionan los componentes del cóctel de ARNip de modo que el beneficio terapéutico del cóctel es mejor que el beneficio terapéutico de un solo componente ARNip por sí mismo.

También se proporcionan métodos para preparar la proporción adecuada de cada dúplex a fin de permitir que el cóctel de ARNip logre el efecto sinérgico más potente. En una realización, la proporción se determina mediante la determinación del nivel de expresión de la secuencia diana en comparación con la de la secuencia de control. Una secuencia diana de mayor expresión requerirá una mayor proporción de las correspondientes moléculas de ARNip.

La invención también proporciona la composición de la invención para el tratamiento de una herida dérmica o epidérmica en un sujeto. La herida puede estar causada por una lesión física, una quemadura, una alergia, enfermedad diabética, inflamación o un tumor. La herida puede caracterizarse al menos en parte por inflamación y neovascularización. La composición se puede aplicar en un ungüento, aerosol, parche transdérmico u otras formas conocidas por los expertos en la técnica.

La terapia mediada por ARNip con éxito no solo depende de la identificación de las dianas y la secuencia de las moléculas de ARNip activas, sino también de la liberación *in vivo* eficiente en los tejidos diana y en el citoplasma (41-43). Las vías de liberación de la formulación en cóctel de ARNip para el tratamiento de heridas en la piel, la cicatrización debe ser local y tópica con vehículos validados clínicamente adecuados según lo establecido en las reivindicaciones. Además de usar imiquimod en crema al 5% como vehículo para la aplicación tópica del cóctel de ARNip, tres vehículos basados en polímeros, incluyendo polímeros de histidina - lisina (HKP) (44), PEI pegilado (45) y dendrímero PAMAM (46) son vehículos particularmente útiles.

Ejemplos

Ejemplo 1. Modelo de cirugía de labios para análisis de cicatrización de heridas

Hay resultados de estudios anteriores que muestran que heridas cutáneas en la piel de ratones KO en HOXB13 cicatrizaron con una cicatrización reducida. Las posibles diferencias entre la piel de la espalda y del labio plantearon la cuestión de si la herida en los labios en ratones defectivos cicatrizaría con menor formación de cicatrices, ya que las capas de músculo y de grasa del tejido de la piel de los labios están mucho menos organizadas que la de la piel dorsal superior. En primer lugar se comparó la estructura de las regiones dorsal y de los labios. A diferencia de la estructura de la piel de la espalda, las capas musculares y de grasa de la región del labio no están organizadas en capas distintas (Figura 1). No estaba claro si la estructura alterada en la región labial influiría en el proceso de cicatrización de la herida. Para revelar el potencial del uso del modelo de cirugía de labio de ratón para estudiar el proceso de cicatrización de heridas, los inventores han establecido un modelo de cirugía de labio de ratón para imitar la cirugía de labio y paladar leporino. En condiciones de esterilidad y con anestesia general, ratones adultos SV y KO en HoxB13 (de 8-16 semanas de edad) recibieron una sola herida por incisión en la piel de espesor completo de 0,5 cm en paralelo con sus dientes frontales, seguido de sutura (6,0 Nylon) de la herida, imitando la cirugía de labio y paladar leporino. Se administró 10 % de tinta china estéril para poder rastrear la herida. Cada animal se alojó individualmente después de la cirugía. Se obtuvieron muestras de la herida del labio para biopsia para su análisis histológico, inmunohistológico y de expresión génica en cada punto de tiempo deseado. La expresión de *HoxB13* se confirmó en la piel de labio de ratón mediante RT-PCR con muestras de ARN total aislado de tejido de la piel de los labios de ratón SV. Se realizó transcripción inversa usando un kit de síntesis de ADNc Bio-Rad iScript. La PCR se realizó con el cebador directo 5' - CTCCAGCTCCTGTGCCTTAT-3' y el cebador inverso 5'-ACTGGCCATAGGCTGGTATG-3'. El producto *HoxB13* fue detectado y confirmado mediante secuenciación (SeqWright Inc).

Ejemplo 2. Los ratones KO en HoxB13 muestran mejor cicatrización de heridas y menor formación de cicatrices

Tras el establecimiento del modelo de la herida en el labio, los ratones KO en *HoxB13* (amablemente proporcionados por el Dr. Mario R. Capecchi) se sometieron a cirugías idénticas. Los ratones KO se volvieron a cruzar con los ratones C57BL6 SV durante al menos 10 generaciones para asegurar que los ratones SV y KO tienen el mismo fondo genético. Las muestras para biopsias de heridas labiales por incisión se obtuvieron de heridas a 20, 30 y 60 días y la organización del colágeno se determinó mediante tinción tricrómica de Masson del colágeno (Figura 2). Las heridas del día 20 (B-Día20) y 30 (B-Día30) mostraron tinción de colágeno más densa y mayores contracciones de la herida en los ratones SV que en los ratones KO en *HoxB13*. De hecho, la contracción del colágeno en los ratones de tipo salvaje fue tan fuerte que los inventores o se podían centrar en el colágeno contraído y el colágeno circundante simultáneamente en las heridas del día 20 y el día 30. El día 60, el colágeno SV es denso, pero la contracción no es tan pronunciada como en las heridas el día 20 y el día 30. Por el contrario, los ratones KO en *HoxB13* mostraron organización laxa del colágeno en las biopsias de las heridas el día 20, el día 30 y el día 60, lo que sugiere la formación reducida de cicatrices en la región labial de los ratones defectivos, en consonancia con lo que se observó en el dorsal superior de la espalda.

Ejemplo 3. Los fibroblastos defectivos HoxB13 mostraron una tasa de proliferación y actividad de migración reducidas

A continuación, los inventores compararon la actividad de los fibroblastos primarios de ratón SV y KO *in vitro*. Los fibroblastos dérmicos primarios se preparan a partir de ratones recién nacidos de 3 días de edad. Se sacrificó a los ratones mediante dislocación cervical y se esterilizaron con etanol al 70 %. La piel se recogió y se empapó en PBS con 20µg/ml de gentamicina durante 45 minutos. Después, se hizo flotar la piel en 25 unidades/ml de solución de dispasa (Sigma) durante la noche a 4 °C. La capa epidérmica se separó de la capa dérmica usando un fórceps de punta fina. La capa epidérmica se procesó adicionalmente para aislar los queratinocitos. La capa dérmica se procesó adicionalmente en 100 unidades / ml de colagenasa bruta (Sigma) a 37 °C durante una hora. Después de la filtración a través de filtros celulares (Falcon, 70 µm), las células se sembraron en placas de cultivo tisular en DMEM rico en glucosa con 10 % de FBS y se subcultivaron dos veces antes de su uso para los ensayos. Para el ensayo de proliferación, las células se sembraron a 5.000 / pocillo en placas de 96 pocillos. Otros ensayos de MTT se realizaron todos los días (Molecular Probes, CA) y demostraron una actividad de proliferación reducida de fibroblastos defectivos en HoxB13. Este resultado se confirmó mediante un método de recuento celular manual utilizando un hemocitómetro (datos no mostrados). Se ha informado de que HOXB13 es un inhibidor del activador de

la proliferación de células neuronales de las vías de apoptosis (Economides et al., 2003). Por lo tanto, se esperaba que la tasa de proliferación de los fibroblastos defectivos en HOXB13 aumentara, lo que contrasta con lo que se ha observado. Es posible que los papeles de HOXB13 puedan ser específicos del tipo celular. De hecho, la sobreexpresión de HoxB13 se ha correlacionado con cáncer de próstata y se ha propuesto a HoxB13 como biomarcador para el cáncer de próstata (Edwards et al., 2005). Además, los inventores realizaron un ensayo de herida de raspado *in vitro* para imitar las heridas por incisión. Para este ensayo, se sembraron 2×10^5 fibroblastos dérmicos primarios por pocillo en placas de seis pocillos, que se revistieron previamente con colágeno de tipo I, de tipo IV o fibronectina. Después, las células se incubaron en DMEM rico en glucosa con 0,2 % de FBS durante 24 horas. A continuación, se utilizó una punta de Pipetman™ de 1 ml para raspar la monocapa celular para crear una brecha. El porcentaje de la brecha cerrada después de incubar durante 4 horas y 24 horas en DMEM / FBS 0,2 % se midió utilizando el software Olympus Microsuite. Se añadió el factor B de crecimiento derivado de plaquetas (10 ng / ml) para vigilar su efecto sobre la migración de fibroblastos SV y KO. Como se demuestra en la Figura 3, los fibroblastos KO en HoxB13 mostraron una tasa de migración de fibroblastos SV más lenta en ausencia de PDGF en la superficie recubierta con colágeno de tipo I, de tipo IV y fibronectina a las 4 horas después de la herida. Además, los fibroblastos KO en HoxB 13 fueron sensibles a la estimulación con PDGF. A las 24 horas de la herida, la diferencia en la actividad de migración no era tan pronunciada.

Ejemplo 4. La sobreexpresión de HoxB13 inhibe la proliferación y estimula la diferenciación terminal

Cuando los queratinocitos epiteliales de rata (REK) se elevaron a la interfaz de aire líquido como se ha descrito (Tammi et al.2000), las células REK se diferencian en todas las capas de la epidermis. Usando esto como un modelo de diferenciación de los queratinocitos *in vitro*, se investigó el efecto de HOXB13 sobre la estratificación de REK. Los clones de células REK que expresan HOXB13 se obtuvieron mediante transducción retroviral y selección clonal. El ADNc de HoxB 13 se subclonó en el vector MLV bajo el control de un promotor de CMV. Las partículas retrovirales se produjeron mediante cotransfección en tres plásmidos (Li et al., 2001). Las células REK se transdujeron mediante las partículas retrovirales con HoxB13 o vector solamente a una MOI~10 y se seleccionaron en 2 µg/ml de puomicina (Nota: 1µg / ml de puomicina es suficiente para matar todas las células no transducidas). Las células resistentes a la puomicina se sembraron en tres placas de 96 pocillos a una densidad de una célula por pocillo. Después de la incubación de dos semanas, las células en cada pocillo se visualizaron y los clones individuales se transfirieron, se expandieron y se mantuvieron en 1 µg/ml de puomicina. La expresión de HoxB13 o vector se confirmó mediante RT-PCR usando un cebador localizado en el vector y el otro cebador situado en el ADNc de HoxB13. Las células REK que expresan HoxB13 mostraron una tasa de proliferación reducida en comparación con las REK transducidas con el vector solamente utilizando el ensayo MTT (Figura 4). La sobreexpresión de HoxB13 en REK dio lugar a una diferenciación terminal excesiva cuando estas células REK se elevaron a la interfaz de aire líquido (Figura 5). Este resultado se reprodujo con dos clones de REK-HoxB13 adicionales. En conclusión, la sobreexpresión de HOXB13 afecta a la proliferación y la estratificación de las células de queratinocitos.

Ejemplo 5. HOXB13 es una proteína nuclear

Con el fin de determinar la ubicación subcelular de HoxB13, una proteína fluorescente verde, la proteína de fusión GFP-HoxB 13 se generó mediante la eliminación del codón de terminación de GFP y el codón de iniciación de HoxB13. La expresión de GFP- HoxB13 estaba dirigida por un promotor del CMV. El plásmido que contiene el ADNc de GFP- *HoxB13* se transfectó en células epiteliales REK o 293T de riñón humano utilizando Lipofectamine (Invitrogen, CA) y la expresión de GFP se monitorizó con un microscopio fluorescente a las 24 horas de la transfección. En contraste con un informe anterior de que la expresión HOXB13 es citoplasmática durante el desarrollo de piel fetal (Komuves et al., 2003), los inventores han descubierto que GFP-HoxB13 está localizada en el núcleo, lo que sugiere que HOXB13 es una proteína nuclear (Figura 6). La localización nuclear de HoxB 13 hace muy difícil que sea accesible por los inhibidores de molécula pequeña y los inhibidores de anticuerpos monoclonales. Por lo tanto, la aplicación del inhibidor de ARNip para silenciar su expresión a través de la degradación del ARNm en el citoplasma ofrece un enfoque terapéutico lógico.

Ejemplo 6. Identificación de potentes dúplex de ARNip para componer un cóctel de ARNip multidirigidos

Se prepararon ARNip para llegar a los factores de la vía de VEGF: mVEGF-A (XM_192823), mVEGFR1 (D88689) y mVEGFR-2 (MN_010612). Se escogieron dos secuencias diana de cada gen. Estas secuencias son (de 5 'a 3'): mVEGF-A (1. AAGCCGUCCUGUGCCGCUG; 2. AACGAUGAAGCCUGGAGUGC); mVEGFR1 (1. AAGUAAAAGUGCCUGAACUG; 2. AAGCAGCCAGACUCUCUUUC); mVEGFR2 (1. AAGCUCAGCACACAGAAAGAC; 2. AAUGC GCGGUGGUGACAGUA). En cuanto a los controles no relacionados, se seleccionaron dos secuencias de ARNip de la luciferasa de luciérnaga (Luc, AF434924) como Luc (1. AAGCUAUGAAACGAUAUGGGC; 2. AACCGCUGGAGAGCAACUGCA). La búsqueda de secuencias BLAST confirmó la especificidad de estos ARNip con sus secuencias específicas y las dianas de mVEGF-A se diseñaron para ser compartidos por diferentes isómeros de mVEGF-A. Todos los ARNip se prepararon de forma adaptada como oligonucleótidos de ARN bicatenario de 21 nucleótidos con un dúplex de 19 nt en el medio y un saliente de dTdT en el extremo 3 'de cualquier hebra de ARN, sintetizado por Qiagen. Para conseguir un mejor efecto del ARNi, los inventores usaron habitualmente una mezcla de dos dúplex de ARN bicatenario de 21 nucleótidos dirigidos a dos

secuencias diferentes en una sola molécula de ARNm. La RT-PCR se llevó a cabo para la detección de disminución de ARNm por ARNip *in vitro*. El ARN citoplasmático se aisló mediante RNAwiz (Ambion, # 9736) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con tratamiento adicional con ADNasa y se sometió a RT-PCR con los cebadores especialmente preparados. Los cebadores inversos específicos de ARNm para la reacción de RT fueron todos oligonucleótidos de 47 unidades con las 30 unidades del extremo 5 de secuencia única (denominada secuencia "TS1", indicado en mayúsculas más adelante) unido a una secuencia de 17 unidades única para cada molécula de ARNm (en minúsculas más adelante). Eran (de 5' a 3'): 1) mVEGFA Dn: GAACATCGATGACAAGCTTAGGTATCGATAcaagctgcctgccttg; 2): mVEGFR1 Dn: GAACATCGATGACAAGCTTAGGTATCGATAtagattgaagattccgc; 3) mVEGFR2 Dn: GAACATCGATGACAAGCTTAGGTATCGATaggtcactgaca gaggcg. Los ensayos de PCR para todos los genes analizados, que siguen al ensayo de RT, utilizan un mismo cebador inverso, TS1: GAACATCGATGACAAGCTTAGGTATCGATA. Sin embargo, los cebadores directos para PCR, todos eran oligonucleótidos de 30 unidades, único para cada gen: VEGFA hasta: GATGTCTACCAGCGAAGCTACTGCCGTCCG; 2) mVEGFR1 hasta: GTCAGCTGCTGGGACACCGCGGTCTTGCCT; 3) mVEGFR2 hasta: GGCGCTGCTAGCTGTGCTCTGTGGT TCTG. La RT-PCR del gen doméstico GAPDH se usó como control para la cantidad de ARN usada en RS-PCR. Se usó un cebador de oligonucleótido dT (19 unidades) para el ensayo de RT de GAPDH. Los cebadores utilizados para la PCR seguida fueron oligonucleótidos de 20 unidades: 1) GAPDH Up: CCTGGTACCAGGGCTGCTT; 2) GAPDH Descendente: CCAGCTTCTCCATGGTGGT. La RT-PCR también se utilizó de acuerdo con el protocolo descrito previamente. Para la detección de la expresión de mVEGF-A, los cebadores utilizados fueron 5'-GCGGGCTGCCTCGCAGTC-3' (sentido) y 5'-TCACCGCCTTGGCTTGTAC-3' (antisentido). La Figura 7 muestra que los tres pares de ARNip disminuyen de forma eficaz la expresión del gen diana. Para evaluar la potencia del cóctel de ARNip con tres pares de dúplex de ARNip, se utilizó un modelo de neovascularización ocular de ratón con liberación de nanopartículas del polímero histidina - lisina *in vivo*.

25 **Ejemplo 7. Inhibición de la angiogénesis mediante liberación local de cóctel de ARNip**

Un estudio previo demostró que el nucleótido oligonucleótido que contiene CpG encapsulado en pastillas de hidrón induce la angiogénesis mediada por dVEGF cuando se inserta en microbolsas corneanas. Este sistema se utilizó para medir el efecto inhibitorio de la administración local de las preparaciones de ARNip preparadas para dirigir al VEGF, así como dos de sus receptores (VEGFR1 y VEGFR2). En todos los casos se usó una sola dosis de 10 µg de ARNip con nanopartículas de polímeros de histidina-lisina. Esta se administró mediante inyección subconjuntival 24 horas después del establecimiento de las microbolsas que contienen ODN CpG. Los ARNip se analizaron individualmente, así como una mezcla 1: 1 :1 de los tres (siVEGFA, siVEGFR1 y siVEGFR2). La formación de nuevos vasos sanguíneos en el limbo corneal se monitorizó a los días 4 y 7 después de la implantación de las pastillas. Como se muestra en la Figura 8, la inhibición significativa de la neovascularización corneal tuvo como resultado los tres ARNip de ensayo en comparación con los proporcionados con control de siLacZ el día 4 después de la implantación de la pastilla (P <0,05). La combinación de los tres ARNip analizados fue el inhibidor más eficaz, proporcionando una reducción del 60% en la neovascularización (P <0,01). La liberación local de ARNip se llevó a cabo con nanopartículas de polímero-lisina histidina aunque la administración se subconjuntival. El beneficio sinérgico del cóctel de ARNip multidirigidos se demostró en este modelo de angiogénesis ocular. Los datos proporcionan un fuerte apoyo a la utilización de cócteles de ARNip multidirigidos como se divulga en el presente documento para mejorar la cicatrización de heridas de la piel de adultos con menos formación de tejido cicatricial y una resistencia a la tracción más fuerte.

45 **Ejemplo 8. ARNip de veinticinco unidades dirigido a los genes tanto humanos como de ratón**

Se preparan secuencias de ARNip de 25 unidades dirigidas a las secuencias homólogas de humanos y de ratón en los genes ortólogos. Por ejemplo, la secuencia dúplex de ARNip dirigida a HoxB 13 es capaz de dirigirse a los genes de HoxB13 humanos y de HoxB13 de ratón. La Tabla 1 proporciona secuencias identificadas para la terapéutica con ARNip (36-37). Cada secuencia se dirige al gen correspondiente de ser humano y de ratón. Por lo tanto, las secuencias potentes definidas a partir de las células de ratón se pueden confirmar de nuevo utilizando células humanas. Si el ARNip dúplex particular es potente en ambas pruebas, la actividad de silenciamiento revelada en el modelo animal de ratón podría suponer que es activa en el ser humano. Con este enfoque, los inventores pueden abordar una preocupación general acerca de la especificidad de especie de este tipo de inhibidores, tales como el anticuerpo monoclonal, que se han encontrado. Además, para los candidatos terapéuticos de dúplex de ARNip, los datos de eficacia y toxicidad obtenidos a partir del estudio utilizando el modelo de ratón pueden traducirse fácilmente al entorno humano.

60 **Ejemplo 9. El polímero HK potencia la liberación local de ARNip**

La liberación local mediada por nanopartículas de ARNip-polímero de HK ha logrado una potente actividad antiangiogénica. En un estudio separado utilizando polímero HK para mejorar la liberación de ARNip intratumoral, las curvas de crecimiento tumoral han mostrado una eficacia antitumoral significativa con una clara regulación por disminución de la expresión del gen diana. A los 10 días después de la inyección de células MDA-MB-435 en la almohadilla de grasa mamaria, los ratones con tumores visibles se separaron en grupos de tratamiento. Cada grupo

estaba formado por cuatro ratones con ocho tumores y el tamaño del tumor se evaluó en dos dimensiones y se calculó. Los ratones recibieron 4 µg/ tumor de ARNip con cada inyección intratumoral cada 5 días. Para confirmar la eficacia antitumoral de ARNip Raf-1 con el polímero óptimo con mayor detalle, los ratones con tumores se dividieron en estos grupos: Sin tratar, b-galactosidasa ARNip y ARNip de Raf-1. Como se ve en la Figura 9. El ARNip de Raf-1

- 5 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* después de la liberación intratumoral mediada por el polímero HK. Claramente, el polímero HK ha sido validado como un vehículo de liberación local eficaz de ARNip. Esto condujo a los inventores a concluir que el polímero HK facilitaría la liberación local de ARNip en las heridas de la piel con las formulaciones adecuadas.
- 10 Durante las últimas décadas, los poliésteres biodegradables, tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), y poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), se han estudiado ampliamente para una amplia variedad de aplicaciones farmacéuticas y biomédicas. La familia de poliéster biodegradable se ha considerado como uno de los pocos polímeros biodegradables sintéticos con biodegradabilidad controlable, una excelente biocompatibilidad y alta seguridad. La necesidad de diversas formulaciones de fármacos para fármacos y vías de administración
- 15 diferentes tuvo como resultado el desarrollo de diversos tipos de copolímeros de bloque (por ejemplo, de dibloque, tribloque, multibloque y de bloque en forma de estrella) que consisten en los poliésteres biodegradables y poli(etilenglicol) (PEG).

Los dendrímeros PAMAM representan una emocionante nueva clase de la arquitectura macromolecular denominada polímeros de "estrella densa". A diferencia de los polímeros clásicos, los dendrímeros tienen un alto grado de uniformidad molecular, una estrecha distribución del peso molecular, características de tamaño y forma específicos, y una superficie terminal altamente funcionalizada. El proceso de fabricación es una serie de etapas repetitivas que comienzan con un núcleo iniciador central. Cada etapa de crecimiento posterior crecimiento representa una nueva

20 "generación" de polímero con un diámetro molecular más grande, el doble del número de sitios de superficie reactiva, y aproximadamente el doble del peso molecular de la generación anterior. Los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) son la clase más frecuente dendrímeros adecuados para muchas aplicaciones en la ciencia de materiales y de biotecnología. Los dendrímeros PAMAM constan de un núcleo de alquildiamina y ramificaciones de amina terciaria.

30 **Ejemplo 10: Los cócteles de ARNip reducen la expresión de los genes diana en células cultivadas.**

Se prepararon dúplex de ARNip dirigidos a los ARNN DE HOXB13, TGF-beta 2 y COX-2 de ser humano y de ratón *in vitro*.

- 35 1. Dúplex de ARNip preparados: Se han preparado tres secuencias dirigidas a cada uno de los tres ARNm, con extremo romo de 25 unidades:

hmHX-25-1: sentido 5'-r(GGUGGCUGGAACAGCCAGAUGUGUU)-3'
 antisentido 5'-r(AACACAUCUGGCUGUCCAGCCACC)-3'

hmHX-25-2: sentido 5'-r(GCUGGAACAGCCAGAUGUGUUGCCA)-3'
 antisentido 5'-r(UGGCAACACAUCUGGCUGUCCAGC)-3'

hmHX-25-3: sentido 5'-r(CGCCAGAUUACCAUCUGGUUUCAGA)-3'
 antisentido 5'-r(UCUGAAACCAGAUGGUAUCUGGCG)-3'

hmTF-25-1: sentido 5'-r(GGAUCCACGAGCCCAAGGGCUACCA)-3'
 antisentido 5'-r(UGGUAGCCCUUGGGCUCUGGAUCC)-3'

hmTF-25-2: sentido 5'-r(CCCAAGGGCUACCAUGCCAACUUCU)-3'
 antisentido 5'-r(AGAAGUUGGCAUGGUAGCCCUUGGG)-3'

hmTF-25-3: sentido 5'-r(GAGCCCAAGGGCUACCAUGCCAACU)-3'
 antisentido 5'-r(AGUUGGCAUGGUAGCCCUUGGGCUC)-3'

hmCX-25-1: sentido 5'-r(GGUCUGGUGCCUGGUCUGAUGAUGU)-3'
 antisentido 5'-r(ACAUCAUCAGACCAGGCACCAGACC)-3'

hmCX-25-2: sentido 5'-r(GAGCACCAUUCUCCUUGAAAGGACU)-3'
 antisentido 5'-r(AGUCCUUUCAAGGAGAAUGGUGCUC)-3'

hmCX-25-3: sentido 5'-r(CCUCAAUUCAGUCUCUCAUCUGCAA)-3'
 antisentido 5'-r(UUGCAGAUGAGAGACUGAAUUGAGG)-3'

2. También se prepararon dos secuencias control y se utilizaron en el estudio:

40

Lu25-a: sentido 5'-r(GAGGAGCCUUCAGGAUUACAAGAUU)-3'
 antisentido 5'-r(AAUCUUGUAAUCCUGAAGGCUCCUC)-3'
 GF25-a sentido 5'-r(GCUGACCCUGAAGUUCAUC)dTdT
 antisentido 5'-r(GAUGAACUUCAGGGUCAGC)dTdT

3. También se prepararon seis pares de los cebadores de PCR para la detección de la secuencia del ADNc de HOXB13, Cox-2 y TGF-beta1 y se sintetizaron para las secuencias tanto humanas como de ratón:

hHxup: 5'-GCCTCTCGGAGCGCCAGATT-3'
 hHxdn: 5'-CTAGTACTGGTTATCGTGAT-3'
 mHxup: 5'-CTCCAGCTCCTGTGCCTTAT-3'
 mHxdn: 5'-ACTGGCCATAGGCTGGTATG-3'.
 hCxup: 5'-CGGGCTGGGCCATGGGGTGGA-3'
 hCxdn: 5'-CCTATCAGTATTAGCCTGCTT-3'
 mCxup: 5'-GGAAGCCTTCTCCAACCTCT-3'
 mCxdn: 5'-GGATACACCTCTCCACCAAT-3'.
 hTgb2up: 5'-GAGTACTACGCCAAGGAGGTT-3'
 hTgb2dn: 5'-CCATTCATGAACAGCATCAGT-3'
 mTgb2up: 5'-CTACTGTGTGCTGAGCACCTT-3'
 mTgb2dn: 5'-CGCTGCTCGGCCACTCTGGCT-3'

5 4. Las células PC3 de carcinoma de próstata humano se usaron para la detección de la disminución de la expresión génica. Una serie de experimentos de transfección estándar se llevaron a cabo utilizando el protocolo proporcionado por el proveedor (Invitrogen) con los dúplex de ARNip identificados en la etapa 2 en consecuencia.

10 5. Se aislaron muestras de ARN total y se sometieron a análisis de RT-PCR utilizando los respectivos cebadores para PCR identificados en la etapa 3 anterior. Los resultados se muestran en las Figuras 10, 11, 12 y 13. Se ve que, como se detecta mediante RT-PCR, la expresión de los genes diana se reduce significativamente cuando el ARNip correspondiente focalización se transfecta, mientras que varios ARNip control (es decir, que no son diana) no tienen ningún efecto sobre la expresión.

15 **Ejemplo 11. Potente dúplex de ARNip dúplex para silenciar la expresión de TGF-β1, COX-2 y HoxB13 *in vitro***

La tabla 1 proporciona 10 secuencias de ARNip para cada uno de los genes diana, HoxB13, COX-2 y TGF-β.

20 *Selección de cuatro dúplex de ARNip para cada gen diana*

La secuencia control de ARNip se seleccionó dirigida una secuencia no relacionada y sin homólogo en seres humanos y ratón. Es Lu25-a: (sentido, 5'-GAGGAGCCUUCAGGAUUACAAGAUU-3' y antisentido, 5'-AAUCUUGUAAUCCU GAAGGCUCCUC-3'). Las cuatro secuencias de ARNip dirigidas a HOXB13 de ser humano y de ratón son: hmHX-1: (sentido, 5'-GGUGGCUGGAACAGCCAGAUGUGUU-3' y antisentido, 5'-AACACAUCUGGCUGUCCAGCCACC-3'); hmHX-2: (sentido, 5'-GCUGGAACAGCCAGAUGUGUCCCA-3' y antisentido, 5'-UGGCAACACAUUCUGGCUGUCCAGC-3'); hmHX-3: (sentido, 5'-CGCCAGAUUACCAUCUGGUUUCAGA-3' y antisentido, 5'-UCUGAAACCAGAUGGUAAUCUGGCG-3'); y hmHX-4: (sentido, 5'-CAAGGAUAUCGAAGGCUUGCUGGGA-3' y antisentido, 5'-UCCCAGCAAGCCUUCGAUAUCCUUG-3'). Las cuatro secuencias de ARNip dirigidas a COX-2 de ser humano y de ratón son: hmCX-1: (sentido, 5'-GGUCUGGUGCCUGGUCUGAUGAU-3' y antisentido, 5'-ACAUCAUCAGACCAGGCACCAGACC-3'); hmCX-2: (sentido, 5'-GAGCACCAUUCUCCUUGAAAGGACU-3' y antisentido, 5'-AGUCCUUUCAAGGAGAAUGGUGCUC-3'); hmCX-3: (sentido, 5'-CCUCAUU CAGUCUCUCAUCUGCAA-3' y antisentido, 5'-UUGCAGAUAGAGACUGAAUUGAGG-3'); y hmCX-4: (sentido, 5'-GUCUUUGGUCUGGUGCCUGGUCUGA-3' y antisentido, 5'-UCAGACCAGGCACCAGACCAAAGAC-3'). Las cuatro secuencias de ARNip dirigidas a TGF-β1 de ser humano y de ratón son: hmTF-1: (sentido, 5'-GGAUCCACGAGCCCAAGGGCUACCA-3' y antisentido, 5'-UGGUAGCCCUUGGGUCUGGAUCC-3'); hmTF-2: (sentido, 5'-CCCAAGGGCUACCAUGCCAACUUCU-3' y antisentido, 5'-AGAAGUUGGCAUGGUAGCCCUUGGG-3'); hmTF-3: (sentido, 5'

GAGCCCAAGGGCUACCAUGCCAACU-3' y antisentido, 5'-AGUUGGCAUGGUAGCCCUUGGGCUC-3'); y hmTF-4: (sentido, 5'-CCCCGAGGUGAUUUCCAUCUACAA-3' y antisentido, 5'-UUGUAGAUGGAAAUCACCUCCGGGG-3').
Transfección de dúplex de ARNip en cultivos celulares específicos

5 Para medir la disminución de la expresión génica de HoxB13 a niveles de mana y de proteína utilizando cuatro dúplex de ARNip seleccionados, las células REK que expresan HOXB13 se transfectaron mediante cuatro dúplex de ARNip con LipofectAmine 2000. Del mismo modo, para la medición de la disminución de la expresión génica de COX-2 a nivel de ARNm y de proteína utilizando cuatro dúplex de ARNip seleccionados, fibroblastos de prepuccio humano (HFF) obtenidos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA) se cultivan en placas de 10
 10 cm en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS), 100 µg/ml de estreptomycin y 100 U / ml de penicilina y se transfectaron con los dúplex de ARNip usando LipofectAmine 2000. Las células se deberán lavar dos veces con PBS e incubar en medio sin FBS durante 24 horas. El medio sin FBS se sustituyó por medio que contenía 10 % de FBS para iniciar el ciclo celular. Para la medición de la disminución de la expresión del gen TGF-β1 a niveles de ARNm y de proteínas utilizando cuatro dúplex de ARNip seleccionados, las células endoteliales embrionarias de ratón (MEEC) se transfectarán con ARNip-LipofectAmine 2000, seguido de análisis RT-PCR. Peligros potenciales: la transfección de las células con Lipofectamine 2000 puede no siempre funcionar de manera eficiente, deben aplicarse métodos de transfección alternativos, tales como electroporación u otros agentes de transfección. La transfección eficiente y el posterior análisis de RT-PCR pueden tener que funcionar en conjunto para lograr datos satisfactorios.

20 *Medición de los niveles de ARNm mediante RT-PCR*

El ARN total de cada una de esas líneas celulares transfectadas, incluyendo las células REK que expresan HoxB13 (de ratón), las células que expresan COX-2 (humanas) y las células endoteliales de ratón embrionario se aíslan y se purifican para el análisis RT-PCR. Para la detección del amplicón de HoxB133 (de ratón), a una reacción RT le sigue con una reacción de PCR usando el cebador directo 5' - CTCCAGCTCCTGTGCCTTAT-3' y el cebador inverso 5'-ACT GGCCATAGGCTGGTATG-3'. Para la detección del amplicón de COX-2 (de ser humano), a una reacción RT le sigue una reacción de PCR usando el cebador directo 5'-CGGGCTGGCCATGGGGTGA-3' y el cebador inverso 5'-CCTATCAGTATTAGCCTGCTT -3'. Para la detección del amplicón de TGF-β1 (de ratón), a una reacción RT le sigue con una reacción de PCR usando el cebador directo 5'-CTACTGTGTGCTGAGCACCTT-3' y el cebador inverso 5'-CGCTGCTCGGCCACTCTGGCT-3'. Los productos de PCR se deben cargar en un gel de agarosa al 1 % y se teñirán con bromuro de etidio. El producto de la PCR deberá exhibir los niveles de disminución de cada mana particular usando los dúplex de ARNip particulares. El resultado de este experimento es determinar la potencia de cada dúplex de ARNip y proporcionar el primer vistazo si un dúplex de ARNip en particular debe ser el más potente. El análisis de RT-PCR está estrechamente coordinado con el experimento de transfección de manera que se optimizan las condiciones adecuadas para la transfección eficiente para una línea celular en particular, con el fin de lograr la cantidad suficiente de ARN total para el análisis PCR. Además, la selección de los dúplex de ARNip más potentes para cada gen se deberá basa en tres experimentos repetidos.

40 *Medición de los niveles de proteínas utilizando ELISA*

Para medir los niveles de proteínas de las células transfectadas con los correspondientes dúplex de ARNip, el análisis de transferencia Western y el análisis ELISA deben ser suficientes y satisfactorios. Los lisados celulares o los medios de cultivo celular se utilizarán para la detección de proteínas. Aunque el ensayo ELISA para la detección HoxB13 de ratón no está disponible comercialmente, los inventores puede usar el anticuerpo policlonal de rata frente a HoxB 13 de ratón (Aviva Systems Biologics, San Diego, CA) para detectar la disminución mediada de ARNip en las células REK que expresan HoxB13 con un análisis de transferencia Western. El anticuerpo anti-Hoxb 13 de conejo se generó contra la porción N-terminal (aminoácidos 1-79) de HoxB ratón 13. Este anticuerpo debería reconocer la proteína HoxB13 tanto en ratones SV como defectivos. Esta última es una proteína truncada que se detiene en el aminoácido 33 del homeodominio. Antes de usar, los antisueros deberán purificarse por afinidad positivamente, seguido de purificación por afinidad negativa contra Hoxcl3 de ratón y Hoxdl3 de pollo para eliminar la posible reactividad cruzada con las otras proteínas Hoxl3. La tinción debe verse usando un microscopio Leica DMLB y las imágenes pueden capturarse utilizando un Sistema Digital DEI750D Optronics (Goleta, CA). La COX-2 humana se analiza utilizando el kit ELISA para COX-2 (Zymed, San Francisco, CA) que es un ensayo de tipo sándwich de inmunoabsorción ligado a enzimas para la detección cuantitativa de la COX-2 humana en sobrenadantes de cultivo celular y lisados celulares. Dado que la ciclooxigenasa (COX) es una enzima unida a la membrana, que tiene un peso molecular de 71 kDa, el lisado celular se debe preparar para el análisis ELISA. El TGF-β1 de ratón se analiza usando TGFβ1 (factor de crecimiento transformante beta 1, TGF-beta1, TGF-b1) de ser humano/ratón utilizando el kit de ELISA Ready-SET-Go (con placas prerrecubiertas). La selección de los dúplex de ARNip más potentes para cada gen se deberá basa en tres experimentos repetidos. El problema potencial es que en algún momento el dúplex de ARNip más potente seleccionado a partir de la disminución de mana no se correlaciona con el seleccionado de la disminución de proteínas. Cuando esa situación ocurre, los inventores deben fiarse de los datos de la disminución del nivel de ARNm, ya que es el reflejo directo de mecanismo de acción del ARNi. La discrepancia de la disminución del nivel de proteínas algunas veces puede deberse al efecto no específico o denominado "desviado", que no es el resultado del mecanismo de acción del ARNi.

Ejemplo 12. Selección del cóctel de ARNip más eficaz *in vivo*

Después de la selección del dúplex de ARNip más potente para cada uno de los siguientes tres genes, HOXB13, COX-2 y TGF- β 1 según los estudios de cultivo celular, se combinan juntos, ya que en el cóctel de ARNip se pueden usar varias proporciones de las combinaciones tales como 1: 1: 1, 2: 1: 1 y 3: 1: 1, etc. Debido a la importancia de HoxB13 en la cicatrización de heridas de la piel adulta, se determina un cambio adecuado en la proporción del dúplex de ARNip específico de HoxB13.

Modelo de ratón para la evaluación de cóctel de ARNip multidirigidos

Con el fin de evaluar el cóctel de ARNip apropiado y la formulación más adecuada, los inventores tienen acceso al ratón adulto defectivo (KO) en HoxB13. Los inventores encontraron que las heridas de KO de *HoxB13* exhiben varias características de las heridas fetales producidas en fases tempranas de la gestación, incluyendo el cierre más rápido, una mayor resistencia a la tracción y menos cicatrices dérmica en comparación con las heridas de sus homólogos de tipo salvaje (SV). La evaluación bioquímica reveló que los niveles de HA en la epidermis y en la dermis son significativamente mayores en la piel de KO *HoxB13* adultos sin heridas en comparación con la piel SV. Basándose en estos resultados, los inventores postularon que HoxB13 en la piel del adulto estimula la diferenciación, mientras que su ausencia crea un entorno más similar al fetal y que una consecuencia de este estado de tipo fetal potencia la cicatrización de heridas. Además de un modelo bien aceptado utilizando las heridas de la piel del dorso en ratones KO para *HoxB13*, los inventores también han establecido un modelo de cirugía de labio en ratón para imitar la cirugía de labio y el paladar leporinos de la cirugía, que se realiza bajo anestesia general y en condiciones estériles. Los ratones adultos SV y KO en HoxB13 (de 8-16 semanas de edad) reciben una sola herida por incisión en la piel de espesor completo de 0,5 cm en paralelo con sus dientes frontales, seguido de sutura (6,0 Nylon) de la herida, imitando la cirugía de labio y paladar leporino.

Las formulaciones utilizadas para la liberación del cóctel de ARNip multidirigidos

Para establecer una nanopartícula de polímero-ARNip, los inventores decidieron analizar primero el ramificado de histidina-lisina para esta formulación. La instalación del núcleo del biopolímero en la Universidad de Maryland sintetiza polímeros en un sintetizador Ranin Voyager (PTI, Tucson, AZ). El polímero HK ramificado, eficaz para la transferencia de ARNip *in vivo*, conformó un complejo con dúplex de ARNip para la administración local. El polímero se purifica mediante HPLC (Beckman, Fullerton, CA). Los segundos polímeros ramificados de H (histidina) y K (lisina) utilizados en este estudio deberán ser R-KR-KR-KR, donde R = [HHHKHHHKHHHKHHH] 2KH4NH4]. H3K4b es un polímero ramificado con el mismo núcleo y estructura descritos anteriormente, a excepción de las ramificaciones R que difieren: R = KHHHKHHHKHHHKHHHK. El HKP se puede disolver en solución acuosa y después mezclar con solución acuosa de ARNip en una proporción de 4: 1 en masa, formando nanopartículas de tamaño medio de 150-200 nm de diámetro. Las soluciones acuosas de HKP-ARNip eran semitransparentes sin agregación visible de precipitado, y se pueden almacenar a 4 °C durante al menos tres meses. Además de los polímeros HK, los inventores también pueden analizar dos tipos diferentes de vehículos poliméricos, PEI pegilado y dendrímero de PAMAM, con el cóctel de ARNip para una liberación eficaz en las zonas circundantes de las heridas de la piel. Todas estas formulaciones poliméricas de ARNip se disuelven en la solución D5W son ARNasa.

Administración del cóctel de ARNip multidirigidos en las heridas de la piel

Diversas formulaciones se evalúan en dos modelos diferentes de heridas de la piel, incluyendo formulaciones fijas con tres proporciones diferentes de tres dúplex de ARNip diferentes. Las tres relaciones son dúplex de ARNip dirigidos a HOXB13, COX-2 y TGF- β 1 a una proporción de 1: 1: 1, 2: 1: 1 y 3: 1: 1 formulados con el polímero H3K4b. Los grupos de estudio son: G1: 20 μ g de la formulación polímero HK-ARNip (50 μ l) para cada herida por cirugía labial; G2: 20 μ g de la formulación polímero HK-ARNip HoxB13 (50 μ l) para cada herida por cirugía labial; G3: 20 μ g de la formulación polímero HK-ARNip COX-2 (50 μ l) para cada herida por cirugía labial; G4: 20 μ g de la formulación polímero HK-ARNip TGF- β 1 (50 μ l) para cada herida por cirugía labial; G5: 20 μ g de la proporción uno de la formulación del cóctel polímero HK-ARNip (50 μ l) para cada herida por cirugía labial; G6: 20 μ g de la proporción dos de la formulación polímero HK-ARNip (50 μ l) para cada herida por cirugía labial; G7: 20 μ g de la proporción tres de la formulación polímero HK-ARNip (50 μ l) para cada herida por cirugía labial. En cada grupo hay cuatro animales. La misma administración está disponible para ratones tanto SV como KO para HoxB 13. El resultado de este estudio es demostrar el beneficio sinérgico de las formulaciones de cóctel de ARNip en comparación con la formulación de un solo ARNip.

Los impactos de las diferentes formulaciones en la cicatrización de heridas

Se analizan tres formulaciones con el cóctel de ARNip, utilizando el modelo de cirugía labial de ratón en ratones SV para HoxB 13 utilizando una única proporción de la combinación de ARNip combinación, tal como 1: 1: 1. El experimento incluye G1: 20 μ g de la formulación control de polímero HK-ARNip (50 μ l); G2: 20 μ g de la formulación control de polímero PEI Pegilado-ARNip (50 μ l); G3: 20 μ g de la formulación control de polímero dendrítico PAMAM-ARNip (50 μ l); G4: 20 μ g de la formulación control de cóctel de polímero HK-ARNip (50 μ l); G5: 20 μ g de la formulación control de cóctel de polímero PEI Pegilado-ARNip (50 μ l); y G6: 20 μ g de la formulación control de cóctel

de polímero dendrítico PAMAM-ARNip (50 µl). Cada grupo tiene cuatro animales. A los análisis de los niveles de ARNm y proteínas les siguen otros estudios *in vivo*. Los resultados proporcionan una formulación óptima del cóctel de ARNip multidirigidos para un protocolo clínicamente viable.

5 *Silenciamiento del gen diana in vivo a niveles de ARNm y de proteínas*

Las muestras de piel se escinden de ratón tanto SV como KO para HoxB13, ya sea en heridas de la piel de la espalda o heridas por cirugía labial y se sumergieron en DMEM rico en glucosa que contiene 10 % de FBS y antibióticos / fungizona, la superficie se esterilizó en etanol al 70 %, se diseccionó en secciones de 5-mm² y se digirieron en dispasa en DMEM (5 mg / ml) durante la noche a 4 °C. Las muestras de ARN total de tejidos y células se transcriben de forma inversa utilizando el kit y el protocolo RETROscript (Ambion). Para la tinción de anticuerpos, las muestras de piel fijadas con paraformaldehído de adulto SV y KO para *HoxB13* deberán procesarse, incluirse en parafina, seccionarse (6 m), y cocer durante la noche a 55 °C. El método similar de aislamiento de ARN y preparación de muestras para inmunohistoquímica se puede utilizar para las detecciones de COX-2 y TGF-β1 *in vivo*. El criterio para la formulación cóctel de ARNip más potente debe realizarse teniendo en cuenta el modelo de herida en la piel, el genotipo de HoxB13 y la relación de cada dúplex de ARNip. El mismo principio se debe considerar que disminución del nivel de ARNm es la indicación clave de la potencia del cóctel de ARNip multidirigidos.

20 *Los potenciales beneficios terapéuticos del cóctel de ARNip multidirigidos*

Para tener una evaluación inicial de los posibles beneficios terapéuticos del cóctel de ARNip, los inventores van a llevar a cabo dos análisis: Análisis histológico y HA. Las muestras de piel fijadas con paraformaldehído se procesan, incluyen en parafina y se seccionaron (6 m). Los portaobjetos se introducirán en horno a 55 °C y se teñirán con hematoxilina y eosina o con tinción tricrómica de Masson para el colágeno, utilizando protocolos estándar. Para la detección de HA, secciones de piel se bloquean en 2 % de FBS, se incuban con proteína de unión a HA biotinilada (bHABP, 1 µg/ml en PBS, Associates of Cape Cod, Inc., Falmouth, MA) durante la noche a 4 °C, se aclaran en PBS, se incuban con Cy-3-estreptavidina (1: 500; Jackson Immunoresearch Laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se aclaran en PBS y se montan como se ha descrito anteriormente. Como control negativo, el tejido debe incubarse en PBS solo. La inmunofluorescencia debe verse con un microscopio Leica DMLB y las imágenes se capturarán utilizando un Sistema Digital DEI-750D Optronics. El análisis histológico proporciona información gráfica acerca de la diferencia morfológica entre las heridas de la piel tratadas y no tratadas y las intensidades de la presencia de la proteína HA.

35 **Ejemplo 13. Desarrollo de un protocolo clínico viable para el cóctel de ARNip multidirigidos**

Una proporción adecuada de dúplex de ARNip en la formulación de un cóctel se define con una formulación de polímero optimizada, y se correlaciona con un modelo concreto de ARNip de ratón y cócteles de los mismos, se ensaya en el modelo de cirugía labial.

40 *La curva dependiente de la dosis de la formulación cóctel de ARNip multidirigidos*

Para definir la dosis adecuada de las formulaciones de cóctel de ARNip candidatos terapéuticos definidos, se analizan 6 dosis diferentes en el modelo de cirugía labial de ratón. Los grupos de ensayo van a ser G1: aplicar 2 µg / 50 µl sobre la herida; G2: aplicar 10 µg / 50 µl sobre la herida; G3: aplicar 20 µg / 50 µl sobre la herida; G4: aplicar 30 µg / 50 µl sobre la herida; G5: aplicar 40 µg / 50 µl sobre la herida y G6: aplicar 60 µg / 50 µl sobre la herida. Cada grupo tiene cuatro animales. Las lecturas bioquímicas y de biología molecular deben medirse junto con la evaluación histológica y morfológica.

50 *Análisis histológico y HA*

Las muestras de piel fijadas con paraformaldehído se procesan, incluyen en parafina y se seccionaron (6 m). Los portaobjetos se introducen en horno a 55 °C y se teñirán con hematoxilina y eosina o con tinción tricrómica de Masson para el colágeno, utilizando protocolos estándar. Para la detección de HA, secciones de piel se bloquean en 2 % de FBS, se incuban con proteína de unión a HA biotinilada (bHABP, 1 µg/ml en PBS, Associates of Cape Cod, Inc., Falmouth, MA) durante la noche a 4 °C, se aclaran en PBS, se incuban con Cy-3-estreptavidina (1: 500; Jackson Immunoresearch Laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se aclaran en PBS y se montan como se ha descrito anteriormente. Como control negativo, el tejido debe incubarse en PBS solo. La inmunofluorescencia debe verse con un microscopio Leica DMLB y las imágenes se capturarán utilizando un Sistema Digital DEI-750D Optronics. El análisis histológico proporciona información gráfica acerca de la diferencia morfológica entre las heridas de la piel tratadas y no tratadas y las intensidades de la presencia de la proteína HA.

Cuantificación del contenido en colágeno

65 Contenido en colágeno se determina midiendo el contenido en hidroxiprolina de las muestras. En pocas palabras, las muestras de espesor completo de piel dorsal (≈16 mg) cosechadas de ratones adultos de 8 a 16 semanas de

edad (n = 6 cada una para SV y KO para *HoxB13*) se liofilizan durante la noche y se hidrolizan en HCl 6 N durante 18 horas a 110 °C (uso suficiente para cubrir el tejido) y después se ajusta el pH a un valor entre 6 y 7 con NaOH. Las muestras se diluyen a 5 ml con H₂O y se filtran usando papel de filtro Whatman. Las siguientes soluciones se añaden sucesivamente a 1,0 ml de cada muestra: solución de cloramina T (1,0 ml, 0,05 M, temperatura ambiente durante 20 minutos), ácido perclórico (1,0 ml, 3,15 M, temperatura ambiente durante 5 minutos) y 20 % de p-dimetilaminobenzaldehído (1,0 ml). Las muestras deben incubarse 60 °C durante 20 minutos y se enfrían a temperatura ambiente. Las absorbancias se van a leer a una longitud de onda de 557,5 nm y las concentraciones de hidroxiprolina van a determinarse utilizando una curva estándar. El siguiente cálculo se utilizará para determinar el contenido en colágeno: $\mu\text{g de hidroxiprolina} \times 7,46 = \mu\text{g de colágeno}$. Los valores se indican en $\mu\text{g/mg}$ de peso seco.

Medición de tensiometría

Para este estudio, la herida por incisión más la piel circundante se escinde cuidadosamente y el tejido se fija en paraformaldehído al 4% durante la noche. Toda el tejido tiene que fijarse durante el mismo tiempo y la tensiometría en todos los puntos de tiempo se lleva a cabo la el día después de obtención de muestras de la herida. Antes del análisis tensiométrico, las muestras se cortarán cuidadosamente a una longitud y anchura uniformes, y se determina el espesor de la piel en el sitio de la herida. Los estudios de tensiometría se llevan a cabo utilizando un sistema de ensayo Instron. Los resultados se indicarán como el módulo Y y el módulo Y –e obtiene mediante el cálculo del esfuerzo / deformación y es representativo de la fuerza total de la herida. El esfuerzo es la cantidad de fuerza requerida para romper el área de sección transversal/aparte de heridas en la herida. La deformación es la longitud original de la muestra / longitud a la rotura. Los valores brutos de deformación y las áreas de sección transversal no variarán significativamente en cualquier punto de tiempo después de la formación de la herida en heridas SV y KO para *HoxB13* (datos no mostrados). Por lo tanto, las diferencias en los valores del módulo Y se deben principalmente al componente de fuerza del valor del esfuerzo.

Ejemplo 14. Preparación de inhibidores de ARNip

La presente invención proporciona un nuevo abordaje para preparar secuencias dirigidas de ARNip. Hay tres aspectos importantes que difieren de otros abordajes:

- (1) las secuencias dirigidas por los dúplex de ARNip tienen homología con las secuencias del mismo gen tanto de ser humano como de ratón. Eso significa que cada uno de los dúplex de ARNip disminuye la misma diana génica en células tanto de ser humano como de ratón. Por ejemplo, un potente ARNip específico del gen *HoxB13* disminuye la expresión génica de *HoxB13* de ser humano y de *HoxB 13* de ratón.
- (2) las secuencias se prepararon en tres longitudes diferentes: 21 unidades, 23 unidades y 25 unidades. Las longitudes óptimas de una secuencia dirigida de ARNip dada se identifican en diversos sistemas modelo.
- (3) los oligonucleótidos de ARNip se preparan en forma extremo romo o de extremo cohesivo. Como se usa en el presente documento, "oligonucleótidos" y términos similares basados en el mismo se refieren a oligonucleótidos cortos compuestos por nucleótidos de origen natural, así como a los oligonucleótidos compuestos por nucleótidos sintéticos o modificados. Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se utilizan como sinónimos en el presente documento.

Un oligonucleótido que es un ARNip puede tener cualquier número de nucleótidos entre 19 y 30 nucleótidos. En una realización preferida, un ARNip puede tener cualquier número de nucleótidos entre 19 y 27 nucleótidos. Los ARNip pueden tener dos extremos romos o dos extremos cohesivos, o un extremo romo con un extremo cohesivo. Los nucleótidos salientes de un extremo cohesivo pueden variar de uno a cuatro o más.

En una realización particularmente preferida, la invención proporciona ARNip de 21, 23 y 25 pares de bases con extremos romos.

Tabla 1. Secuencias de dúplex de ARNip dirigidos a los genes *HoxB13*, *COX-2* y *TGF-beta 2* en genomas tanto de ser humano como de ratón.

| ARNip de 25 unidades | | |
|--------------------------------------|---|---------------------------|
| HoxB 13 ser humano ratón, de 5' a 3' | 1 | ggcuccauggagcccggcaauuaug |
| | 2 | ccauggagcccggcaauuaugccac |
| | 3 | ggagcccggcaauuaugccaccuug |
| | 4 | caaggauaucgaaggcuugcuggga |
| | 5 | gguggcuggaacagccagauguguu |
| | 6 | gcuggaacagccagauguguugcca |
| | 7 | ggacaagaggcgcaagaucucggca |

| | | |
|---------------------------------------|----|----------------------------|
| | 8 | gcaagaucucggcagccaccagccu |
| | 9 | cgccagauuaccaucugguuucaga |
| | 10 | ccaucugguuucagaaccgccgggu |
| COX-2 ser humano ratón, de 5' a 3' | 1 | gauguuugcauucuugcccagcac |
| | 2 | caucaguuuucaagacagaucaua |
| | 3 | guuuuucagacagaucauaagcga |
| | 4 | gucuuuggucuggugccuggucuga |
| | 5 | ggucuggugccuggucugaugaugu |
| | 6 | gugccuggucugaugauguauugcca |
| | 7 | gagcaccuucuccuugaaggacu |
| | 8 | caccuucuccuugaaggacuauu |
| | 9 | ccucaauucagucucucaucugcaa |
| | 10 | caauucagucucucaucugcaauaa |
| TGF-beta ser humano ratón, de 5' a 3' | 1 | gcgggcagauccugagcaagcugaa |
| | 2 | ggcagauccugagcaagcugaagcu |
| | 3 | cagauccugagcaagcugaagcuca |
| | 4 | ccccggaggugauuuccaucuacaa |
| | 5 | ccggaggugauuuccaucuacaa |
| | 6 | cuccgaaaugccauccgccccacu |
| | 7 | gaaaugccauccgccccacuucu |
| | 8 | cgcccacuucuacagaccuacu |
| | 9 | cacuuucuacagaccuacuucaga |
| | 10 | ccaguggugaucagaaaacuauaaa |

Las secuencias que figuran en las Tablas 2 - 9 son las secuencias de codificación de ARNm diana que pueden usarse para las secuencias de ARNip cambiando la "t" por "u", tales como las secuencias enumeradas en la Tabla 1.

5 Tabla 2. Secuencias para el factor transformante de crecimiento beta 1:

| Organismo | Gen | Homología | Longitud | Nº | Secuencias sentido |
|------------|--------|------------|-------------|----|------------------------|
| Ser humano | TGF-b1 | Ser humano | 21 unidades | 1 | ggtcaccgcgctgtaatggt |
| Ratón | | Ratón | | 2 | caccgcgctgtaatggtgga |
| | | | | 3 | ccaactattgctcagctcca |
| | | | | 4 | gcggcagctgtacattgactt |
| | | | | 5 | ccacgagcccaagggtacca |
| | | | | 6 | gccaagggtaccatgcaa |
| | | | | 7 | ccaagggtaccatgccaact |
| | | | | 8 | cgcaagccaagggtgagcag |
| | | | | 9 | cgctcctgcaagtgcagctga |
| | | | | 10 | caagggtaccatgccaactt |
| | | | 23 unidades | 1 | gaggtcaccgcgctgtaatggt |
| | | | | 2 | gtcaccgcgctgtaatggtgga |
| | | | | 3 | gtcggcagctgtacattgactt |
| | | | | 4 | cgagcccaagggtaccatgcca |
| | | | | 5 | gccaagggtaccatgccaact |

ES 2 545 963 T3

| | | |
|-------------|----|---------------------------|
| | 6 | caagggtaccatgccaacttct |
| | 7 | gtgctcctgcaagtcagctg |
| | 8 | ccaagggtaccatgccaactt |
| | 9 | accaactattgctcagctccac |
| | 10 | ccgcccggcccgtgccgaggc |
| 25 unidades | 1 | ggatccacgagccaagggtacca |
| | 2 | gatccacgagccaagggtaccat |
| | 3 | cacgagccaagggtaccatgcca |
| | 4 | gagccaagggtaccatgccaact |
| | 5 | ccaagggtaccatgccaacttct |
| | 6 | gaggcaccgctgctaattgtgg |
| | 7 | gtacaacagcaccgctgaccgggtg |
| | 8 | ggcggcctccccatgccgcct |
| | 9 | |
| | 10 | |

Tabla 3. Secuencias para el factor transformante de crecimiento beta 2:

| Organismo | Gen | Homología | Longitud | Nº | Secuencias sentido |
|------------|-------|------------|-------------|----|---------------------------|
| Ser humano | TGFb2 | Ser humano | 21 unidades | 1 | cgggcagatcctgagcaagct |
| Ratón | | Ratón | | 2 | gcagatcctgagcaagctgaa |
| | | | | 3 | gagtactacgccaaggagggt |
| | | | | 4 | ccatcccggcccactttctaca |
| | | | | 5 | ggcagatcctgagcaagctga |
| | | | | 6 | gatcctgagcaagctgaagct |
| | | | | 7 | ccatcccggcccactttctaca |
| | | | | 8 | ggagggtattccatctacaa |
| | | | | 9 | ccgaaaatgccatcccggcca |
| | | | | 10 | cactttctacagaccctactt |
| | | | 23 unidades | 1 | cctgagcaagctgaagctacca |
| | | | | 2 | gagtactacgccaaggagggtta |
| | | | | 3 | ccatcccggcccactttctacaga |
| | | | | 4 | ccgcccactttctacagacccta |
| | | | | 5 | cagatcctgagcaagctgaagct |
| | | | | 6 | ccggagggtattccatctacaa |
| | | | | 7 | ctccgaaaatgccatcccggcca |
| | | | | 8 | cactttctacagaccctactca |
| | | | | 9 | ccagtggtgatcagaaaactata |
| | | | | 10 | ggaagaccccatctctgcta |
| | | | 25 unidades | 1 | gcgggcagatcctgagcaagctgaa |
| | | | | 2 | ggcagatcctgagcaagctgaagct |
| | | | | 3 | cagatcctgagcaagctgaagctca |
| | | | | 4 | ccccggagggtattccatctacaa |
| | | | | 5 | ccggagggtattccatctacaaca |
| | | | | 6 | ctccgaaaatgccatcccggcact |

| | |
|----|---------------------------|
| 7 | gaaaatgcatccgcccacttct |
| 8 | cgcccactttctacagaccctact |
| 9 | cactttctacagaccctactcaga |
| 10 | ccagtggtgatcagaaaactataaa |

Tabla 4. Secuencias para COX-2:

| Organismo | Gen | Homología | Longitud | Nº | Secuencias sentido |
|------------|-------|------------|-------------|----|---------------------------|
| Ser humano | COX-2 | Ser humano | 21 unidades | 1 | caaaagctggaagccttctc |
| Ratón | | Ratón | | 2 | gatgttgattctttgccca |
| | | | | 3 | cattctttgccagcactca |
| | | | | 4 | catcagttttcaagacagat |
| | | | | 5 | cagttttcaagacagatcat |
| | | | | 6 | gttttcaagacagatcataa |
| | | | | 7 | ctgcgctttcaaggatgga |
| | | | | 8 | gtcttggctggtgcctggt |
| | | | | 9 | cttggctggtgcctggtct |
| | | | | 10 | ggagcaccattctcctgaaa |
| | | | 23 unidades | 1 | gatgttgattctttgccagc |
| | | | | 2 | catcagttttcaagacagatca |
| | | | | 3 | cagttttcaagacagatcataa |
| | | | | 4 | ctgcgctttcaaggatgga |
| | | | | 5 | gtcttggctggtgcctggtct |
| | | | | 6 | cttggctggtgcctggtctga |
| | | | | 7 | ggtctggtgcctggtctgatgat |
| | | | | 8 | ctggtgcctggtctgatgatga |
| | | | | 9 | gcctggtctgatgatgatgcca |
| | | | | 10 | gagcaccattctcctgaaagga |
| | | | 25 unidades | 1 | gatgttgattctttgccagcac |
| | | | | 2 | catcagttttcaagacagatcata |
| | | | | 3 | gttttcaagacagatcataagcga |
| | | | | 4 | gtcttggctggtgcctggtctga |
| | | | | 5 | ggtctggtgcctggtctgatgat |
| | | | | 6 | gtgcctggtctgatgatgatgcca |
| | | | | 7 | gagcaccattctcctgaaaggact |
| | | | | 8 | caccattctcctgaaaggacttat |
| | | | | 9 | cctcaattcagtctctcatctgcaa |
| | | | | 10 | caattcagtctctcatctgcaataa |

5 Tabla 5. Secuencias para HoxB13:

| | | | | | |
|------------|--------|------------|-------------|---|-----------------------|
| Ser humano | HoxB13 | Ser humano | 21 unidades | 1 | ggctccatggagcccggcaat |
| Ratón | | Ratón | | 2 | ccagcctatggccagttacct |
| | | | | 3 | ccatggagcccggcaattatg |
| | | | | 4 | gcccggcaattatgccacct |

| | | |
|-------------|----|---------------------------|
| | 5 | caaggatatcgaaggcttgct |
| | 6 | gatatcgaaggcttgctggga |
| | 7 | gtggctggaacagccagatgt |
| | 8 | gctggaacagccagatgtgtt |
| | 9 | gatctcggcagccaccagcct |
| | 10 | cgccagattaccatctggttt |
| 23 unidades | 1 | ggctccatggagcccggcaatta |
| | 2 | catggagcccggcaattatgcca |
| | 3 | ggagcccggcaattatgccacct |
| | 4 | gtggctggaacagccagatgtgt |
| | 5 | cgccagattaccatctggtttca |
| | 6 | ccagattaccatctggtttcaga |
| | 7 | atctggttcagaaccgccgggt |
| | 8 | aagatctcggcagccaccagcct |
| | 9 | ccagattaccatctggtttcaga |
| | 10 | cgccagattaccatctggtttca |
| 25 unidades | 1 | ggctccatggagcccggcaattatg |
| | 2 | ccatggagcccggcaattatgccac |
| | 3 | ggagcccggcaattatgccaccttg |
| | 4 | caaggatatcgaaggcttgctggga |
| | 5 | ggtggctggaacagccagatgtgtt |
| | 6 | gctggaacagccagatgtgttgcca |
| | 7 | ggacaagaggcgcaagatctcggca |
| | 8 | gcaagatctcggcagccaccagcct |
| | 9 | cgccagattaccatctggtttcaga |
| | 10 | ccatctggtttcagaaccgccgggt |

Tabla 6. Secuencias para PDGF a:

| Organismo | Gen | Homología | Longitud | Nº | Secuencias sentido |
|------------|--------|------------|-------------|----|-------------------------|
| Ser humano | PDGF a | Ser humano | 21 unidades | 1 | caccctcctccggccgcgct |
| Ratón | | Ratón | | 2 | ctcctccgggccgcgctccct |
| | | | | 3 | gtactgaatttcgccccaca |
| | | | | 4 | ctgaatttcgccccacagga |
| | | | | 5 | ggagcgcgccccgcggcct |
| | | | | 6 | ctgctgctcctcggctgcgga |
| | | | | 7 | gctgctcctcggctgcggata |
| | | | | 8 | gatccacagcatccgggacct |
| | | | | 9 | ccacagcatccgggacctcca |
| | | | | 10 | catccgggacctccagcgact |
| | | | 23 unidades | 1 | gccaccctcctccggccgcgct |
| | | | | 2 | ccctcctccgggccgcgctccct |
| | | | | 3 | gatggtactgaatttcgcccca |
| | | | | 4 | ctggagcgcgccccgcggcct |
| | | | | 5 | gcgccccccccgcggcctcgct |
| | | | | 6 | gcctcgggacgcatgaggacct |

ES 2 545 963 T3

| | | | |
|--|-------------|----|----------------------------|
| | | 7 | ggctgctgctgctcctcggt |
| | | 8 | gcctgctgctcctcggtgcgga |
| | | 9 | cagatccacagcatccgggacct |
| | | 10 | gaccaggacggtcatttacgaga |
| | 25 unidades | 1 | gcgccaccctcctccgggcccgcgct |
| | | 2 | caccctcctccgggcccgcgctcct |
| | | 3 | gggatggactgaatttcgccgcca |
| | | 4 | gatggactgaatttcgccgcaca |
| | | 5 | ggtactgaatttcgccgccacagga |
| | | 6 | ggctggagcgcgccgccccgcggcct |
| | | 7 | gagcgcgccgccgcccgcgctcgcct |
| | | 8 | ccagcgcctcgggacgcgatgagga |
| | | 9 | gcgcctcgggacgcgatgaggacct |
| | | 10 | gcctgctgctcctcggtgcggata |

Tabla 7. Secuencias para Lamina B1:

| Lamina B1 | | | | |
|------------|------------|-------------|----|---------------------------|
| Ser humano | Ser humano | 21 unidades | 1 | ggagacggagaacagcgcgct |
| Ratón | Ratón | | 2 | ggagaacagcgcgctgcagct |
| | | | 3 | gaacagcgcgctgcagctgca |
| | | | 4 | gaacagcgcgctgcagctgca |
| | | | 5 | gaggctgggagatgatcagaa |
| | | | 6 | ggctgggagatgatcagaaaa |
| | | | 7 | gagcctactgaggacttga |
| | | | 8 | cagttagcagatgaaacttta |
| | | | 9 | gttagcagatgaaactttact |
| | | | 10 | caatgggaggctgggagatga |
| | | 23 unidades | 1 | ctggagacggagaacagcgcgct |
| | | | 2 | gagaacagcgcgctgcagctgca |
| | | | 3 | gagcctactgaggacttgagt |
| | | | 4 | gggaggctgggagatgatcagaa |
| | | | 5 | cagagcctactgaggacttga |
| | | | 6 | cgacacggcccgcgagcgcgcca |
| | | | 7 | cagttagcagatgaaactttact |
| | | | 8 | gttagcagatgaaactttactta |
| | | | 9 | ccaatgggaggctgggagatgat |
| | | | 10 | gaagatgtgaaggttatattgaa |
| | | 25 unidades | 1 | gcctggagacggagaacagcgcgct |
| | | | 2 | cggagaacagcgcgctgcagctgca |
| | | | 3 | gagcctactgaggacttgagttt |
| | | | 4 | gggaggctgggagatgatcagaaaa |
| | | | 5 | gtcagagcctactgaggacttga |
| | | | 6 | gacgacacggcccgcgagcgcgcca |
| | | | 7 | gacacggcccgcgagcgcgccaagc |
| | | | 8 | cagttagcagatgaaactttactta |
| | | | 9 | gatcaaccaatgggaggctgggaga |

| | |
|----|--------------------------|
| 10 | ccaatggaggctgggagatgatca |
|----|--------------------------|

Tabla 8. Secuencias para VEGF A:

| Organismo | Gen | Homología | Longitud | Nº | Secuencias sentido |
|------------|-------|------------|-------------|----|---------------------------|
| Ser humano | VEGFA | Ser humano | 21 unidades | 1 | gtgtgcgacagctgctcca |
| Ratón | | Ratón | | 2 | ccaccatgccaagtgtcca |
| | | | | 3 | cctggtggacatctccagga |
| | | | | 4 | gcacataggagagatgagctt |
| | | | | 5 | caagatccgcagacgtgtaa |
| | | | | 6 | ggcggaggcagcttgagttaa |
| | | | | 7 | cttgagttaaacgaacgtact |
| | | | | 8 | ggaaggagcctccctcagggt |
| | | | | 9 | cacttgggtccggagggcga |
| | | | | 10 | cagtattcttggttaattt |
| | | | 23 unidades | 1 | gcctccgaaacctgaacttct |
| | | | | 2 | ctccaccatgccaagtgtcca |
| | | | | 3 | cctggtggacatctccaggagt |
| | | | | 4 | cagcacataggagagatgagctt |
| | | | | 5 | gcttgagttaaacgaacgtact |
| | | | | 6 | gttaaacgaacgtactgcagat |
| | | | | 7 | ggaaggagcctccctcagggtt |
| | | | | 8 | ctccctcagggttcgggaacca |
| | | | | 9 | ctaagtattggtgtcttact |
| | | | | 10 | gagaaagtgtttatatacggta |
| | | | 25 unidades | 1 | cctccgaaacctgaacttctgct |
| | | | | 2 | ccaccatgccaagtgtcccaggct |
| | | | | 3 | ccctggtggacatctccaggagta |
| | | | | 4 | gatccgcagacgtgaaatgttct |
| | | | | 5 | cgcagacgtgaaatgttctgcaa |
| | | | | 6 | gtaaatgttctgcaaaaacacaga |
| | | | | 7 | cagcttgagttaaacgaacgtactt |
| | | | | 8 | gttaaacgaacgtactgcagatgt |
| | | | | 9 | ccatgccaagtgtcccaggctgca |
| | | | | 10 | ccctggtggacatctccaggagta |

5 Tabla 9. Secuencias para FGF-2:

| Organismo | Gen | Homología | Longitud | Nº | Secuencias sentido |
|------------|-------|------------|-------------|----|------------------------|
| Ser humano | FGF-2 | Ser humano | 21 unidades | 1 | ctcaaggacccaagcggct |
| Ratón | | Ratón | | 2 | ggccactcaaggacccaag |
| | | | | 3 | ggcttctctgcgatccat |
| | | | | 4 | caagcagaagagagaggagtt |
| | | | | 5 | cagaagagagaggagtgtgt |
| | | | | 6 | gagaggagtgtgtctatcaa |
| | | | | 7 | gaagagagaggagtgtgtct |
| | | | | 8 | gaatctaataactacaataact |

| | | |
|-------------|----|---------------------------|
| | 9 | cagttggtatgtggcactgaa |
| | 10 | cactgaaacgaactgggcagt |
| 23 unidades | 1 | cactcaaggacccaagcggt |
| | 2 | caagcagaagagagaggagtgt |
| | 3 | gcagaagagagaggagtgtgt |
| | 4 | cagaagagagaggagtgtgtct |
| | 5 | gaagagagaggagtgtgtctat |
| | 6 | gagagaggagtgtgtctatcaa |
| | 7 | ggaatctaataactacaactt |
| | 8 | ggtatgtggcactgaaacgaact |
| | 9 | gttggtatgtggcactgaaacga |
| | 10 | gtggcactgaaacgaactgggca |
| 25 unidades | 1 | gccactcaaggacccaagcggt |
| | 2 | caagcagaagagagaggagtgtgt |
| | 3 | gaagagagaggagtgtgtctatca |
| | 4 | cagaagagagaggagtgtgtctat |
| | 5 | gaagagagaggagtgtgtctatca |
| | 6 | ggaatctaataactacaatactac |
| | 7 | ctaataactacaatactaccggtc |
| | 8 | cagttggtatgtggcactgaaacga |
| | 9 | gtggcactgaaacgaactgggcagt |
| | 10 | tcttccaatgtctgctaagagctga |

Ejemplo 15. Método para la preparación del cóctel de ARNiP

La presente invención proporciona el cóctel terapéutico de ARNiP dirigidos a múltiples genes de control de enfermedades en el mismo tratamiento. La presente invención proporciona agentes de ARNi, tales como oligonucleótidos de ARNiP, que son químicamente similares a la misma fuente de suministro y el mismo proceso de fabricación, y están compuestos por cuatro tipos de nucleótidos con secuencias diferentes. La invención proporciona un medicamento en cóctel de ARNiP mejorar de la cicatrización de heridas sin cicatrices dirigiendo los genes implicados en el proceso de cicatrización de heridas, incluidos TGF-β, COX-2, HoxB13 y otros.

En una realización preferida, el cóctel de ARNiP tiene las siguientes características:

- (1) El cóctel de ARNiP contiene al menos tres dúplex de ARNiP dirigidos al menos a tres genes diferentes (no tres secuencias del mismo gen) a una proporción necesaria para la terapia.
- (2) Los cócteles de ARNiP para cada combinación están dirigidos a las funciones de cada gen en un fondo de una red de biología de sistemas, en la que estos genes están funcionando ya sea en la misma vía o en una diferente.

Tabla A. El cóctel de ARNiP dirigidos a HoxB13, COX-2 y TGF-β1

| | | |
|--------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| Combinaciones de cóctel de ARNiP (secuencias de ARNiP) | | |
| HoxB 13 | | |
| COX-2 | Homólogos humanos y de ratón | |
| TGF-β1 | | |
| Cóctel 1 | HoxB13 | 5'-caaggauaucgaagggcuugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-gucuuuggucuggugccuggucuga-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ccccggaggugauuuccaucuacaa-3' |
| Cóctel 2 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaagggcuugcuggga-3' |

| | | |
|----------|---------|---------------------------------|
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ccggaggugauuuccaucuacaaca-3' |
| Cóctel 3 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-gagcaccuucuccuugaaaggacu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-cgcccacuuucacagaccuacuu-3' |
| Cóctel 4 | HoxB 13 | 5'-cgccagauuaccuucugguuucaga-3' |
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-cgcccacuuucacagaccuacuu-3' |

Tabla B. El segundo cóctel de ARNip dirigidos a HoxB 13, COX-2 y VEGFA.

| | | |
|---------------------------------------------------------|---------|---------------------------------|
| Combinaciones de cóctel de ARNip (secuencias dirigidas) | | |
| HoxB13 | | |
| COX-2 Homólogos humanos y de ratón | | |
| VEGFA | | |
| Cóctel 1 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-gucuuuggucuggugccuggucuga-3' |
| | VEGFA | 5'-ccaugccaagugguccaggcugca-3' |
| Cóctel 2 | HoxB13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | VEGFA | 5'-ccaugccaagugguccaggcugca-3' |
| Cóctel 3 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-gagcaccuucuccuugaaaggacu-3' |
| | VEGFA | 5'-ccaugccaagugguccaggcugca-3' |
| Cóctel 4 | HoxB13 | 5'-cgccagauuaccuucugguuucaga-3' |
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | VEGFA | 5'-ccaugccaagugguccaggcugca-3' |

5 Tabla C. Cóctel de ARNip alternativo dirigido a HoxB13, COX-2, TGF-B1 y TGF-β2:

| | | |
|---------------------------------------------------------|---------|-----------------------------|
| Combinaciones de cóctel de ARNip (secuencias dirigidas) | | |
| HoxB13 | | |
| COX-2 Homólogos humanos y de ratón | | |
| TGF-β1 | | |
| TGF-β2 | | |
| Cóctel 1 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcu-3' |
| | COX-2 | 5'-gucuuuggucuggugccuggu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-cacgagccaagggcuaccu-3' |
| | TGF-β2 | 5'-ggaggugauuuccaucuaca-3' |

| | | |
|----------|--------|---------------------------------|
| Cóctel 2 | HoxB13 | 5'-caaggauaucgaagguugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-cacgagccaagggcuaccaugcca-3' |
| | TGF-β2 | 5'-ccggaggugauuuccaucuacaaca-3' |
| Cóctel 3 | HoxB13 | 5'-caaggauaucgaagguugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-gagcaccuucuccuugaaaggacu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ggauccacgagccaagggcuacca-3' |
| | TGF-β2 | 5'-cagauccugagcaagcugaagcuca-3' |
| Cóctel 4 | HoxB13 | 5'-cgccagauuaccaucugguuucaga-3' |
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ggauccacgagccaagggcuacca-3' |
| | TGF-β2 | 5'-cagauccugagcaagcugaagcuca-3' |

Tabla D. Cóctel de ARNip alternativo dirigido a HoxB13, TGF-β1 y TGF-β2:

| Combinaciones de cóctel de ARNip (secuencias dirigidas) | | |
|---------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| HoxB13 | Homólogos humanos y de ratón | |
| TGF-β1 | | |
| TGF-β2 | | |
| Cóctel 1 | HoxB13 | 5'-caaggauaucgaagguugcu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-cacgagccaagggcuaccu-3' |
| | TGF-β2 | 5'-ggaggtgattccatctacaa-3' |
| Cóctel 2 | HoxB13 | 5'-caaggauaucgaagguugcuggga-3' |
| | TGF-β1 | 5'-cacgagccaagggcuaccaugcca-3' |
| | TGF-β2 | 5'-ccggaggugauuuccaucuacaaca-3' |
| Cóctel 3 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaagguugcuggga-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ggauccacgagccaagggcuacca-3' |
| | TGF-β2 | 5'-cagatcctgagcaagctgaagctca-3' |
| Cóctel 4 | HoxB 13 | 5'-cgccagauuaccaucugguuucaga-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ggauccacgagccaagggcuacca-3' |
| | TGF-β2 | 5'-cagatcctgagcaagctgaagctca-3' |

5 Tabla E. Cóctel de ARNip alternativo dirigidos a HoxB13, COX-2 y TGF-β1:

| Combinaciones de cóctel de ARNip (secuencias de ARNip) | | |
|--------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| HoxB 13 | Homólogos humanos y de ratón | |
| COX-2 | | |
| TGF-β1 | | |
| Cóctel 1 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaagguugcu-3' |
| | COX-2 | 5'-gucuuuggucuggugccuggucu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-cacgagccaagggcuaccu-3' |

| | | |
|----------|---------|---------------------------------|
| Cóctel 2 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ggauccacgagccaagggcuacca-3' |
| Cóctel 3 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-gagcaccuucuccuugaaaggacu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ggauccacgagccaagggcuacca-3' |
| Cóctel 4 | HoxB 13 | 5'-cgccagauuaccaucugguuucaga-3' |
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ggauccacgagccaagggcuacca-3' |

Tabla F. Cóctel de ARNip alternativo dirigido a Hoxβ13, COX-2, TGF-β1 y PDGFa:

| | | |
|--------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Combinaciones de cóctel de ARNip (secuencias de ARNip) | | |
| HoxB13 | | |
| COX-2 | Homólogos humanos y de ratón | |
| TGF-β1 | | |
| PDGFa | | |
| Cóctel 1 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcu-3' |
| | COX-2 | 5'-gucuuuggucuggugccuggucu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-cacgagccaagggcuaccu-3' |
| | PDGF a | 5'-gtactgaatttcgccccaca-3' |
| Cóctel 2 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ggauccacgagccaagggcuacca-3' |
| | PDGF a | 5'-gggaugguacugaauuucgcccca-3' |
| Cóctel 3 | HoxB13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-gagcaccuucuccuugaaaggacu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ggauccacgagccaagggcuacca-3' |
| | PDGF a | 5'-gggaugguacugaauuucgcccca-3' |
| Cóctel 4 | HoxB13 | 5'-cgccagauuaccaucugguuucaga-3' |
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ggauccacgagccaagggcuacca-3' |
| | PDGF a | 5'-gggaugguacugaauuucgcccca-3' |

5 Tabla G. Cóctel de ARNip alternativo dirigido a HoxB13, COX-2 TGF-β1 y Lamina:

| | | |
|--------------------------------------------------------|------------------------------|--|
| Combinaciones de cóctel de ARNip (secuencias de ARNip) | | |
| HoxB 13 | | |
| COX-2 | Homólogos humanos y de ratón | |
| TGF-β1 | | |

| Lamina | | |
|----------|---------|---------------------------------|
| Cóctel 1 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcu-3' |
| | COX-2 | 5'-gucuuuggucuggugccuggucu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-cacgagccaagggcuaccu-3' |
| | Lamin | 5'-gagccuuacugaggacuuggaguuu-3' |
| Cóctel 2 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ggauccacgagccaagggcuacca-3' |
| | Lamin | 5'-gagccuuacugaggacuuggaguuu-3' |
| Cóctel 3 | HoxB13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-gagcaccuucuccuugaaggacu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ggauccacgagccaagggcuacca-3' |
| | Lamin | 5'-gucagagccuuacugaggacuugga-3' |
| Cóctel 4 | HoxB13 | 5'-cgccagauuaccuugcuugcu-3' |
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | TGF-β1 | 5'-ggauccacgagccaagggcuacca-3' |
| | Lamin | 5'-gucagagccuuacugaggacuugga-3' |

Tabla H. Cóctel de ARNip alternativo dirigido a HoxB13, COX-2 y Lamina:

| Combinaciones de cóctel de ARNip (secuencias de ARNip) | | |
|--------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| HoxB13 | | |
| COX-2 | Homólogos humanos y de ratón | |
| Lamina | | |
| Cóctel 1 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcu-3' |
| | COX-2 | 5'-gucuuuggucuggugccuggucu-3' |
| | Lamina | 5'-gagccuuacugaggacuuggaguuu-3' |
| Cóctel 2 | HoxB13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | Lamina | 5'-gagccuuacugaggacuuggaguuu-3' |
| Cóctel 3 | HoxB 13 | 5'-caaggauaucgaaggcuugcuggga-3' |
| | COX-2 | 5'-gagcaccuucuccuugaaggacu-3' |
| | Lamina | 5'-gucagagccuuacugaggacuugga-3' |
| Cóctel 4 | HoxB 13 | 5'-cgccagauuaccuugcuugcu-3' |
| | COX-2 | 5'-ggucuggugccuggucugaugaugu-3' |
| | Lamina | 5'-gucagagccuuacugaggacuugga-3' |

5 **Ejemplo 16. Construcciones adicionales de ARNip.**

El diseño de ARNip dirigidos a secuencias de ARNm tanto de ser humano como de ratón

Un esfuerzo que los inventores han realizado en el diseño de ARNip es que las secuencias de ARNip de 25

unidades son capaces de dirigirse a las secuencias homólogas de ser humano y ratón en el mismo gen. Por ejemplo, la secuencia dúplex de ARNip dirigida a Hoxb13 es capaz de dirigirse a los genes de HoxB13 humanos y de HoxB13 de ratón. Las secuencias se han diseñado *in silico* usando las reglas generales para el diseño de ARNip y un algoritmo exclusivo para garantizar las siguientes características: (1) termodinámica óptima, (2) mejorar la unión de RISC, (3) eliminar los motivos de estimulación inmune, (4) homología ser humano-ratón, (5) potencial "fuera de la diana" en BLAST y (6) cóctel de ARNip multidirigidos. Cada secuencia puede dirigirse a los genes correspondientes tanto de ser humano como de ratón. Por lo tanto, las secuencias potentes definidas a partir del estudio con células de ratón se pueden confirmar adicionalmente utilizando células humanas.

10 *Se identificaron potentes dúplex de ARNip dirigidos a ARNm de TGF-β1, Cox-2 y Hoxb13*

De entre diez secuencias de ARNip de 25 unidades diseñadas *in silico*, se eligieron las primeras tres para análisis. Antes de analizar dichos oligos de ARNip (sintetizados por Qiagen) en las células correspondientes, tales como células PC-3 humanas (una metástasis ósea de un adenocarcinoma de próstata de grado IV), los inventores usaron primero RT-PCR para examinar la presencia de expresión del gen diana en las muestras de ARN total (Figura 14). Curiosamente, los inventores encontraron una expresión sustancial de ARNm de TGF-β1, Cox-2 y Hoxb13 humanos en las células PC-3. Los inventores analizaron además la expresión de estos tres genes en células C166 de ratón. Los resultados de RT-PCR indicaron de nuevo que los tres genes se expresan en las células C166. Por lo tanto, los inventores pueden transfectar las tres oligos de ARNip seleccionados dirigidos a un gen particular en la célula correspondiente y después evaluar su potencial de silenciamiento génico, seguido de aislamiento del ARN total y análisis RT-PCR. Se utilizaron tres dosis para cada transfección en la placa de 6 pocillos: 0.5 ug, 1 ug y 2 ug, con Lipo2000 siguiendo las instrucciones del proveedor. Para evitar la sobreamplificación y los efectos de meseta de la RT-PCR, los inventores solo realizaron 25-30 ciclos de amplificación, con el fin de distinguir las actividades de silenciamiento de cada oligo de ARNip dirigido a un gen particular. Los productos de RT-PCR se sometieron también a electroforesis en gel y cuantificación. La Figura 23 demuestra las selecciones de los oligos de ARNip potentes dirigidos a los genes de TGF-β, Cox-2 y Hoxb13. Sobre la base de los análisis de RT-PCR de las muestras de ARN total aislado de células PC-3 humanas y células C166 de ratón, después de las transfecciones de estos oligos de ARNip dirigidos a las secuencias de ARNm TGF-β1, Cox-2 y Hoxb13, los inventores han seleccionado los siguientes potentes dúplex de ARNip de 25 unidades para su posterior evaluación de sus actividades terapéuticas potenciales para la mejora de la cicatrización de heridas sin cicatrices: (1) hmTF-2: sentido, 5'-CCCAAGGGCUACCAUGCCAACUUCU-3', antisentido, 5'-AGAAGUUGGCAUGGUAGCCCUUGGG-3'; (2) hmCX-1: (sentido, 5'-GGUCUGGUGCCUGGUCUGAUGAUGU-3', antisentido, 5'-ACAUCAUCAGACCAGG CACCAGACC-3'; (3) hmHX-1: (sentido, 5'-GGUGGCUGGAACAGCCAGAUGUGUU-3', antisentido, 5'-AACACAUCUGGCUGUCCAGCCACC-3').

35 *Modelo de herida por escisión de piel para el análisis de la cicatrización de heridas*

Se crearon heridas en la piel por escisión de espesor completo y 5 mm de diámetro 5 mm en ambos lados de la línea media dorsal del dorso depilado de un ratón (utilizar C57 de ratón o Balb / c, de ratón, Figura 15). En las heridas de control y tratadas pueden observarse el fenotipo de cicatrización de heridas, tales como los cambios en el cierre de la herida y la disminución del gen diana y los cambios histopatológicos. Con el fin de evaluar la disminución de la expresión de genes mediada por ARNip en el tejido de la piel del ratón, se utiliza RT-PCR para detectar expresiones de ARNm de TGF-β1, Cox-2 y Hoxb13 en las muestras de ARN total de la piel de ratón. Se extrajeron muestras de ARN total de muestras de piel de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNAqueous-4PCR, Ambion). 0,25 µg de ARN total se incubaron a 70 °C durante 3 minutos con cebadores de oligo (dT) y luego se sometieron a transcripción inversa a 42 °C durante 30 minutos en 20 µl de la mezcla de reacción que contiene transcriptasa inversa seguida de PCR (35 ciclos) usando cebadores específicos para los genes de TGF-β1, Cox-2 y HoxB13. (1) TGF-β de ratón, directo: 5'-CTACTGTGTGCTGAGCACCTT-3', inverso: 5'-CGCTGCTCGGCCACTCTGGCT-3', y producto: 488bp; (2) Cox-2 de ratón, directo: 5'-GGAAGCCTTCTCCAACCTCT-3', inverso: 5'-GGATACACCTCTCCACCAAT-3', producto: 371 pb; (3) HoxB13 de ratón, directo: 5'-CTCCAGCTCCTGTGCCTTAT-3', inverso: 5'-ACTGCCATAGGCTGGTATG-3', producto: 205 pb.

55 *Polímero de histidina-lisina para liberación de ARNip in vivo*

Se han aplicado polímeros de histidina - lisina optimizados (HKP) para liberación de ARNip *in vitro* e *in vivo*. Un par de las especies poliméricas de HK, H3K4b y PT73, tiene un esqueleto de lisina con cuatro ramificaciones que contienen múltiples repeticiones de histidina, lisina o asparagina. Cuando esta solución acuosa de HKP se mezcló con ARNip en solución acuosa a una proporción de N / P de 4: 1 en masa, las nanopartículas (de tamaño promedio de 100-200 nm de diámetro) se autoensamblaron (Figura 16). El polímero de histidina-lisina ramificado óptimo, HKP, se sintetizó en un sintetizador Ranin Voyager (PTI, Tucson, AZ). Las dos especies de la HKP utilizadas en el estudio fueron H3K4b y PT73 con una estructura de (R) K (R) -K (R) - (R) K (X), para H3K4b donde R =KHHHKKHHHKKHHHKKHHH; y para PT73 donde R = KHHHKKHHHKKHHHKKHHH, X =C(O)NH₂, K = lisina, H = histidina y N = Asparagina. El HKP se disolvió en solución acuosa y después mezclar con solución acuosa de ARNip en una proporción de 4: 1 en masa, formando nanopartículas de tamaño medio de de 150-200 nm de diámetro. La solución acuosa de HKP-ARNip era semitransparente sin agregación visible de precipitado, y se puede almacenar a

4 °C durante al menos tres meses. Los inventores aplicaron HKP para la liberación de ARNip con metilcelulosa en la herida en la piel.

Modelo de herida por escisión de piel para el análisis de la cicatrización de heridas

5 El primer experimento que hicieron los inventores con el modelo de herida por escisión de la piel es analizar el beneficio terapéutico de TGF-ARNip con administración tópica mediada por el polímero histidina-lisina. En el experimento Se usaron diez ratones con heridas pareadas por escisión en la piel de espesor completo de diámetro 5 mm en ambos lados de la línea media dorsal del dorso depilado del ratón Balb / c). Como vehículo para la administración tópica se usó la metilcelulosa convencional con o sin nanopartículas / ARNip. Dos heridas en cada ratón se trataron solo con metilcelulosa o con metilcelulosa más nanopartícula / ARNip a diario durante los primeros 10 5 días. Las observaciones se realizaron los días 0, 5, 9 y 15. Cuando se juntaron las imágenes (Figura 17), los inventores encontraron un beneficio terapéutico evidente sobre el cierre de las heridas de la piel tratadas con la liberación de ARNip potenciada por nanopartículas. La velocidad de cierre de la herida al quinto día fue mucho más 15 rápido en el grupo tratado que la del grupo de control. Al noveno día, herida casi todas las heridas tratadas estaban bastante cerrado, mientras que en el grupo de control todavía había muchas heridas abiertas. El día 15, la observación superficial no mostró ninguna diferencia significativa entre los dos grupos.

Cuantificación de los cierres de la herida por escisión realizada en la piel

20 El segundo experimento que realizaron los inventores fue cuantificar el cierre de la herida en cada punto de tiempo. Al mismo tiempo, los inventores también se preguntaron si el beneficio terapéutico es el resultado del polímero de HK o del propio ARNip. En el estudio se usaron cuatro grupos de tratamiento con 10 muestras cada uno: 1) solo metilcelulosa, 2) de metilcelulosa más nanopartícula / TGF-1-ARNip, 3) metilcelulosa más TGF-1-ARNip, y 4) metilcelulosa más nanopartícula / control-ARNip. Al promediar las mediciones de las muestras de las heridas de cada grupo al quinto y al noveno día, los inventores encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el grupo 2 y otros tres grupos, a pesar de que algunos efectos se observaron con el grupo 3. Claramente, el beneficio terapéutico para el cierre más rápido de las heridas de la piel es el resultado de la liberación de TGF β -1-ARNip 25 potenciada con nanopartículas.

Signos de la disminución del gen diana en muestras de heridas por escisión en la piel

30 Dado que se sabe que el TGF β -1 potenciado por nanopartículas era responsable del beneficio terapéutico para el cierre de las heridas en la piel, aparece una cuestión clave de que si el gen diana en el tejido de alrededor de la herida estaba regulado por disminución. Para responder a esta pregunta, el ARN total se aisló de las muestras representativas de cada grupo, seguido de análisis RT-PCR. Como se muestra en la Figura 21, la disminución específica de la expresión de TGF β -1 en el tejido de la herida tratada con la liberación de ARNip de TGF β -1 potenciada con nanopartículas, en comparación con los grupos control. Curiosamente, el cóctel de ARNip dirigidos a TGF β -1, Hoxb13 and Cox-2 empaquetados con el polímero HK demostró una actividad de disminución similar al paquete de ARNip de TGF β -1 con el polímero HK, mientras que los dúplex de ARNip específicos de cualquiera de Hoxb13 o Cox-2 empaquetados con el polímero HK mostró regulación por disminución de TGF β -1. 35 40

Imágenes de histopatología de la estructura del tejido dérmico durante el proceso de cicatrización de la herida

45 Se usaron tres aumentos diferentes para demostrar la estructura de tejido dérmico que rodea el área de la herida como se indica con las flechas. Las muestras de piel se cosecharon 14 días después de la herida, se fijaron en paraformaldehído y se sometieron a tinción tricrómica de Masson para detectar tejido cicatricial colaginoso. La restauración de la arquitectura normal del tejido se puede ver en heridas tratadas con nanocomplejos de ARNip de TGF β 1, ARNip de Cox-2 y ARNip de HOXB13. La arquitectura de los neodermis de las heridas tratadas con nanocomplejos de ARNip de TGF β 1, ARNip de Cox-2 y ARNip de Hoxb13 se asemeja a la de la dermis normales con las fibras reticuladas de colágeno dispuestas de forma laxa en el patrón de tejido en cesta. Por el contrario, las fibras de colágeno en los neodermis de heridas de control simuladas y de heridas tratadas con nanocomplejos-ARNip de control se colocan densamente en un patrón paralelo anormal. Estos acontecimientos permiten que las fibras de colágeno se encuentren cercanas entre sí (figura 22), lo que facilita la reticulación del colágeno y, finalmente, la disminución del espesor de la cicatriz. La reticulación del colágeno intramolecular e intermolecular 50 55 tiene como resultado un aumento de la fuerza de rezumado de la herida.

La liberación de ARNip de Cox-2 potenciada con nanopartículas tuvo como resultado una estructura similar a la del tejido normal

60 Dado que se sabe que el TGF β -1 potenciado con nanopartículas era responsable del beneficio terapéutico para el cierre de heridas en la piel. También se observó que los dúplex de ARNip dirigidos a los genes de Cox-2 and Hoxb13 eran capaces de potenciar el cierre de la herida. Al mismo tiempo, los inventores desean confirmar que los cambios histopatológicos son el resultado de nanopartículas / ARNip (Figura 23). Las imágenes muestran que las nanopartículas / ARNip de Cox-2 son los contribuyentes potentes que tienen como resultado una estructura de la piel similar a la del tejido normal. La resistencia a la tracción de una herida es una medida de su capacidad de carga 65

por unidad de área. La resistencia al rezumado de una herida es la fuerza requerida para romper una herida, independientemente de su dimensión. La resistencia al rezumado varía con el espesor de la piel. La resistencia a la tracción de una herida se produce aproximadamente 60 días después de la lesión. Una herida cicatrizada solo alcanza aproximadamente el 80 % de la resistencia a la tracción de la piel no herida.

5

Eficacia antifúngica de los péptidos de histidina-lisina

En estudios anteriores de los inventores, se demostró que los péptidos HK son más eficaces en la liberación de ARNiP en las células que sus homólogos lineales. Para determinar si los péptidos HK ramificados son agentes antifúngicos más eficaces, se estudiaron los péptidos HK que variaban en su número de ramificaciones para determinar la inhibición del crecimiento de *C. albicans* (Figura 24). H2K3b redujo el crecimiento de *C. albicans* en un 11,3 % a 37,5 µg/ml (4,5 µM) y 61,7 % a 50 µg/ml (6,0 µM). H2K4b tuvo el efecto antifúngico más fuerte al reducir el crecimiento de *C. albicans* a casi 40 % a 37,5 µg/ml (3,4 µM) y 85 % a 50 µg/ml (4,5 µM). Estos resultados muestran que los péptidos HK más altamente ramificados eran más eficaces en la inhibición del crecimiento de *C. albicans* que sus homólogos menos ramificados. Respecto a la toxicidad *in vitro* e *in vivo*, las diferencias en la toxicidad *in vivo* entre estos péptidos son más notables. Los datos preliminares indican que no hay toxicidad aguda o subaguda (en pulmón, hígado y riñón) en los ratones a los que se ha administrado H3K (G) 4b a dosis hasta 1.000 mg (50 mg / kg) por vía intravenosa durante un período de 10 segundos (Fig. 25). Por el contrario, los estudios preliminares indican que a 1,000 µg, H2K4b era tóxico para el hígado, los pulmones y los riñones 24 horas después de la inyección, mientras que H3K4b era mínimamente tóxico para el riñón. De los tres órganos examinados, el riñón parece ser el más sensible a estos péptidos. En relación con H2K4b, una disminución de la carga catiónica en las ramificaciones terminales de H3K4b y H3K (G) K4b puede, en parte, explicar su toxicidad reducida *in vitro* e *in vivo*; la reducción de la carga puede disminuir su interacción con las membranas celulares cargadas negativamente. Con ocho glicinas adicionales, el polímero H3K (G) polímero 4b tiene una carga reducida por número total de aminoácidos en relación con H3K4b. Debido a que hay cinco lisinas en cada brazo terminal de H3K (G) 4b y H3K4b, sin embargo, los inventores dudan de que las diferencias mínimas de carga expliquen fácilmente la toxicidad reducida de H3K (G) 4b en relación a H3K4b. Una posibilidad alternativa es que las glicinas pueden interrumpir las hélices alfa en las ramas terminales, de modo que potencian la flexibilidad del polímero y permiten la degradación enzimática. Varios programas de estructura secundaria para los péptidos predicen una marcada diferencia en el contenido de hélices alfa entre un péptido que contiene glicina, H3K (G) 4b y los péptidos que no contienen glicina, H2K4b y H3K4b. De hecho, los datos preliminares con espectroscopia de dicroísmo circular demuestran que H3K (G) 4b tiene una estructura con menos hélices alfa relación con su homólogo H3K4b.

En resumen, según los estudios intensivos sobre la terapéutica con ARNiP para mejorar la cicatrización de heridas en la piel sin cicatriz con varios modelos de ratón, los inventores están muy seguros de que los péptidos de histidina-lisina ramificados son un agente de liberación muy potente para ARNiP *in vivo* (dérmico).

Ejemplo 17: Diseño experimental para estudios futuros

Para alcanzar los objetivos del estudio propuesto: desarrollar un protocolo terapéutico de ARNiP clínicamente viable para mejorar la cicatrización de heridas en la piel de adultos con menos formación de tejido cicatricial sin disminuir la resistencia a la tracción ni interrumpir la reepitelización, los inventores han establecido tres objetivos específicos:

45 *Identificar los dúplex de ARNiP más potentes para silenciar la expresión de TGF-β, COX-2 in vitro HOXB13*

Como se describe en la Tabla 1, los inventores diseñaron 10 secuencias de ARNiP *in silico* para cada uno de los genes diana, HOXB13, la COX-2 y TGF-β1. Después, se tomaron 3 dúplex de ARNiP de cada una de esas 10 secuencias de ARNiP y analizar sus potencias para la disminución del gen diana en los respectivos cultivos celulares, células PC-3 humanas y células C166 de ratón.

50

Selección del dúplex de ARNiP más potente para cada gen diana

Para asegurarse de que el dúplex de ARNiP más potente se selecciona para la aplicación terapéutica futura, los inventores decidieron utilizar dichos dúplex de ARNiP identificados como punto de referencia para evaluar tres dúplex de ARNiP adicionales para cada uno de estos genes diana: TGF-β1, Cox-2 y Hoxb13. En términos de la secuencia de control de ARNiP, los inventores seleccionaron un dúplex de ARNiP dirigido a una secuencia no relacionada y sin ninguna homología con ambos genomas de ser humano y de ratón: CT-1: (sentido, 5'-GAGGAGCCUUCAGGAUUACAAGAUU-3' y antisentido, 5'-AAUCUUGUAAUCCUGAAGGCUCCUC-3'), que se ha validado en varios de sus publicaciones anteriores (35, 49). Las tres secuencias de dúplex de ARNiP adicionales dirigidas a Hoxb13 de ser humano y de ratón son: hmHX-1: (sentido, 5'-CAAGGAUAUCAAGGCUUGCUGGGA-3', antisentido, 5'-UCCCAGCAAGCCUUCGAUAUCCUUG-3'); hmHX-2: (sentido, 5'-GGACAAGAGGCGCAAGAUCUCGGCA-3', antisentido, 5'-UGCCGAGAUCUUGCG CCUCUUGUCC-3'); hmHX-3: (sentido, 5'-GCAAGAUCUCGGCAGCCACCAGCCU-3', antisentido, 5'-AGGCUGGUGGCUGCCGAGAUCUUGC-3'). Las tres secuencias de dúplex de ARNiP adicionales dirigidas a Cox-2 de ser humano y de ratón son: hmCX-1: (sentido, 5'-CAUCAGUUUUAAGACAGAUCAUA-3', antisentido, 5'-UAUGAUCUGUCUUGAAAAACUGAUG-3'); hmCX-2: (sentido, 5'-GUCUUUGGUCUGGUGCCUGGUCUGA-3', antisentido, 5'-

65

UCAGACCAGGCACCAGACCAAAGAC-3'); hmCX-3: (sentido, 5'- GUGCCUGGUCU GAUGAUGUAUGCCA-3', antisentido, 5'-UGGCAUCAUCAUCAGACCAGGCAC-3'). Las tres secuencias de dúplex de ARNip adicionales dirigidas a TGF- β 1 de ser humano y de ratón son: hmTF-1: (sentido, 5'- GAUCCACGAGCCCAAGGGCUACCAU-3', antisentido, 5'-AUGGUAGCCCUUGGGCUCGUGGAUC-3'); hmTF-2: (sentido, 5'- CACGAGCCCAAGGGCUACCAUGCCA-3', antisentido, 5'-UGGCAUGGUAGCCCUUGGGCUCGUG-3'); hmTF-3: (sentido, 5'-GGCGCCGCCUCCCCAUGCCGCCCU-3', antisentido, 5'-AGGGCGGC AUGGGGGAGGCGGCGCC-3'). Se va a realizar una serie de experimentos de transfección, seguidos de aislamiento de ARN y análisis de RT-PCR, para determinar si alguno de estos dúplex de ARNip adicionales es mejor que los ya identificados.

10 *Transfección de dúplex de ARNip en cultivos celulares específicos*

Puesto que los inventores han descubierto que las células PC-3 humanas son muy adecuadas para los ensayos de silenciación génica mediados por ARNip para las tres dianas génicas, los inventores se quedarán con las células PC-3 para los estudios *in vitro* de la disminución de la expresión génica tanto a nivel de ARNm como de proteína, utilizando tres dúplex de ARNip adicionales para comparar con los dúplex de ARNip identificados. Del mismo modo, las células C166 de ratón también pueden ser útiles para los ensayos de los dúplex de ARNip para silenciar los tres genes. Estas dos líneas celulares se cultivarán en placas de 10 cm en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 100 μ g/ml de estreptomycin y 100 U / ml de penicilina y se transfectaron con los dúplex de ARNip utilizando Lipofectamine 2000. Las células se deben lavar dos veces con PBS y se incuban en medio sin FBS durante 24 horas. El medio sin FBS se sustituyó por medio que contenía 10 % de FBS para iniciar el ciclo celular. Los experimentos de transfección tendrán un grupo de control reactivo, un grupo de control de ARNip no específico, tres dosis diferentes para la transfección de los dúplex de ARNip: 0.5, 1,0 y 2,0 μ g por pocillo en placa de 6 pocillos. Peligros potenciales: la transfección de las células con Lipofectamine 2000 no siempre puede funcionar de manera eficiente. Se pueden usar métodos de transfección alternativos, tales como electroporación u otros agentes de transfección. La transfección eficiente y el posterior análisis de RT-PCR pueden tener que funcionar en conjunto para lograr datos satisfactorios.

Medición de los niveles de ARNm mediante RT-PCR

ARN total de cada una de dichas líneas celulares transfectadas: PC-3 y C166. Para la detección del amplicón de HoxB13 (de ratón), a una reacción de RT le seguirá una reacción de PCR usando el cebador directo 5' - CTCCAGCTCCTGTGCCTTAT-3' y el cebador inverso 5'-ACT GGCCATAGGCTGGTATG-3'. Para la detección del amplicón de Cox-2 (de ser humano), a una reacción RT le seguirá una reacción de PCR usando el cebador directo 5'-CGGGCTGGGCCATGGGGTGGA-3' y el cebador inverso 5'-CCTATCAGTATTAGCCTGCTT -3'. Para la detección del amplicón de TGF- β 1 (de ratón), a una reacción RT le seguirá una reacción de PCR usando el cebador directo 5'-CTACTGTGTGCTGAGCACCTT-3' y el cebador inverso 5'-CGCTGCTCGG CCACTTGCTGCT-3'. Los productos de PCR se deben cargar en un gel de agarosa al 1 % y se teñirán con bromuro de etidio. El producto de la PCR deberá exhibir los niveles de disminución de cada mana particular usando los dúplex de ARNip particulares. El resultado de este experimento determinará la potencia de cada dúplex de ARNip y proporcionar el primer vistazo si un dúplex de ARNip en particular debe ser el más potente. El análisis de RT-PCR puede estar estrechamente coordinado con el experimento de transfección de manera que se pueden optimizar las condiciones adecuadas para la transfección eficiente para una línea celular en particular, con el fin de lograr la cantidad suficiente de ARN total para el análisis PCR. Además, la selección de los dúplex de ARNip más potentes para cada gen se deberá basa en tres experimentos repetidos. Las eficacias de silenciación se compararán entre los tres dúplex adicionales de ARNip y los dúplex de ARNip previamente identificados.

Medición de los niveles de proteínas utilizando ELISA

Para medir los niveles de proteínas de las células transfectadas con los correspondientes dúplex de ARNip, el análisis de transferencia Western y el análisis ELISA deben ser suficientes y satisfactorios. Los lisados celulares o los medios de cultivo celular se utilizarán para la detección de proteínas.. Aunque el ensayo ELISA para la detección Hoxb13 de ratón no está disponible comercialmente, los inventores puede usar el anticuerpo policlonal de rata frente a HoxB13 de ratón (Aviva Systems Biologics, San Diego, CA) para detectar la disminución mediada de ARNip en las células REK que expresan HoxB13 con una análisis de transferencia Western. El anticuerpo anti-Hoxb 13 de conejo se generó contra la porción N-terminal (aminoácidos 1-79) de Hoxb13 de ratón. Este anticuerpo deberá reconocer la proteína Hoxb13 tanto SV como defectiva. Esta última es una proteína truncada que se detiene en el aminoácido 33 del homeodominio. Antes de usar, los antisueros deberán purificarse por afinidad positivamente, seguido de purificación por afinidad negativa contra Hoxc13 de ratón y Hoxd13 de pollo para eliminar la posible reactividad cruzada con las otras proteínas Hox13. La tinción debe verse usando un microscopio Leica DMLB y las imágenes pueden capturarse utilizando un Sistema Digital DEI750D Optronics (Goleta, CA). La COX-2 humana se analizará utilizando el kit ELISA para COX-2 (Zymed, San Francisco, CA) que es un ensayo de tipo sándwich de inmunoabsorción ligado a enzimas para la detección cuantitativa de la COX-2 humana en sobrenadantes de cultivo celular y lisados celulares. Dado que la ciclooxigenasa (COX) es una enzima unida a la membrana, que tiene un peso molecular de 71 kDa, el lisado celular se debe preparar para el análisis ELISA. El TGF- β 1 de ratón se analizará usando TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante beta 1, TGF- β 1/ TGF- β 1) de ser humano/ratón utilizando el kit de ELISA Ready-SET-Go (con placas prerrecubiertas). La selección de los dúplex de ARNip más potentes para cada

gen se deberá basa en tres experimentos repetidos.

El problema potencial es que en algún momento el dúplex de ARNip más potente seleccionado a partir de la disminución de mana no se correlaciona con el seleccionado de la disminución de proteínas. Cuando esa situación ocurre, los inventores deberán fiarse de los datos de la disminución del nivel de ARNm, ya que es el reflejo directo de mecanismo de acción del ARNi. La discrepancia de la disminución del nivel de proteínas algunas veces puede deberse al efecto no específico o denominado "desviado", que no es el resultado del mecanismo de acción del ARNi.

Selección del cóctel de ARNip más eficaz in vivo

Después de la selección del dúplex de ARNip más potente para cada uno de los siguientes tres genes, Hoxb13, COX-2 and TGF- β 1 basándose en los estudios de cultivo celular, los inventores los combinarán juntos como cóctel de ARNip con varias proporciones. Las combinaciones se pueden utilizar como 1: 1: 1, 2: 1: 1 y 3: 1: 1, etc. Debido a la importancia de Hoxb13 en la cicatrización de heridas de la piel en adultos, los inventores se centrarán en la proporción del cambio del dúplex de ARNip específico de HOXB13. Además, los inventores evaluarán los modelos de ratón adecuados y las formulaciones de nanopartículas de ARNip, por lo que pueden definir la formulación de ARNip-nanopartícula más adecuada para el potencial protocolo terapéutico.

Modelo de ratón para la evaluación de cócteles de ARNip multidirigidos

Con el fin de evaluar el cóctel de ARNip apropiado y la formulación más adecuada, obtendremos el ratón adulto defectivo (KO) PARA Hoxb13 del laboratorio del Dr. Ling Li, ya que las heridas de KO para Hoxb13 presentan varias características de las heridas fetales producidas en fases tempranas de la gestación, incluyendo el cierre más rápido, una mayor resistencia a la tracción y menos cicatrización dérmica en comparación con las heridas de sus homólogos de tipo salvaje (SV). La evaluación bioquímica reveló que los niveles de ácido hialurónico (HA) en la epidermis y en la dermis son significativamente mayores en la piel de ratón KO HoxB13 adulto sin heridas en comparación con la piel SV. Basándose en estos resultados, los inventores postularon que Hoxb13 en la piel del adulto estimula la diferenciación, mientras que su ausencia crea un entorno más similar al fetal y que una consecuencia de este estado de tipo fetal potencia la cicatrización de heridas. Además de un modelo bien aceptado utilizando las heridas de la piel del dorso en ratones KO para HoxB13, los inventores también han establecido un modelo de cirugía de labio en ratón para imitar la cirugía de labio y el paladar leporinos de la cirugía. En el estudio de los inventores, en condiciones de esterilidad y con anestesia general, ratones adultos SV y KO en Hoxb13 (de 8-16 semanas de edad) recibirán una sola herida por incisión en la piel de espesor completo de 0,5 cm en paralelo con sus dientes frontales, seguido de sutura (6,0 Nylon) de la herida, imitando la cirugía de labio y paladar leporino.

Las formulaciones utilizadas para la liberación del cóctel de ARNip multidirigidos

Para establecer una nanopartícula de polímero-ARNip, los inventores decidieron analizar primero el ramificado de histidina-lisina para esta formulación. La instalación del núcleo del biopolímero en la Universidad de Maryland sintetizará polímeros en un sintetizador Ranin Voyager (PTI, Tucson, AZ). El polímero HK ramificado, eficaz para la transferencia de ARNip en vivo, conformó un complejo con dúplex de ARNip para la administración local. El polímero se purificará mediante HPLC (Beckman, Fullerton, CA). Los segundos polímeros ramificados de H (histidina) y K (lisina) utilizados en este estudio deberán ser R-KR-KR, donde R = [HHHKHHHKHHHKHHH] 2KH4NH4. H3K4b es un polímero ramificado con el mismo núcleo y estructura descritos anteriormente, a excepción de las ramificaciones R que difieren: R = KHHHKHHHKHHHKHHHK. El HKP se puede disolver en solución acuosa y después mezclar con solución acuosa de ARNip en una proporción de 4: 1 en masa, formando nanopartículas de tamaño medio de de 150-200 nm de diámetro. Las soluciones acuosas de HKP-ARNip era semitransparente sin agregación visible de precipitado, y se puede almacenar a 4 °C durante al menos tres meses (50). Además de los polímeros HK, los inventores también pueden analizar dos tipos diferentes de vehículos poliméricos, PEI pegilado y dendrímero de PAMAM, con el cóctel de ARNip para una liberación eficaz en las zonas de las heridas de la piel. Todas estas formulaciones poliméricas ARNip se disolverán en la solución libre D5W sin ARNasa y después se introdujeron en 2 % de metilcelulosa (1: 1) o 2 % de metilcelulosa: PBS (1: 1). La formulación se aplicará sobre los lechos de la herida y se cubrirán o no con un vendaje transparente Tegaderm.

Administración del cóctel de ARNip multidirigidos en las heridas de la piel

Para analizar las diversas formulaciones en dos modelos diferentes de heridas en la piel, en primer lugar los inventores analizaron las formulaciones fijas con tres proporciones diferentes de tres dúplex de ARNip diferentes. Las tres proporciones son dúplex de ARNip dirigidos a Hoxb13, Cox-2 y TGF- β 1 a una proporción de 1: 1: 1, 2: 1: 1 y 3: 1: 1 formulados con el polímero H3K4b. Los grupos de estudio van a ser; G1: 20 μ g de la formulación polímero HK-ARNip (50 μ l) para cada herida por cirugía labial; G2: 20 μ g de la formulación de polímero HK-ARNip de Hoxb13 (50 μ l) para cada herida por cirugía labial; G3: 20 μ g de la formulación polímero HK-ARNip de Cox-2 (50 μ l) para cada herida por cirugía labial; G4: 20 μ g de la formulación polímero HK-ARNip de TGF- β 1 (50 μ l) para cada herida por cirugía labial; G5: 20 μ g de la proporción uno de la formulación del cóctel polímero HK-ARNip (50 μ l) para cada herida por cirugía labial; G6: 20 μ g de la proporción dos de la formulación polímero HK-ARNip (50 μ l) para cada herida por cirugía labial; G7: 20 μ g de la proporción tres de la formulación polímero HK-ARNip (50 μ l) para cada herida por cirugía labial. En cada grupo hay cuatro animales. La misma administración estará disponible para

ratones tanto SV como KO para HoxB13. El resultado de este estudio es demostrar el beneficio sinérgico de las formulaciones de cóctel de ARNip en comparación con la formulación de un solo ARNip. La comparación entre los resultados del animal KO y el animal SV proporcionará una idea de cómo los diferentes modelos de ensayo responderán a las nuevas formulaciones terapéuticas.

5

Los impactos de las diferentes formulaciones en la cicatrización de heridas

Dado que se van a analizar tres formulaciones con el cóctel ARNip, los inventores han previsto analizar únicamente las tres formulaciones con un modelo de la cirugía labial en ratón de ratón SV para Hoxb13 El experimento se centrará en una proporción de la combinación de ARNip tal como 1: 1: 1. El experimento incluirá G1: 20 µg de la formulación control de polímero HK-ARNip (50 µl); G2: 20 µg de la formulación control de polímero PEI Pegilado-ARNip (50 µl); G3: 20 µg de la formulación control de polímero dendrítico PAMAM-ARNip (50 µl); G4: 20 µg de la formulación control de cóctel de polímero HK-ARNip (50 µl); G5: 20 µg de la formulación control de cóctel de polímero PEI Pegilado-ARNip (50 µl); y G6: 20 µg de la formulación control de cóctel de polímero dendrítico PAMAM-ARNip (50 µl). Cada grupo tiene cuatro animales. A los análisis de los niveles de ARNm y proteínas les siguen otros estudios *in vivo*. Este estudio ayudará a los inventores a determinar la mejor formulación del cóctel de ARNip multidirigidos para un protocolo clínico.

10

15

Silenciamiento del gen diana in vivo a niveles de ARNm y de proteínas

20

Las muestras de piel se escindirán de ratón tanto SV como KO para HoxB13, ya sea en heridas de la piel de la espalda o heridas por cirugía labial y se sumergieron en DMEM rico en glucosa que contiene 10 % de FBS y antibióticos / fungizona, la superficie se esterilizó en etanol al 70 %, se diseccionó en secciones de 5-mm² y se digirieron en dispa en DMEM (5 mg / ml) durante la noche a 4 °C. Las muestras de ARN total de tejidos y células se transcribirán de forma inversa utilizando el kit y el protocolo RETROscript (Ambion). Para la tinción de anticuerpos, las muestras de piel fijadas con paraformaldehído de adulto SV y KO para *HoxB13* deberán procesarse, incluir en parafina, seccionar (6 m) y cocer durante la noche a 55 °C. El método similar de aislamiento de ARN y preparación de muestras para inmunohistoquímica se puede utilizar para las detecciones de Cox-2 y TGF-β1 *in vivo*. El criterio para la formulación cóctel de ARNip más potente debe realizarse teniendo en cuenta el modelo de herida en la piel, el genotipo de Hoxb13 y la proporción de cada dúplex de ARNip. El mismo principio se debe considerar que disminución del nivel de ARNm es la indicación clave de la potencia del cóctel de ARNip multidirigidos.

25

30

Los potenciales beneficios terapéuticos del cóctel de ARNip multidirigidos

Para tener una evaluación inicial de los posibles beneficios terapéuticos del cóctel de ARNip, los inventores van a llevar a cabo dos análisis: Análisis histológico y HA. Las muestras de piel fijadas con paraformaldehído se procesarán, incluirán en parafina y se seccionarán (6 µm). Los portaobjetos se introducirán en horno a 55 °C y se teñirán con hematoxilina y eosina o con tinción tricrómica de Masson para el colágeno, utilizando protocolos estándar. Para la detección de HA, secciones de piel se bloquearán en 2 % de FBS, se incuban con proteína de unión a HA biotinilada (bHABP, 1 µg/ml en PBS, Associates of Cape Cod, Inc., Falmouth, MA) durante la noche a 4 °C, se aclaran en PBS, se incuban con Cy-3-estreptavidina (1: 500; Jackson Immunoresearch Laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se aclaran en PBS y se montan como se ha descrito anteriormente. Como control negativo, el tejido debe incubarse en PBS solo. La inmunofluorescencia debe verse con un microscopio Leica DMLB y las imágenes se capturarán utilizando un Sistema Digital DEI-750D Optronics. El análisis histológico proporcionará información gráfica acerca de la diferencia morfológica entre las heridas de la piel tratadas y no tratadas y las intensidades de la presencia de la proteína HA.

35

40

45

Desarrollo del protocolo clínico para el cóctel de ARNip multidirigidos

Una proporción adecuada de cóctel de ARNip se definirá con una formulación de polímero optimizada, y se correlacionará con un modelo de ratón concreto. Los inventores diseñarán experimentos para analizar este protocolo terapéutico candidato para las características farmacológicas y cualquier toxicidad o efecto adverso visible. Con el fin de presentar una imagen clara, los inventores solo asumirán que el modelo de cirugía labial va a ser el seleccionado por los inventores en el momento (aunque el resultado real solo se puede alcanzar cuando completen los dos primeros estudios).

50

55

La curva dependiente de la dosis de la formulación cóctel de ARNip multidirigidos

Para definir la dosis adecuada de las formulaciones de cóctel de ARNip candidatas terapéuticas definidas, los inventores analizarán 6 dosis diferentes en el modelo de cirugía labial de ratón. Los grupos de ensayo van a ser G1: aplicar 2 µg / 50 µl sobre la herida; G2: aplicar 10 µg / 50 µl sobre la herida; G3: aplicar 20 µg / 50 µl sobre la herida; G4: aplicar 30 µg / 50 µl sobre la herida; G5: aplicar 40 µg / 50 µl sobre la herida y G6: aplicar 60 µg / 50 µl sobre la herida. Cada grupo contendrá cuatro animales. Las lecturas bioquímicas y de biología molecular deben medirse junto con la evaluación histológica y morfológica.

60

65

Análisis histológico y HA

Las muestras de piel fijadas con paraformaldehído se procesarán, incluirán en parafina y se seccionarán (6 µm). Los portaobjetos se introducirán en horno a 55 °C y se teñirán con hematoxilina y eosina o con tinción tricrómica de Masson para el colágeno, utilizando protocolos estándar. Para la detección de HA, secciones de piel se bloquearán en 2 % de FBS, se incuban con proteína de unión a HA biotinilada (bHABP, 1 µg/ml en PBS, Associates of Cape Cod, Inc., Falmouth, MA) durante la noche a 4 °C, se aclaran en PBS, se incuban con Cy-3-estreptavidina (1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se aclaran en PBS y se montan como se ha descrito anteriormente. Como control negativo, el tejido debe incubarse en PBS solo. La inmunofluorescencia debe verse con un microscopio Leica DMLB y las imágenes se capturarán utilizando un Sistema Digital DEI-750D Optronics. El análisis histológico proporcionará información gráfica acerca de la diferencia morfológica entre las heridas de la piel tratadas y no tratadas y las intensidades de la presencia de la proteína HA.

Cuantificación del contenido de colágeno

El contenido en colágeno se determinará midiendo el contenido en hidroxiprolina de las muestras. En pocas palabras, las muestras de espesor completo de piel dorsal (≈16 mg) cosechadas de ratones adultos de 8 a 16 semanas de edad (n = 6 cada una para SV y KO para *HoxB13*) se liofilizarán durante la noche y se hidrolizan en HCl 6 N durante 18 horas a 110 °C (uso suficiente para cubrir el tejido) y después se ajusta el pH a un valor entre 6 y 7 con NaOH. Las muestras se diluirán a 5 ml con H₂O y se filtran usando papel de filtro Whatman. Las siguientes soluciones se añadirán sucesivamente a 1,0 ml de cada muestra: solución de cloramina T (1,0 ml, 0,05 M, temperatura ambiente durante 20 minutos), ácido perclórico (1,0 ml, 3,15 M, temperatura ambiente durante 5 minutos) y 20 % de p-dimetilaminobenzaldehído (1,0 ml). Las muestras deben incubarse 60 °C durante 20 minutos y se enfrían a temperatura ambiente. Las absorbancias se van a leer a una longitud de onda de 557,5 nm y las concentraciones de hidroxiprolina van a determinarse utilizando una curva estándar. El siguiente cálculo se utilizará para determinar el contenido en colágeno: µg de hidroxiprolina x 7,46 = µg de colágeno. Los valores se indican en µg/mg de peso seco.

Medición de tensiometría

Para este estudio, la herida por incisión más la piel circundante se escindirán cuidadosamente y el tejido se fijará en paraformaldehído al 4 % durante la noche. Toda el tejido tiene que fijarse durante el mismo tiempo y la tensiometría en todos los puntos de tiempo se llevará a cabo el día después de obtención de muestras de la herida. Antes del análisis tensiométrico, las muestras se cortarán cuidadosamente a una longitud y anchura uniformes, y se determinará el espesor de la piel en el sitio de la herida. Los estudios de tensiometría se llevarán a cabo utilizando un sistema de ensayo Instron. Los resultados se indicarán como el módulo Y y el módulo Y se obtiene mediante el cálculo del esfuerzo / deformación y es representativo de la fuerza total de la herida. El esfuerzo es la cantidad de fuerza requerida para romper el área de sección transversal/aparte de heridas en la herida. La deformación es la longitud original de la muestra / longitud a la rotura. Los valores brutos de deformación y las áreas de sección transversal no variarán significativamente en cualquier punto de tiempo después de la formación de la herida en heridas SV y KO para *Hoxb13* (datos no mostrados). Por lo tanto, las diferencias en los valores del módulo Y se deben principalmente al componente de fuerza del valor del esfuerzo.

En conclusión, los inventores creen que el abundante conjunto de datos del estudio propuesto proporcionará información importante para la comprensión de las características de la formulación cóctel de ARNip multidirigidos y, por tanto, se definirá un protocolo clínico para la mejora de la cicatrización de heridas en la piel de adultos con menos formación de tejido cicatricial, una fuerte resistencia a la tracción, y un cierre más rápido. El cóctel de ARNip multidirigidos representa un nuevo abordaje terapéutico para tratar diversas heridas en la piel y será muy valioso para los mercados tanto como cosmecéutico.

50 REFERENCIAS

1. Singer AJ, Clark RA: Cutaneous wound healing. N Engl J Med 1999, 341:738-746.
2. Martin P: Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. Science 1997, 276:75-81.
3. Rowlatt U: Intrauterine wound healing in a 20 week human fetus. Virchows Arch A Pathol Anat Histol 1979, 381:353-361.
4. Lin RY, et al. Exogenous transforming growth factor-beta amplifies its own expression and induces scar formation in a model of human fetal skin repair. Ann Surg 1995, 222:146-154.
5. Cowin AJ, et al. Expression of TGF-beta and its receptors in murine fetal and adult dermal wounds. Eur J Dermatol 2001, 11:424-431.
6. Kummel TM, et al. Transforming growth factor beta (TGF-beta) induces fibrosis in a fetal wound model. J Pediatr Surg 1988, 23:647-652.
7. Lanning DA, et al. TGF-beta1 alters the healing of cutaneous fetal excisional wounds. J Pediatr Surg 1999, 34:695-700.
8. Soo C, et al. Ontogenetic transition in fetal wound transforming growth factor-beta regulation correlates with collagen organization. Am J Pathol 2003, 163:2459-2476.
9. Sullivan KM, et al. A model of scarless human fetal wound repair is deficient in transforming growth factor beta.

- J Pediatr Surg 1995, 30:198-202202-193.
10. Stelnicki EJ, et al. A new *in vivo* model for the study of fetal wound healing. *Ann Plast Surg* 1997, 39:374-380.
11. Whitby DJ and Ferguson MW: Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev Biol* 1991, 147:207-215.
- 5 12. Roberts AB, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83:4167-4171.
13. Shah M, et al. Neutralising antibody to TGF-beta 1, 2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *J Cell Sci* 1994, 107:1137-1157.
14. Shah M, et al. Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta. *Lancet* 1992,339:213-214.
- 10 15. Choi BM, et al. Control of scarring in adult wounds using antisense transforming growth factor-beta 1 oligodeoxynucleotides. *Immunol Cell Biol* 1996, 74:144-150.
16. Wu KK: Cyclooxygenase 2 induction: molecular mechanism and pathophysiologic roles. *J Lab Clin Med* 1996, 128:242-245.
- 15 20. Wilgus TA, et al. Topical application of a selective cyclooxygenase inhibitor suppresses UVB mediated cutaneous inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000, 62:367-384.
21. Sun WH, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress epithelial cell kinetics and delay gastric wound healing in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2000, 15:752-761.
22. Guo JS, et al. Antiangiogenic effect of a highly selective cyclooxygenase-2 inhibitor on gastric ulcer healing in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002, 183:41-45.
- 20 23. Simon AM, et al. Cyclooxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002, 17:963-976.
24. Blomme EA, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition does not affect the healing of cutaneous full-thickness incisional wounds in SKH-1 mice. *Br J Dermatol* 2003, 148:211-223.
- 25 25. Muller-Decker K, et al. The effects of cyclooxygenase isozyme inhibition on incisional wound healing in mouse skin. *J Invest Dermatol* 2002, 119:1189-1195.
26. Muscara MN, et al. Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol* 2000, 129:681-686.
27. Futagami A, et al. Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. *Lab Invest* 30 2002, 82:1503-1513.
28. Wilgus TA, et al. Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. *Wound Repair Regen* 2003, 11:25-34.
29. Mack, J. A. et al. HoxB13 knockout adult skin exhibits high levels of hyaluronan and enhanced wound healing. *FASEB J*. 2003 Jul;17(10):1352-4. Epub 2003 May 20.
- 35 30. Mack, J.A. et al. HoxB13 up-regulates transglutaminase activity and drives terminal differentiation in an epidermal organotypic model. *J Biol Chem*. 2005 Aug 19;280(33):29904-11. Epub 2005 Jun 17.
31. Stelnicki, E.J. et al. Modulation of the human homeobox genes PRX-2 and HOXB13 in scarless fetal wounds. *J Invest Dermatol*. 1998 Jul;111(1):57-63.
32. Wilgus, T.A. et al. Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. *Wound Repair Regen*. 2003 Jan-Feb;11(1):25-34.
- 40 33. Manus, M.T. and P.A. Sharp (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Review, Genetics*. 3(10):737-747.
34. Lu, P.Y. et al. (2003) ARNip-mediated antitumorogenesis for drug target validation and therapeutics. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 5(3):225-234.
- 45 35. Kim, B. et al. (2004) Inhibition of ocular angiogenesis by ARNip targeting vascular endothelial growth factor-pathway genes; therapeutic strategy for herpetic stromal keratitis. *Am. J. Pathol*. 165 (6): 2177-85.
36. Tuschl, Zamore, Lehmann, Bartel and Sharp (1999), *Genes & Dev*. 13: 3191-3197.
37. Elbashir, Lendeckel and Tuschl (2001). *Genes & Dev*. 15: 188-200.
38. Kim, DH, J.J.Rossi et al. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol*. 2005 Feb;23(2):222-6.
- 50 39. Reynolds A, et al. Induction of the interferon response by ARNip is cell type- and duplex length-dependent. *RNA*. 2006,12(6):988-93.
40. Fedorov Y, et al. Off-target effects by ARNip can induce toxic phenotype. *RNA*. 2006,12(7):1188-96.
41. Lu, P.Y. and M. Woodle (2005) Delivering ARNip *in vivo* For functional genomics can novel therapeutics. In *RNA Interference Technology*. Cambridge University Press. P 303-317.
- 55 42. Lu, P. Y. et al. (2005) Modulation of angiogenesis with ARNip inhibitors for novel therapeutics. *TRENDS in Molecular Medicine*. 11(3), 104-13.
43. Lu PY, Xie F, Woodle MC. (2005) *in vivo* application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics. *Adv Genet*. 54:117-42.
- 60 44. Leng, Q. J. and Mixson AJ. Small interfering RNA targeting Raf-1 inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Therapy*. (2005), 1-9. See also [<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=29747>; *Nucleic Acids Res*. 2001 March 15; 29(6): 1334-1340. Copyright © 2001 Oxford University Press Branched copolymers of histidine and lysine are efficient carriers of plasmids, Qing-Rong Chen, Lei Zhang, Sanford A. Stass, and A. James Mixson]
- 65 45. Sutton D. et al. Efficient suppression of secretory clusterin levels by polymer-ARNip nanocomplexes enhances ionizing radiation lethality in human MCF-7 breast cancer cells *in vitro*. *International Journal of*

Nanomedicine 2006:1(2) 155-162

46. Braun C., et al. Structure/Function Relationships of Polyamidoamine/DNA Dendrimers as Gene Delivery Vehicles, J. of Pharm. Sci., 94(2) (2005).

47. Woodle, MC and PY Lu, Nanoparticles for RNAi Therapy. Nanotoday, August 2005, 34-41.

5 48. Xie, Y.F., M. Woodle and PY Lu. Harnessing *in vivo* ARNip delivery for functional genomics and novel therapeutics. Drug Discovery Today, 2006 Jan;11(1-2):67-73.

49. Li B.J. et al, Using ARNip in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque.2005, Nature Medicine, 11, 944-951.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SIARNOMICS, INC.

15 <120> TERAPÉUTICA CON ARNT MULTIDIRIGIDOS PARA LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS DE LA PIEL SIN CICATRIZ

<130> SIR-005/P001-PCT

20 <140> PCT/US2008/012498

<141> 06-11-2008

<150> 60/985.820

<151> 06-11-2007

25 <160> 333

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1

<211> 25

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 1

caaggauauc gaaggcuugc uggga 25

40 <210> 2

<211> 25

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 2

uccagcaag ccuucgauau ccuug 25

50 <210> 3

<211> 25

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 3

60 gucuuugguc uggugccugg ucuga 25

<210> 4

<211> 25

<212> ARN

65 <213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 4
ucagaccagg caccagacca aagac 25

10 <210> 5
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

20 <400> 5
ccccggaggu gauuuccauc uacaa 25

25 <210> 6
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 6
uuguagaugg aaauccaccuc cgggg 25

40 <210> 7
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 7
gguggcugga acagccagau guguu 25

55 <210> 8
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

65 <400> 8
aacacaucug gcuguuccag ccacc 25

70 <210> 9
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

75 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

80 <400> 9
ggucuggugc cuggucugau gaugu 25

85 <210> 10
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 10
acaucaucag accaggcacc agacc 25

10 <210> 11
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 11
cccaagggcu accaugccaa cuucu 25

20 <210> 12
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 12
agaaguuggc augguagccc uuggg 25

30 <210> 13
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 13
cacgagccca agggcuacca ugcca 25

40 <210> 14
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 14
uggcauggua gcccuugggc ucgug 25

55 <210> 15
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 15
ccggagguga uuuccaucua caaca 25

65 <210> 16
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 16
uguuguagau ggaaucacc uccgg 25

10 <210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

20 <400> 17
ctccagctcc tgtccttat 20

25 <210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

35 <400> 18
actggccata ggctggtatg 20

40 <210> 19
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 19
aagccguccu gugugccgcu g 21

55 <210> 20
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

65 <400> 20
aacgaugaag ccuggagug c 21

70 <210> 21
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

75 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

80 <400> 21
aaguuaaaag ugccugaacu g 21

85 <210> 22
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 22
aagcaggcca gacucucuuu c 21

10 <210> 23
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 23
aagcucagca cacagaaaga c 21

20 <210> 24
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 24
aaugcggcgg uggugacagu a 21

30 <210> 25
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 25
aagcuaugaa acgauauggg c 21

40 <210> 26
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 26
aaccgcugga gagcaacugc a 21

55 <210> 27
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 27
gaacatcgat gacaagctta ggtatcgata caagctgcct cgccttg 47

65 <210> 28
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 28
gaacatcgat gacaagctta ggtatcgata tagattgaag attccgc 47

<210> 29
<211> 47
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 29
gaacatcgat gacaagctta ggtatcgata ggtcactgac agaggcg 47

<210> 30
<211> 30
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

25 <400> 30
gaacatcgat gacaagctta ggtatcgata 30

<210> 31
<211> 30
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

35 <400> 31
gatgtctacc agcgaagcta ctgccgtccg 30

40 <210> 32
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 32
50 gtcagctgct gggacaccgc ggtcttcct 30

<210> 33
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 33
60 ggcgctgcta gctgctgctc tgtggtctg 30

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

5 <400> 34
cctggtcacc agggctgctt 20

<210> 35
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

15 <400> 35
ccagccttct ccatgggtgt 20

<210> 36
<211> 18
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

25 <400> 36
gcgggctgcc tcgcagtc 18

<210> 37
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

35 <400> 37
tcaccgcctt ggcttgcac 20

<210> 38
<211> 25
40 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

45 <400> 38
gcuggaacag ccagaugugu ugcca 25

50 <210> 39
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 39
uggcaacaca ucuggcuguu ccagc 25

<210> 40
<211> 25
65 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 40
cgccagauua ccaucugguu ucaga 25

10 <210> 41
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 41
ucugaaacca gaugguaauc uggcg 25

20 <210> 42
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

30 <400> 42
ggauccacga gcccaagggc uacca 25

35 <210> 43
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

45 <400> 43
ugguagcccu ugggcucgug gaucc 25

50 <210> 44
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 44
gagccaagg gcuaccaugc caacu 25

65 <210> 45
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

70 <400> 45
aguuggcaug guagcccuug ggcuc 25

75 <210> 46
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 46
gagcaccuuu cucuugaaa ggacu 25

10 <210> 47
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

20 <400> 47
aguccuuuca aggagaaugg ugcuc 25

25 <210> 48
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 48
ccucauuuca gucucucauc ugcaa 25

40 <210> 49
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 49
uugcagauga gagacugaau ugagg 25

55 <210> 50
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

65 <400> 50
gaggagccuu caggauuaca agauu 25

70 <210> 51
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

75 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

80 <400> 51
aaucuuguaa uccugaaggc uccuc 25

85 <210> 52
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la molécula combinada de ADN/ARN: oligonucleótido sintético

5 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 52
gcugaccug aagucauct t 21

10 <210> 53
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la molécula combinada de ADN/ARN: oligonucleótido sintético

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

20 <400> 53
gaugaacuuc agggucagct t 21

25 <210> 54
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 54
gcctctcgga ggccagatt 20

35 <210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 55
ctagtactgg ttatcgtgat 20

45 <210> 56
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 56
cgggctgggc catgggtgg a 21

55 <210> 57
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

65 <400> 57
cctatcagta ttagcctgct t 21

5 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

10 <400> 58
 ggaagccttc tccaacctct 20

15 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

20 <400> 59
 ggatacacct ctccaccaat 20

25 <210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 60
 gagtactacg ccaaggaggt t 21

35 <210> 61
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

45 <400> 61
 ccattcatga acagcatcag t 21

50 <210> 62
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

55 <400> 62
 ctactgtgtg ctgagcacct t 21

60 <210> 63
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

65 <400> 63
 cgctgctcgg ccactctggc t 21

ES 2 545 963 T3

5 <210> 64
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

10 <400> 64
agggcgccau gggggaggcg gcgcc 25

15 <210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 65

Lys His His His Lys His His His Lys His His His Lys His His His
1 5 10 15

Lys

25 <210> 66
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 66
ggcuccaugg agcccggcaa uuaug 25

35 <210> 67
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

45 <400> 67
ccauggagcc cggcauuau gccac 25

50 <210> 68
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

55 <400> 68
ggagcccggc aaauaugcca ccuug 25

60 <210> 69
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 69
ggacaagagg cgcaagaucu cggca 25

<210> 70
<211> 25
10 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 70
gcaagaucuc ggcagccacc agccu 25

<210> 71
<211> 25
20 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 71
ccaucugguu ucagaaccgc cgggu 25

<210> 72
<211> 25
30 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 72
gauguuugca uucuuugccc agcac 25

<210> 73
<211> 25
40 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 73
50 caucaguuuu ucaagacaga ucaua 25

<210> 74
<211> 25
55 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 74
guuuuucag acagaucaua agcga 25

<210> 75
<211> 25
65 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 75
gugccugguc ugaugaugua ugcca 25

<210> 76
<211> 25
10 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 76
caccuucuc cuugaaagga cuuau 25

<210> 77
<211> 25
20 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 77
caauucaguc ucucucugc aaaua 25

<210> 78
<211> 25
30 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 78
gcgggcagau ccugagcaag cugaa 25

<210> 79
<211> 25
40 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 79
50 ggcagauccu gagcaagcug aagcu 25

<210> 80
<211> 25
55 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 80
cagaucuga gcaagcugaa gcuca 25

<210> 81
<211> 25
65 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 81
cuccgaaaau gccauccgc ccacu 25

<210> 82
<211> 25
10 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 82
gaaaaugcca uccgcccac uuucu 25

<210> 83
<211> 25
20 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 83
cgcccacuuu cuacagacc uacuu 25

<210> 84
<211> 25
30 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 84
cacuuucua acagccuacu ucaga 25

<210> 85
<211> 25
40 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 85
50 ccagugguga ucagaaaacu auaaa 25

<210> 86
<211> 21
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 86
ggtcaccgc gtgctaatgg t 21

<210> 87
<211> 21
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 87
caccgcgctg ctaatggtgg a 21

<210> 88
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 88
ccaactattg ctcagctcc a 21

<210> 89
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 89
gcggcagctg tacattgact t 21

30 <210> 90
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

40 <400> 90
ccacgagccc aagggtacc a 21

<210> 91
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 91
gcccaagggc taccatgcca a 21

<210> 92
<211> 21
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 92
ccaagggcta ccatgccaac t 21

<210> 93
<211> 21
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 93
cgcaagccca aggtggagca g 21

<210> 94
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 94
cgctcctgca agtgcagctg a 21

<210> 95
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 95
caagggctac catgccaact t 21

30 <210> 96
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

40 <400> 96
gaggtcacc gcgtgctaat ggt 23

<210> 97
<211> 23
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 97
gtcaccgcg tgctaatggt gga 23

<210> 98
<211> 23
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 98
gtgcggcagc tgacattga ctt 23

<210> 99
<211> 23
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 99
cgagcccaag ggctaccatg cca 23

<210> 100
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 100
gccaagggc taccatgcca act 23

<210> 101
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 101
caagggtac catgccaact tct 23

<210> 102
<211> 23
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 102
gtgcgctct gcaagtgcag ctg 23

<210> 103
<211> 23
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 103
50 cccaagggt accatgcaa ctt 23

<210> 104
<211> 23
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 104
accaactatt gcttcagtc cac 23

<210> 105
<211> 23
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 105
ccgcccggcc cgctgcccga ggc 23

<210> 106
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 106
ggatccacga gcccaagggc tacca 25

<210> 107
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 107
gatccacgag cccaagggt accat 25

<210> 108
<211> 25
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 108
cagagccca agggctacca tgcca 25

<210> 109
<211> 25
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 109
50 gagccaagg gctaccatgc caact 25

<210> 110
<211> 25
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 110
ccaagggt accatgcaa cttct 25

<210> 111
<211> 25
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 111
gaggtcaccc gcggtgctaata ggtgg 25

<210> 112
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 112
gtacaacagc acccgcgacc gggtg 25

<210> 113
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 113
ggcgccgct ccccatgcc gccct 25

<210> 114
<211> 21
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 114
cgggcagatc ctgagcaagc t 21

40 <210> 115
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 115
gcagatcctg agcaagctga a 21

<210> 116
<211> 21
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 116
ccatcccgcc cactttctac a 21

<210> 117
<211> 21
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 117
ggcagatcct gagcaagctg a 21

<210> 118
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 118
gatcctgagc aagctgaagc t 21

<210> 119
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 119
ggaggtgatt tccatctaca a 21

<210> 120
<211> 21
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 120
ccgaaaatgc catccgccc a 21

<210> 121
<211> 21
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 121
cactttctac agaccctact t 21

<210> 122
<211> 23
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 122
cctgagcaag ctgaagctca cca 23

<210> 123
<211> 23
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 123
gagtactacg ccaaggaggt tta 23

<210> 124
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 124
ccatcccgcc cactttctac aga 23

<210> 125
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 125
ccgcccactt tctacagacc cta 23

<210> 126
<211> 23
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 126
cagatcctga gcaagctgaa gct 23

<210> 127
<211> 23
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 127
ccggaggtga ttccatcta caa 23

<210> 128
<211> 23
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 128
ctccgaaaat gccatcccgcc cca 23

<210> 129
<211> 23
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 129
cactttctac agaccctact tca 23

<210> 130
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 130
ccagtggtga tcagaaaact ata 23

<210> 131
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 131
ggaagacccc acatctcctg cta 23

<210> 132
<211> 25
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 132
gcgggcagat cctgagcaag ctgaa 25

<210> 133
<211> 25
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 133
ggcagatcct gagcaagctg aagct 25

<210> 134
<211> 25
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 134
cagatcctga gcaagctgaa gctca 25

<210> 135
<211> 25
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 135
ccccggaggt gattccatc taca 25

<210> 136
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 136
ccggaggatga ttccatcta caaca 25

<210> 137
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 137
ctccgaaaat gccatcccgc ccact 25

<210> 138
<211> 25
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 138
gaaaatgcca tccgcccac ttct 25

40 <210> 139
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 139
cgcccacttt ctacagacc tact 25

<210> 140
<211> 25
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 140
cactttctac agaccctact tcaga 25

<210> 141
<211> 25
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 141
ccagtgtga tcagaaaact ataaa 25

<210> 142
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 142
caaaagctgg gaagccttct c 21

<210> 143
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 143
gatgttgca ttcttgccc a 21

30 <210> 144
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 144
cattcttgc ccagcactc a 21

40 <210> 145
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 145
50 catcagttt tcaagacaga t 21

<210> 146
<211> 21
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 146
cagttttca agacagatca t 21

<210> 147
<211> 21
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 147
gttttcaag acagatcata a 21

<210> 148
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 148
ctg'gccttt tcaagatgg a 21

<210> 149
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 149
gtctttggtc tggcgctgg t 21

30 <210> 150
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 150
ctttggtctg gtcgctggtc t 21

40 <210> 151
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 151
50 ggagcacat tctcctgaa a 21

<210> 152
<211> 23
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 152
gatgttgca ttcttgccc agc 23

<210> 153
<211> 23
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 153
catcagtttt tcaagacaga tca 23

<210> 154
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 154
cagtttttca agacagatca taa 23

<210> 155
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 155
ctg'gcgcttt tcaaggatgg aaa 23

30 <210> 156
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 156
gtctttggtc tggcctgg tct 23

40 <210> 157
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 157
ctttggctg gtcctggc tga 23

50 <210> 158
<211> 23
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 158
ggctcggc ctgctgat gat 23

<210> 159
<211> 23
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 159
ctggtgcctg gtctgatgat gta 23

10 <210> 160
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 160
gcctggtctg atgatgatg cca 23

20 <210> 161
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 161
gagcaccatt ctcttgaaa gga 23

30 <210> 162
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

40 <400> 162
gatgttgca ttcttgccc agcac 25

45 <210> 163
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 163
catcagttt tcaagacaga tcata 25

55 <210> 164
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 164
gttttcaag acagatcata agcga 25

65 <210> 165
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 165
gtctttggtc tggcgctgg tctga 25

<210> 166
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 166
ggctcgggctc ctggtctgat gatgt 25

<210> 167
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 167
gtgcctgggc tgatgatgta tgcca 25

<210> 168
<211> 25
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 168
gagcaccatt ctcttgaaa ggact 25

40 <210> 169
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 169
caccattctc cttgaaagga cttat 25

<210> 170
<211> 25
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 170
cctcaattca gtctctcatc tgcaa 25

<210> 171
<211> 25
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 171
caattcagtc tctcatctgc aataa 25

<210> 172
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 172
ggctccatgg agcccggcaa t 21

<210> 173
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 173
ccagcctatg gccagttacc t 21

<210> 174
<211> 21
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 174
ccatggagcc cggcaattat g 21

<210> 175
<211> 21
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 175
50 gcccggaat tatgccacct t 21

<210> 176
<211> 21
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 176
caaggatc gaaggcttgc t 21

<210> 177
<211> 21
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 177
gatatcgaag gcttgctggg a 21

<210> 178
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 178
gtggctggaa cagccagatg t 21

<210> 179
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 179
gctggaacag ccagatgtg t 21

<210> 180
<211> 21
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 180
gatctcggca gccaccagcc t 21

<210> 181
<211> 21
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 181
cgccagatta ccatctggtt t 21

<210> 182
<211> 23
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 182
ggctccatgg agcccggcaa tta 23

<210> 183
<211> 23
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 183
catggagccc ggcaattatg cca 23

<210> 184
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 184
ggagcccggc aattatgcca cct 23

<210> 185
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 185
gtggctggaa cagccagatg tgt 23

<210> 186
<211> 23
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 186
cgccagatta ccatctgttt tca 23

40 <210> 187
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 187
ccagattacc atctggttc aga 23

<210> 188
<211> 23
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 188
atctggttc agaaccgccg ggt 23

<210> 189
<211> 23
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 189
aagatctcgg cagccaccag cct 23

<210> 190
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 190
ggctccatgg agcccggcaa ttatg 25

<210> 191
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 191
ccatggagcc cggcaattat gccac 25

<210> 192
<211> 25
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 192
ggagcccggc aattatgcca cctg 25

<210> 193
<211> 25
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 193
50 caaggatc gaaggcttgc tggga 25

<210> 194
<211> 25
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 194
ggtggctgga acagccagat gtgtt 25

<210> 195
<211> 25
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 195
gctggaacag ccagatgtgt tgcca 25

<210> 196
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 196
ggacaagagg cgcaagatct cggca 25

<210> 197
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 197
gcaagatctc ggcagccacc agcct 25

<210> 198
<211> 25
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 198
cgccagatta ccatctggtt tcaga 25

<210> 199
<211> 25
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 199
ccatctggtt tcagaaccgc cgggt 25

<210> 200
<211> 21
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 200
caccctctc cgggccgcgc t 21

<210> 201
<211> 21
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 201
ctcctccggg ccgcgctccc t 21

<210> 202
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 202
gtactgaatt tcgccccac a 21

<210> 203
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 203
ctgaatttcg ccgccacagg a 21

<210> 204
<211> 21
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 204
ggagcgcgccc ccccgcggcc t 21

40 <210> 205
<211> 21
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 205
ctgctgctcc tcggctgcgg a 21

<210> 206
<211> 21
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 206
gctgctctc ggctgcggat a 21

<210> 207
<211> 21
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 207
gatccacagc atccgggacc t 21

<210> 208
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 208
ccacagcatc cgggacctcc a 21

<210> 209
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 209
catccgggac ctccagcgac t 21

30 <210> 210
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

40 <400> 210
gccacctcc tccgggccgc gct 23

<210> 211
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 211
ccctctccg ggccgcgctc cct 23

<210> 212
<211> 23
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 212
gatgtactg aatttcgccg cca 23

<210> 213
<211> 23
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 213
ctggagcgcc cgccccgcg cct 23

<210> 214
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 214
gcgccccccc cgcggcctcg cct 23

<210> 215
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 215
gcctcgggac gcgatgagga cct 23

<210> 216
<211> 23
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 216
ggcttgctg ctgctcctcg gct 23

<210> 217
<211> 23
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 217
50 gctgctgct cctcggtgc gga 23

<210> 218
<211> 23
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 218
cagatccaca gcatccgga cct 23

<210> 219
<211> 23
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 219
gaccaggacg gtcatttacg aga 23

<210> 220
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 220
gcgccaccct cctccgggcc gcgct 25

<210> 221
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 221
caccctctc cggccgcgc tcct 25

<210> 222
<211> 25
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 222
gggatgtac tgaatttcgc cgcca 25

40 <210> 223
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 223
gatgtactg aatttcgccc ccaca 25

<210> 224
<211> 25
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 224
ggtactgaat ttcgcccca cagga 25

<210> 225
<211> 25
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 225
ggctggagcg cccgccccgc ggcct 25

<210> 226
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 226
gagcgccccgc cccgcggcct cgcct 25

<210> 227
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 227
ccagcgctc gggacgcgat gagga 25

<210> 228
<211> 25
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 228
gcgctcggg acgcatgag gacct 25

40 <210> 229
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 229
50 gctgtgtct cctcggctgc ggata 25

<210> 230
<211> 21
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 230
ggagacggag aacagcgcgc t 21

<210> 231
<211> 21
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 231
ggagaacagc gcgctgcagc t 21

<210> 232
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 232
gaacagcgcg ctgcagctgc a 21

<210> 233
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 233
gaggctggga gatgatcaga a 21

30 <210> 234
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 234
40 ggctgggaga tgatcagaaa a 21

<210> 235
<211> 21
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 235
50 ggccttact gaggacttg a 21

<210> 236
<211> 21
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 236
cagttagcag atgaaactt a 21

<210> 237
<211> 21
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 237
gtagcagat gaaacttac t 21

<210> 238
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 238
caatgggagg ctgggagatg a 21

<210> 239
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 239
ctggagacgg agaacagcgc 23

30 <210> 240
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 240
40 gagaacagcg cgctgcagct gca 23

<210> 241
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 241
50 gaccttact gaggacttg agt 23

<210> 242
<211> 23
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 242
gggaggctgg gagatgatca gaa 23

<210> 243
<211> 23
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 243
cagagcctta ctgaggactt gga 23

<210> 244
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 244
cgacacggcc cgcgagcgcg cca 23

<210> 245
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 245
cagttagcag atgaaacttt act 23

30 <210> 246
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 246
gtagcagat gaaactttac tta 23

40 <210> 247
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 247
ccaatgggag gctgggagat gat 23

50 <210> 248
<211> 23
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 248
gaagatgtga aggttatatt gaa 23

<210> 249
<211> 25
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 249
gcctggagac ggagaacagc gcgct 25

<210> 250
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 250
cggagaacag cgcgctgcag ctgca 25

<210> 251
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 251
gagcctact gaggactgg agttt 25

<210> 252
<211> 25
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 252
gggaggctgg gagatgatca gaaa 25

40 <210> 253
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 253
gtcagagcct tactgaggac ttgga 25

<210> 254
<211> 25
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 254
gacgacacgg cccgagcg cgcca 25

<210> 255
<211> 25
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 255
gacacggccc gcgagcgcgc caagc 25

<210> 256
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 256
cagttagcag atgaaacttt actta 25

<210> 257
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 257
gatcaaccaa tgggaggctg ggaga 25

30 <210> 258
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 258
ccaatgggag gctgggagat gatca 25

40 <210> 259
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 259
gtgtgcgag acagtgtcc a 21

<210> 260
<211> 21
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 260
ccacatgcc aagtggtccc a 21

<210> 261
<211> 21
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 261
cctggtggac atctccagg a 21

<210> 262
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 262
gcacatagga gagatgagct t 21

<210> 263
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 263
caagatccgc agacgtgtaa a 21

<210> 264
<211> 21
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 264
ggcgaggcag ctgagttaa a 21

<210> 265
<211> 21
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 265
50 cttgagttaa acgaacgtac t 21

<210> 266
<211> 21
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 266
ggaaggagcc tcctcaggg t 21

<210> 267
<211> 21
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 267
cactttgggt cggaggcg a 21

<210> 268
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 268
cagtattctt ggtaaatatt t 21

<210> 269
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 269
gctccgaaa ccatgaactt tct 23

30 <210> 270
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 270
ctccacatg ccaagtggtc cca 23

40 <210> 271
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 271
cctggtggac atctccagg agt 23

50 <210> 272
<211> 23
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 272
cagcacatag gagatgag ctt 23

<210> 273
<211> 23
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 273
gcttgagtta aacgaacgta ctt 23

<210> 274
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 274
gttaaacgaa cgtacttgca gat 23

<210> 275
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 275
ggaaggagcc tcctcaggg ttt 23

30 <210> 276
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

40 <400> 276
ctccctcagg gtttcgggaa cca 23

<210> 277
<211> 23
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 277
ctaatgttat tgggtcttc act 23

<210> 278
<211> 23
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 278
gagaaagtgt ttatatacg gta 23

<210> 279
<211> 25
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 279
cctccgaaac catgaacttt ctgct 25

<210> 280
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 280
ccaccatgcc aagtgtccc aggct 25

<210> 281
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 281
ccctggtgga catctccag gagta 25

<210> 282
<211> 25
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 282
gatccgcaga cgtgtaaag ttct 25

<210> 283
<211> 25
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 283
50 cgcagacgtg taaatgttc tgcaa 25

<210> 284
<211> 25
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 284
gtaaagtgc ctgcaaaaac acaga 25

<210> 285
<211> 25
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 285
cagcttgagt taaacgaacg tactt 25

<210> 286
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 286
gttaaacgaa cgtacttgca gatgt 25

<210> 287
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 287
ccatgccaag tggcccagg ctgca 25

30 <210> 288
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

40 <400> 288
ctcaaggac cccaagcggc t 21

<210> 289
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 289
ggccactca aggaccccaa g 21

<210> 290
<211> 21
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 290
ggcttctcc tgcgcatcca t 21

<210> 291
<211> 21
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 291
caagcagaag agagaggagt t 21

<210> 292
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 292
cagaagagag aggagtgtg t 21

<210> 293
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 293
gagaggagt ggtctatca a 21

<210> 294
<211> 21
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 294
gaagagagag gagggtgtc t 21

40 <210> 295
<211> 21
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 295
gaatctaata actacaatac t 21

<210> 296
<211> 21
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 296
cagttggtat gtggcactga a 21

<210> 297
<211> 21
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 297
cactgaaacg aactgggcag t 21

<210> 298
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 298
cactcaagg accccaagcg gct 23

<210> 299
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 299
caagcagaag agagaggagt tgt 23

<210> 300
<211> 23
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 300
gcagaagaga gaggagtgtg gtt 23

<210> 301
<211> 23
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 301
cagaagagag aggagtgtg tct 23

<210> 302
<211> 23
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 302
gaagagagag gagggtgtc tat 23

<210> 303
<211> 23
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 303
gagagaggag ttgtgtctat caa 23

<210> 304
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 304
ggaatctaata aactacaata ctt 23

<210> 305
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 305
ggtatgtggc actgaaacga act 23

30 <210> 306
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 306
gttggatgtg ggcactgaaa cga 23

40 <210> 307
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 307
gtggcactga aacgaactgg gca 23

50 <210> 308
<211> 25
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 308
gccactcaa ggacccaag cggt 25

<210> 309
<211> 25
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 309
caagcagaag agagaggagt tgtgt 25

<210> 310
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 310
gaagagagag gagggtgtc tatca 25

<210> 311
<211> 25
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 311
cagaagagag aggagttgtg tctat 25

<210> 312
<211> 25
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 312
ggaatctaata aactacaata cttac 25

40 <210> 313
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 313
50 ctaataacta caatacttac cggtc 25

<210> 314
<211> 25
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 314
cagttggtat gtggcactga aacga 25

<210> 315
<211> 25
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 315
gtggcactga aacgaactgg gcagt 25

<210> 316
<211> 25
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 316
tcttccaatg tctgctaaga gctga 25

<210> 317
<211> 25
20 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 317
ccaugccaag uggucccagg cugca 25

<210> 318
<211> 21
30 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 318
caaggauauc gaagguugc u 21

40 <210> 319
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 319
gucuuugguc uggugccugg u 21

<210> 320
<211> 21
55 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

60 <400> 320
cacgagcca agggcuacca u 21

<210> 321
<211> 21
65 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 321
ggaggugauu uccaucuaca a 21

<210> 322
<211> 23
10 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15 <400> 322
gucuuugguc uggugccugg ucu 23

<210> 323
<211> 25
20 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

25 <400> 323
gggaugguac ugaauuucgc cgcca 25

<210> 324
<211> 25
30 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 324
gagccuuacu gaggacuugg aguuu 25

40 <210> 325
<211> 25
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 325
50 gucagagccu uacugaggac uugga 25

<210> 326
<211> 17
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 326

Lys His His His Lys His His His Asn His His His Asn His His His
 1 5 10 15

Asn

5 <210> 327
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 327
 ugccgagauc uugcgccucu ugucc 25

15 <210> 328
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 328
 aggcuggugg cugccgagau cuugc 25

25 <210> 329
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 329
 uaugaucugu cuugaaaaac ugaug 25

40 <210> 330
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

45 <400> 330
 uggcauacau caucagacca ggcac 25

50 <210> 331
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

55 <400> 331
 gauccacgag cccaagggcu accau 25

60 <210> 332
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 545 963 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5

<400> 332

augguagccc uugggcucgu ggauC 25

<210> 333

<211> 25

10

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético

15

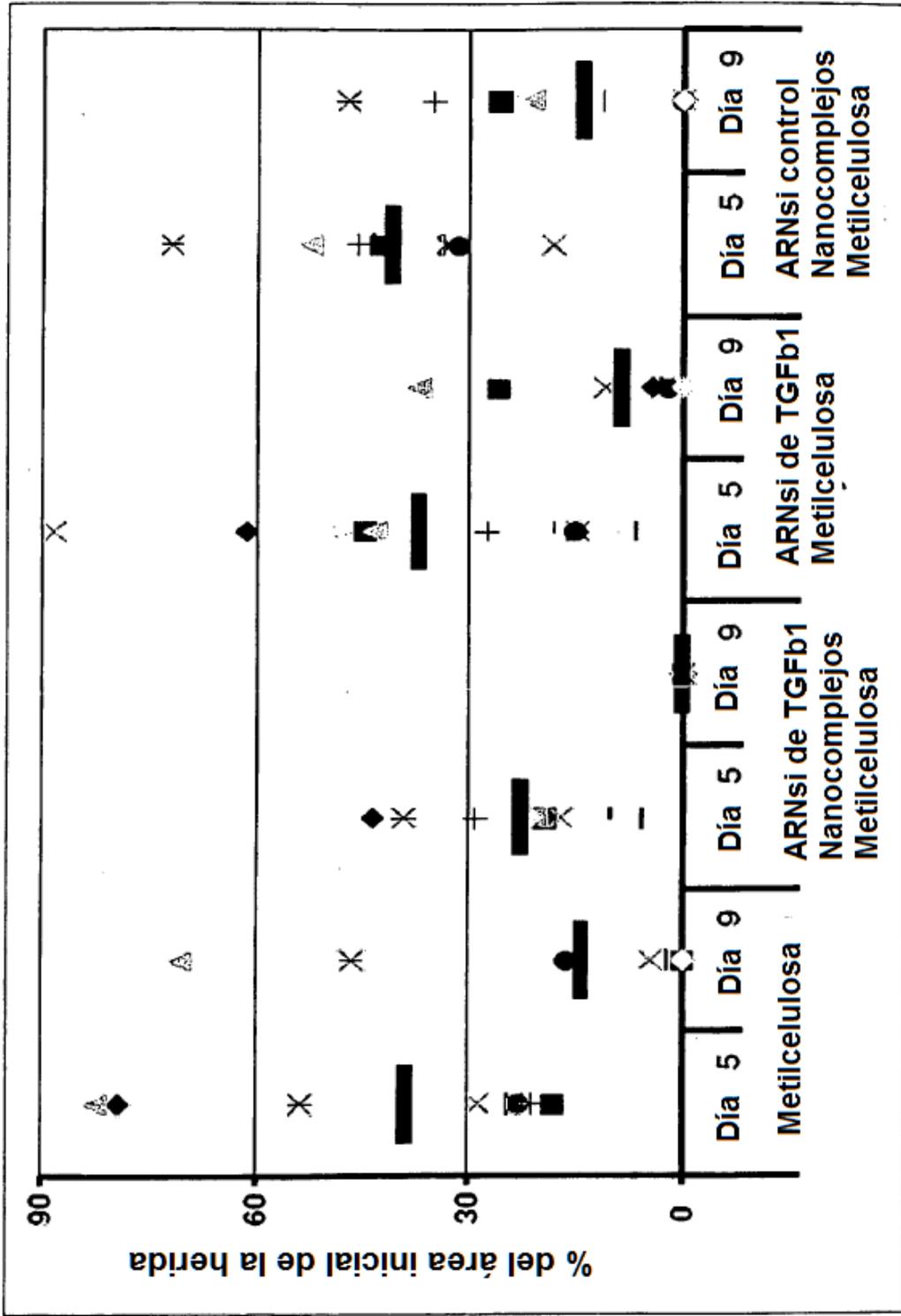
<400> 333

ggcgccgccu cccccaugcc gccu 25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende al menos tres moléculas de ARNip diferentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que al menos una de dichas moléculas de ARNip está dirigida a una molécula de ARNm codificada por un gen TGF-β1, al menos una de dichas moléculas de ARNip está dirigida a una molécula de ARNm codificada por un gen Cox-2 y por lo menos una de dichas moléculas de ARNip está dirigida a una molécula de ARNm codificada por un gen Hoxb13, en la que dichas moléculas de ARNip diferentes inhiben la expresión de dichos genes tanto en células humanas como de ratón, en donde dicha composición comprende una nanopartícula que comprende un copolímero de histidina-lisina y en donde dichas moléculas de ARNip diferentes comprenden los siguientes oligonucleótidos:
- 10
- (1) hmTF-2: sentido, 5'-CCCAAGGGCUACCAUGCCAACUUCU-3' (SEC ID N° 11) antisentido, 5'AGAAGUUGGCAUGGUAGCCCUUGGG-3' (SEC ID N° 12);
- 15 (2) hmCX-1: sentido, 5'-GGUCUGGUGCCUGGUCUGAUGAUGU-3' (SEC ID N° 9) antisentido, 5'-ACAUCAUCAGACCAGGCACCAGACC-3' (SEC ID N° 10); y
- (3) hmHX-1: sentido, 5'-GGUGGCUGGAACAGCCAGAUGUGUU-3' (SEC ID N° 7) antisentido, 5'-AACACAUCUGGCUGUCCAGCCACC-3' (SEC ID N° 8).
- 20 2. La composición de la reivindicación 1 para su uso en medicina.
3. La composición de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una herida dérmica o epidérmica en un mamífero, en donde dicha herida se caracteriza, al menos en parte, por inflamación y neovascularización.
- 25 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho mamífero es un ser humano.
5. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en donde el uso de dicha composición da como resultado la cicatrización de heridas con formación de cicatrices reducida.

Figura A.



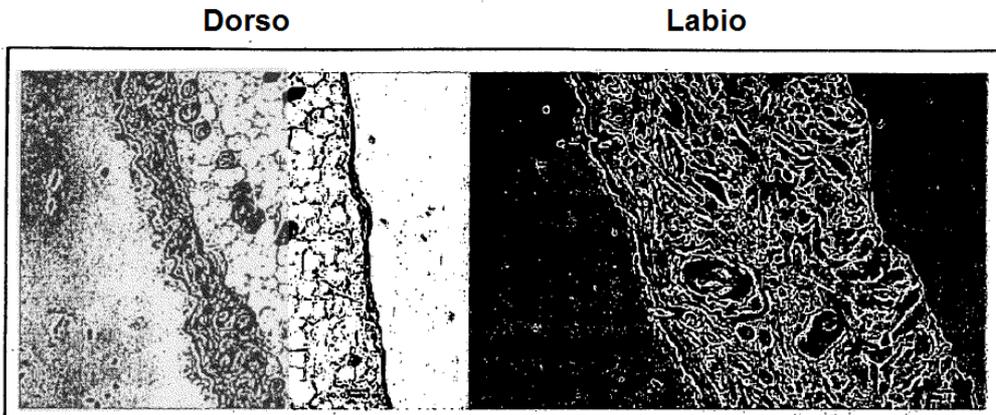


Figura 1. Tinción on hematoxilina y eosina (H y E) de piel del dorso y de los labios de tipo silvestre (barra de escala=50 micrómetros)

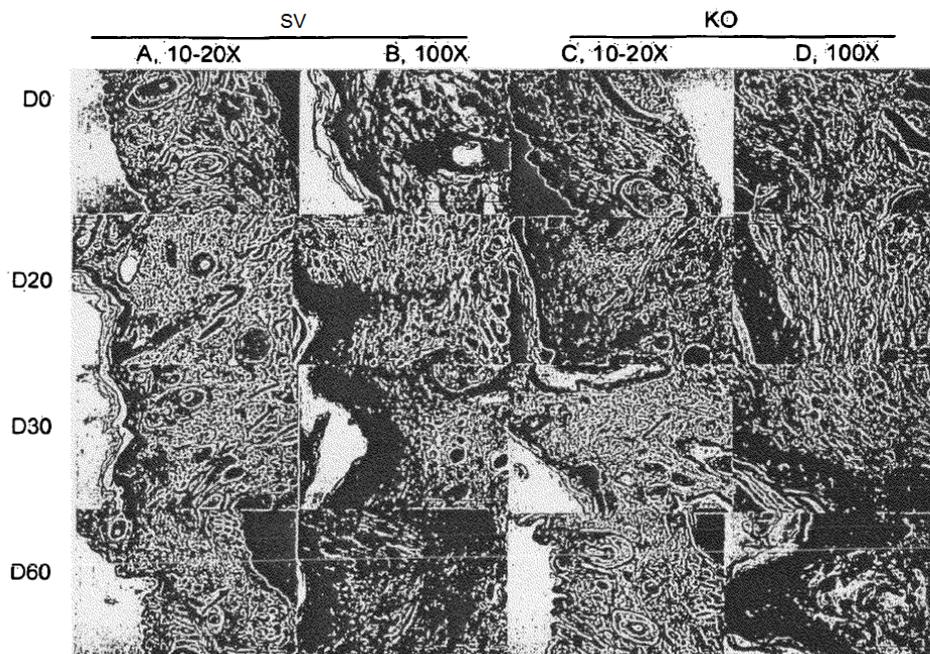


Figura 2. Organización el colágeno en biopsias de heridas SV y KO para Hoxb13 (barra de escala= 50 μ m). Columna A, bajo aumento (lente de 10x o 20x) de biopsias de heridas en ratones SV; Columna B, alto aumento (lente de 100x) de biopsias de heridas en ratones SV; Columna C, bajo aumento (lente de 10x o 20x) de biopsias de heridas en ratones KO para Hoxb13; Columna D, alto aumento (lente de 100x) de biopsias de heridas en ratón. Fila 1, piel no herida; fila 2, biopsias de heridas el día 20; fila 3, biopsias de heridas el día 30; fila 4, biopsias de heridas el día 60. Las flechas rojas identifican la localización de la tinta china.

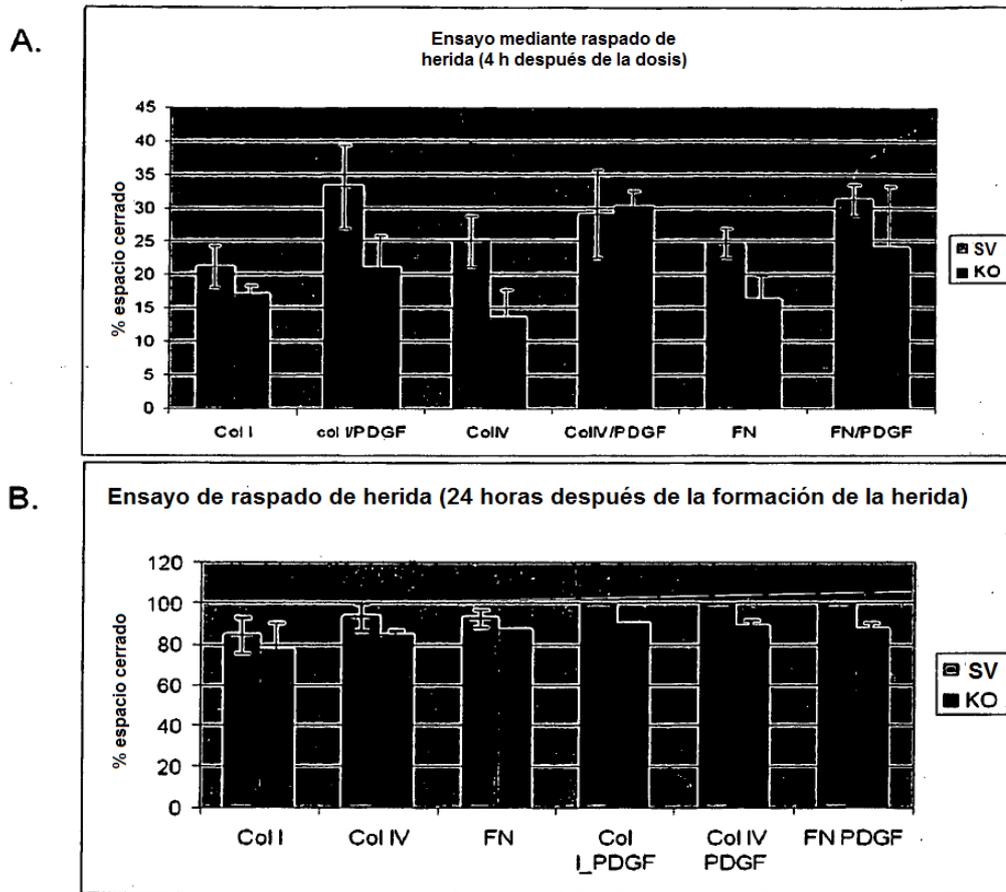


Figura 3. Ensayos de raspado de heridas usando fibroblastos dérmicos primarios aislados de ratones SV y KO para Hoxb13 (barra de error calculada a partir de seis repeticiones).

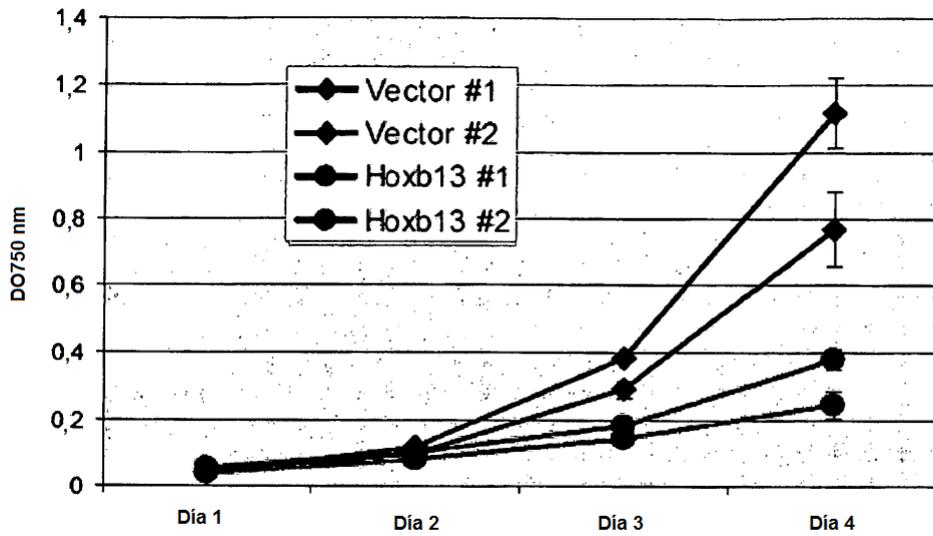


Figura 4. Índice de proliferación reducido en células REK que expresan HOXB13. Se sembraron 1×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Los ensayos de MTT se realizaron conforme a las instrucciones de Molecular Probe (n= 4).

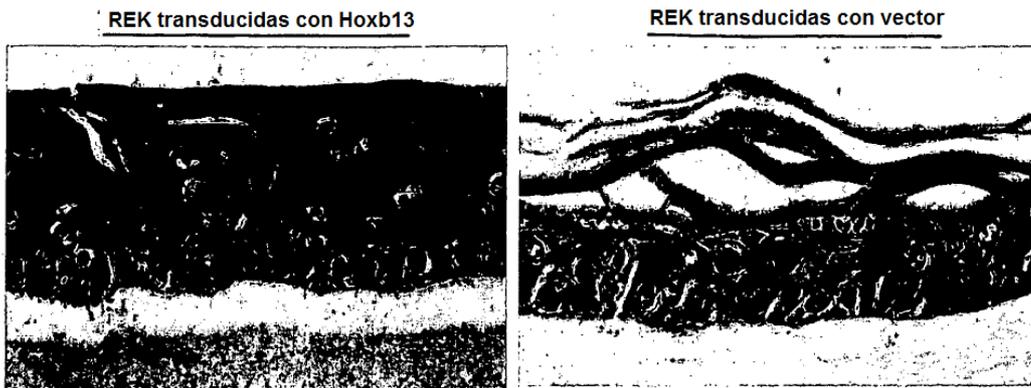


Figura 5. La sobreexpresión de HOXB13 tiene como resultado una diferenciación aberrante al 5º día del cultivo de REK elevadas (tinción de H y E).

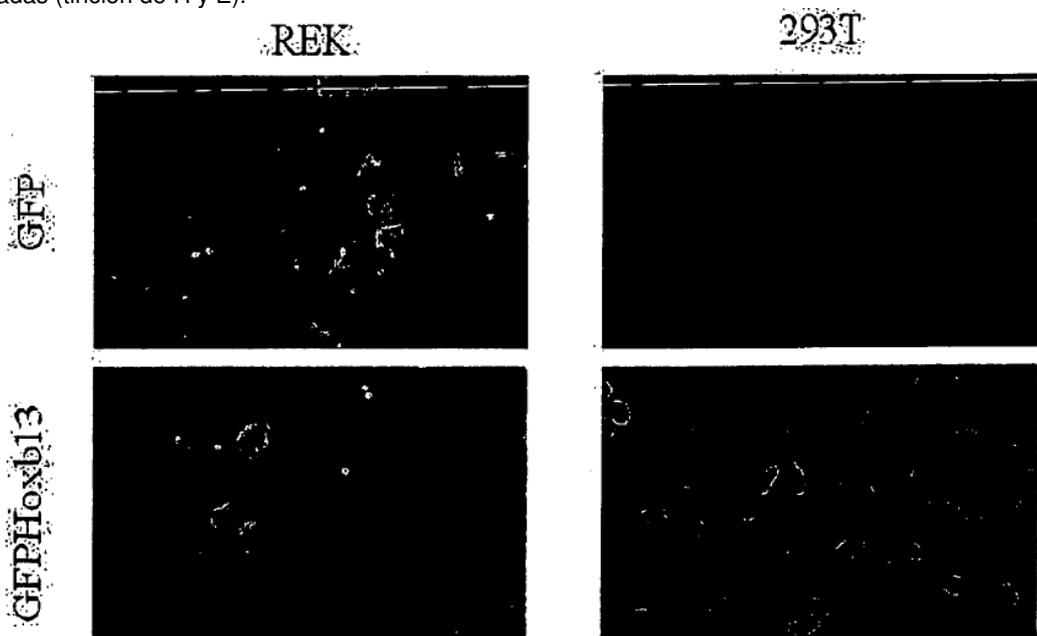


Figura 6. La proteína GFP-HOXB13 se localiza en el núcleo en células REK y 293T.

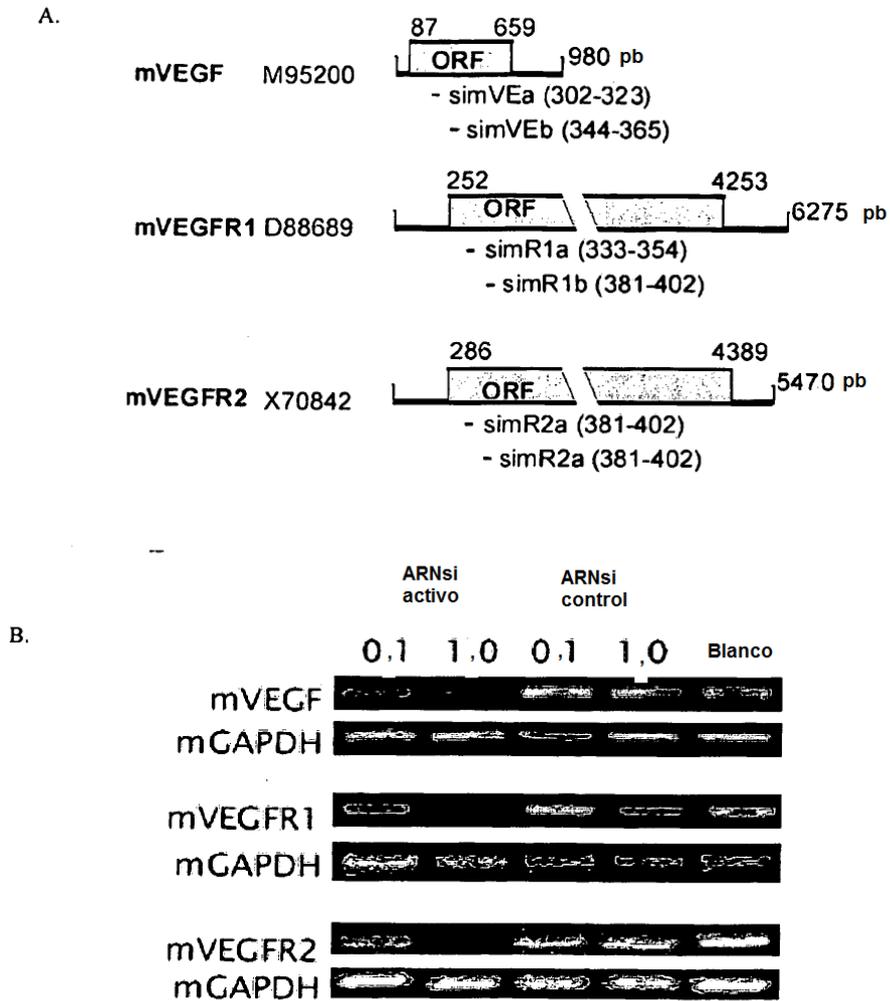


Figura 7. A. Localizaciones de secuencias diana en ARNm de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2. B. Mediciones de disminución de ARNm tras la transfección de ARNi *in vitro*.

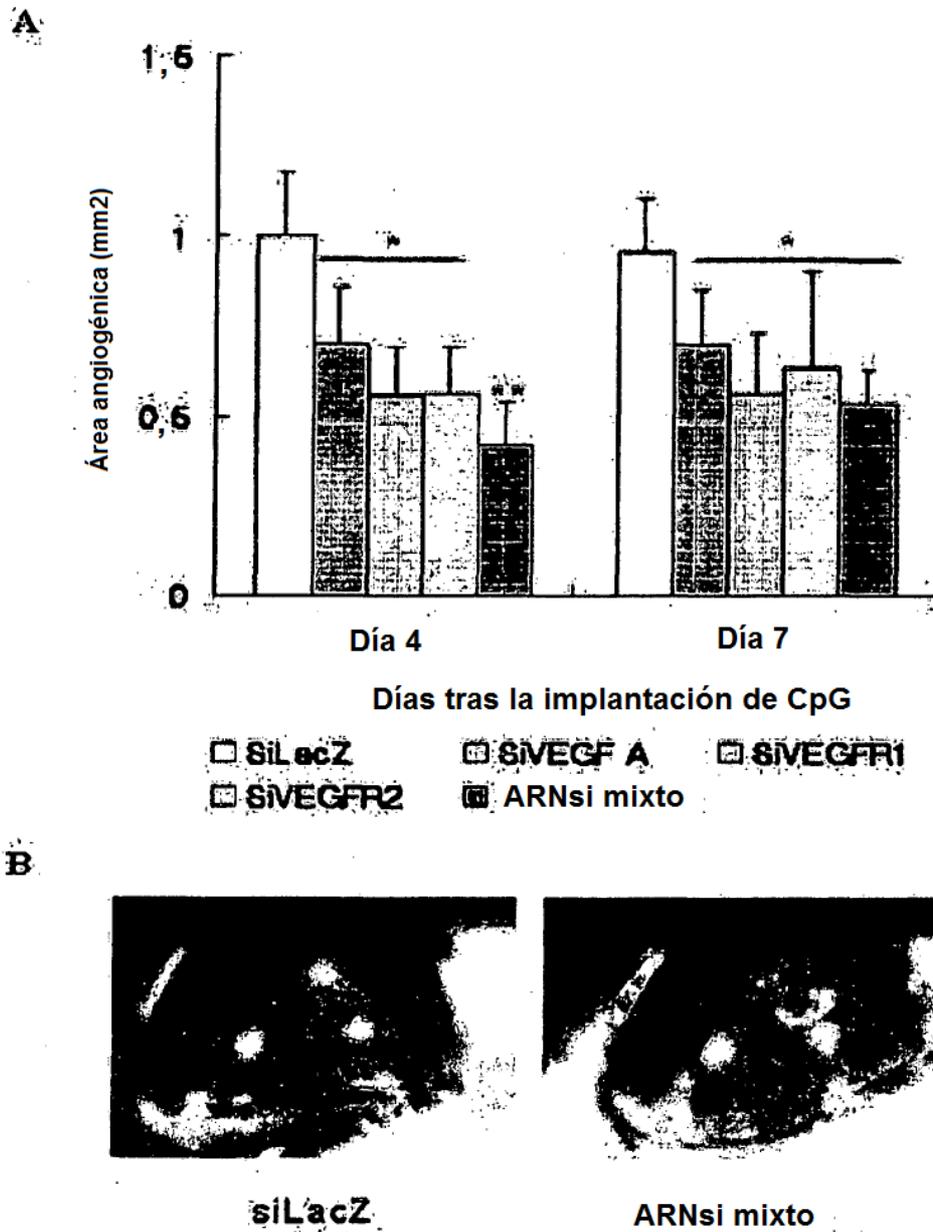


Figura 8. La liberación local de ARNip dirigido a los genes de la vía del VEGF inhibe la angiogénesis inducida por CpG ODN.

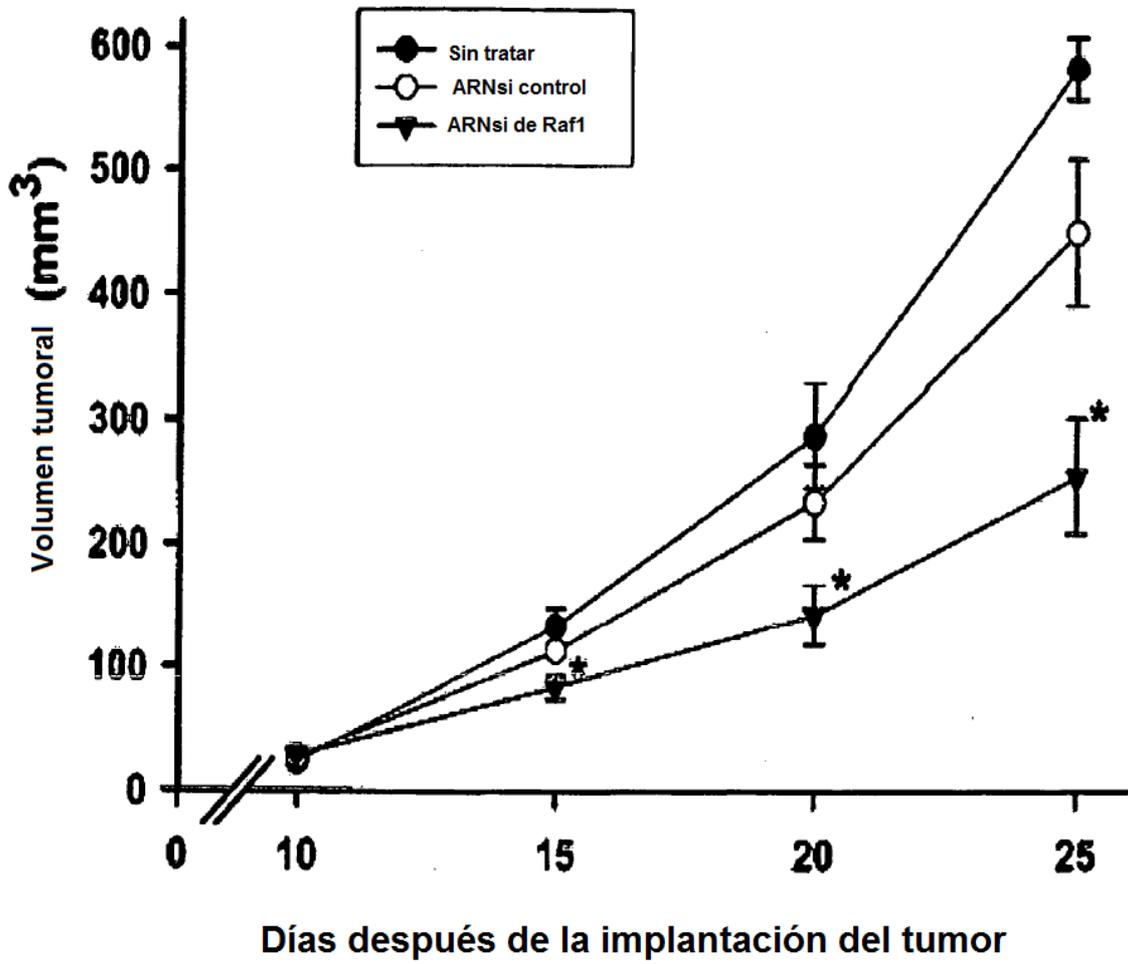


Figura 9. EL ARNip de Raf-1 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* después de la liberación intratumoral mediada por el polímero HK.

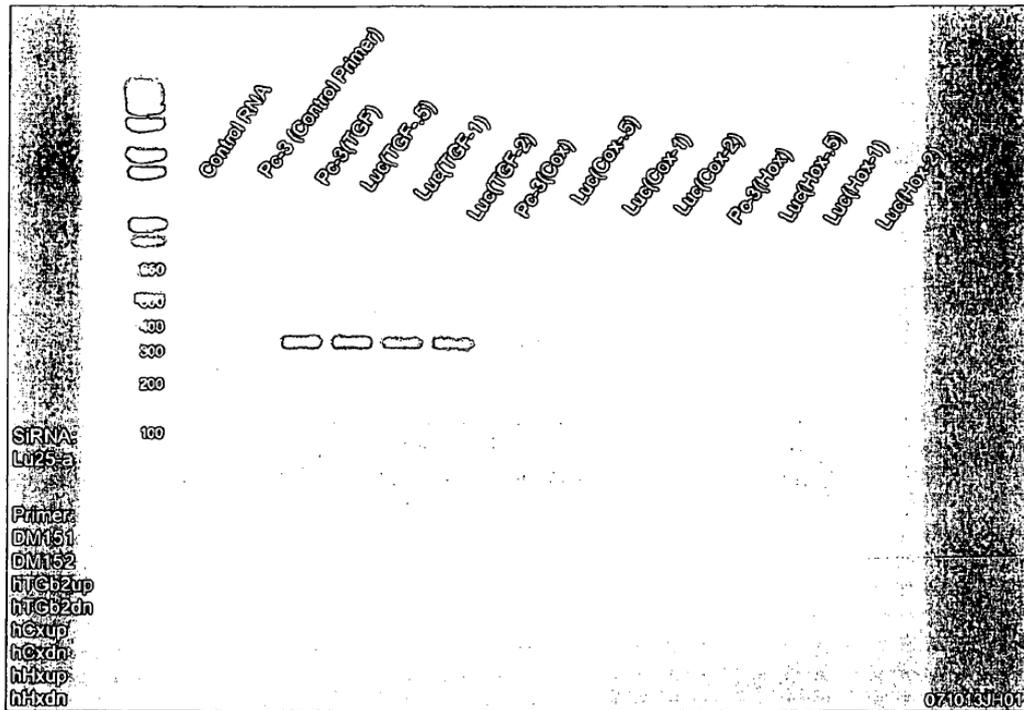


Figura 10. Los cebadores usados en el estudio pueden detectar secuencias de las tres especies de ARNm en las muestras de ARN total de células PC3. Los cebadores para RT-PCR usados para análisis se muestran en la columna, en la parte inferior izquierda. El dúplex de ARNip dirigido mostrado en la columna en la parte central izquierda.

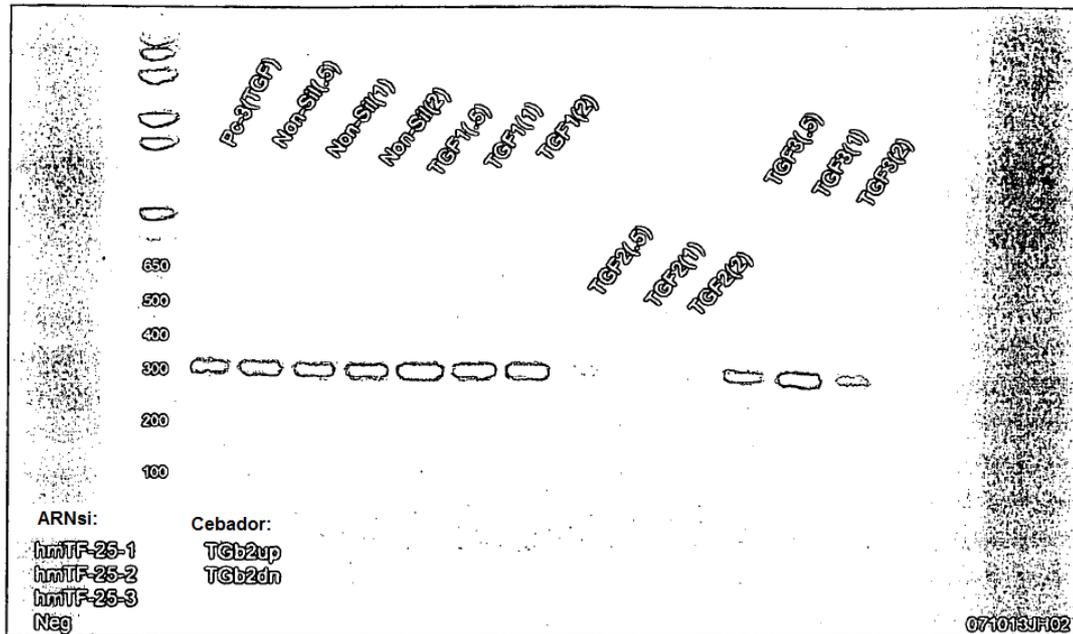


Figura 11. El ARNip de TGFbeta-2 (hmTF-25-2) puede disminuir significativamente la expresión del gen diana en las células PC3. Los cebadores de RT-PCR usados para el análisis se muestran en la columna, en la parte inferior izquierda. Los dúplex de ARNip dirigidos se muestran en la primera columna en la parte inferior izquierda.

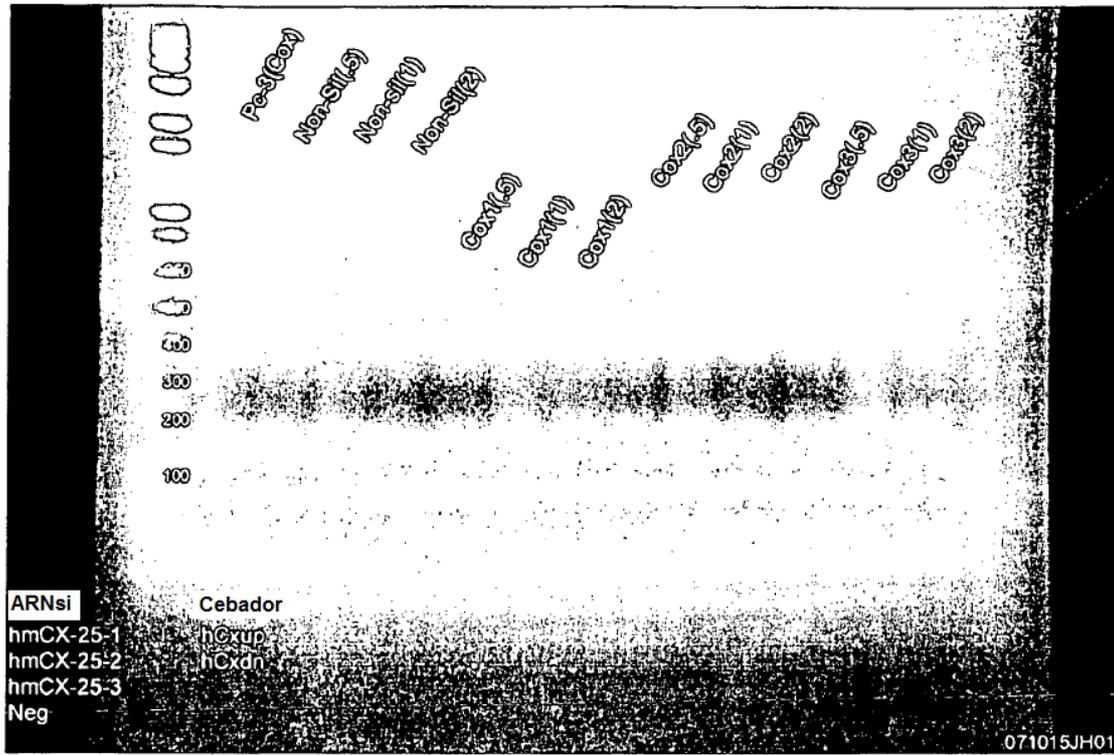


Figura 12. El ARNip de Cox1 (hmCX-25-1) puede disminuir la expresión del gen diana en las células PC3. Los cebadores de RT-PCR usados para el análisis se muestran en la segunda columna, en la parte inferior izquierda. Los dúplex de ARNip dirigidos se muestran en la primera columna en la parte inferior izquierda.

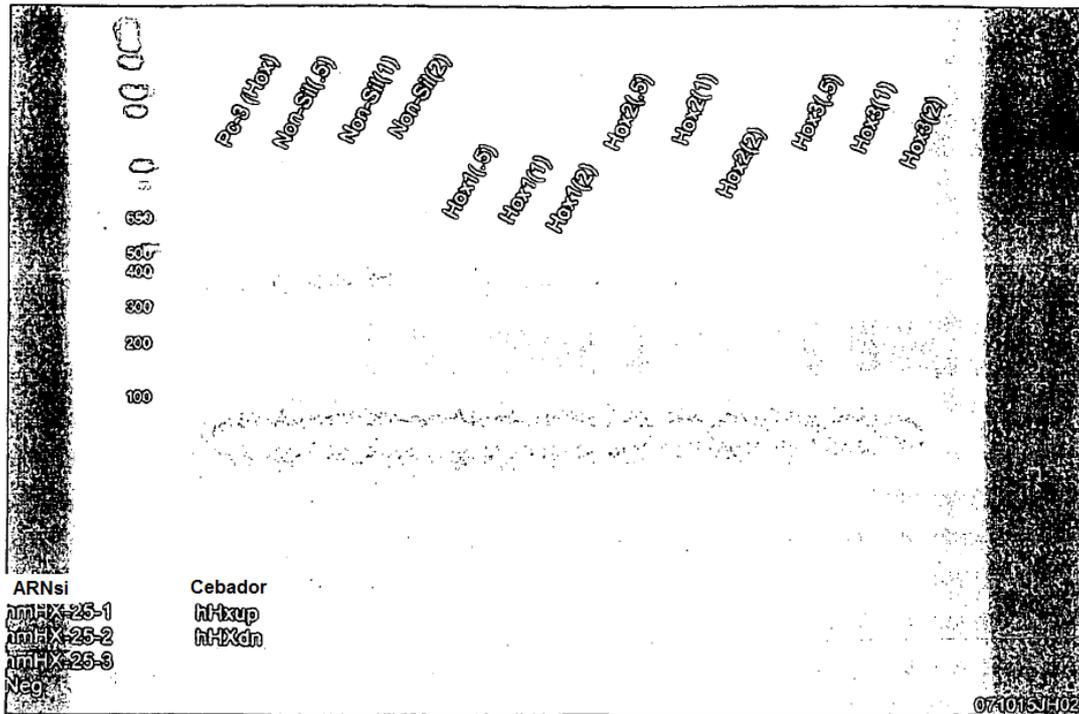
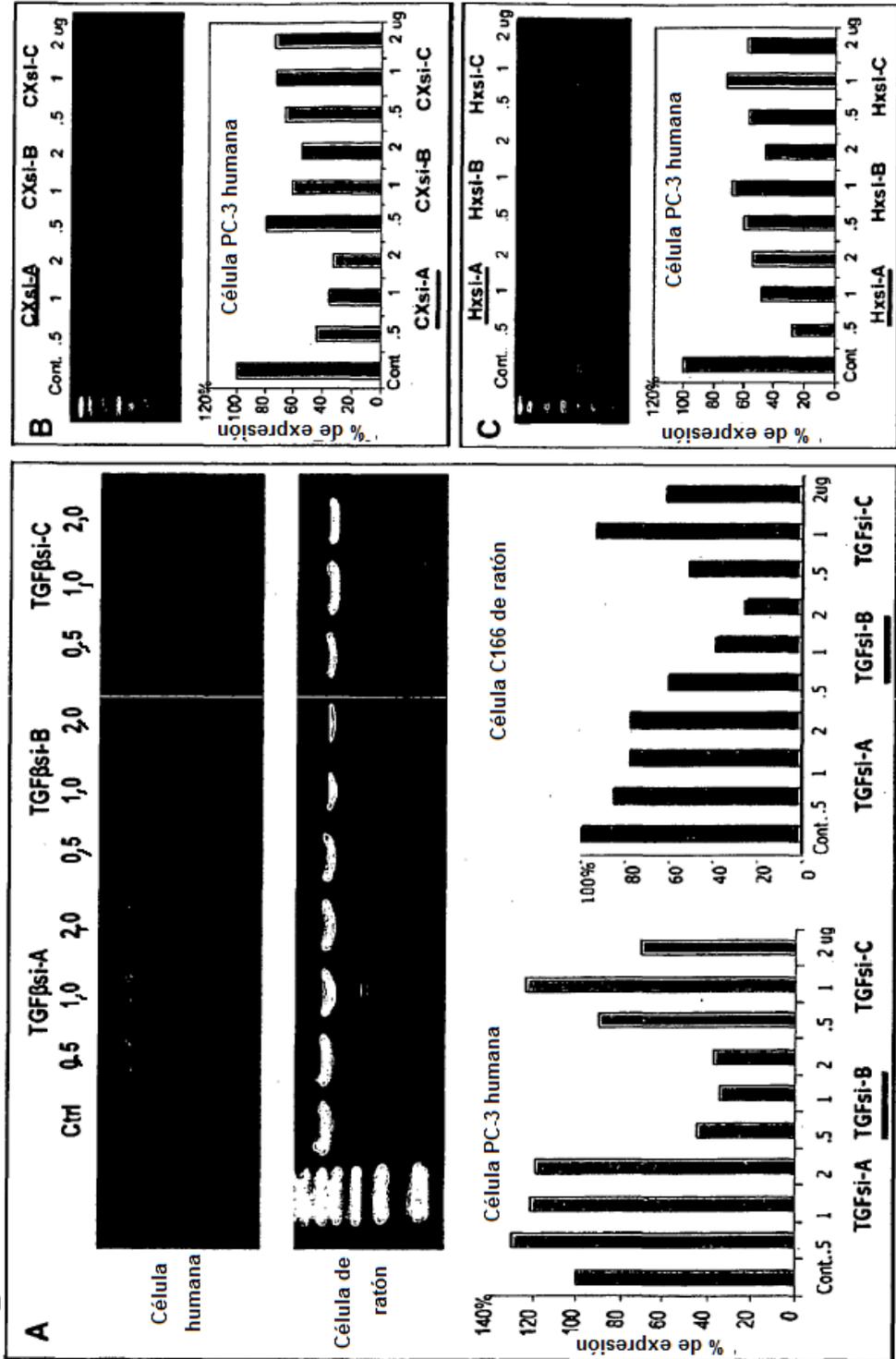


Figura 13. El ARNip de Hox1 (hmHX-25-1) puede disminuir la expresión del gen diana en las células PC3. Los cebadores de RT-PCR usados para el análisis se muestran en la segunda columna, en la parte inferior izquierda. Los dúplex de ARNip dirigidos se muestran en la primera columna en la parte inferior izquierda.

Figura 14.



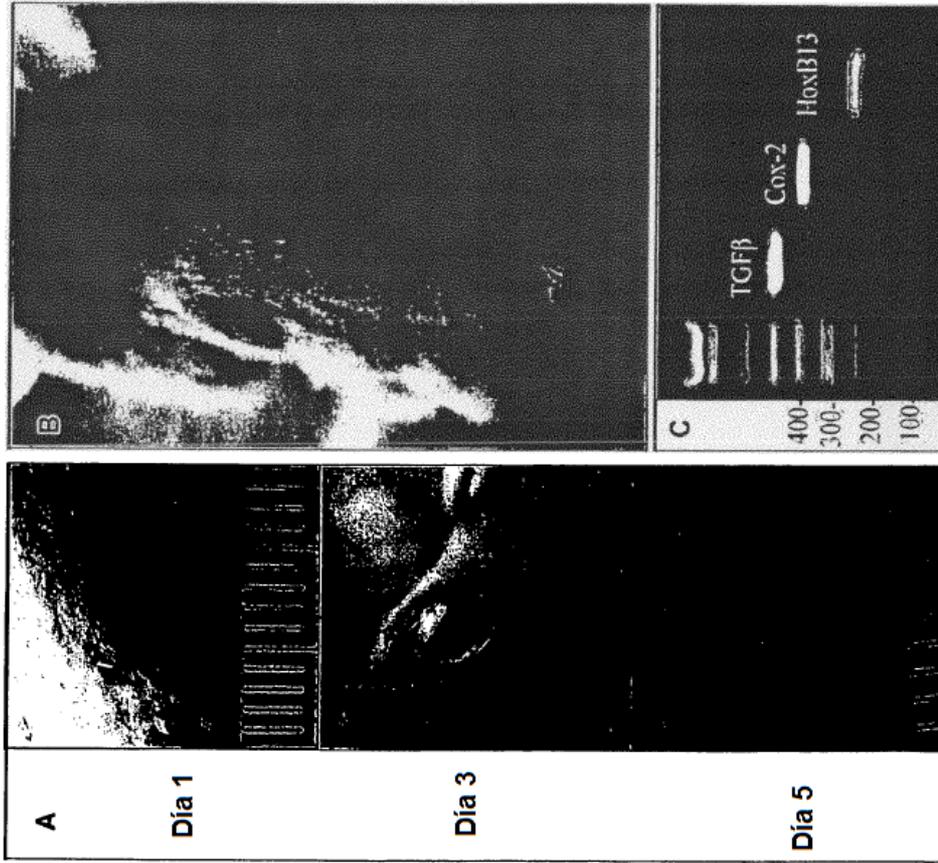


Figura 15.

Figura 16.

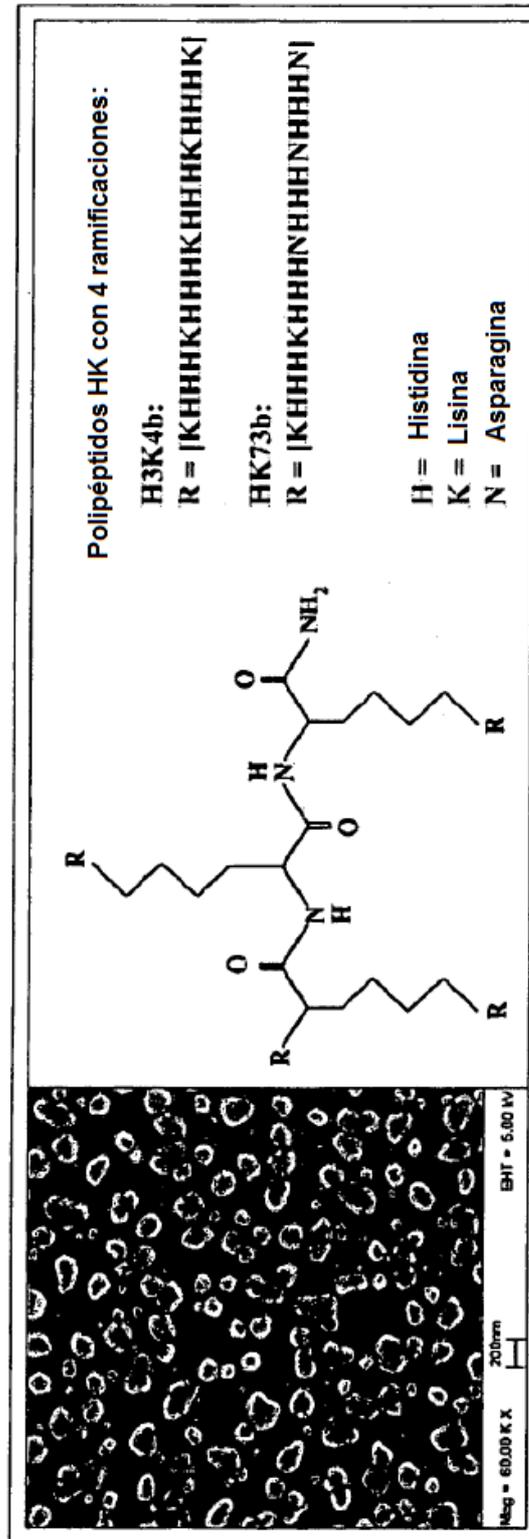


Figura 17.

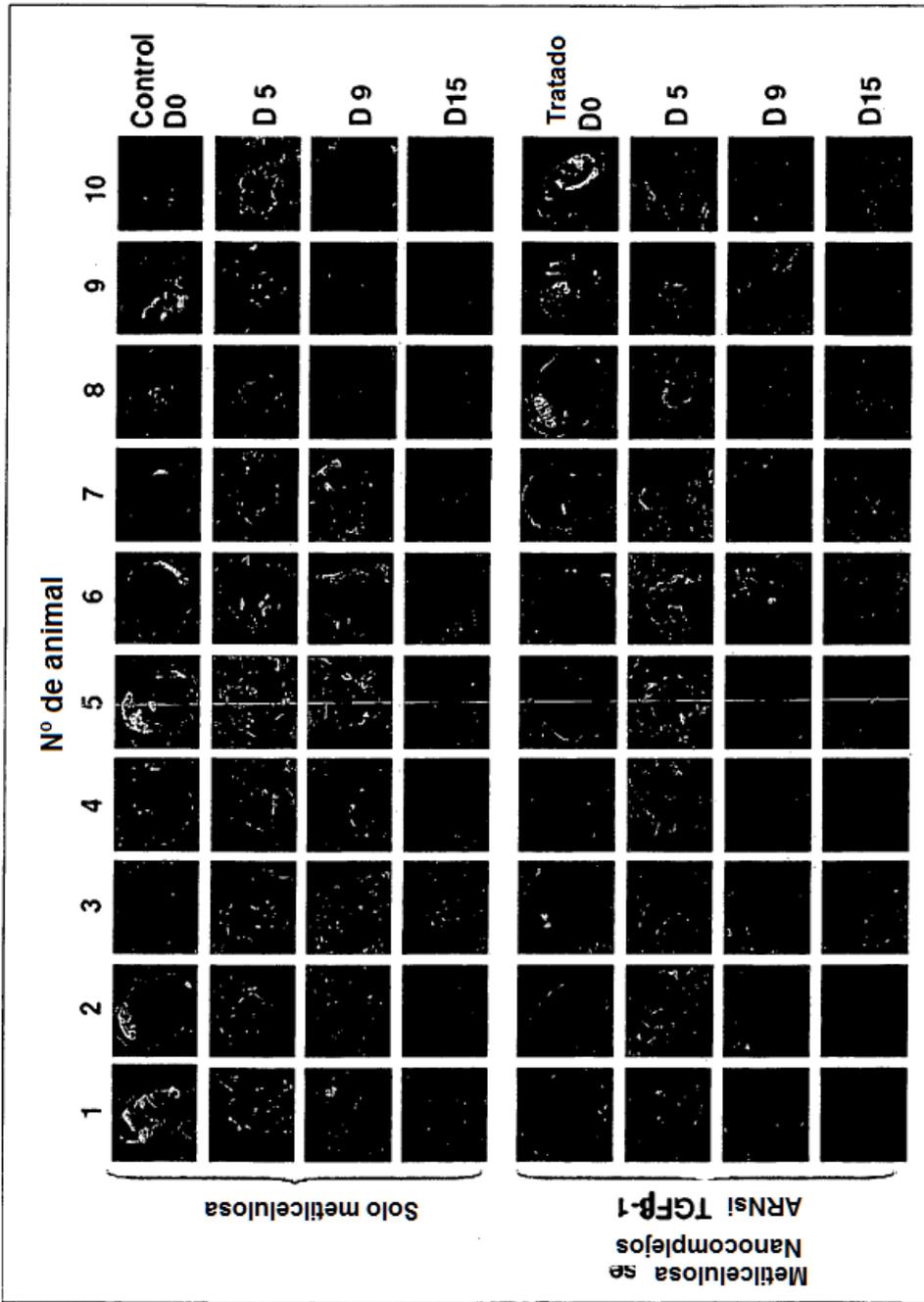


Figura 18.

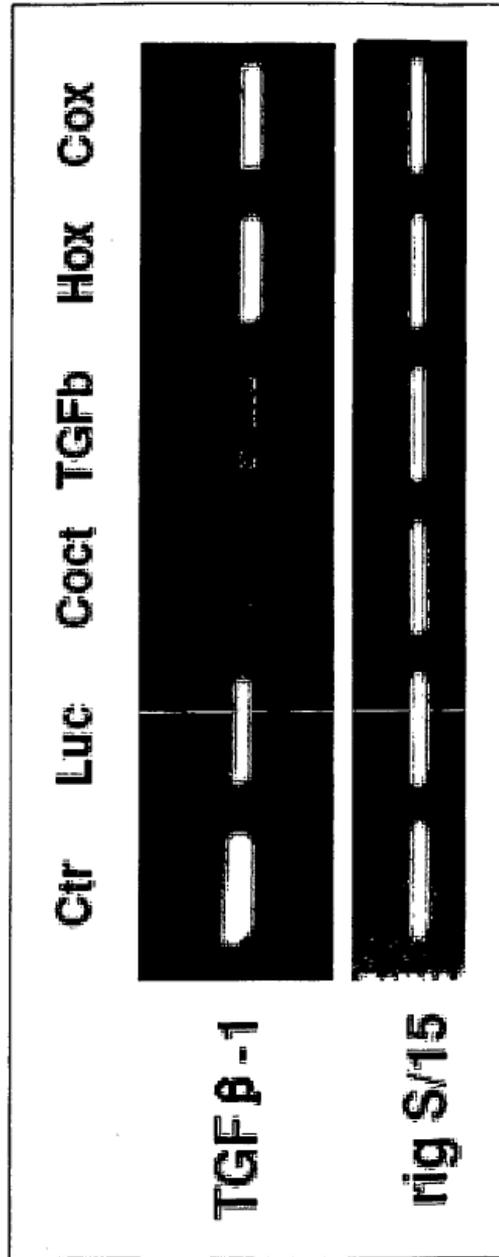


Figura 19.

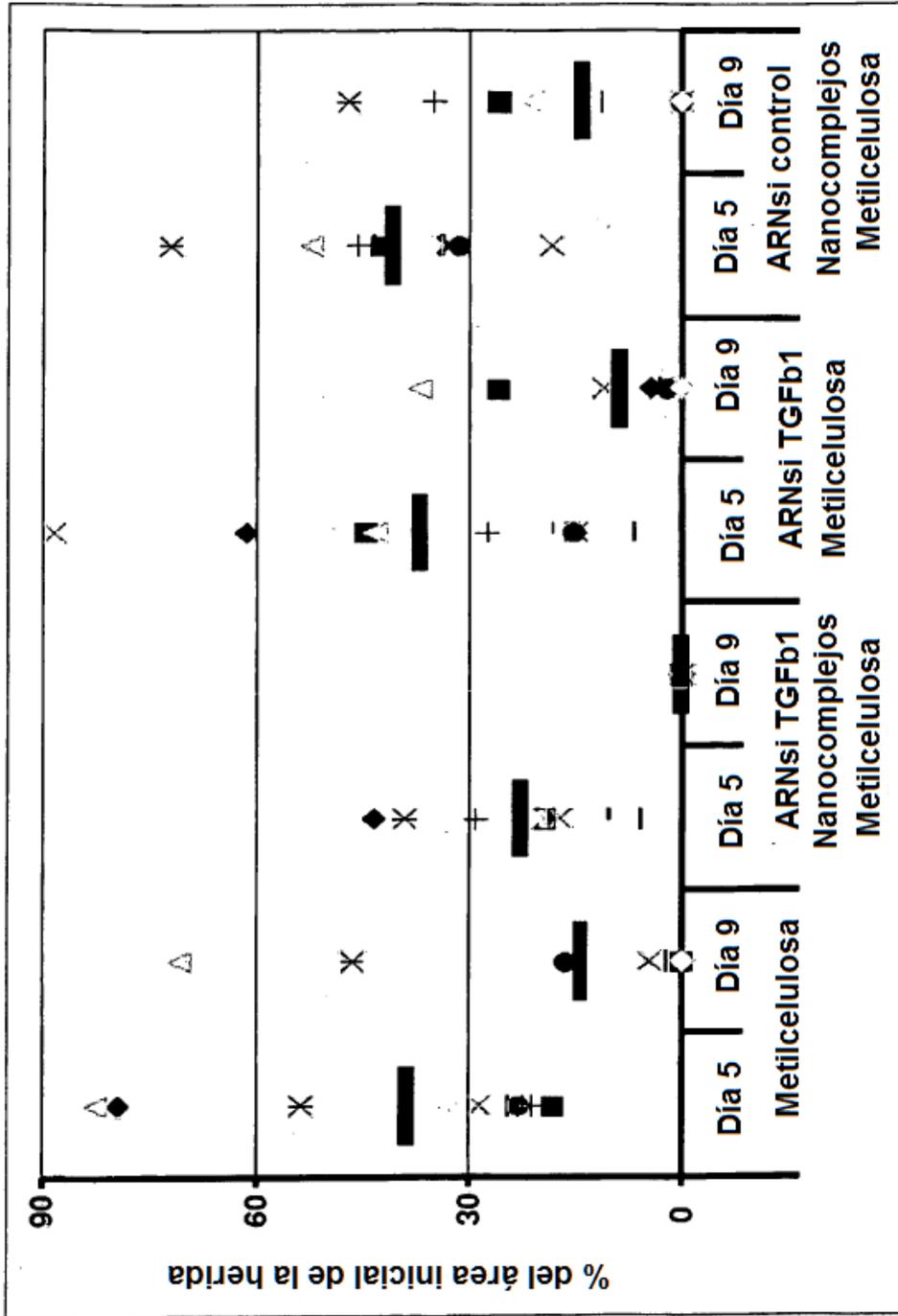


Figura 20.

Comparación del cierre de herida por escisión

Comparación del cierre de herida por escisión
(nanocomplejos de ARNsi/HK73 de HoxB13)

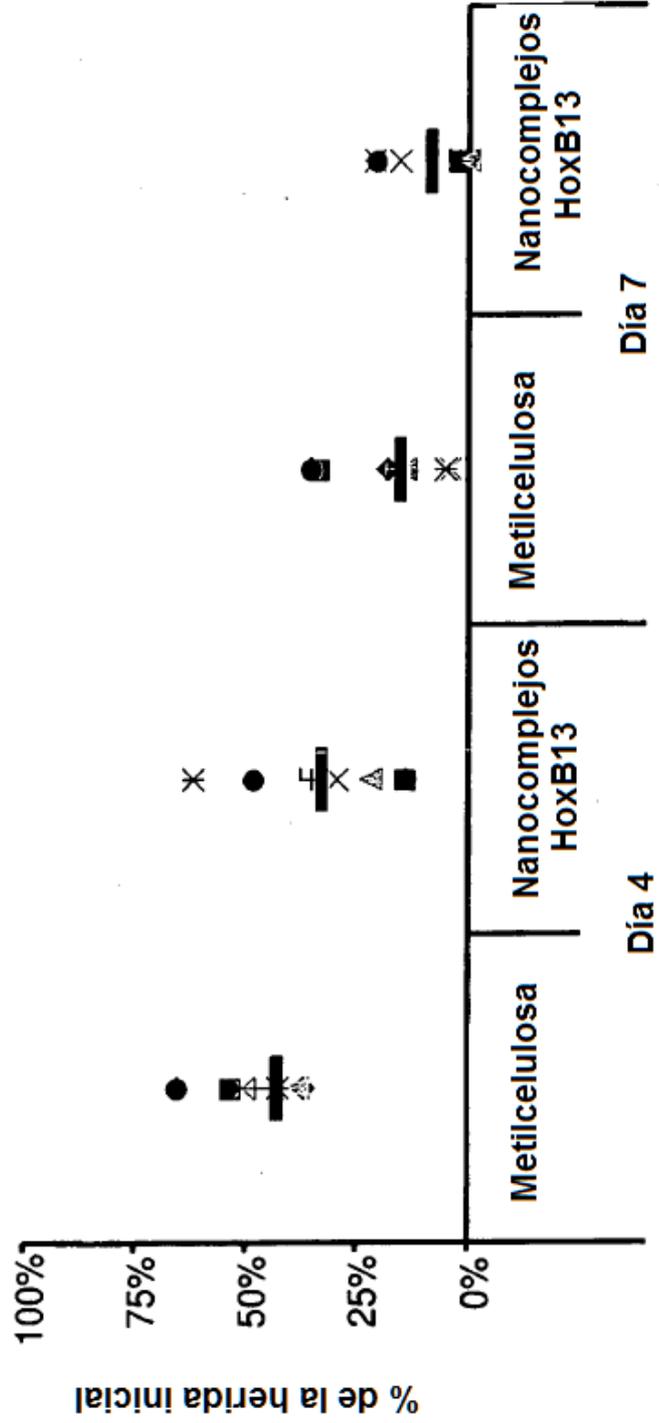
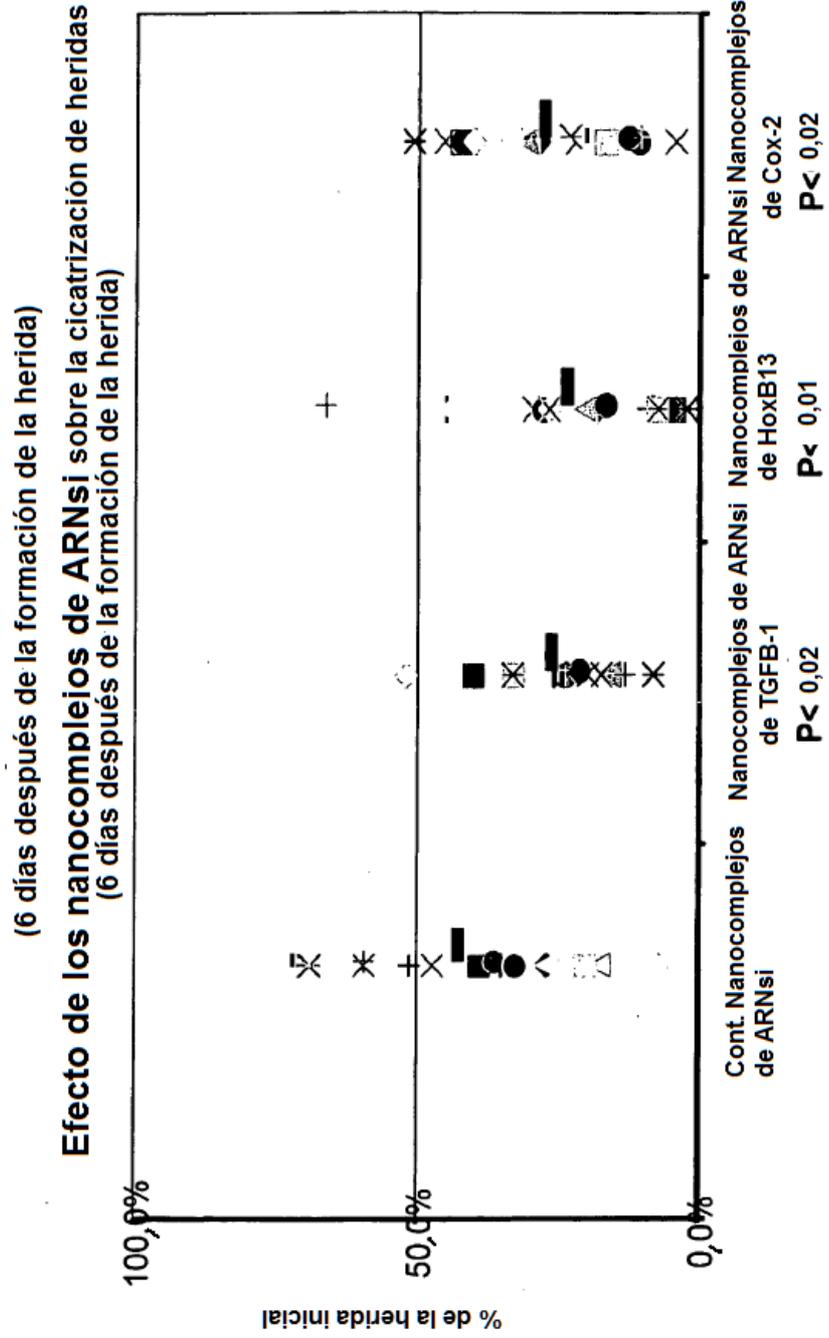


Figura 21. Efecto de los nanocomplejos de ARNsi/polímero H73 sobre la cicatrización de heridas



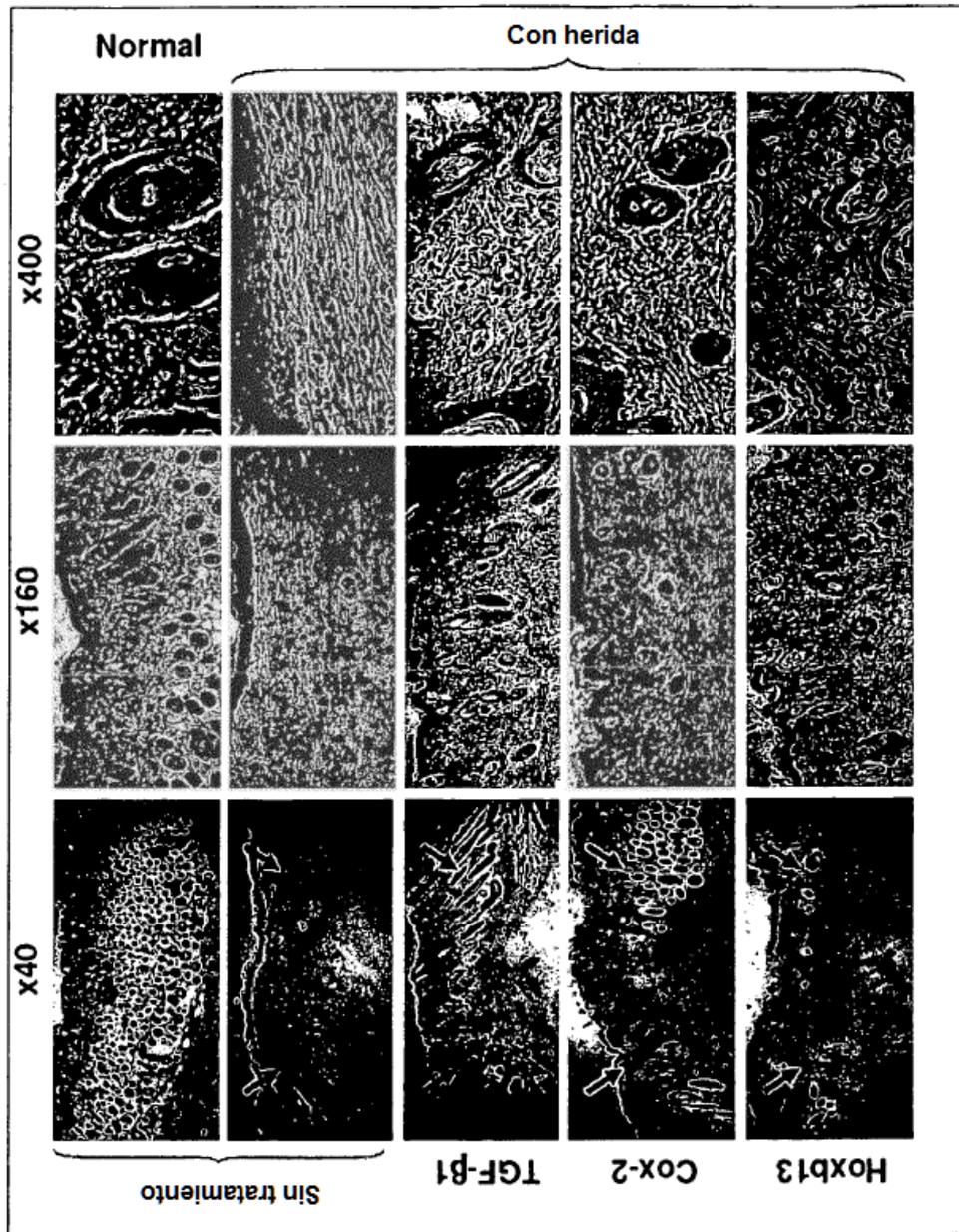


Figura 22.

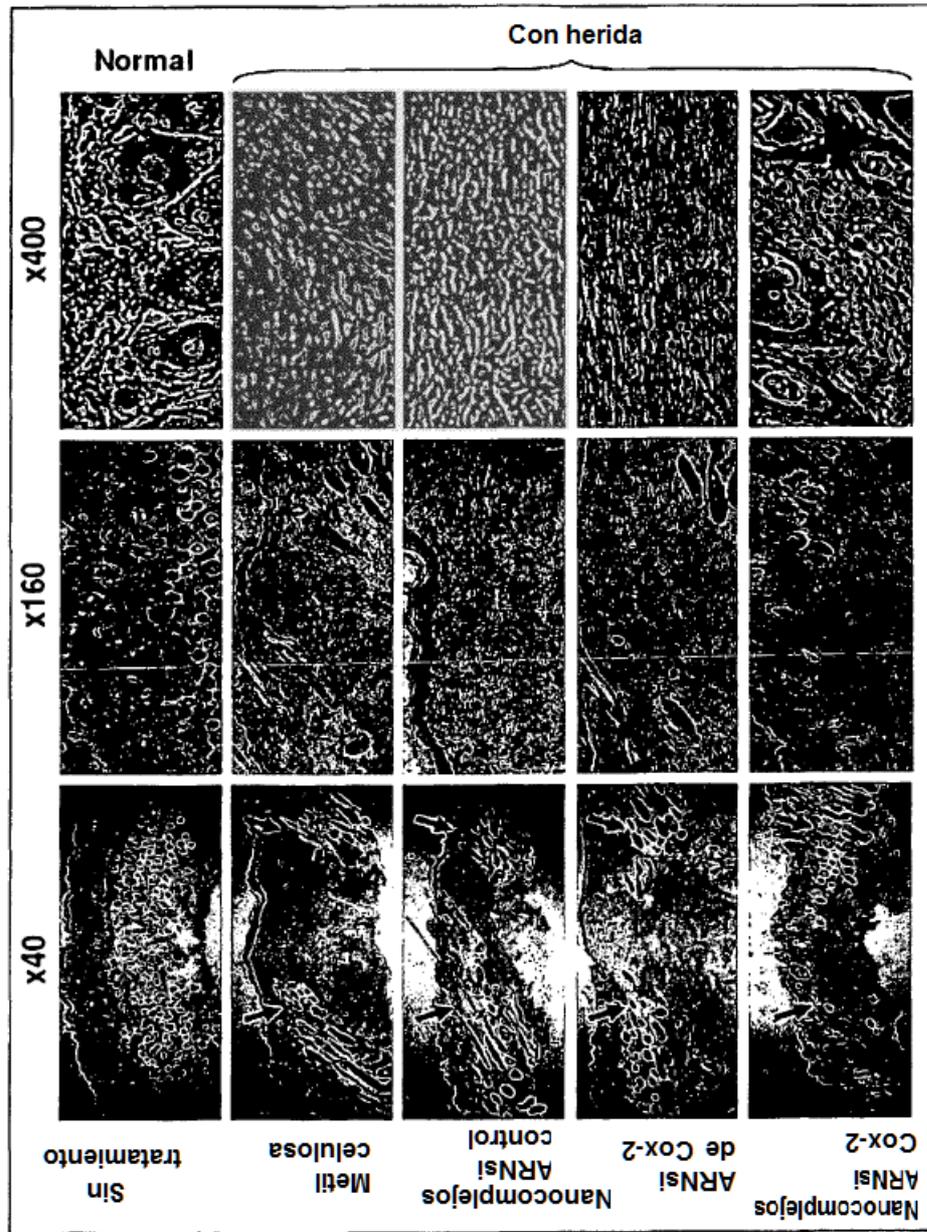


Figura 23.

Figura 24.

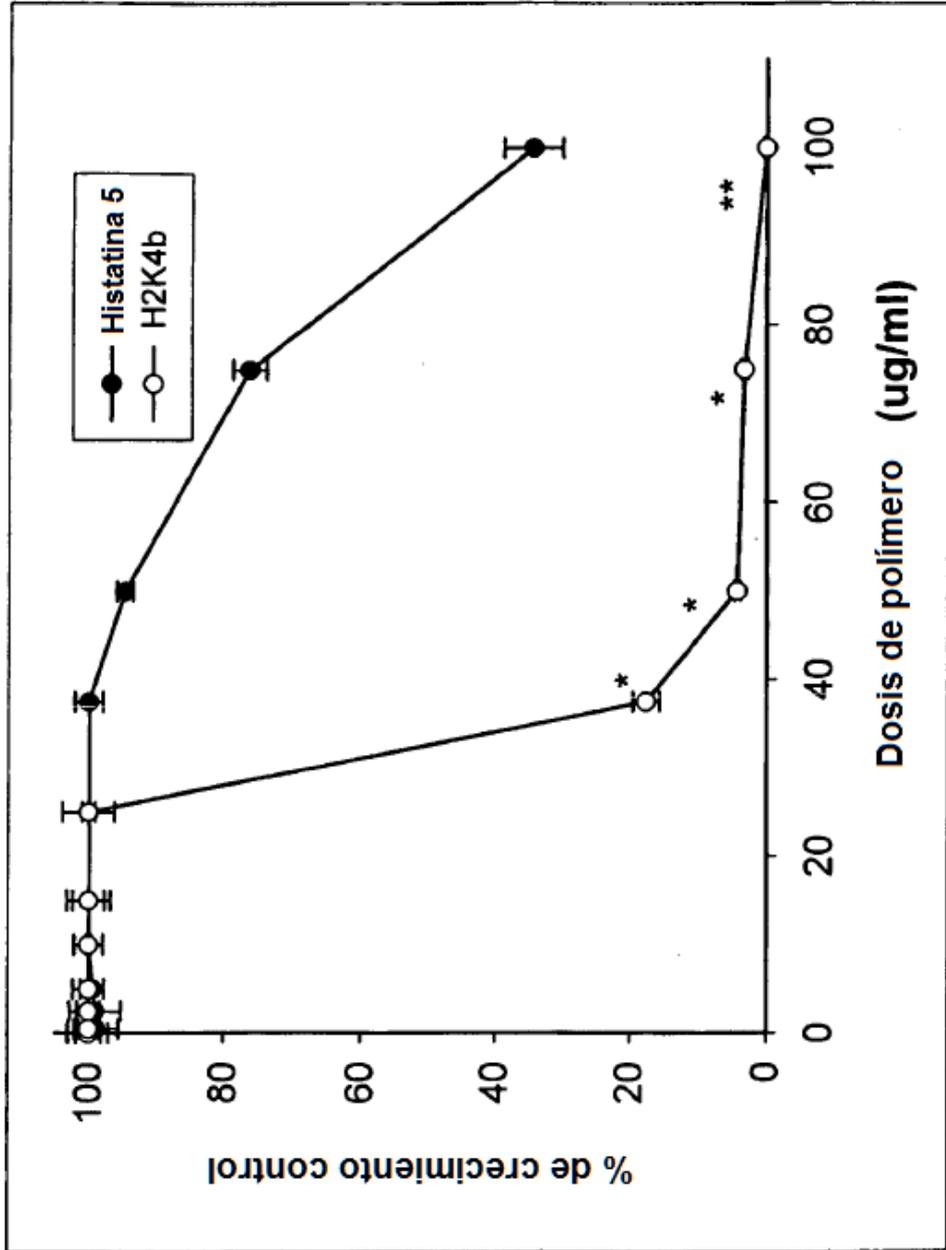


Figura 25.

