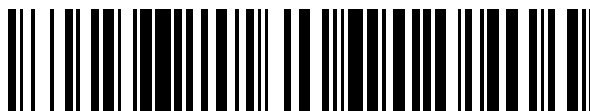


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 591**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2010 PCT/US2010/050173**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2011 WO11038210**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2010 E 10819521 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2480669**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con la filagrina (flg) mediante la modulación de la expresión y actividad del gen FLG**

30 Prioridad:

25.09.2009 US 246080 P

24.02.2010 US 307654 P

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

20.04.2018

73 Titular/es:

**CURNA, INC. (100.0%)
4400 Biscayne Boulevard
Miami, FL 33137, US**

72 Inventor/es:

**COLLARD, JOSEPH;
KHORKOVA SHERMAN, OLGA y
COITO, CARLOS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 664 591 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

Tratamiento de enfermedades relacionadas con la filagrina (flg) mediante la modulación de la expresión y actividad del gen FLG

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos N.º 61/246.080 presentada el 25 de septiembre de 2009 y la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos N.º 10 61/307.654 presentada el 24 de febrero de 2010.

Las realizaciones de la invención comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o la función del gen FLG y moléculas asociadas.

15 ANTECEDENTES

La filagrina es una proteína catiónica altamente cargada que ayuda a la agregación y posterior formación de puentes disulfuro entre los filamentos de queratina. Deriva de la profilagrina, un gran precursor fosforilado (4400 kD) que se expresa como gránulos de queratohialina en la capa granular de la epidermis. Durante la transición desde la capa granular al estrato córneo, la profilagrina se convierte en filagrina por proteólisis y desfosforilación específicas del sitio. Además del procesamiento de la profilagrina para convertirse en filagrina, la transición de una célula granular a un corneocito se caracteriza por la degradación del núcleo y otros orgánulos, el ensamblaje de una envoltura cornificada y la reorganización de la red de filamentos intermedios de queratina en una lámina bidimensional. La filagrina desempeña un papel fundamental en la generación y el mantenimiento de un estrato córneo flexible e hidratado y su hidrólisis está cuidadosamente regulada para generar aminoácidos libres que forman una parte principal de los factores naturales de hidratación (NMF). La transición a partir de un precursor granular, la profilagrina, a una proteína distribuida de forma difusa ocurre rápidamente en la transición granular a estrato córneo en respuesta a una señal de iniciación que aún no se conoce. Que la profilagrina se exprese como un precursor, en lugar de como una proteína madura, sugiere que la expresión de la filagrina debe estar regulada para prevenir efectos citotóxicos. Muchas afecciones inflamatorias de la piel se caracterizan por la atenuación de la capa granular con una paraqueratosis concomitante, es decir, núcleos retenidos en los queratinocitos del estrato córneo. Aunque las señales que están interrumpiendo la diferenciación terminal en estas afecciones inflamatorias pueden ser dispares, un tema final común es la pérdida de la capa granular con la consecuente diferenciación terminal incompleta. En afecciones donde la profilagrina disminuye, como la dermatitis atópica, o está esencialmente ausente, como en la ictiosis vulgar, la calidad del estrato córneo se ve comprometida debido a la incapacidad de un estrato córneo sin NMF de permanecer hidratado bajo la acción desecante del entorno.

Los factores naturales de hidratación (NMF) desempeñan una función importante en el mantenimiento del contenido de humedad del estrato córneo. Se ha informado que los aminoácidos que forman los constituyentes principales de los NMF se producen mediante la filagrina escindida proteolíticamente originada a partir de los gránulos de queratohialina. La filagrina es una proteína compuesta de 317 aminoácidos. Desde que se aclaró que los aminoácidos que forman los constituyentes principales de los NMF derivan de la filagrina, se han llevado a cabo investigaciones sobre la relación entre los estados mórbidos que presentan una piel seca con la filagrina. En los últimos años, se ha aclarado que el contenido de aminoácidos del estrato córneo se reduce en una piel seca como se observa en la xerosis senil, las enfermedades atópicas y otras similares, y que la expresión de la filagrina en dicha piel seca disminuye. Además, es bien conocido que los problemas de la piel como la piel áspera están causados por un entorno seco.

El gen de la filagrina desempeña un papel en la construcción de las capas de barrera de la piel, y las mutaciones en este gen derivan en afecciones como el eccema. Filagrina es una proteína abundante en las capas más externas de la piel y está producida por el gen de la filagrina. La función de la filagrina es ayudar a producir las capas de barrera de la piel impermeables presentes en la superficie más externa de la piel y mantenerlas hidratadas. La función de barrera inherente de la piel es similar a una película plástica o adhesiva, actúa para evitar la pérdida de agua de la piel y, lo que es más importante, para proteger el cuerpo de materiales extraños del entorno, como los alérgenos. La falta de una barrera cutánea intacta provoca que los alérgenos entren en el cuerpo donde producen una variedad de respuestas alérgicas que incluyen eczema, asma, fiebre del heno y otras alergias.

La hibridación ADN-ARN y ARN-ARN son importantes para muchos aspectos de la función del ácido nucleico incluyendo replicación, transcripción y traducción del ADN. La hibridación también es fundamental para una variedad de tecnologías que tanto detectan un ácido nucleico particular como alteran su expresión. Los nucleótidos

antisentido, por ejemplo, alteran la expresión génica hibridándose con ARN diana, interfiriendo así con el splicing, la transcripción, la traducción y la replicación de ARN. El ADN antisentido tiene la característica añadida de que los híbridos de ADN-ARN sirven de sustrato para la digestión por ribonucleasa H, una actividad que está presente en la mayoría de los tipos de células. Las moléculas antisentido pueden suministrarse al interior de células, como es el caso para oligodesoxinucleótidos (ODN), o pueden expresarse a partir de genes endógenos como moléculas de ARN. La FDA recientemente aprobó un fármaco antisentido, VITRAVENE™ (para el tratamiento de retinitis por citomegalovirus), que refleja que el antisentido tiene utilidad terapéutica.

RESUMEN

10 Este resumen se proporciona para presentar un resumen de la invención para indicar brevemente la naturaleza y sustancia de la invención. Se presenta en el entendimiento de que no se utilizará para interpretar ni limitar el alcance o significado de las reivindicaciones. La invención se define mediante las reivindicaciones.

15 En una realización, la presente divulgación proporciona procedimientos de inhibición de la acción de un transcrito antisentido natural usando uno o más oligonucleótidos antisentido dirigidos a cualquier región del transcrito antisentido natural produciendo la regulación positiva del gen sentido correspondiente. También está contemplado en el presente documento que la inhibición del transcrito antisentido natural pueda conseguirse mediante ARNs, ribozimas y moléculas pequeñas, que se considera que están dentro del alcance de la presente invención.

20 Una realización proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido del gen FLG en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con un complemento inverso de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 4629 de la SEQ ID NO: 2 modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido del gen FLG en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

25 En una realización, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos del gen FLG, por ejemplo, nucleótidos expuestos en la SEQ ID NO: 2, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 3 a 13.

30 Otra realización proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido del gen FLG en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con un complemento inverso del antisentido del polinucleótido del gen FLG, modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido del gen FLG en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

35 Otra realización proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido de la familia de FLG en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con un oligonucleótido antisentido para un polinucleótido antisentido de la familia de FLG; modulando de este modo la función y/o la expresión del polinucleótido de la familia de FLG en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

40 En una realización, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen a polinucleótidos del gen FLG sentido y/o antisentido.

45 En una realización, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen a polinucleótidos del gen FLG sentido y/o antisentido, una o más moléculas moduladoras del gen FLG, un vehículo farmacéuticamente aceptable y combinaciones de los mismos

50 En una realización, los oligonucleótidos comprenden uno o más nucleótidos modificados o sustituidos.

55 En una realización, los oligonucleótidos comprenden uno o más enlaces modificados.

60 En otra realización más, los nucleótidos modificados comprenden bases modificadas que comprenden fosforotioato, metilfosfonato, ácidos nucleicos peptídicos, 2'-O-metilo, fluoro- o carbono, metileno u otras moléculas de ácido nucleico bloqueado (LNA). Preferentemente, los nucleótidos modificados son moléculas de ácido nucleico

bloqueado, que incluyen α -L-LNA.

En una realización, los oligonucleótidos se administran a un paciente por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intravenosa o por vía intraperitoneal.

5

En una realización, los oligonucleótidos se administran en una composición farmacéutica. Un régimen de tratamiento comprende administrar los compuestos antisentido al menos una vez al paciente; sin embargo, este tratamiento puede modificarse para comprender múltiples dosis durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede combinarse con uno o varios de otros tipos de terapias.

10

En una realización, los oligonucleótidos se administran en una composición farmacéutica. Un régimen de tratamiento comprende administrar al menos una vez a un paciente una composición que comprende uno o más de un compuesto antisentido y una o más moléculas moduladoras del gen FLG; este tratamiento puede modificarse para comprender múltiples dosis durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede combinarse con uno o varios de

15 otros tipos de terapias.

En una realización, los oligonucleótidos están encapsulados en un liposoma o unidos a una molécula portadora (por ejemplo, colesterol, péptido TAT).

20 Otros aspectos se describen más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de FLG1 después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosfotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm del FLG1 en células HepG2 se incrementan significativamente con dos de los oligonucleótidos diseñados para AK056431 antisentido del FLG1. Las barras indicadas como CUR-1157, CUR-1158, CUR-1159, CUR-1160 y CUR-1161 se corresponden con muestras tratadas con SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente.

La Figura 2 muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de FLG1 después del tratamiento de células 518A2 con oligonucleótidos fosfodiéster con una T invertida en 3' y oligos fosfodiéster con un gapmero 2'-O-metilo introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm del FLG1 en células 518A2 se incrementan significativamente con dos de los oligonucleótidos diseñados para AK056431 antisentido del FLG1. Las barras indicadas como CUR-1128, CUR-1129, CUR-1130 y CUR-1131 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11 respectivamente.

La Figura 3 muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de FLG1 después del tratamiento de células 518A2 con oligonucleótidos fosfodiéster introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm del FLG1 en células 518A2 se incrementan significativamente con dos de los oligonucleótidos diseñados para AK056431 antisentido del FLG1. Las barras indicadas como CUR-1396 y CUR-1397 se corresponden con muestras tratadas con las SEQ ID NO: 12 y 13 respectivamente.

La Figura 4 muestra el cambio en veces de la expresión de ARNm de Filagrina en células 518A2 y queratinocitos primarios tratados con los compuestos: Pioglitazona, Lomerizina, Bupropión, Fenpropamato, Benidipino, Piroxicam, Topiramato, Isradipino, Nicorandil, Piribedil, Oxaprozina, Glicopirrolato, Granisetron, Memantina, Nimodipino y Amlodipino; en comparación con las células no tratadas.

Descripción del listado de secuencias: SEQ ID NO: 1: Filagrina (FLG) de Homo sapiens, ARNm. (N.º de acceso del NCBI: NM_002016); SEQ ID NO: 2: Secuencia antisentido natural del gen FLG (AK056431); SEQ ID NO: 3 a 13: Oligonucleótidos antisentido. * indica enlace fosfotioato y 'm' indica modificación 2'-O-metilo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A continuación se describen diversos aspectos de la invención con referencia a ejemplos de aplicaciones a modo ilustrativo. Debe entenderse que los numerosos detalles, relaciones y procedimientos específicos se exponen para proporcionar un entendimiento completo de la invención. Un experto en la materia relevante, sin embargo, reconocerá fácilmente que la invención puede ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con otros procedimientos. La presente invención no está limitada por el orden de actos o acontecimientos, ya que algunos actos pueden producirse en diferentes órdenes y/o simultáneamente con otros actos o acontecimientos. Además, no todos los actos o acontecimientos ilustrados son requeridos para implementar una metodología de

acuerdo con la presente invención .

5 Todos los genes, nombres de genes, y productos génicos divulgados en el presente documento pretenden corresponderse a homólogos de cualquier especie para la cual las composiciones y procedimientos divulgados en el presente documento son aplicables. De este modo, los términos incluyen, aunque sin limitarse a, genes y productos
 10 génicos de seres humanos y ratones. Se entiende que, cuando se divulga un gen o producto génico de una especie particular, esta divulgación pretende ser ejemplar solamente, y no se interpreta como una limitación, a menos que el contexto en el que aparece lo indique claramente. De este modo, por ejemplo, para los genes divulgados en el presente documento, que en algunas realizaciones se refieren a secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos
 15 de mamífero, pretenden englobar genes homólogos y/u ortólogos y productos génicos de otros animales que incluyen, pero sin limitarse a, otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. En una realización, los genes o secuencias de ácidos nucleicos son humanos.

Definiciones

15 La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones solamente y no pretende ser limitante de la divulgación. Tal como se usan en la presente, se pretende que las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyan también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, siempre que las expresiones "que incluye", "incluyen", "que tiene", "tiene", "con", o variantes de los mismos se usan
 20 en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, dichas expresiones pretenden ser inclusivas de una manera similar a la expresión "que comprende."

El término «aproximadamente» significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se ha determinado por un experto habitual en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es
 25 decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar 1 o más de 1 de desviación estándar, conforme a la práctica de la técnica. Alternativamente, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta el 20 %, preferentemente hasta el 10 %, más preferentemente hasta el 5 %, y más preferentemente todavía hasta el 1 % de un valor dado. Alternativamente, particularmente con respecto a sistemas biológicos o procesos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5
 30 veces, y más preferentemente dentro de 2 veces, de un valor. En los casos en los que se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se exprese lo contrario, el término «aproximadamente» significa que se debe asumir que el valor se encuentra comprendido en un intervalo de error aceptable para el valor particular.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "ARNm" significa (el) los transcrito(s) de ARNm actualmente conocidos de un gen elegido como diana, y cualquier transcrito adicional que pueda ser dilucidado.

Por "oligonucleótidos antisentido" o "compuesto antisentido" se indica una molécula de ARN o de ADN que se une a otro ARN o ADN (ARN, ADN diana). Por ejemplo, si éste es un oligonucleótido de ARN, se une a otra diana de ARN
 40 por medio de interacciones ARN-ARN y altera la actividad del ADN diana. Un oligonucleótido antisentido puede regular positivamente o regular negativamente la expresión y/o función de un polinucleótido particular. La definición pretende comprender cualquier molécula de ARN o ADN extraña que es útil desde un punto de vista terapéutico, de diagnóstico u otro. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, moléculas de ARN o ADN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), micro ARN, moléculas de ARN señuelo, ARNsi, ARN enzimático, ARN de edición terapéutica y
 45 ARN agonista y antagonista, compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), agentes de splicing alternativos, cebadores, sondas y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Por lo tanto, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

50 En el contexto de esta invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. El término "oligonucleótido" también incluye oligómeros lineales o circulares de monómeros o enlaces naturales y/o modificados, que incluyen desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas sustituidas y alfa-anómeras de los mismos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), fosforotioato, metilfosfonato y similares. Los oligonucleótidos
 55 son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido diana por medio de un patrón regular de interacciones monómero a monómero, tales como tipo de apareamiento de bases de Watson-Crick, tipos de apareamiento de bases de Hoögsteeen o Hoögsteeen inversa, o similares.

El oligonucleótido puede ser "quimérico", es decir, estar compuesto de diferentes regiones. En el contexto de esta
 60 invención los compuestos "quiméricos" son oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicas, por

ejemplo, una o más regiones de ADN, una o más regiones de ARN, una o más regiones de PNA, etc. Cada región química está compuesta por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos normalmente comprenden al menos una región donde el oligonucleótido se modifica con el fin de presentar una o más propiedades deseadas. Las propiedades deseadas del oligonucleótido incluyen, pero sin limitarse a, por ejemplo, resistencia a la degradación por nucleasas incrementada, captación celular incrementada y/o afinidad de unión por el ácido nucleico diana incrementada. Las diferentes regiones del oligonucleótido pueden, por lo tanto, tener diferentes propiedades. Los oligonucleótidos quiméricos de la presente invención pueden formarse como estructuras mixtas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o análogos de oligonucleótido, tal como se ha descrito anteriormente.

El oligonucleótido puede estar compuesto de regiones que pueden enlazarse en "registro", es decir, cuando los monómeros se enlazan consecutivamente, como en ADN nativo, o se enlazan mediante espaciadores. Se pretende que los espaciadores constituyan un "puente" covalente entre las regiones y tengan, en casos preferidos, una longitud que no supere aproximadamente los 100 átomos de carbono. Los espaciadores pueden portar diferentes funcionalidades, por ejemplo, tener carga positiva o negativa, portar propiedades de unión a ácido nucleico especiales (intercaladores, ligantes de surcos, toxinas, fluoróforos, etc.), ser lipófilos, inducir estructuras secundarias especiales como, por ejemplo, péptidos que contienen alanina que inducen hélices alfa.

Tal como se usa en el presente documento, "FLG" y "Filagrina" son incluyentes de todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, cadenas de polinucleótido sentido y antisentido, etc.

Tal y como se usan en el presente documento, las palabras 'Filagrina', FLG, FLGI y ATOD2, se consideran lo mismo en la bibliografía y se usan indistintamente en la presente solicitud.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido específico para" u "oligonucleótido que se dirige a" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una parte del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una parte de un transcrito de ARNm del gen elegido como diana. La estabilidad de los complejos y los dúplex puede determinarse mediante cálculos teóricos y/o ensayos in vitro. Ensayos a modo de ejemplo para determinar la estabilidad de complejos y dúplex de hibridación se describen en los ejemplos más adelante.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico diana" engloba ADN, ARN (que comprende pre-ARNm y ARNm) transcrito a partir de dicho ADN, y también ADN derivado de dicho ARN, secuencias codificantes, no codificantes, polinucleótidos sentido o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos, que se hibridan específicamente con él, se denomina generalmente "antisentido". Las funciones de ADN con las que interferirán incluyen, por ejemplo, la replicación y transcripción. Las funciones de ARN con las que interferirán comprenden todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, corte y empalme del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. El efecto global de dicha interferencia con las funciones del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de un producto codificado u oligonucleótidos.

El ARN de interferencia "ARNi" está mediada por moléculas de ARN bicatenario (ARNdc) que tienen homología específica de secuencia con sus secuencias de ácido nucleico «diana». En ciertas realizaciones de la presente invención, los mediadores son dúplex de ARN "de interferencia pequeño" (ARNsi) de 5-25 nucleótidos. Los ARNsi se derivan a partir del procesamiento del ARNdc mediante una enzima ARNasa conocida como Dicer. Los productos dúplex son reclutados en un ARNsi multiproteína denominado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Sin desear quedar ligado por ninguna teoría particular, se cree entonces que un RISC es guiado a un ácido nucleico diana (adecuadamente ARNm), en el que el dúplex de ARNsi interactúa de una forma específica de secuencia para mediar en la escisión en un modo catalítico. Los ARN de interferencia pequeños que pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación pueden sintetizarse y usarse de acuerdo con procedimientos que son bien conocidos en la técnica y que serán familiares para el experto en la materia. Los ARN de interferencia pequeños para su uso en los procedimientos de la presente invención comprenden adecuadamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En ejemplos de realizaciones no limitantes, los ARNsi pueden comprender aproximadamente 5 a aproximadamente 40 nt, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nt, o aproximadamente 20-25 nucleótidos.

La selección de los oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinean

automáticamente secuencias de ácido nucleico e indican regiones de identidad u homología. Dichos programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo de especies permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no han sido secuenciados, se realizan Southern blots para permitir una determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Realizando Southern blots a grados de astringencia variables, tal como es muy conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que muestran un alto grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico diana en un sujeto a controlar y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico correspondientes en otras especies. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente invención.

Por «ARN enzimático» se indica una molécula de ARN con actividad enzimática (Cech, (1988) J. American. Med. Assoc. 260, 3030-3035). Los ácidos nucleicos enzimáticos (ribozimas) actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce a través de la parte de unión diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. De este modo, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y luego se une a ARN diana mediante apareamiento de bases, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana.

Por «ARN señuelo» se indica una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN señuelo compite, por lo tanto, con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de ARN de respuesta de activación en trans (TAR) de HIV puede actuar como un "señuelo" y se une de forma eficiente a la proteína tat de VIH, impidiendo de este modo que se una a secuencias TAR codificadas por el ARN de VIH. Esto se indica que es un ejemplo específico. Los expertos en la materia reconocerán que esto es solo un ejemplo, y fácilmente pueden generarse otras realizaciones usando técnicas generalmente conocidas en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "monómeros" normalmente indica monómeros enlazados por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que varían en tamaño entre unas pocas unidades monoméricas, por ejemplo, entre aproximadamente 3-4, y aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos, fosforoselenoato, fosforamidoato y similares, tal como se describe más completamente más adelante.

El término "nucleótido" cubre nucleótidos de origen natural, así como nucleótidos no de origen natural. Debe ser evidente para el experto en la materia que diversos nucleótidos que se consideraron anteriormente "no de origen natural" se han descubierto posteriormente en la naturaleza. De este modo, "nucleótidos" incluye no solamente las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de las mismas. Ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos son moléculas que contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-alquilil(C3-C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 3-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "no de origen natural" descritos en Benner y col., patente de EE.UU. N.º 5.432.272. El término "nucleótido" pretende cubrir todos y cada uno de estos ejemplos, además de análogos y tautómeros de los mismos. Nucleótidos especialmente interesantes son aquellos que contienen adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran como los nucleótidos de origen natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los azúcares naturales 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Kornberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992), además de sus análogos.

"Análogos", en referencia a nucleótidos, incluye nucleótidos sintéticos que tienen restos de bases modificados y/o restos de azúcar modificados (véase, por ejemplo, descrito generalmente por Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, Nueva York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429-4443; Toulmé, J.J., (2001) Nature Biotechnology 19:17-18; Manoharan M., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1489:117-139; Freier S. M., (1997) Nucleic Acid Research, 25:4429-4443; Uhlman, E., (2000) Drug Discovery & Development, 3:203-213; Herdewin P., (2000) Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10:297-310); 2'-O, 3'-C-linked [3.2.0] bicycloarabinonucleosides. Dichos análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad y especificidad del dúplex o el tríplex, o similares.

Tal como se usa en el presente documento, "hibridación" significa el apareamiento de cadenas sustancialmente complementarias de compuestos oligoméricos. Un mecanismo de apareamiento implica la formación de puentes de

hidrógeno, que pueden ser puentes de hidrógeno de Watson-Crick, Hoögsteen o de Hoögsteen inverso, entre bases de nucleósidos o de nucleótidos (nucleótidos) complementarias de las cadenas de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleótidos complementarios que se aparean mediante la formación de puentes de hidrógeno. La hibridación puede producirse en circunstancias variables.

5

Un compuesto antisentido es "específicamente hibridable" cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico diana para causar una modulación de la función y/o la actividad, y existe un grado de complementariedad suficiente para evitar unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que se realizan ensayos en el caso de ensayos in vitro.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "condiciones de hibridación astringentes" o "condiciones astringentes" se refiere a condiciones en las que un compuesto de la invención hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones astringentes son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias y en el contexto de esta divulgación, "condiciones astringentes" en las que compuestos oligoméricos hibridan con una secuencia diana se determinan mediante la naturaleza y la composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que están siendo investigados. En general, las condiciones de hibridación astringentes comprenden bajas concentraciones (<0,15 M) de sales con cationes inorgánicos tales como Na⁺⁺ o K⁺⁺ (es decir, baja fuerza iónica), temperatura superior a 20 °C - 25 °C por debajo de la T_m del complejo de compuesto oligomérico: secuencia diana, y la presencia de desnaturalizantes tales como formamida, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, o el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS). Por ejemplo, la tasa de hibridación disminuye un 1,1% por cada 1% de formamida. Un ejemplo de una condición de hibridación de alta astringencia es 0,1X tampón cloruro sódico-citrato sódico (SSC)/0,1 % (peso/volumen) de SDS a 60 °C durante 30 minutos.

"Complementario", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de apareamiento preciso entre dos nucleótidos en una o dos cadenas oligoméricas. Por ejemplo, si una nucleobase en cierta posición de un compuesto antisentido es capaz de formar puentes de hidrógeno con una nucleobase en cierta posición de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana un ADN, ARN, o molécula de oligonucleótido, entonces la posición de la formación de puentes de hidrógeno entre el oligonucleótido y se considera que el ácido nucleico diana es una posición complementaria. El compuesto oligomérico y el ADN, ARN, o molécula de oligonucleótido, adicional son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar puentes de hidrógeno entre sí. De este modo, "específicamente hibridable" y "complementariedad" son expresiones que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o complementariedad sobre un número suficiente de nucleótidos de modo que se produzca unión estable y específica entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

Se entiende en la técnica que no es necesario que la secuencia de un compuesto oligomérico sea un 100 % complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos, de modo que segmentos intermedios o adyacentes no estén implicados en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura en bucle, desapareamiento o estructura de horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente invención comprenden al menos aproximadamente el 70 %, o al menos aproximadamente el 75 %, o al menos aproximadamente el 80 %, o al menos aproximadamente el 85 %, o al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %, o al menos aproximadamente el 99 %, de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácidos nucleicos diana a la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de los 20 nucleótidos del compuesto antisentido son complementarios a una región diana y, por lo tanto, hibridarían específicamente, representaría el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleótidos complementarios y no necesitan ser contiguos entre sí o a nucleótidos complementarios. Por lo tanto, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleótidos de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría el 77,8 % de complementariedad global con el ácido nucleico diana y de este modo estaría dentro del alcance de la presente divulgación. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica. La homología porcentual, la identidad de secuencia o la complementariedad se pueden determinar mediante, por ejemplo, el programa Gap (paquete para el análisis de secuencias Wisconsin Package. Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando la configuración predeterminada, que usa el algoritmo de Smith-Waterman (Adv. Appl. Math., (1981) 2, 482-489).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "punto de fusión térmico (T_m)" se refiere a la temperatura, bajo fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidas, a la que el 50% de los oligonucleótidos complementarios a la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Normalmente, condiciones
 5 astringentes serán aquellas en las que la concentración de sales es la concentración de ion Na (u otras sales) de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones astringentes con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida.

10 Tal como se usa en el presente documento, "modulación" significa un incremento (estimulación) o una disminución (inhibición) de la expresión de un gen.

El término "variante", cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede englobar una secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen de tipo silvestre. Esta definición también puede comprender,
 15 por ejemplo, variantes "alélicas", de "splicing", de "especie" o "polimórficas". Una variante de splicing puede tener identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá un mayor o menor número de polinucleótidos debido al splicing alterno de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la
 20 invención las variantes de productos génicos de tipo silvestre (wild type). Las variantes pueden resultar de al menos una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos y pueden producir ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede o puede no alterarse. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede
 25 producirse solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

Los polipéptidos resultantes generalmente tendrán identidad significativa de aminoácidos los unos con respecto a los otros. Una variante polimórfica es una variación en la secuencia de polinucleótidos de un gen particular entre
 30 individuos de una especie dada. Las variantes polimórficas también pueden englobar "polimorfismos de un solo nucleótido" (SNP), o mutaciones de una sola base en las que la secuencia de polinucleótidos varía en una base. La presencia de SNP puede ser indicativa de, por ejemplo, una cierta población con una propensión por una patología, es decir susceptibilidad frente a resistencia.

Los polinucleótidos derivados incluyen ácidos nucleicos sometidos a modificación química, por ejemplo, sustitución
 35 de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Los derivados, por ejemplo, oligonucleótidos derivados, pueden comprender partes no de origen natural, tales como restos de azúcar alterados o enlaces inter-azúcar. A modo de ejemplo, entre éstos están fosforotioato y otras especies que contienen azufre que se conocen en la técnica. Los ácidos nucleicos derivados también pueden contener etiquetas, que incluyen radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromógenos, sustratos, cofactores, inhibidores, partículas
 40 magnéticas y similares.

Un polipéptido o péptido "derivado" es uno que se modifica, por ejemplo, por glucosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, acoplamiento químico o tratamiento suave con formalina. Un derivado
 45 también puede modificarse para contener una etiqueta detectable, tanto directa como indirectamente, que incluye, aunque no se limita a, un radioisótopo, etiqueta fluorescente y enzimática.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Cuando el compuesto de la presente invención es ácido, su sal correspondiente puede prepararse convenientemente a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, que incluyen bases
 50 inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de dichas bases inorgánicas incluyen aluminio, amonio, calcio, cobre (ico y oso), férrico, ferroso, litio, magnesio, manganeso (ico y oso), potasio, sodio, cinc y sales similares. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, así como aminas cíclicas y aminas sustituidas tales como aminas sustituidas de origen natural y sintetizadas. Otras bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables a partir de las cuales se
 55 pueden formar sales incluyen resinas de intercambio iónico tales como, por ejemplo, arginina, betaína, cafeína, colina, N, N'-dibenciletilenediamina, dietilamida, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares.

60

Cuando el compuesto de la presente invención es básico, su sal correspondiente puede prepararse convenientemente a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que incluyen ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos. Dichos ácidos incluyen, por ejemplo, ácido acético, benzenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isotiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mútrico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, ácido succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico y similares. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto precursor formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales convencionales no tóxicas incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como ácido acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidrox maleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar mediante procedimientos químicos convencionales. Generalmente, las sales se preparan haciendo reaccionar la base o el ácido libre con cantidades estequiométricas o con un exceso del ácido o base inorgánico u orgánico formador de sal deseado, en un disolvente o combinación de disolventes adecuados.

Los compuestos de la presente invención pueden tener centros asimétricos y presentarse como racematos, mezclas racémicas y como diastereómeros individuales. Todos estos isómeros, incluidos los isómeros ópticos, se incluyen en la presente invención.

Los ejemplos de productos para el cuidado de la piel incluyen, aunque no se limitan a, cremas hidratantes, preparaciones de simulación de bronceado, lociones bronceadoras, aceites para masajes, aceites de baño, perfumes, bálsamos, cremas, mascarillas, espumas y geles para afeitarse. Los ejemplos de cosméticos incluyen, aunque no se limitan a, lápices labiales, bases de maquillaje, sombra de ojos, delineador de ojos, colorete y corrector. Los ejemplos de productos de limpieza incluyen, aunque no se limitan a, champús (en particular champús anticasta), jabón, productos de limpieza personal que incluyen gel de ducha y baño de burbujas y detergentes para tejidos y detergentes para lavavajillas. Los ejemplos de productos para el cuidado del cabello incluyen, aunque no se limitan a, espumas fijadoras para el cabello, aerosoles fijadores para el cabello, geles fijadores para el cabello, acondicionadores para el cabello o tintes para el cabello.

Al evaluar el genotipo de profilagrina de un individuo, es posible determinar la predisposición del individuo a una afección de la piel. Por "genotipo de profilagrina", se entiende la identidad de los alelos de profilagrina en el genoma del individuo. Los individuos analizados mediante un procedimiento de la invención son típicamente mamíferos. En una realización, el mamífero puede ser un roedor. En otra realización, el mamífero puede ser un humano. De este modo, los individuos analizados mediante un procedimiento de la invención son diploides y, por lo tanto, comprenden dos copias del gen de profilagrina dentro de su genoma. Si un individuo tiene dos copias idénticas de un gen de profilagrina, entonces son homocigotos para ese alelo. Si un individuo tiene dos copias diferentes de un gen de profilagrina, es decir, uno es polimórfico respecto al otro, entonces el individuo es heterocigótico para ese alelo. Por "predisposiciones" se entiende que la presencia de un alelo de profilagrina individual en el genoma de un individuo, o la combinación de alelos de profilagrina presentes en el genoma de un individuo, están asociados o son predictivos de una afección cutánea.

El término "afecciones de la piel" como se usa en el presente documento incluye dentro de su significado todos los parámetros físicos de la piel, incluyendo el cuero cabelludo, tales como retención de humedad, producción de sustancias o formación de barrera. En una realización, la expresión "afecciones de la piel" se refiere a la capacidad de la piel para mantener niveles saludables de producción de NMF. En consecuencia, la invención proporciona un procedimiento para determinar la predisposición de un individuo para mantener un nivel saludable de producción de NMF. Dicho de otra manera, la invención proporciona un procedimiento para determinar la susceptibilidad del individuo a las afecciones relacionadas con la producción aberrante de NMF. Típicamente, las afecciones de la piel causadas o exacerbadas por la producción aberrante de NMF son causadas por la producción de NMF menor que la de una piel sana. Las afecciones asociadas con la producción aberrante de filagrina y NMF incluyen ictiosis vulgar. En otra realización, el término "afecciones de la piel" se refiere a la piel seca. Las afecciones de la piel seca incluyen xerosis senil/posmenopáusica, xerosis inducida por tensioactivos, xerosis de invierno, quemaduras solares. En otra realización, el término "afección de la piel" se refiere a afecciones del cuero cabelludo como la caspa. En otra realización, el término "afecciones de la piel" se refiere al eritema, como el eritema inducido por detergentes.

La expresión "cuidado de los sustratos queratinosos" se refiere a todas las acciones destinadas a conservar o restaurar el funcionamiento saludable de la piel y/o del cabello y/o las uñas o cualquier proceso que proporcione los medios para conservar o mejorar su apariencia y/o textura. De este modo, el cuidado incluye la hidratación, la acción calmante, la protección contra todo tipo de agresiones, especialmente la protección solar, y la lucha contra los signos del envejecimiento y su prevención.

La frase "signos del envejecimiento cutáneo" incluye todas las modificaciones relacionadas con la apariencia externa de la piel debido al envejecimiento. Los ejemplos de estas modificaciones incluyen arrugas y líneas de expresión, piel flácida, piel floja, piel de apariencia delgada, pérdida de elasticidad y/o tono de la piel, piel opaca y piel sin brillo. También se incluyen modificaciones internas de la piel que no se traducen directamente en cambios de la apariencia externa de la piel. Un ejemplo de estas modificaciones internas es la degradación que ocurre internamente en la piel como resultado de la exposición posterior a la radiación UV. La expresión "para mejorar la apariencia de la piel" incluye todos los fenómenos que probablemente tengan como consecuencia una mejora visual del aspecto de la piel. La piel tendrá un aspecto más agradable; será, por ejemplo, mucho más bella, firme y/o lisa. Se reducirán o eliminarán todas las pequeñas imperfecciones. Por ejemplo, se atenuará la piel acartonada. Además, el principio activo de acuerdo con la invención, o la composición que lo contiene, puede estar destinado a proteger los sustratos queratinosos y, particularmente, la piel, el cabello y las uñas de cualquier tipo de agresión externa. El uso de estos agentes activos, o la composición que los contiene, permitirá proteger los sustratos queratinosos y resistir mejor el estrés causado por el entorno.

La frase "agresión externa" se refiere a las agresiones producidas por el entorno. Estos pueden ser de origen químico, físico, biológico o térmico.

La expresión "enfermedad o trastorno dermatológico" se refiere a todas las enfermedades que afectan a la piel que pueden o no tener consecuencias visibles. Por lo tanto, a modo de ejemplo: trastornos de la diferenciación y de la proliferación celular, trastornos de la queratinización, signos del envejecimiento cutáneo, reacciones inflamatorias o alérgicas, trastornos de las funciones sebáceas, proliferaciones dérmicas o epidérmicas (malignas o no malignas), trastornos cutáneos debidos a la exposición a rayos UV, y se pueden mencionar las patologías asociadas con el envejecimiento cronológico o actínico.

Tal como se usa en el presente documento, el término "animal" o "paciente" pretende comprender, por ejemplo, seres humanos, ovejas, alces, venados, ciervos, mulos, visones, mamíferos, monos, ganado vacuno, cerdos, cabras, perros, gatos, ratas, ratones, aves, pollo, reptiles, peces, insectos y arácnidos.

"Mamífero" cubre mamíferos de sangre caliente que normalmente están bajo atención médica (por ejemplo, seres humanos y animales domesticados). Los ejemplos incluyen felinos, caninos, equinos, bovinos y humanos, además de solo humanos.

"Tratar" o "tratamiento" cubre el tratamiento de una patología en un mamífero, e incluye: a) prevenir que se produzca la patología en un mamífero, en particular, cuando dicho mamífero tiene predisposición a la patología, pero todavía no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la patología, por ejemplo, detener el desarrollo; y/o (c) aliviar la patología, por ejemplo, causando la regresión de la patología hasta que se alcance un criterio de valoración deseado. Tratar también incluye la mejora de un síntoma de una enfermedad (por ejemplo, reducir el dolor o molestia), donde dicha mejora puede o puede no afectar directamente la enfermedad (por ejemplo, causa, transmisión, expresión, etc.).

Tal como se usa en el presente documento, "cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasia o tumores malignos en mamíferos, incluyendo, pero sin limitarse a: leucemias, linfomas, melanomas, carcinomas y sarcomas. El propio cáncer se manifiesta como un "tumor" o tejido que comprende células malignas del cáncer. Los ejemplos de tumores incluyen sarcomas y carcinomas como tales, pero no limitado a: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomisarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrional, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma,

- melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma. Otros cánceres que pueden tratarse con la composición divulgada de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitarse a, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rhabdomyosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón de células pequeñas, tumores primarios del cerebro, cáncer de estómago, cáncer de colon, tumores pancreáticos, insuloma carcinoide maligno, vejiga urinaria, cáncer gástrico, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de esófago, cáncer del tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer suprarrenal cortical, y cáncer de próstata.
- 5 "Enfermedad o trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno del sistema nervioso y/o sistema visual. "Enfermedad o trastorno neurológico" incluye enfermedades o trastornos que implican al sistema nervioso central (cerebro, tronco del encéfalo y cerebelo), el sistema nervioso periférico (incluyendo los nervios craneales), y el sistema nervioso autónomo (partes del cual están ubicadas en el sistema nervioso tanto central como periférico). Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, pero sin limitarse a, dolor de cabeza, estupor y coma, demencia,
- 10 convulsiones, trastornos del sueño, traumatismos, infecciones, neoplasmas, neuropatología, trastornos del movimiento, enfermedades desmielinizantes, trastornos de la médula espinal y trastornos de los nervios periféricos, músculos y uniones neuromusculares. Las adicciones y las enfermedades mentales, que incluyen, pero sin limitarse a, trastorno bipolar y esquizofrenia, también se incluyen en la definición de trastorno neurológico. La siguiente es una lista de varios trastornos, síntomas, signos y síndromes neurológicos que pueden ser tratados usando las
- 15 composiciones y procedimientos de acuerdo con la presente invención: afasia adquirida epileptiforme; encefalomiелitis diseminada aguda; adrenoleucodistrofia; degeneración macular relacionada con la edad; agenesia del cuerpo calloso; agnosia; síndrome de Aicardi; enfermedad de Alexander; enfermedad de Alpers; hemiplejía alterna; demencia vascular; esclerosis lateral amiotrófica; anencefalia; síndrome de Angelman; angiomatosis; anoxemia; afasia; apraxia; quistes aracnoideos; aracnoiditis; malformación de Chiari Anronl; malformación
- 20 arteriovenosa; síndrome de Asperger; telegiectasia ataxia; trastorno de hiperactividad y déficit de atención; autismo; disfunción autónoma; dolor de espalda; enfermedad de Batten; enfermedad de Behcet; parálisis de Bell; blefaroespasmo esencial benigno; focal benigna; amiotrofia; hipertensión intracraneal benigna; enfermedad de Binswanger; blefaroespasmo; síndrome de Bloch Sulzberger; lesión del plexo braquial; absceso cerebral; lesión cerebral; tumores cerebrales (incluyendo glioblastoma multiforme); tumor medular; síndrome de Brown-Sequard;
- 25 enfermedad de Canavan; síndrome del túnel carpiano; causalgia; síndrome de dolor central; mielínólisis pontina central; trastorno encefálico; aneurisma cerebral; arteriosclerosis cerebral; atrofia cerebral; gigantismo cerebral; parálisis cerebral; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; neuropatía inducida por quimioterapia y dolor neuropático; malformación de Chiari; corea; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; dolor crónico; síndrome de dolor crónico regional; síndrome de Coffin Lowry; coma, incluyendo estado vegetativo persistente; diplejía facial congénita;
- 30 degeneración corticobasal; arteritis craneal; craneosinostosis; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; trastornos por traumatismo acumulativo; síndrome de Cushing; enfermedad de cuerpos de inclusión citomegálicos; infección por citomegalovirus; síndrome de ojos danzantes y pies danzantes; síndrome DandyWalker; enfermedad de Dawson; síndrome de Morsier; parálisis de Dejerine-Klumke; demencia; dermatomiositis; neuropatía diabética; esclerosis difusa; disautonomía; disgrafía; dislexia; distonías; encefalopatía epiléptica infantil temprana; síndrome de la silla
- 35 vacía; encefalitis; encefalocelos; angiomatosis encefalotrigeminal; epilepsia; parálisis de Erb; temblor esencial; enfermedad de Fabry; síndrome de Fahr; desmayo; parálisis espástica familiar; convulsiones febriles; síndrome de Fisher; ataxia de Friedreich; demencia fronto-temporal y otras "tauopatías"; enfermedad de Gaucher; síndrome de Gerstmann; arteritis de células gigantes; enfermedad de inclusión de células gigantes; leucodistrofia de células globosas; síndrome de Guillain-Barré; mielopatía asociada HTLV-1; enfermedad Hallervorden-Spatz; traumatismo craneoencefálico; cefalea; espasmo hemifacial; paraplejía espástica; hereditaria atáctica polineurítica; herpes zóster óptico; herpes zóster; síndrome de Hirayama; demencia y la neuropatía asociadas a HIV (también manifestaciones neurológicas del SIDA); holoprosencefalia; enfermedad de Huntington y otras enfermedades de repetición de poliglutamina; hidranencefalia; hidrocefalia; hipercortisolismo; hipoxia; encefalomiелitis mediada por
- 40 inmunidad; miositis por cuerpos de inclusión; incontinencia pigmentaria; enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico infantil; enfermedad de Refsum infantil; espasmos infantiles; miopatía inflamatoria; quiste intracraneal; hipertensión intracraneal; síndrome de Joubert; síndrome de Kearns-Sayre; enfermedad de Kennedy, síndrome de Kinsbourne; síndrome de Klippel Feil; enfermedad de Krabbe; enfermedad Kugelberg-Welander; kuru; enfermedad de Lafora; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; síndrome de Landau-Kleffner; síndrome lateral medular (Wallenberg); dificultades de aprendizaje; enfermedad de Leigh; síndrome de Lennox-Gustaut; síndrome de Lesch-Nyhan; leucodistrofia; demencia con cuerpos de Lewy; lisencefalia; síndrome de enclaustramiento; enfermedad de Lou Gehrig (es decir, enfermedad de las neuronas motoras o esclerosis lateral amiotrófica); enfermedad del disco lumbar; La enfermedad de Lyme - secuelas neurológicas; enfermedad de Machado-Joseph; macrocefalia; megalocéfalia; síndrome de Melkesson-Rosenthal; enfermedad de Meniere; meningitis; enfermedad de Menkes;
- 45 leucodistrofia metacromática; microcefalia; migraña; síndrome de Miller Fisher; miniderrames; miopatías mitocondriales; síndrome de Moebius; amiotrofia monomérica; enfermedad de la neuronas motoras; enfermedad de
- 50
- 55
- 60

- Moyamoya; mucopolisacaridosis; demencia multiinfarto; neuropatía motora multifocal; esclerosis múltiple y otras enfermedades desmielinizantes; atrofia de múltiple sistemas con hipotensión postural; distrofia muscular; miastenia grave; esclerosis difusa mielinoclastica; encefalopatía mioclónica de los lactantes; mioclonía; miopatía; mionía congénita; narcolepsia; neurofibromatosis; síndrome neuroléptico maligno; manifestaciones neurológicas del SIDA;
- 5 secuelas neurológicas del lupus; neuromiotonía; lipofuscinosis cerioidea; trastornos de la migración neuronal; enfermedad de Niemann-Pick; síndrome de McLeod- O'Sullivan; neuralgia occipital; secuencia de espina bífida oculta; síndrome Ohtahara; atrofia olivopontocerebelosa; opsoclonio-mioclonio; neuritis óptica; hipotensión ortostática; síndrome de sobreuso; parestesia; enfermedad o trastorno neurodegenerativo (enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia, esclerosis
- 10 múltiple y otras enfermedades y trastornos asociados con la muerte celular neuronal); paramiotonía congénita; enfermedades paraneoplásicas; ataques paroxísticos; Síndrome de Parry Romberg; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; parálisis periódicas; neuropatía periférica; neuropatía dolorosa y dolor neuropático; estado vegetativo persistente; trastornos profundos del desarrollo; reflejo de estornudo fótico; enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico; enfermedad de Pick; nervio pinzado; tumores de la hipófisis; polimiositis; pencefalía; síndrome post-polio;
- 15 neuralgia postherpética; encefalomielitis postinfecciosa; hipotensión postural; síndrome de Prader-Willi; esclerosis lateral primaria; enfermedades priónicas; atrofia hemifacial progresiva; leucoencefalopatía multifocal progresiva; poliodistrofia esclerosante progresiva; parálisis supranuclear progresiva; pseudotumor cerebral; síndrome de Ramsay-Hunt (tipos I y II); encefalitis de Rasmussen; síndrome de distrofia simpática refleja; enfermedad de Refsum; trastornos por movimientos repetitivos; lesiones por esfuerzo repetitivo; síndrome de piernas inquietas; mielopatía
- 20 asociada a retrovirus; síndrome de Rett; síndrome de Reye; baile de San Vito; enfermedad de Sandhoff; enfermedad de Schilder; esquizencefalía; displasia septo-óptica; síndrome del bebé zarandeado; herpes; síndrome de Shy-Drager; síndrome de Sjogren; apnea del sueño; síndrome de Soto; espasticidad; espina bífida; lesión de la médula espinal; tumores de la médula espinal; atrofia muscular en la columna; síndrome de Stiff-Person; accidente cerebrovascular; síndrome de Sturge-Weber; panencefalitis esclerosante subaguda; encefalopatía arteriosclerótica
- 25 subcortical; corea de Sydenham; síncope; siringomielia; discinesia tardía; enfermedad de Tay-Sachs; arteritis temporal; síndrome de médula espinal anclada; enfermedad de Thomsen; síndrome del opérculo torácico; Tic Douloureux; parálisis de Todd; Síndrome de Tourette; ataque isquémico transitorio; encefalopatías espongiiformes transmisibles; mielitis transversa; lesión cerebral traumática; temblor; neuralgia trigeminal; paraparesia espástica tropical; esclerosis tuberosa; demencia vascular (demencia multiinfarto); vasculitis incluyendo arteritis temporal;
- 30 enfermedad de Von Hippel-Lindau; síndrome de Wallenberg; enfermedad de Werdnig-Hoffman; síndrome de West; latigazo cervical; síndrome de Williams; enfermedad de Wildon; y síndrome de Zellweger: Síndrome de Wallenberg; enfermedad de Werdnig-Hoffman; síndrome de West; latigazo; síndrome de Williams; enfermedad de Wildon; y síndrome de Zellweger.
- 35 Una "inflamación" se refiere a las condiciones inflamatorias sistémicas y condiciones asociadas con la migración a nivel local y la atracción de monocitos, leucocitos y/o neutrófilos. Los ejemplos de la inflamación incluyen, pero no se limitan a, inflamación resultante de la infección con microorganismos patógenos (incluyendo bacterias gram-positivas y gram-negativas, virus, hongos y parásitos como protozoos y helmintos), rechazo al trasplante (incluido el rechazo a órganos sólidos como riñón, hígado, corazón, pulmón o córnea, así como rechazo a los trasplantes de médula ósea
- 40 incluyendo enfermedad injerto-contra-huésped (EICH), o por reacciones alérgicas autoinmunitarias localizadas agudas o crónicas. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen glomerulonefritis aguda; artritis o artritis reactiva; glomerulonefritis crónica; enfermedad inflamatoria intestinal, como enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enterocolitis necrotizante; hepatitis; sepsis; enfermedad hepática alcohólica, esteatosis hepática no alcohólica; transfusiones de granulocitos síndromes asociados; dermatosis inflamatorias como la dermatitis de contacto,
- 45 dermatitis atópica, psoriasis, lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmune, esclerosis múltiple, y algunas formas de diabetes autoinmune, o cualquier otro estado donde el ataque del propio sistema inmunológico del sujeto se traduce en la destrucción del tejido patológico. Las reacciones alérgicas incluyen asma alérgico, bronquitis crónica y aguda de hipersensibilidad retardada. Estados de enfermedad inflamatoria sistémica incluyen inflamación asociada con trauma, quemaduras, reperfusión tras eventos isquémicos (por ejemplo, eventos trombóticos en el
- 50 corazón, el cerebro, el intestino o los vasos periféricos, incluyendo infarto de miocardio e ictus), sepsis, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) o síndrome de disfunción orgánica múltiple . El reclutamiento de células inflamatorias también se produce en placas ateroscleróticas. Inflamación incluye, pero sin limitarse a, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Wegener, tiroiditis de Hashimoto, carcinoma hepatocelular, atrofia del timo, pancreatitis crónica, artritis reumatoide, osteoartritis, hiperplasia linfoide reactiva, carcinoma papilar, colitis ulcerosa, enfermedad
- 55 de Crohn, colitis ulcerosa, colecistitis aguda, colecistitis crónica, cirrosis, sialoadenitis crónica, peritonitis, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, gastritis crónica, adenomiosis, endometriosis, cervicitis aguda, cervicitis crónica la hiperplasia linfoide, esclerosis múltiple, hipertrofia secundaria a la púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía por IgA primaria, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, enfisema pulmonar, pielonefritis crónica y cistitis crónica,
- 60 Una enfermedad o trastorno cardiovascular incluye aquellos trastornos que pueden causar isquemia o son causados

por reperfusión del corazón. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, aterosclerosis, enfermedad de la arteria coronaria, miocarditis granulomatosa, miocarditis crónica (no granulomatosa), cardiomiopatía hipertrófica primaria, enfermedad arterial periférica (EAP), enfermedad vascular periférica, tromboembolismo venoso, embolismo pulmonar, accidente cerebrovascular, angina de pecho, infarto de miocardio, daño tisular cardiovascular provocado por paro cardíaco, daño tisular cardiovascular provocado por bypass cardíaco, choque cardíaco, y afecciones relacionadas que serían conocidas por los expertos en la materia o que implican disfunción de o daño tisular al corazón o la vasculatura, especialmente, pero sin limitarse a, daño tisular relacionado con la activación de PON1. Las enfermedades CVS incluyen, aunque sin limitarse a, aterosclerosis, miocarditis granulomatosa, infarto de miocardio, fibrosis miocárdica secundaria a enfermedad valvular cardíaca, fibrosis miocárdica sin infarto, cardiomiopatía hipertrófica primaria, y miocarditis crónica (no granulomatosa).

"Enfermedad o trastorno neurodegenerativo" se refiere a una amplia gama de enfermedades y trastornos del sistema nervioso central y periférico que incluyen, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la demencia, la esclerosis múltiple y otras enfermedades y trastornos asociados con la muerte celular neuronal.

Polinucleótidos y composiciones de oligonucleótidos y moléculas

Dianas: en una realización, las dianas incluyen secuencias de ácido nucleico de la Filagrina (FLG), incluyendo sin limitarse a, secuencias sentido y/o antisentido no codificantes y/o secuencias codificantes asociadas con FLG.

El gen de la filagrina desempeña un papel en la construcción de las capas de barrera de la piel, y las mutaciones en este gen derivan en afecciones como el eccema. La Filagrina es una proteína abundante en las capas más externas de la piel y está producida por el gen de la filagrina. La función de la Filagrina es ayudar a producir las capas de barrera de la piel impermeables presentes en la superficie más externa de la piel y mantenerlas hidratadas. La función de barrera inherente de la piel es similar a una película plástica o adhesiva, actúa para evitar la pérdida de agua de la piel y, lo que es más importante, para proteger el cuerpo de materiales extraños del entorno, como los alérgenos. La falta de una barrera cutánea intacta provoca que los alérgenos entren en el cuerpo donde producen una variedad de respuestas alérgicas que incluyen eczema, asma, fiebre del heno y otras alergias.

Se ha demostrado que la falta de expresión de la proteína filagrina predispone a los individuos al desarrollo de ictiosis vulgar y, más recientemente, eccema atópico o dermatitis. El gen de la filagrina reside en el cromosoma humano 1q21 dentro del complejo de diferenciación epidérmica, una región que también hospeda genes de muchas otras proteínas que son importantes para la función de barrera normal de la epidermis. La función principal de la filagrina parece ser la de agregar el citoesqueleto epidérmico para formar una matriz de proteína y lípidos densa que regule la permeabilidad de la piel al agua y a partículas externas como los alérgenos.

Pioglitazona - ACTOS (clorhidrato de pioglitazona) es un agente antidiabético oral que actúa principalmente reduciendo la resistencia a la insulina. ACTOS se usa en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (también conocida como diabetes mellitus no insulino dependiente [NIDDM] o diabetes de inicio en adultos). Los estudios farmacológicos indican que ACTOS mejora la sensibilidad a la insulina en los músculos y el tejido adiposo e inhibe la gluconeogénesis hepática. ACTOS mejora el control glucémico al tiempo que reduce los niveles de insulina circulante. Pioglitazona, monoclóhidrato de [(+)-5-[[4-[2-(5-etil-2-piridinil)etoxi]fenil]metil]-2,4-] tiazolidinediona pertenece a una clase química distinta y tiene una acción farmacológica diferente que las sulfonilureas, la metformina o los inhibidores de la α -glucosidasa. La molécula contiene un carbono simétrico, y el compuesto se sintetiza y se utiliza como la mezcla racémica. Los dos enantiómeros de la pioglitazona se interconvierten *in vivo*. No se encontraron diferencias en la actividad farmacológica de los dos enantiómeros.

El clorhidrato de pioglitazona es un polvo cristalino blanco inodoro que tiene una fórmula molecular de $C_{19}H_{20}N_2O_3S \cdot HCl$ y un peso molecular de 392,90 daltons. Es soluble en N,N-dimetilformamida, ligeramente soluble en etanol anhidro, muy poco soluble en acetona y acetonitrilo, prácticamente insoluble en agua e insoluble en éter.

ACTOS está indicado como un complemento de la dieta y el ejercicio para mejorar el control glucémico en adultos con diabetes mellitus tipo 2. La pioglitazona también se ha utilizado para tratar la esteatohepatitis no alcohólica (hígado graso), pero este uso actualmente se considera experimental.

Sin embargo, aún no se ha investigado la pioglitazona para su uso en el campo de la dermatología.

Lomerizina: es un bloqueador del canal de calcio con propiedades antimigrañosas e inhibe selectivamente la constricción de las arterias cerebrales. Se sabe que es un neuroprotector y está en ensayos para el glaucoma. Los

efectos secundarios de la Lomerizina incluyen efectos secundarios cardiovasculares mínimos, somnolencia y enrojecimiento.

Sin embargo, aún no se ha investigado la lomerizina para su uso en el campo de la dermatología.

5

Bupropión, también conocido como Wellbutrin, Zyban, Voxra, Budeprion o Aplenzin; anteriormente conocido como amfebutamona es un antidepresivo de la clase de la aminocetona, químicamente no está relacionado con el inhibidor de la recaptación de la serotonina tricíclico, tetracíclico, selectivo u otros agentes antidepresivos conocidos, su estructura se parece mucho a la del dietilpropión; está relacionado con las feniletilaminas.

10

El bupropión se designa como clorhidrato de (\pm) -1-(3-clorofenil)-2-[(1,1-dimetiletil)amino]-1-propanona. Su peso molecular es de 276,2. La fórmula molecular es $C_{13}H_{18}ClNO \cdot HCl$. El polvo de clorhidrato de bupropión es blanco, cristalino y muy soluble en agua. Tiene un sabor amargo y produce la sensación de anestesia local en la mucosa oral.

15

Bupropión está indicado para el tratamiento del trastorno depresivo agudo. Un episodio depresivo agudo (DSM-IV) implica la presencia de 1) estado de ánimo depresivo o 2) pérdida de interés o placer; además, al menos 5 de los siguientes síntomas han estado presentes durante el mismo período de 2 semanas y representan un cambio del funcionamiento anterior: estado de ánimo depresivo, interés o placer notablemente disminuido en las actividades habituales, cambio significativo en el peso y/o apetito, insomnio o hipersomnia, agitación o retraso psicomotor, aumento de la fatiga, sentimientos de culpa o inutilidad, disminución del pensamiento o concentración alterada, intento de suicidio o ideación suicida.

20

Bupropión ha demostrado cierto éxito en el tratamiento de la fobia social y la ansiedad comórbida con la depresión, pero no el trastorno de pánico con agorafobia. Su potencial ansiolítico se ha comparado con el de la sertralina y la doxepina. Sin embargo, puede causar agitación en algunos pacientes, especialmente en dosis más altas, y a menudo aumenta la ansiedad, al igual que el metilfenidato. Como psicoestimulante, es inherentemente un compuesto ansiogénico y los beneficios contrarios son poco conocidos y aparentemente paradójicos.

25

Bupropión reduce la gravedad de los deseos de nicotina y los síntomas de abstinencia. Otras indicaciones para Bupropión son la obesidad y el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH). Bupropión se ha aprobado por la FDA para la prevención del trastorno afectivo estacional. Según varios estudios de facilidad y un estudio piloto, el bupropión reduce el nivel de un mediador inflamatorio del TNF-alfa y puede ser útil en afecciones autoinflamatorias como por ejemplo la enfermedad de Crohn y la psoriasis.

30

Sin embargo, aún no se ha investigado el bupropión para su uso en el campo de la dermatología.

35

El fenpropamato es un miorelajante de acción central, con efectos sedantes y anticonvulsivos adicionales. La sobredosis es similar a la del barbitúrico. Su mecanismo de acción es probablemente similar al meprobamato. Fenpropamato se utilizó previamente en humanos como un ansiolítico, y todavía se usa a veces en anestesia general y para tratar calambres musculares y espasticidad. Fenpropamato todavía se usa en algunos países europeos, pero generalmente se ha reemplazado por fármacos más nuevos. Fenpropamato se metaboliza por degradación oxidativa del grupo amida y orto-hidroxilación del anillo de benceno, y los riñones lo eliminan en la orina.

40

Sin embargo, aún no se ha investigado el fenpropamato para su uso en el campo de la dermatología.

Benidipina, también conocido como benidipino o hidrocloreuro de benidipino, es un bloqueador del canal de calcio dihidropiridínico para el tratamiento de la presión arterial alta (hipertensión). Benidipina es un bloqueador de los canales de calcio dihidropiridínico que inhibe no solo los canales de calcio de tipo L sino también los de tipo T. El nombre químico de Benidipino es éster clorhidrato del ácido 3-metil-5-[(3R)-1-(feniletil)-3-piperidinil] del ácido (4R)-rel-1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-3,5-piridindicarboxílico. Agente antihipertensivo oralmente activo que muestra una amplia gama de actividades *in vitro* e *in vivo*. Inhibe los canales de Ca^{2+} de tipo L- y T. También inhibe la activación del receptor mineralocorticoide inducida por aldosterona. Exhibe efectos cardioprotectores y antiateroscleróticos.

50

Sin embargo, aún no se ha investigado la benidipino para su uso en el campo de la dermatología.

Piroxicam es un miembro del grupo oxicam de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Cada cápsula granate y azul contiene 10 mg de piroxicam, cada cápsula granate contiene 20 mg de piroxicam para administración oral. El nombre químico para piroxicam es 4-hidroxil-2-metil-N-2-piridinil-2H-1,2-benzotiazin-3-carboxamid-1,1-

60

dióxido. Piroxicam se produce como un sólido cristalino blanco, moderadamente soluble en agua, ácido diluido y la mayoría de los disolventes orgánicos. Es poco soluble en alcohol y en soluciones acuosas. Presenta un protón 4-hidroxi débilmente ácido (pKa 5,1) y un nitrógeno piridílico básico débil (pKa 1,8). El peso molecular de piroxicam es de 331,35. La fórmula molecular es $C_{15}H_{13}N_3O_4S$.

5

Piroxicam es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo utilizado para aliviar los síntomas de la artritis reumatoide y la osteoartritis, dismenorrea primaria, dolor postoperatorio; y actúa como un analgésico, especialmente cuando hay un componente inflamatorio. También se usa en medicina veterinaria para tratar ciertas neoplasias que expresan receptores de ciclooxigenasa (COX), como cánceres de vejiga, colon y próstata.

10

Sin embargo, aún no se ha investigado el piroxicam para su uso en el campo de la dermatología.

Topiramato es un monosacárido sustituido con sulfamato. Los comprimidos TOPAMAX® (topiramato) están disponibles como comprimidos redondos de 25 mg, 50 mg, 100 mg y 200 mg para administración oral. TOPAMAX® (cápsulas de topiramato) Las Cápsulas Sprinkle están disponibles como cápsulas sprinkle de 15 mg y 25 mg para administración oral en forma de cápsulas enteras, o se abren y se espolvorean sobre alimentos blandos.

15

Topiramato es un polvo cristalino blanco con un sabor amargo. Topiramato es más soluble en soluciones alcalinas que contienen hidróxido de sodio o fosfato de sodio y tiene un pH de 9 a 10. Es fácilmente soluble en acetona, cloroformo, dimetilsulfóxido y etanol. La solubilidad en agua es de 9,8 mg/ml. Su solución saturada tiene un pH de 6,3. Topiramato tiene la fórmula molecular $C_{12}H_{21}NO_8S$ y un peso molecular de 339,36. Topiramato se designa químicamente como sulfamato de 2,3: 4,5-di-O-isopropilideno-β-D-fructopiranososa.

20

Topiramato se usa solo o con otros medicamentos para tratar ciertos tipos de convulsiones en personas que tienen epilepsia. Topiramato también se usa con otros medicamentos para controlar las convulsiones en personas que tienen el síndrome de Lennox-Gastaut (un trastorno que causa convulsiones y retrasos en el desarrollo). Topiramato se usa para tratar pacientes que continúan teniendo convulsiones incluso cuando toman otros medicamentos anticonvulsivos. Topiramato también se usa para prevenir los dolores de cabeza por migraña, pero no para aliviar el dolor de las migrañas cuando se producen. Topiramato pertenece a una clase de medicamentos llamados anticonvulsivos. Funciona al reducir la excitación anormal en el cerebro.

25

30

Topiramato trata la epilepsia en niños y adultos y originalmente se comercializó como un anticonvulsivo. En los niños está indicado para el tratamiento del síndrome de Lennox-Gastaut, un trastorno que causa convulsiones y retraso en el desarrollo. También está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y, con mayor frecuencia, recetado para la prevención de las migrañas. Los psiquiatras han usado topiramato para tratar el trastorno bipolar y, a menudo, usan topiramato para aumentar los psicotróficos o contrarrestar el aumento de peso asociado con numerosos antidepresivos.

35

Topiramato se ha investigado para su uso en el tratamiento del alcoholismo y la obesidad, especialmente para reducir los atracones.

40

Topiramato también se usa en ensayos clínicos para tratar el trastorno de estrés postraumático. Un estudio piloto sugirió que el topiramato es eficaz contra los espasmos infantiles. Otro estudio recomienda topiramato como un tratamiento eficaz en la prevención de la leucomalacia periventricular en recién nacidos prematuros después de una lesión isquémica hipóxica. Otros usos no aprobados y de investigación incluyen el tratamiento del temblor esencial, la bulimia nerviosa, el trastorno obsesivo compulsivo, el alcoholismo, el abandono del hábito de fumar, la hipertensión intracraneal idiopática, el dolor neuropático, la cefalea en racimos y la dependencia de la cocaína. Topiramato también se está estudiando con una mezcla de fentermina para formar un fármaco llamado Qnexa para el tratamiento de la obesidad.

45

50

Sin embargo, aún no se ha investigado el topiramato para su uso en el campo de la dermatología.

Isradipino es un antagonista del calcio. Químicamente, el isradipino es 4-(4-benzofurazanil)-1,4-dihidro-2,6-dimetil-,metil-1-metiletiléster del ácido 3,5-piridindicarboxílico. Isradipino es un polvo amarillo, cristalino y fino que es inodoro o tiene un débil olor característico. Isradipino es prácticamente insoluble en agua (<10 mg/l a 37 °C), pero es soluble en etanol y fácilmente soluble en acetona, cloroformo y cloruro de metileno.

55

Isradipino está indicado en el tratamiento de la hipertensión. Se puede usar solo o al mismo tiempo que los diuréticos de tipo tiazida. Por lo general, se receta para el tratamiento de la presión arterial alta a fin de reducir el riesgo de accidente cerebrovascular y ataque cardíaco. Una investigación más reciente en modelos animales

60

sugiere que el isradipino puede tener usos potenciales para tratar la enfermedad de Parkinson.

Sin embargo, aún no se ha investigado el isradipino para su uso en el campo de la dermatología.

- 5 Nicorandil es uno de los medicamentos comunes utilizados en el tratamiento de la angina de pecho. El fármaco puede clasificarse como un fármaco vasodilatador.

La acción de nicorandil se entiende por el proceso de alisar el músculo liso de los vasos sanguíneos. La acción está especialmente marcada especialmente en el caso del sistema venoso.

10

Nicorandil actúa activando los canales de potasio y donando óxido nítrico para activar la enzima guanilato ciclasa. La enzima guanilato ciclasa causa activación de cGMP que a su vez deriva en vasodilatación arterial y venosa por desfosforilación de la cadena ligera de miosina. Siendo selectivo para los canales de potasio vascular, nicorandil no tiene una acción significativa sobre la contractilidad y la conducción cardíacas.

15

Nicorandil puede dilatar los vasos coronarios de un individuo sano, sin embargo, sus efectos sobre los vasos coronarios de una persona con cardiopatía isquémica serán pequeños ya que estarán completamente dilatados. En cambio, dilata el sistema venoso, reduciendo la precarga y el trabajo del corazón.

- 20 Sin embargo, aún no se ha investigado el nicorandil para su uso en el campo de la dermatología.

Piribedil es el agonista D2 que se usa principalmente para tratar la enfermedad de Parkinson. Actúa mediante la estimulación de receptores de dopamina, lo que alivia diversos síntomas como temblores. También se usa para tratar otras afecciones, como problemas circulatorios, debido a sus efectos antagónicos D2. El fármaco también viene bajo la marca Trivastal que viene en forma de cápsulas de liberación prolongada que deben tomarse por vía oral. Piribedil puede usarse como monoterapia o junto con la terapia con L-dopa en la enfermedad de Parkinson temprana y avanzada. Una gran cantidad de pacientes de edad avanzada se han beneficiado debido a sus efectos relativos en la cognición, como el tratamiento de la memoria deteriorada, la atención y el enfoque.

- 30 Piribedil funciona estimulando los receptores de dopamina presentes en el cerebro que, de hecho, trata el déficit de los receptores postsinápticos D2 y D3 de las vías mesolímbica y mesocortical. El fármaco también tiene efectos vasodilatadores mejorando de este modo los diferentes síntomas cognitivos y refuerza la transmisión noradrenérgica que resulta en la mejora del enfoque, la atención y la memoria.

- 35 Piribedil también está indicado en el tratamiento de déficits cognitivos patológicos en personas mayores (deterioro de la atención, motivación, memoria, etc.), tratamiento de mareos en ancianos, tratamiento de manifestaciones isquémicas retinianas, tratamiento adyuvante en claudicación intermitente debido a enfermedad vascular periférica (PVD) de los miembros inferiores (etapa 2), anhedonia y depresión resistente al tratamiento en depresivos unipolares y bipolares (fuera de etiqueta).

40

Sin embargo, aún no se ha investigado el piribedil para su uso en el campo de la dermatología

Oxaprozina es un miembro del grupo ácido propiónico de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). El nombre químico de la oxaprozina es sal potásica del ácido 4,5-difenil-2-oxazolpropiónico. Su fórmula empírica es C₁₈H₁₄NO₃K y su peso molecular es 331. Oxaprozina potassium es un polvo blanco a blanquecino con un punto de fusión de 215 °C. Es poco soluble en alcohol y muy soluble en agua. La PK en agua es 9,7.

- 45 Oxaprozina se usa para aliviar la inflamación, hinchazón, agarrotamiento y dolor en las articulaciones asociados con la osteoartritis y la artritis reumatoide.

50

Sin embargo, aún no se ha investigado la oxaprozina para su uso en el campo de la dermatología.

Glicopirrolato es una sal de amonio cuaternario con el nombre químico: Bromuro de 3-[[ciclopentilhidroxifenilacetil]oxi]-1,1-dimetilpirrolidinio. Su fórmula molecular es C₁₉H₂₈BrNO₃ y su peso molecular es 398,33.

- 55 La inyección de glicopirrolato está indicada para su uso como antimuscarínico preoperatorio para reducir las secreciones salivales, traqueobronquiales y faríngeas; para reducir el volumen y la acidez libre de las secreciones gástricas; y para bloquear los reflejos inhibitorios vagales cardíacos durante la inducción de la anestesia y la incubación. Cuando se indique, la inyección de Robinul se puede usar intraoperatoriamente para contrarrestar las

60

arritmias asociadas a los reflejos vaginales o inducidos por fármacos o vagales. Glicopirrolato protege contra los efectos muscarínicos periféricos (p. ej., bradicardia y secreciones excesivas) de agentes colinérgicos como neostigmina y piridostigmina administrados para revertir el bloqueo neuromuscular debido a relajantes musculares no despolarizantes.

5

Glicopirrolato está indicado en la úlcera péptica, para uso en adultos como terapia adyuvante para el tratamiento de la úlcera péptica cuando se desea un efecto anticolinérgico rápido o cuando no se tolera la medicación oral.

En anestesia, la inyección de glicopirrolato se puede utilizar como medicamento preoperatorio para reducir las secreciones salivales, traqueobronquiales y faríngeas, así como para disminuir la acidez de la secreción gástrica. También se usa junto con neostigmina, un agente neuromuscular que bloquea el agente de inversión, para prevenir los efectos muscarínicos de la neostigmina, como por ejemplo la bradicardia. También se usa para reducir la saliva excesiva (sialorrea). Disminuye la secreción ácida en el estómago y, por lo tanto, se puede usar para tratar las úlceras estomacales, junto con otros fármacos. Se ha descrito el uso en el tratamiento del asma y la EPOC. Se ha utilizado tópicamente y por vía oral para tratar la hiperhidrosis.

Sin embargo, aún no se ha investigado el glicopirrolato para su uso en el campo de la dermatología.

20 Granisetron, hidrocloreto de granisetron, un agente antiemético y antiemético. Químicamente es clorhidrato de endo-N-(9-metil-9-azabicyclo-[3.3.1]-non-3-il)-1-metil-1H-indazol-3-carboxamida con un peso molecular de 348,9 (base libre de 312,4). Su fórmula empírica es C₁₈H₂₄N₄O•HCl.

Indicaciones de granisetron: El hidrocloreto de granisetron se usa para la prevención de las náuseas y los vómitos asociados con los cursos iniciales y repetidos de terapia emetógena contra el cáncer, que incluyen dosis altas de cisplatino. Náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia. Los antagonistas del receptor 5-HT₃ son los medicamentos principales que se usan para tratar y prevenir las náuseas y los vómitos inducidos por la quimioterapia. Muchas veces se administran por vía intravenosa unos 30 minutos antes de comenzar la terapia. Náuseas y vómitos postoperatorios y posradiagnósticos. Es una terapia posible para las náuseas y los vómitos debido a enfermedades médicas agudas o crónicas o gastroenteritis aguda. El tratamiento del síndrome de vómitos cíclicos aunque no hay ensayos formales para confirmar la eficacia. Náuseas y vómitos asociados con la radiación, incluida la irradiación corporal total y la radiación abdominal fraccionada.

Sin embargo, aún no se ha investigado el granisetron para su uso en el campo de la dermatología.

35 Memantina es un antagonista del receptor NMDA oralmente activo. El nombre químico del clorhidrato de memantina es clorhidrato de 1-amino-3,5-dimetiladamantano.

El hidrocloreto de memantina está indicado para el tratamiento de la demencia moderada a grave del tipo Alzheimer. Memantina también se está analizando para el trastorno de ansiedad generalizada, epilepsia, dependencia de opiáceos, lupus eritematoso sistémico, depresión, trastorno obsesivo compulsivo, síndrome de Tourette, problemas con el juego, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), glaucoma, tinnitus, dolor neuropático incluyendo síndrome complejo de dolor regional, trastornos generalizados del desarrollo, demencia asociada al VIH, nistagmo, esclerosis múltiple y autismo.

45 Sin embargo, aún no se ha investigado la memantina para su uso en el campo de la dermatología.

Nimodipino pertenece a la clase de agentes farmacológicos conocidos como bloqueadores de los canales de calcio. Nimodipina es isopropil-2-metoxietil-1,4-dihidro- 2,6-dimetil-4-(m-nitrofenil)- 3,5-piridinadicaboxilato. Tiene un peso molecular de 418,5 y una fórmula molecular de C₂₁H₂₆N₂O₇.

50

Nimodipino está indicado para la mejoría del resultado neurológico al reducir la incidencia y gravedad de los déficits isquémicos en pacientes con hemorragia subaracnoidea por aneurismas de baya intracraneal rotos independientemente de su condición neurológica postictus (es decir, Hunt y Hess Grades IV).

55 El principal uso del nimodipino es la prevención del vasoespasmio cerebral y la isquemia resultante, una complicación de la hemorragia subaracnoidea (una forma de hemorragia cerebral), específicamente de aneurismas de baya intracraneal rotos, independientemente de la condición neurológica postictus del paciente. Su administración comienza dentro de los 4 días posteriores a una hemorragia subaracnoidea y se continúa durante tres semanas. Si la presión arterial cae más del 5 %, se ajusta la dosificación. Mientras que el nimodipino no se usa actualmente en la lesión de cabeza, se ha mostrado prometedor en estudios clínicos. Un estudio de 2009 (Asian A y

60

cols., February 2009 Pharmacol. Res. 59 (2): 120-4), encontraron que los pacientes con traumatismo craneoencefálico grave a los que se les administró nimodipino vía inyección venosa periférica, junto con los procedimientos estándar tenían una presión de perfusión cerebral significativamente mayor y saturación de oxígeno venoso yugular, mientras que la presión intracraneal, el lactato yugular y la glucosa yugular eran menores. El estudio
5 concluyó que los valores de puntuación del resultado de Glasgow fueron más altos y que el metabolismo cerebral mejoró.

Sin embargo, aún no se ha investigado el nimodipino para su uso en el campo de la dermatología.

10 Amlodipino, el besilato de amlodipino se describe químicamente como 3-etil-5-metil(±)-2-[(2-aminoetoxi)metil]-4-(2-clorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-3, 5-piridindicarboxilato, monobencenosulfonato. La fórmula empírica es $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_8O_3S$.

La base de amlodipino (como besilato, mesilato o maleato) es un bloqueador de los canales de calcio de acción
15 prolongada (clase de dihidropiridina) utilizado como antihipertensivo y en el tratamiento de la angina de pecho. Al igual que otros bloqueadores de los canales de calcio, el amlodipino actúa relajando el músculo liso de la pared arterial, disminuyendo la resistencia periférica total y, por lo tanto, reduciendo la presión arterial.

Amlodipino está indicado en el tratamiento de la hipertensión. Se puede usar solo o en combinación con otros
20 agentes antihipertensivos, también está indicado para la Arteriopatía coronaria (CAD). Amlodipino está indicado para el tratamiento sintomático de la angina estable crónica. Amlodipino se puede usar solo o en combinación con otros agentes antianginosos.

Amlodipino también está indicado para el tratamiento de la angina vasoespástica confirmada o sospechada.
25 Amlodipino se puede usar como monoterapia o en combinación con otros agentes antianginosos.

En pacientes con arteriopatía coronaria (CAD) recientemente documentada por angiografía y sin insuficiencia
cardíaca o una fracción de eyección <40%, el amlodipino está indicado para reducir el riesgo de hospitalización por angina y para reducir el riesgo de un procedimiento de revascularización coronaria.

30 Sin embargo, aún no se ha investigado el amlodipino para su uso en el campo de la dermatología.

En una realización, se usan oligonucleótidos antisentido y las composiciones de la presente invención para prevenir
o tratar enfermedades o trastornos asociados con miembros de la familia FLG. Enfermedades y trastornos mediados
35 por filagrina (FLG) ejemplares que pueden tratarse con células/tejidos regenerados a partir de células madre obtenidas usando los compuestos antisentido que comprenden: una enfermedad o trastorno asociado con la función anormal y/o la expresión del gen FLG, una enfermedad o trastorno dermatológico, signos del envejecimiento cutáneo, una afección de la piel causada por una agresión externa, una alergia, psoriasis, asma, eczema, fiebre del heno, ictiosis vulgar, dermatitis atópica (AD), eccema herpético, artritis reumatoide, una enfermedad o trastorno
40 cardiovascular, cáncer, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad o trastorno mediada por inmunidad, una enfermedad o trastorno de hiperinmunidad o hipoinmunidad, una enfermedad o trastorno autoinmune, asma, psoriasis, una alergia (p. ej., rinitis alérgica, alergia por tipo de contacto, alergia alimentaria, etc.), enfermedad de cehac, una enfermedad o trastorno neurológico, una enfermedad o trastorno neurodegenerativo (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ALS, etc.), síndrome de desgaste relacionado con el SIDA, una
45 enfermedad o trastorno asociado con la función de barrera de la piel, una enfermedad inflamatoria crónica de la piel, piel seca clínica.

En una realización, la modulación del gen FLG por uno o varios oligonucleótidos antisentido y/o composiciones de la
presente invención se administra a un paciente que los necesite, para prevenir o tratar cualquier enfermedad o
50 trastorno relacionado con la expresión, función o actividad anómalas del gen FLG en comparación con un control normal.

En una realización, la composición de la presente invención comprende uno o más oligonucleótidos específicos para
uno o más polinucleótidos para filagrina (FLG), dichos polinucleótidos comprenden secuencias antisentido,
55 secuencias complementarias, alelos, homólogos, isoformas, variantes, derivados, mutantes, fragmentos, o combinaciones de los mismos.

En una realización, la composición de la presente invención comprende uno o más oligonucleótidos específicos para
uno o más polinucleótidos para filagrina (FLG) y una o más moléculas moduladoras del gen FLG, comprendiendo
60 dichos polinucleótidos secuencias antisentido, secuencias complementarias, alelos, homólogos, isoformas,

variantes, derivados, mutantes, fragmentos o combinaciones de los mismos.

Una realización de la presente invención proporciona una composición, donde la molécula se selecciona del grupo de Pioglitazona, Lomerizina, Bupropión, Fenprobamato, Benidipino, Piroxicam, Topiramato, Isradipino, Nicorandil, 5 Piribedil, Oxaprozina, Glicopirrolato, Granisetron, Memantina, Nimodipino y Amlodipino,

Una realización de la presente invención proporciona una composición para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno dermatológico, comprendiendo la composición una o más moléculas moduladoras del gen FLG y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

Una realización de la presente invención proporciona una composición, donde el compuesto se selecciona del grupo de Pioglitazona, Lomerizina, Bupropión, Fenprobamato, Benidipino, Piroxicam, Topiramato, Isradipino, Nicorandil, Piribedil, Oxaprozina, Glicopirrolato, Granisetron, Memantina, Nimodipino y Amlodipino.

15 Una realización de la presente invención proporciona una composición, donde la composición comprende además un oligonucleótido antisentido que modula la expresión o actividad del gen FLG.

Una realización de la presente invención proporciona una composición, donde la composición comprende además un oligonucleótido antisentido para una secuencia antisentido natural de Filagrina, donde el oligonucleótido 20 antisentido modula la expresión del gen FLG en un sujeto.

Una realización de la presente invención proporciona una composición, donde el oligonucleótido comprende secuencias de nucleótidos establecidas como SEQ ID NOS: 3 a 13.

25 Una realización de la presente invención proporciona una composición, donde el oligonucleótido se establece como SEQ ID NOS: 3 a 13 comprenden una o más modificaciones o sustituciones.

Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno asociado a FLG en un sujeto, el procedimiento comprende la administración al sujeto de una composición que 30 comprende una o más moléculas moduladoras del gen FLG y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento, donde el compuesto se selecciona del grupo de Pioglitazona, Lomerizina, Bupropión, Fenprobamato, Benidipino, Piroxicam, Topiramato, Isradipino, Nicorandil, Piribedil, Oxaprozina, Glicopirrolato, Granisetron, Memantina, Nimodipino y Amlodipino. 35

Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento, donde las composiciones comprenden además un oligonucleótido antisentido que modula la expresión o actividad del gen FLG.

Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento, donde la composición comprende además 40 un oligonucleótido antisentido para una secuencia antisentido natural de Filagrina, donde los oligonucleótidos antisentido modulan la expresión del gen FLG en un sujeto.

Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento, donde una enfermedad asociada con al menos un polinucleótido de Filagrina se selecciona de entre: una enfermedad o trastorno dermatológico, un signo de 45 envejecimiento cutáneo, un estado de la piel causado por una agresión externa, una alergia, psoriasis, asma, eccema, fiebre del heno, ictiosis vulgar, dermatitis atópica (EA), eccema herpético, artritis reumatoide, una enfermedad o trastorno cardiovascular, cáncer, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad o trastorno de inmunidad media, una enfermedad de hiperinmunidad o hipoinmunidad o trastorno, una enfermedad o trastorno autoinmune, asma, psoriasis, una alergia (p. ej., rinitis alérgica, alergia de tipo de contacto, alergia alimentaria, etc.), 50 enfermedad celíaca, una enfermedad o trastorno neurológico, una enfermedad o trastorno neurodegenerativo (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson enfermedad, ALS, etc.), síndrome de desgaste relacionado con el SIDA, una enfermedad o trastorno asociado con la función de barrera de la piel, una enfermedad inflamatoria crónica de la piel, piel seca clínica.

55 Una realización de la presente invención que proporciona un procedimiento para prevenir o tratar una afección de la piel asociada con al menos un polinucleótido de Filagrina (FLG) y/o al menos un producto codificado de la misma, que comprende: la administración a un paciente que tiene una afección cutánea o riesgo de desarrollar una afección de piel una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto regulador de Filagrina, al menos un oligonucleótido antisentido que se une a una secuencia antisentido natural de dicho al menos un polinucleótido de Filagrina (FLG) y 60 modula la expresión de dicho al menos un polinucleótido de Filagrina (FLG) y un vehículo farmacéuticamente

aceptable; previniendo o tratando de ese modo la enfermedad de la piel asociada con al menos un polinucleótido de Filagrina (FLG) y/o al menos un producto codificado de la misma,

5 Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento, donde el compuesto se selecciona del grupo de Ploglitazona, Lomerizina, Bupropión, Fenprobarnato, Benidipino, Piroxicam, Topiramato, Isradipino, Nicorandil, Piribedil, Oxaprozina, Glicopirrolato, Granisetron, Memantina, Nimodipino y Amlodipino.

10 Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento, donde la afección de la piel está causada por la inflamación, el daño a la luz o el envejecimiento.

15 Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento, donde el estado de la piel es el desarrollo de arrugas, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, queratosis actínica, trastornos de queratinización, una enfermedad de epidermolisis ampollosa, dermatitis exfoliativa, dermatitis seborreica, un eritema, lupus eritematoso discoide, dermatomiositis, cáncer de piel o un efecto del envejecimiento natural.

20 Una realización de la presente invención proporciona un uso de la composición de la reivindicación 30, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno dermatológico.

25 Una realización de la presente invención proporciona un uso, donde la composición comprende además un oligonucleótido antisentido que modula la expresión o actividad del gen FLG.

30 Una realización de la presente invención proporciona un uso, donde la composición comprende además un oligonucleótido antisentido para una secuencia antisentido natural de Filagrina, donde el oligonucleótido antisentido modula la expresión del gen FLG en un sujeto.

35 Una realización de la presente invención proporciona un uso, donde el compuesto se selecciona del grupo de Ploglitazona, Lomerizina, Bupropión, Fenprobarnato, Benidipino, Piroxicam, Topiramato, Isradipino, Nicorandil, Piribedil, Oxaprozina, Glicopirrolato, Granisetron, Memantina, Nimodipino y Amlodipino.

40 Una realización de la presente invención proporciona un uso, donde la enfermedad o trastorno de la piel es el desarrollo de arrugas, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, queratosis actínica, trastornos de queratinización, una enfermedad de epidermolisis ampollosa, dermatitis exfoliativa, dermatitis seborreica, un eritema, lupus eritematoso discoide, dermatomiositis, cáncer de piel o un efecto del envejecimiento natural.

45 En las realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan regímenes terapéuticos y/o cosméticos y tratamientos adaptados relacionados a sujetos que requieren tratamientos de la piel o en riesgo de desarrollar afecciones para las que requerirán tratamientos para la piel. El diagnóstico se puede hacer, por ejemplo, en función del estado del FLG del sujeto. Los niveles de expresión del gen FLG de un paciente en un tejido dado tal como la piel se pueden determinar por métodos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en otra parte en el presente documento, por ejemplo, analizando tejido usando PCR o métodos de detección basados en anticuerpos.

50 Una realización preferida de la presente invención proporciona una composición para el tratamiento de la piel y/o una aplicación cosmética que comprende los compuestos de la presente invención, p. ej., para modular la expresión del gen FLG en la piel. En realizaciones, el tratamiento tópico por los compuestos de la presente invención, para aumentar la esperanza de vida celular o prevenir la apoptosis. Por ejemplo, la piel puede protegerse del envejecimiento, por ejemplo, el desarrollo de arrugas, tratando la piel, por ejemplo, células epiteliales, como se describe en el presente documento. En una realización ejemplar, la piel se pone en contacto con una composición farmacéutica o cosmética de la presente invención. Lesiones cutáneas ejemplares o afecciones de la piel incluyen trastornos o enfermedades asociadas con o causadas por inflamación, daño solar o envejecimiento natural. Por ejemplo, las composiciones encuentran utilidad en la prevención o tratamiento de dermatitis de contacto (incluyendo dermatitis de contacto irritante y dermatitis de contacto alérgica), dermatitis atópica (también conocida como eccema alérgico), queratosis actínica, trastornos de queratinización (incluyendo eczema), enfermedades de epidermolisis bullosa (incluyendo pénfigo), dermatitis exfoliativa, dermatitis seborreica, eritemas (incluyendo eritema multiforme y eritema nodoso), daño causado por el sol u otras fuentes de luz, lupus eritematoso discoide, dermatomiositis, cáncer de piel y efectos del envejecimiento natural.

55 En una realización de la presente invención la composición se incorpora en una formulación tópica que contiene un vehículo tópico que generalmente es adecuado para la administración tópica de fármacos y que comprende cualquier material de este tipo conocido en la técnica. El vehículo tópico se puede seleccionar para proporcionar la composición en la forma deseada, por ejemplo, en forma de una pomada, loción, crema, microemulsión, gel, aceite,

solución, o similares, y puede estar compuesto por un material de origen natural o sintético, es preferible que el vehículo seleccionado no afecte adversamente al agente activo u otros componentes de la formulación tópica. Los ejemplos de vehículos tópicos adecuados para su uso en el presente documento incluyen agua, alcoholes y otros disolventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite mineral, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras y similares. Las formulaciones pueden ser ungüentos, lociones, cremas, microemulsiones y geles incoloros e inodoros.

La composición de la invención puede incorporar en ungüentos, que generalmente son preparaciones semisólidas que se basan típicamente en vaselina u otros derivados del petróleo. La base de ungüento específica a usar, como apreciarán los expertos en la técnica, es aquella que proporcionará una administración óptima del fármaco y, preferiblemente, proporcionará otras características deseadas también, por ejemplo, emoliencia o similar. Al igual que con otros portadores o vehículos, una base de pomada debe ser inerte, estable, no irritante y sin sensibilidad. Como se explica en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co.), las bases de ungüentos se pueden agrupar en cuatro clases: bases oleaginosas; bases emulsionables; bases de emulsión; y bases solubles en agua. Las bases oleaginosas para ungüentos incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas obtenidas de animales e hidrocarburos semisólidos obtenidos del petróleo. Las bases de ungüentos emulsionables, también conocidas como bases de ungüentos absorbentes, contienen poca o nada de agua e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxistearina, lanolina anhidra y vaselina hidrófila. Las bases de ungüentos en emulsión son emulsiones de agua en aceite (W/O) o emulsiones de aceite en agua (O/W) e incluyen, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lanolina y ácido esteárico. Se preparan bases de pomada solubles en agua ejemplares a partir de polietilenglicoles (PEG) de peso molecular variable (véase, por ejemplo, Remington's, anteriormente).

La composición de la invención se puede incorporar en lociones, que generalmente son preparaciones para aplicar a la superficie de la piel sin fricción, y son típicamente preparaciones líquidas o semilíquidas en las que partículas sólidas, incluido el agente activo, están presentes en una base de agua o alcohol. Las lociones son generalmente suspensiones de sólidos, y pueden comprender una emulsión oleosa líquida del tipo de aceite en agua. Las lociones son formulaciones preferidas para tratar grandes áreas del cuerpo, debido a la facilidad para aplicar una composición más fluida, generalmente es necesario que la materia insoluble en una loción se divida finamente. Las lociones típicamente contendrán agentes de suspensión para producir mejores dispersiones, así como compuestos útiles para localizar y mantener el agente activo en contacto con la piel, por ejemplo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, o similares. Una formulación de loción ejemplar para su uso junto con el presente método contiene propilenglicol mezclado con una vaselina hidrófila tal como la que se puede obtener con la marca comercial Aquaphor® de Beiersdorf, Inc. (Norwalk, CT).

La composición de la invención se pueden incorporar en cremas, que generalmente son emulsiones viscosas líquidas o semisólidas, ya sea de aceite en agua o agua en aceite. Las bases de crema son lavables con agua, y contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase oleosa está generalmente compuesta por vaselina y un alcohol graso tal como alcohol cetílico o estearílico; la fase acuosa usualmente, aunque no necesariamente, excede la fase oleosa en volumen, y generalmente contiene un humectante. El emulsionante en una formulación en crema, como se explica en Remington's, anteriormente, es generalmente un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero.

La composición de la invención se puede incorporar en microemulsiones, que generalmente son estables termodinámicamente, dispersiones isotópicamente claras de dos líquidos inmiscibles, tales como aceite y agua, estabilizados por una película interfacial de moléculas tensioactivas (Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (Nueva York: Marcel Dekker, 1992), volumen 9). Para la preparación de microemulsiones, se necesitan un tensioactivo (emulsionante), cotensioactivo (coemulsionante), una fase oleosa y una fase acuosa. Los tensioactivos adecuados incluyen cualquier tensioactivo que sea útil en la preparación de emulsiones, p. ej., emulsionantes que se usan típicamente en la preparación de cremas, el co-tensioactivo (o "co-emulsionante") se selecciona generalmente del grupo de derivados de poliglicerol, derivados del glicerol y alcoholes grasos. Las combinaciones de emulsionante/coemulsionante preferidas generalmente se seleccionan, aunque no necesariamente, del grupo que consiste en monoestearato de glicerilo y estearato de polioxietileno; polietilenglicol y palmitostearato de etilenglicol; y triglicéridos caprílicos y cápricos y macroglicéridos de olcoilo, la fase acuosa incluye no solo agua sino también, típicamente, tampones, glucosa, propilenglicol polietilenglicoles, preferiblemente polietilenglicoles de bajo peso molecular (por ejemplo, PEG 300 y PEG 400), y/o glicerol, y similares que la fase oleosa generalmente comprenderá, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos, aceites vegetales modificados, aceites de silicona, mezclas de mono, di y triglicéridos, mono y diésteres de PEG (por ejemplo, oleoil-macrogol-glicéridos), etc.

La composición de la invención se puede incorporar en formulaciones gel, que generalmente son sistemas semisólidos que consisten en suspensiones formadas por partículas inorgánicas pequeñas (sistemas de dos fases)

- o moléculas orgánicas grandes distribuidas de forma sustancialmente uniforme por todo un líquido transportador (geles de fase única). Las capas monofásicas se pueden preparar, por ejemplo, combinando el agente activo, un líquido portador y un agente gelificante adecuado tal como tragacanto (del 2 al 5 %), alginato sódico (al 2-10 %), gelatina (al 2-15 %), metilcelulosa (al 3-5 %), carboximetilcelulosa sódica (al 2-5 %), carbómero (al 0,3-5 %) o alcohol polivinílico (al 10-20 %) juntos y en mezcla hasta que se produce un producto semisólido característico.
- 5 Otros agentes gelificantes adecuados incluyen metilhidroxixelulosa, polioxietileno-polioxipropileno, hidroxietilcelulosa y gelatina. Aunque los geles comúnmente emplean un líquido portador acuoso, también se pueden usar alcoholes y aceites como el líquido transportador.
- 10 Se pueden incluir diversos aditivos, conocidos por los expertos en la técnica, en la formulación, p. ej., formulaciones tópicas. Los ejemplos de aditivos incluyen, pero no se limitan a, solubilizantes, potenciadores de la permeación de la piel, opacificantes, conservantes (por ejemplo, antioxidantes), agentes gelificantes, agentes tamponantes, tensioactivos (particularmente tensioactivos no iónicos y anfóteros), emulsionantes, emolientes, agentes espesantes, estabilizadores, humectantes, colorantes, fragancias, y similares. La inclusión de solubilizantes y/o potenciadores de
- 15 la permeación de la piel es particularmente preferida, junto con emulsionantes, emolientes y conservantes. Una formulación tópica óptima comprende aproximadamente: del 2 % en peso al 60 % en peso, preferiblemente del 2 % en peso % al 50 % en peso de solubilizador y/o potenciador de la permeación de la piel; del 2 % en peso al 50 % en peso, preferiblemente del 2 % en peso % al 20 % en peso de emulsionantes; del 2 % en peso al 20 % en peso de emoliente; y del 0,01 al 0,2 % en peso de conservante, constituyendo el agente activo y el vehículo (por ejemplo,
- 20 agua) el resto de la formulación.

Un potenciador de la permeación de la piel sirve para facilitar el paso de niveles terapéuticos de agente activo para pasar a través de un área de tamaño razonable de piel intacta. Los potenciadores adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo: alcoholes inferiores tales como metanol, etanol y 2-propanol; alquil metil sulfóxidos

25 tales como dimetilsulfóxido (DMSO), decilmetilsulfóxido (C.sub. 10 MSO) y tetradecilmethylsulfóxido; pirrolidonas tales como 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona y N-(hidroxietil)pirrolidona; urea; N,N-dietil-m-toluamida; alcanodioles C.sub.2-C.sub.6; diversos disolventes tales como dimetilformamida (DMF), N-dimetilacetamida (DMA) y alcohol tetrahidrofurfurílico; y las azacicloheptan-2-onas 1-sustituídas, particularmente 1-n-dodecilciclazacicloheptan-2-ona (laurocapram; disponible bajo la marca registrada Azone® de Whitby Research Incorporated, Richmond, VA).

30 Los ejemplos de solubilizantes incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: éteres hidrófilos tales como dietilenglicol monoetil éter (etoxidiglicol, disponible comercialmente como Transcutol®) y oleato de dietilenglicol monoetil éter (disponible comercialmente como Soficutol®); derivados de aceite de ricino de polietileno tales como aceite de ricino polioxi 35, aceite de ricino hidrogenado polioxi 40, etc.; polietilenglicol, particularmente polietilenglicoles de menor

35 peso molecular tales como PEG 300 y PEG 400, y derivados de polietilenglicol tales como glicéridos caprílicos/cápricos PEG-8 (disponibles comercialmente como Labrasol®); alquilmetilsulfóxidos tales como DMSO; pirrolidonas tales como 2-pirrolidona y N-metil-2-pirrolidona; y ADN. Muchos solubilizantes también pueden actuar como potenciadores de la absorción. Se puede incorporar un único solubilizante en la formulación, o se puede incorporar una mezcla de solubilizantes en la misma.

40 Los emulsionantes y coemulsionantes adecuados incluyen, sin limitación, los emulsionantes y coemulsionantes descritos con respecto a las formulaciones en microemulsión. Los emolientes incluyen, por ejemplo, propilenglicol, glicerol, miristato de isopropilo, propionato de polipropilenglicol-2 (PPG-2) miristil éter, y similares.

45 Otros agentes activos también se pueden incluir en formulaciones, por ejemplo, otros agentes antiinflamatorios, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, antibióticos, vitaminas, antioxidantes y bloqueadores solares que se encuentran comúnmente en formulaciones de protección solar incluyendo, pero no se limitan a, antranilatos, benzofenonas (particularmente benzofenona-3), derivados de alcanfor, cinamatos (por ejemplo, metoxicinamato de octilo), metanos de dibenzoilo (por ejemplo, butil metoxidibenzoilo metano), ácido p-

50 aminobenzoico (PABA) y derivados de los mismos, y salicilatos (por ejemplo, salicilato de octilo).

Las composiciones, de acuerdo con la presente invención, pueden aplicarse más notablemente como una composición cosmética o farmacéutica para su uso en la piel, membranas mucosas y/o membranas semi-mucosas. Las composiciones se pueden aplicar como protección para la piel y/o como productos para el cuidado de la piel, o

55 como una composición antiarrugas y/o antienvjecimiento. También podemos imaginar otras aplicaciones en el dominio de composiciones combinadas, por ejemplo, con otros agentes activos, también podemos usar los compuestos de acuerdo con la invención en las composiciones cosméticas para la salud corporal y capilar.

Además, los compuestos de acuerdo con la invención, tal como se definió previamente, estimulan el funcionamiento

60 metabólico de las células de la piel. Permiten que la síntesis de proteínas aumente, lo que es esencial para su

funcionamiento, especialmente al aumentar la síntesis de proteínas constitutivas de la matriz extracelular. Los compuestos, de acuerdo con la invención, o la composición que los contiene, tienen así una acción positiva sobre la regeneración tisular. Los compuestos de acuerdo con la invención son particularmente eficientes para tratar trastornos de cicatrización de heridas.

5

Las composiciones, destinadas a activar la síntesis endógena de proteínas FLG, previamente definidas, se usan en o para la fabricación de composiciones farmacéuticas y/o cosméticas, para uso tópico. Se usarán, de una manera más general, para tratar trastornos dermatológicos.

10 Además, de acuerdo con otro aspecto, los compuestos definidos previamente de acuerdo con la invención, destinados a activar la síntesis endógena de proteínas FLG en células de la piel, se usan para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de afecciones dérmicas. La presente invención también se refiere al uso de los compuestos definidos previamente como medicamentos.

15 Además, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un proceso cosmético de tratamiento para el cuidado de la piel y/o cuidado del cabello y las uñas que consiste en aplicar, a la superficie de la piel, una cantidad efectiva del agente activo, tal y como se ha definido previamente, para obtener la acción deseada. Los procesos se pueden utilizar especialmente para tratar de forma curativa y/o preventiva los signos del envejecimiento cutáneo, pero también para proteger la piel y/o el cabello y/o las uñas de las agresiones externas, como por ejemplo los
20 efectos negativos de la radiación, y en particular radiación UV, o para combatir los signos de inflamación cutánea e irritación.

El proceso de tratamiento cosmético relacionado con la invención se puede implementar notablemente aplicando las composiciones cosméticas definidas anteriormente de acuerdo con los procedimientos usados por lo general para
25 composiciones, como por ejemplo la aplicación de cremas, geles, sueros, lociones, leches, champús y cremas de protección solar, en la piel o el cabello, y como pasta de dientes aplicada a las encías. Los modos particulares de realización de este proceso de tratamiento cosmético también resultan de la descripción precedente.

Los compuestos de la presente invención son útiles tanto en aplicaciones terapéuticas como no terapéuticas. En una
30 realización, los compuestos de la invención se usan para aplicaciones terapéuticas. En otra realización, los compuestos de la invención se usan para aplicaciones no terapéuticas, como por ejemplo aplicaciones cosméticas. Las aplicaciones terapéuticas de los procedimientos de la invención incluyen medios para diagnosticar la causa de una afección médica de la piel. En consecuencia, el procedimiento de tratamiento para la afección médica de la piel se puede adaptar para complementar el fenotipo del individuo. Las aplicaciones terapéuticas de los procedimientos
35 de la invención también incluyen medios para determinar si es probable que la piel de un individuo reaccione negativamente a una preparación farmacéutica, como por ejemplo una preparación farmacéutica administrada tópicamente. En ese caso, el individuo puede adaptarse a una preparación farmacéutica particular para proporcionar un beneficio terapéutico máximo mientras se minimiza o se evita cualquier efecto o deseado sobre la condición de la piel del individuo.

40

Las aplicaciones no terapéuticas de los procedimientos de la invención incluyen medios para agrupar individuos para los propósitos de ensayos para agentes, por ejemplo, cosméticos o cualquier otra forma de preparación introducida en el cuerpo. Esto puede ser útil para interpretar los resultados obtenidos de dichos ensayos, por ejemplo, donde la reacción de la piel de diferentes individuos durante el ensayo no es uniforme.

45

La heterogeneidad de las respuestas se puede interpretar de forma más clara agrupando o estratificando a los individuos de acuerdo con su predisposición a las afecciones de la piel. El experto apreciará que al usar este procedimiento, es posible desarrollar agentes que sean adecuados para su uso con algunos individuos pero que no sean adecuados para otros. En consecuencia, se puede construir un panel de agentes, cuyo panel incluya diferentes
50 agentes que tengan la idoneidad para su uso con diferentes individuos. Después de los ensayos, los individuos que deseen usar dicho agente pueden usar un procedimiento de la invención para determinar qué agentes son más adecuados para su uso basándose en su propia predisposición a las afecciones de la piel. Por lo tanto, el procedimiento de la invención permite que los individuos se correspondan con un producto de cuidado personal tal como los enumerados anteriormente.

55

Los procedimientos para identificar el genotipo de profilagrina de un individuo se realizan en material biológico del individuo. Preferiblemente, el material biológico se elimina; del individuo antes de realizar el procedimiento de identificación. En otras palabras, típicamente el material biológico es *ex vivo*. El material *ex vivo* puede cultivarse adicionalmente *in vitro* antes de realizar el procedimiento.

60

Una muestra *ex vivo* puede comprender tejido o células tomadas de cualquier parte del cuerpo. Una muestra *ex vivo* preferida comprende material tomado a partir del sistema circulatorio, o material tomado a partir de una cavidad corporal, como por ejemplo la cavidad oral. Una muestra *ex vivo* particularmente preferida es una muestra de saliva.

5 Los alelos presentes en un individuo se pueden determinar a partir de una muestra de saliva usando procedimientos conocidos en la técnica, como por ejemplo los descritos en Schie and Wilson (1997, Journal of Immunological Methods, 208, 91-101). En consecuencia, un individuo puede proporcionar la muestra *ex vivo* sin necesidad de medios de recogida especializados. Por ejemplo, un individuo puede simplemente proporcionar una muestra de saliva o un hisopo bucal antes de la prueba.

10 El gen y la proteína profilagrina son bien conocidos en la técnica y se describen en Gan y cols. (1990, Biochemistry, 29, 9432-9440). Numerosas secuencias de profilagrina se han depositado en bases de datos de acceso público. Un gen de profilagrina comprende múltiples repeticiones de filagrina, generalmente 10, 11 o 12 repeticiones. Las repeticiones de filagrina son típicamente de la misma longitud (972 pb, 324 aminoácidos en humanos) entre sí,
15 aunque esto es menos típico de las repeticiones de filagrina en los extremos 5' y 3' del ARNm. Las repeticiones de filagrina pueden mostrar una variación de secuencia considerable, típicamente de 0-50 %, más típicamente de 2-30 %, aún más típicamente de 10-15 %, entre repeticiones en el mismo alelo y entre alelos diferentes. Por lo general las variaciones son atribuibles a un cambio de una sola base pero también pueden implicar un cambio en la carga (Gan y cols. (1990) Biochemistry, 29, 9432-9440). Se conoce un consenso del mapa de secuencia de aminoácidos de una repetición de filagrina humana (Gan y cols. (1990) Biochemistry, 29, 9432-9440) y preferentemente una repetición de filagrina tendrá al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente el 90 %, aún más preferentemente al menos el 95 % de identidad de secuencia con esa secuencia consenso o una variante de la secuencia consenso mostrada en Gan y cols. (1990, Biochemistry, 29, 9432-9440). Normalmente, las secuencias de aminoácidos que codifican los extremos amino y carboxilo están más conservadas, al igual que las secuencias de
20 ADN 5' y 3' que flanquean las partes codificantes del gen (Presland y cols. (1992) J Biol Chem, 267(33), 23772-23781).

En una realización, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos del gen NEUFLG, lo que incluye, sin limitación regiones no codificantes (matriz). Las dianas del gen FLG comprenden variantes del gen FLG; mutantes
30 del gen FLG, incluyendo SNP; secuencias no codificantes del gen FLG; alelos, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

De acuerdo con realizaciones de la invención, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada a polinucleótidos del gen FLG en solitario, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no
35 codificantes y similares del gen FLG.

En una realización, un oligonucleótido está dirigido a una secuencia antisentido natural (antisentido natural a las regiones codificantes y no codificantes) de dianas del gen FLG, incluyendo, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a estos. Preferentemente el
40 oligonucleótido es una molécula de ARN o ADN antisentido.

En una realización, los compuestos oligoméricos de la presente invención también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanósina, citidina u otros
45 nucleótidos naturales o no naturales en esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones del compuesto antisentido. Estos compuestos se ensayan entonces usando los procedimientos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana, es de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el
50 70 %. En algunas realizaciones la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80%. En algunas realizaciones la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90%. En algunas realizaciones, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90%,
55 aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100%.

Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico diana para producir una pérdida de actividad, y hay un grado de
60

complementariedad suficiente para evitar la unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias de ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea la unión específica. Tales condiciones incluyen, es decir, condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, y condiciones en las que se realizan los ensayos en el caso de ensayos in vitro.

5

Un compuesto antisentido, ya sea ADN, ARN, quimérico, sustituido, etc., es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o de ARN diana interfiere en la función normal del ADN o ARN diana para producir una pérdida de utilidad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión

10

específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos in vitro, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

En una realización, la elección como diana del gen FLG, incluyendo sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como

15

las SEQ ID NO: 2, y similares, modulan la expresión o función del gen FLG. En una realización, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En una realización, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

En una realización, los oligonucleótidos comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3 a 13 incluyendo

20

secuencias antisentido que se identifican y expanden, usando, por ejemplo PCR, hibridación, etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En una forma de realización, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de

25

azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente invención puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no es necesario describirla aquí.

La especificidad y sensibilidad de antisentido también es empleada por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales y el ser humano. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. De este modo, se establece que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes

30

35

de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

En realizaciones de la presente invención, los compuestos antisentido oligoméricos, particularmente oligonucleótidos, se unen a moléculas de ácidos nucleicos diana y modulan la expresión y/o función de moléculas codificadas por un gen diana. Las funciones de ADN con las que interferirán comprenden, por ejemplo, replicación y transcripción. Las funciones de ARN con las que interferirán comprenden todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ADN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, corte y empalme del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. Las funciones pueden regularse positivamente o inhibirse dependiendo de las funciones deseadas.

40

45

Los compuestos antisentido incluyen compuestos antisentido oligoméricos, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), agentes de splicing alternativo, cebadores, sondas, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana. Por lo tanto, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

50

El direccionamiento de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de esta invención, puede ser un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de un ácido nucleico diana cuya función va a modularse. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o patología particular, o una molécula de

55

ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente invención, el ácido nucleico diana codifica para el gen filagrina (FLG).

El proceso de direccionamiento normalmente también incluye la determinación de al menos una región diana, segmento, o sitio dentro del ácido nucleico diana para que la interacción antisentido se produzca de forma que

60

el término "región" se define como una parte del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de ácidos nucleicos diana están segmentos. Los "segmentos" se definen como partes más pequeñas o sub-partes de regiones dentro de un ácido nucleico diana. "Sitios", tal como se usa en la presente invención, se define como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

5

En una realización, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales del gen de la Filagrina (FLG) y modulan la expresión y/o función del gen FLG (SEQ ID NO: 1). Los ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NO: 2 a 13.

10 En una realización, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de los polinucleótidos del gen Filagrina (FLG) y modulan la expresión y/o función del gen FLG. Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de los polinucleótidos sentido o antisentido del gen FLG.

En una realización, los oligonucleótidos antisentido son específicos para secuencias antisentido naturales del gen
15 FLG donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales del gen FLG modulan la expresión y/o la función del gen FLG.

En una realización, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3 a
20 oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Los ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En una forma de realización, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato,
25 alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no es necesario describirla aquí.

Ya que, tal como se conoce en la técnica, el codón de iniciación de la traducción normalmente es 5'-AUG (en
30 moléculas de ARNm transcrito; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también se denomina el "codón AUG", el "codón de iniciación" o el "codón de iniciación AUG". Una minoría de genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha demostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan in vivo. De este modo, las expresiones "codón de iniciación de la traducción" y "codón de iniciación" pueden englobar muchas secuencias de codón, aun cuando el
35 aminoácido iniciador en cada caso normalmente sea metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de iniciación alternativos, uno cualquiera de los cuales puede utilizarse preferencialmente para la iniciación de la traducción en un tipo particular de célula o tejido, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la invención, "codón de iniciación" y "codón de iniciación de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan in vivo para iniciar la traducción de un ARNm transcrito
40 de un gen que codifica para filagrina (FLG), independientemente de las una o más secuencias de dichos codones. Un codón de terminación de la traducción (o "codón de terminación") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

45 Las expresiones "región de codón de iniciación" y "región de codón de iniciación de la traducción" se refieren a una parte de dicho ARNm o gen que engloba de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de iniciación de la traducción. Análogamente, las expresiones "región de codón de terminación" y "región de codón de terminación de la traducción" se refieren a una parte de dicho ARNm o gen que engloba de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier
50 dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de terminación de la traducción. Por consiguiente, la "región de codón de iniciación" (o "región de codón de iniciación de la traducción") y la "región de codón de terminación" (o "región de codón de terminación de la traducción") son todas las regiones que pueden ser eficazmente elegidas como diana con los compuestos antisentido de la presente invención.

55 El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que se conoce en la técnica para referirse a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción, también es una región que puede ser eficazmente elegida como diana. Dentro del contexto de la presente invención, una región elegida como diana es la región intragénica que engloba el codón de iniciación o de terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

60

Otra región diana incluye la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la técnica para referirse a la parte de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de iniciación de la traducción, y que incluye, por lo tanto, nucleótidos entre el sitio caperuza 5' (5' cap) y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). Otra región diana más incluye la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica para referirse a la parte de un ARNm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y que incluye, por lo tanto, nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). El sitio caperuza 5' de un ARNm comprende un residuo de guanosina N7-metilado unido al residuo más 5' del ARNm mediante un enlace trifosfato 5'-5'. La región caperuza 5' de un ARNm se considera que incluye la propia estructura caperuza 5', además de los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio caperuza. Otra región diana para esta invención es la región caperuza 5'.

Aunque algunos transcritos de ARNm eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", que se escinden de un transcrito antes de que se traduzca. Las regiones restantes (y, por tanto, traducidas) se conocen como "exones" y se someten a splicing juntas para formar una secuencia de ARNm continua. En una realización, la elección como diana de sitios de splicing, es decir, empalmes intrón-exón o empalmes exón-intrón, es particularmente útil en situaciones en las que el splicing aberrante participa en la enfermedad, o en las que una producción en exceso de un producto de splicing particular participa en la enfermedad. Un empalme de fusión aberrante debido a la transposición o delección es otra realización de un sitio diana. Los ARNm transcritos producidos mediante el proceso de splicing de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como "transcritos de fusión". Los intrones pueden ser eficazmente elegidos como diana usando compuestos antisentido dirigidos a, por ejemplo, ADN o pre-ARNm.

En una realización, los oligonucleótidos antisentido se unen a regiones codificantes y/o no codificantes de un polinucleótido diana y modulan la expresión y/o función de la molécula diana.

En una realización, los oligonucleótidos antisentido se unen a polinucleótidos antisentido naturales y modulan la expresión y/o función de la molécula diana.

En otra realización, los oligonucleótidos antisentido se unen a polinucleótidos sentido y modulan la expresión y/o función de la molécula diana.

Pueden producirse transcritos de ARN alternativos a partir de la misma región genómica de ADN. Estos transcritos alternativos son generalmente conocidos como "variantes". Más específicamente, "variantes de pre-ARNm" son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que se diferencian de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de inicio o de parada y contienen tanto secuencia intrónica como exónica.

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

Las variantes pueden producirse mediante el uso de señales alternativas para la transcripción de inicio o de parada. Los Pre-ARNm y ARNm pueden poseer más de un codón de iniciación o codón de terminación. Las variantes que se originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que usan codones de iniciación alternativos se conocen como "variantes de inicio alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Aquellos transcritos que usan un codón de terminación alternativo se conocen como "variantes de parada alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de parada alternativa es la "variante de poli A", en la que los múltiples transcritos producidos resultan de la selección alternativa de una de las "señales de parada de poliA" por la maquinaria de transcripción, produciendo de este modo transcritos que terminan en sitios de poliA únicos. Dentro del contexto de la invención, los tipos de variantes descritos en el presente documento también son realizaciones de ácidos nucleicos diana.

Las ubicaciones en el ácido nucleico diana con las que los compuestos antisentido hibridan se definen como al menos una parte de 5 nucleótidos de longitud de una región diana a la que se dirige un compuesto antisentido activo.

Aunque las secuencias específicas de ciertos segmentos diana a modo de ejemplo se exponen en el presente documento, un experto en la materia reconocerá que éstas sirven para ilustrar y describir realizaciones particulares dentro del alcance de la presente invención. Segmentos diana adicionales son fácilmente identificables por un

experto en la materia en vista de esta divulgación.

Se considera que segmentos diana de 5-100 nucleótidos de longitud que comprenden un tramo de al menos cinco (5) nucleótidos consecutivos seleccionados de dentro de los segmentos diana preferidos ilustrativos también son adecuados para el direccionamiento.

Los segmentos diana pueden comprender secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 5' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente cadena arriba del extremo 5' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Segmentos diana similarmente preferidos se representan por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 3' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un tramo consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente cadena abajo del extremo 3' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Un experto en la materia armado con los segmentos diana ilustrados en el presente documento será capaz, sin excesiva experimentación, de identificar segmentos diana preferidos adicionales.

Una vez se han identificado una o más regiones, segmentos o sitios diana, se eligen compuestos antisentido que son suficientemente complementarios a la diana, es decir, hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para dar el efecto deseado.

En realizaciones de la invención, los oligonucleótidos se unen a una cadena antisentido de una diana particular. Los oligonucleótidos tienen al menos 5 nucleótidos de longitud y pueden sintetizarse de manera que cada oligonucleótido se dirija a secuencias solapantes de forma que los oligonucleótidos se sinteticen para cubrir toda la longitud del polinucleótido diana. Las dianas también incluyen regiones codificantes, además de no codificantes.

En una realización, se prefiere dirigirse a ácidos nucleicos específicos por oligonucleótidos antisentido. El direccionamiento de un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular es un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de una secuencia de ácidos nucleicos cuya función va a modularse. Ésta puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o patología particular, o un polinucleótido no codificante tal como, por ejemplo, ARN no codificante (ARNnc).

Los ARN pueden clasificarse en (1) ARN mensajeros (ARNm), que se traducen en proteínas, y (2) ARN no codificantes de proteína (ARNnc). Los ARNnc comprenden microARN, transcritos antisentido y otras unidades transcripcionales (TU) que contienen una alta densidad de codones de terminación y que carecen de cualquier amplio "marco de lectura abierto". Muchos ARNnc parecen empezar a partir de sitios de iniciación en regiones no traducidas 3' (3'UTRs) de loci codificantes de proteínas. Los ARNnc son frecuentemente raros y al menos la mitad de los ARNnc que se han secuenciado por el consorcio FANTOM no parecen estar poliadenilados. La mayoría de los investigadores se han basado, por motivos obvios, en ARNm poliadenilados que se procesan y se exportan al citoplasma. Recientemente, se demostró que el conjunto de ARN nucleares no poliadenilados puede ser muy grande, y que muchos de dichos transcritos surgen de las llamadas regiones intergénicas. El mecanismo por el que los ARNnc pueden regular la expresión génica es por apareamiento de bases con transcritos diana. Los ARN que funcionan por apareamiento de bases pueden agruparse en (1) ARN codificados en cis que están codificados en la misma ubicación genética, pero en la cadena opuesta a los ARN en los que actúan y, por lo tanto, muestran complementariedad perfecta con su diana, y (2) ARN codificados en trans que están codificados en una ubicación cromosómica distinta de los ARN en los que actúan y generalmente no presentan potencial de apareamiento de bases perfecto con sus dianas.

Sin desear ceñirse a ninguna teoría, la perturbación de un polinucleótido antisentido por los oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento puede alterar la expresión de los ARN mensajeros sentido correspondientes. Sin embargo, esta regulación puede tanto ser discordante (la inactivación antisentido produce elevación de ARN mensajero) como concordante (la inactivación antisentido produce reducción concomitante de ARN mensajero). En estos casos, los oligonucleótidos antisentido pueden ser dirigidos a partes solapantes o no solapantes del transcrito antisentido que producen su inactivación o secuestro. El antisentido codificante, además de no codificante, puede ser dirigido de una manera idéntica y que cualquier categoría es capaz de regular los transcritos sentido correspondientes - tanto de una manera concordante como discordante. Las estrategias que se emplean en identificar nuevos oligonucleótidos para su uso contra una diana pueden basarse en la inactivación de transcritos de ARN antisentido por oligonucleótidos antisentido o cualquier otro medio de modulación de la diana

deseada.

Estrategia 1 En el caso de regulación discordante, la inactivación del transcrito antisentido eleva la expresión del gen convencional (sentido). Si el último gen debe codificar un fármaco diana conocido o supuesto, entonces la inactivación de su homólogo antisentido podría imitar posiblemente la acción de un agonista receptor o una enzima

5 estimulante.

Estrategia 2 En el caso de regulación concordante, podrían inactivarse de forma concomitante tanto los transcritos antisentido como sentido y así lograr una reducción sinérgica de la expresión génica (sentido) convencional. Si, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido se usa para lograr la inactivación, entonces esta estrategia puede usarse para aplicar un oligonucleótido antisentido dirigido al transcrito sentido y otro oligonucleótido antisentido al transcrito

10 antisentido correspondiente, o un único oligonucleótido antisentido energéticamente simétrico que se dirige simultáneamente a transcritos sentido y antisentido solapantes.

De acuerdo con la presente invención, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de ARNip, compuestos de interferencia (ARNi) de

15 ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de ARNip, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Por lo tanto, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener

20 elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan de forma rutinaria linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden comprender construcciones tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única cadena con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o

25 parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden comprender nucleótidos protuberantes en los

30 extremos. Modificaciones adicionales pueden comprender grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una cadena, el ARNds puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. De este modo, el ARNdc puede ser completa o

35 parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de ARNds en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en algunas realizaciones, la expresión o función génica está regulada positivamente. Cuando se forma a partir de dos cadenas, o una única cadena que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones formadoras de dúplex de una sola cadena) son cadenas de ARN complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

40 Una vez introducidos a un sistema, los compuestos de la invención pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden trabajar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como "similares a ADN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o "similares a ARN" (es decir, que generalmente tienen uno o

45 más 2'-hidroxilazúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son "similares a ADN" y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son "similares a ARN". En algunas realizaciones (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

50

En una realización, los oligonucleótidos o compuestos antisentido deseados comprenden al menos un ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (ARNip), ARN de interferencia pequeño (ARNip); un microARN de interferencia (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica

55 inducida por ARN pequeño (ARNa); ARN activantes pequeños (ARNap), o combinaciones de los mismos.

Los ARNdc también pueden activar la expresión génica, un mecanismo que se ha llamado "activación génica inducida por ARN pequeño" o ARNa. Los promotores génicos que se dirigen a ARNdc inducen la potente activación transcripcional de genes asociados. El ARNa se demostró en células humanas usando ARNdc sintéticos, llamados

60 "ARN activantes pequeños" (ARNap). No se sabe actualmente si el ARNa está conservado en otros organismos.

Se ha descubierto que el ARN bicatenario pequeño (ARNdc), tal como ARN de interferencia pequeño (ARNip) y microARN (miARN), es el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como ARN de interferencia (ARNi). El ARNi conduce invariablemente al silenciamiento génico mediante la remodelación de cromatina para suprimir de este modo la transcripción, degradación de ARNm complementario, o bloqueo de la traducción de proteínas. Sin embargo, en los aspectos descritos en detalle en la sección de ejemplos a continuación, se muestra que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o función de los polinucleótidos de la filagrina (FLG) y productos codificados por los mismos. Los dsARN también pueden actuar como ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear ceñirse a ninguna teoría, direccionando secuencias a promotores génicos, los ARNap inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por ARNdc (ARNa).

En una realización adicional, los "segmentos diana preferidos" identificados en el presente documento pueden emplearse en un cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos de la familia de la filagrina (FLG). Los "moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica el gen FLG y que comprenden al menos una parte de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana preferido. El procedimiento de cribado comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos sentido o antisentido naturales del gen FLG con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos del gen FLG, por ejemplo, las SEQ ID NO: 3 a 13. Una vez que se demuestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, tanto disminuir como aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos del gen FLG, el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos del gen FLG, o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente divulgación.

Direccionar la secuencia antisentido natural preferentemente modula la función del gen diana. Por ejemplo, el gen FLG (por ejemplo, número de acceso NM_002016). En una realización, la diana es un polinucleótido antisentido del gen FLG. En una realización, un oligonucleótido antisentido dirigido a secuencias sentido y/o antisentido naturales de polinucleótidos del gen FLG (por ejemplo, número de acceso NM_002016), variantes, alelos, isoformas, homólogas, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias correspondientes. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o sentido del gen FLG.

Los segmentos diana preferidos de la presente invención también pueden combinarse con sus compuestos antisentido complementarios respectivos de la presente invención para formar oligonucleótidos (duplexados) bicatenarios estabilizados.

Se ha demostrado en la materia que dichos restos de oligonucleótidos bicatenarios modulan la expresión de la diana y regulan la traducción, además del procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden someterse a modificaciones químicas. Por ejemplo, se ha demostrado que dichos restos bicatenarios inhiben la diana mediante la hibridación clásica de la cadena antisentido del dúplex a la diana, desencadenando de este modo la degradación enzimática de la diana.

En una realización, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos de filagrina (FLG) (por ejemplo, número de acceso: NM_002016), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

De acuerdo con realizaciones de la invención, la molécula de ácido nucleico diana no se limita a la FLG por sí sola, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas del gen FLG.

En un aspecto, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos del gen NEU4, por ejemplo, los polinucleótidos expuestos en SEQ ID NOS: 2, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 3 a 13. El oligonucleótido que comprende la SEQ ID No. 6 no es parte de la invención.

En una realización, los oligonucleótidos son complementarios a, o se unen a, secuencias de ácido nucleico del gen FLG antisentido, incluyendo sin limitación secuencias sentido y/o antisentido no codificantes asociadas con polinucleótidos del gen FLG y modulan la expresión y/o función de moléculas del gen FLG.

En una realización, los oligonucleótidos son complementarios a, o se unen a, secuencias de ácido nucleico del

antisentido natural del gen FLG, expuesto como SEQ ID NO: 2 y modula la expresión y/o la función de moléculas del gen FLG.

5 En una realización, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 3 a 13 y modula la expresión y/o la función de moléculas del gen FLG.

Las dianas de polinucleótido comprenden FLG, que incluyen miembros de la familia del mismo, variantes del FLG; mutantes del FLG, que incluyen SNP; secuencias no codificantes del FLG; alelos del FLG; variantes de especies, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

10

En una realización, los oligonucleótidos que se dirigen a polinucleótidos del gen FLG, comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia pequeño (ARNip); microARN de interferencia (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (ARNa); o, ARN activante pequeño (ARNap).

15

En una realización, direccionar a los polinucleótidos de la Filagrina (FLG), por ejemplo, las SEQ ID: 2, modula la expresión o función de estas dianas. En una realización, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En una realización, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

20

En una realización, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3 a 13. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

25 En una realización, las SEQ ID NO: 3 a 13 comprenden uno o más nucleótidos de LNA.

La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede llevarse a cabo de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ARNip, etc. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos (por ejemplo, ribozimas) son moléculas de ácidos nucleicos capaces de catalizar una o más de diversas reacciones, que incluyen la capacidad para escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas en un modo específico de secuencia de bases de nucleótidos. Dichas moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden usarse, por ejemplo, para dirigirse prácticamente a cualquier transcrito de ARN.

30

Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos que se escinden en trans muestran promesa como agentes terapéuticos para enfermedad humana (Usman & McSwiggen, (1995) Ann. Rep. Med. Chem. 30, 285-294; Christoffersen and Marr, (1995) J. Med. Chem. 38, 2023-2037). Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden diseñarse para escindir dianas de ARN específicas dentro del fondo del ARN celular. Un acontecimiento de escisión de este tipo convierte el ARNm en no funcional y anula la expresión de proteínas de ese ARN. De este modo puede inhibirse selectivamente la síntesis de una proteína asociada a una patología.

40

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce a través de la parte de unión diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. De este modo, el ácido nucleico enzimático se reconoce primero y a continuación se une a ARN diana mediante apareamiento de bases complementario, y una vez se une al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de unirse un ácido nucleico enzimático y escindir su ARN diana, se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y escindir nuevas dianas.

45

50 Varias estrategias como la selección in vitro (evolución) (Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435) para desarrollar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar diversas reacciones, tales como escisión y ligamiento de enlaces fosfodiéster y enlaces amida.

El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuiría significativamente a cualquier estrategia que empleara ribozimas que escinden ARN con el fin de regular la expresión génica. La ribozima de cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una velocidad catalítica (kcat) de aproximadamente 1 min⁻¹ en presencia de concentraciones saturantes (10 mM) de cofactor de Mg²⁺. Se ha demostrado que una ribozima de "ligasa de ARN" artificial cataliza la reacción de auto-modificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min⁻¹. Además, se sabe que ciertas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de recuperación

55

60

- que se aproximan a 100 min⁻¹. Finalmente, la sustitución de un resto específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo con ciertos análogos de nucleótido da ribozimas modificadas que muestran una mejora de hasta 10 veces en la velocidad catalítica. Estos descubrimientos demuestran que las ribozimas pueden promover transformaciones químicas con velocidades catalíticas que son significativamente superiores a aquellas mostradas in vitro por la mayoría de las ribozimas que se auto-escinden naturales. Entonces es posible que las estructuras de ciertas ribozimas que se auto-escinden puedan optimizarse para dar la máxima actividad catalítica, o que puedan prepararse motivos de ARN completamente nuevos que muestran velocidades significativamente más rápidas para la escisión de fosfodiéster de ARN.
- 5 La escisión intermolecular de un sustrato de ARN por un catalizador de ARN que se ajusta al modelo de "cabeza de martillo" se demostró por primera vez en 1987 (Uhlenbeck, O. C. (1987) *Nature*, 328: 596-600). Se recuperó el catalizador de ARN y se hizo reaccionar con múltiples moléculas de ARN, demostrando que era verdaderamente catalítico.
- 10 Los ARN catalíticos diseñados basado en el motivo "hammerhead" han sido utilizados para cortar secuencias diana específicas haciendo cambios de base apropiado en el ARN catalítico para mantener la base necesaria en el apareamiento con las secuencias diana. Esto ha permitido el uso del ARN catalítico para escindir secuencias diana específicas e indica que los ARN catalíticos diseñados según el modelo de "cabeza de martillo" pueden escindir posiblemente ARN de sustrato específico in vivo.
- 15 La interferencia de ARN (ARNi) se ha convertido en una poderosa herramienta para modular la expresión génica en mamíferos y células de mamífero, este enfoque requiere la administración de ARN interferente pequeño (ARNsi) bien como el propio ARN o bien como ADN, usando un plásmido de expresión o virus y la secuencia codificante para ARN de horquilla pequeño que se procesa a ARNsi. Este sistema permite el eficaz transporte de los pre-ARNsi al
- 20 citoplasma en el que son activos y permiten el uso de promotores regulados y específicos de tejido para la expresión génica.
- 25 En una realización, un oligonucleótido o compuesto antisentido comprende un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) y/o ácido desoxirribonucleico (ADN), o un mimético, quimera, análogo u homólogo del mismo.
- 30 Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleótidos naturales, azúcares, y enlaces internucleosídicos covalentes (esqueletos) así como oligonucleótidos que tienen partes no naturales que funcionan de manera similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos son frecuentemente deseados con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por un ácido nucleico diana y elevada estabilidad en presencia de nucleasas.
- 35 De acuerdo con la presente invención, los oligonucleótidos o "compuestos antisentido" incluyen oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, ARN, ADN, mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos), ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de ARNip, compuestos de interferencia (ARNi) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de ARNip, ARNap, ARNa, y otros compuestos oligoméricos que
- 40 hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Por lo tanto, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan de forma rutinaria linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo
- 45 para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden comprender construcciones tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única cadena con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede
- 50 contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden comprender nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden comprender grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se
- 55 forma a partir de solo una cadena, el ARNdc puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. De este modo, el ARNdc puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de ARNdc en líneas celulares transgénicas. Cuando se forma a partir de dos cadenas, o una única cadena que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para
- 60 formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones formadoras de dúplex de una sola cadena) son cadenas de ARN

complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

Una vez introducidos a un sistema, los compuestos de la invención pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden trabajar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como "similares a ADN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o "similares a ARN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilo o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son "similares a ADN" y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son "similares a ARN". En algunas realizaciones (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

Los compuestos antisentido de acuerdo con esta invención pueden comprender una parte antisentido de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleótidos (es decir, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleósidos enlazados) de longitud. Esto se refiere a la longitud de la cadena antisentido o parte del compuesto antisentido. En otras palabras, un compuesto antisentido monocatenario de la invención comprende de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos, y un compuesto antisentido bicatenario de la invención (tal como un ARNdc, por ejemplo) comprende una cadena sentido y antisentido o parte de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que éste comprenda partes antisentido de 5, 6, 7,8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74,75, 76, 77, 78, 79, o 80 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

En una realización, los compuestos antisentido de la invención tienen partes antisentido de 10 a 50 nucleótidos de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que éstos integran oligonucleótidos que tienen partes antisentido de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40,41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos tienen 15 nucleótidos de longitud.

En una realización, los compuestos antisentido o de oligonucleótido de la invención tienen partes antisentido de 12 o 13 a 30 nucleótidos de longitud. Un experto en la materia apreciará que éstos integran compuestos antisentido que tienen partes antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

En una realización, los compuestos oligoméricos de la presente invención también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina o citidina en esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de ARNds. Estos compuestos se ensayan entonces usando los procedimientos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana, es de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80%. En algunas realizaciones la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90%. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100%.

En una realización, los oligonucleótidos antisentido, como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en las SEQ ID NO: 2 a 13 comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En una realización, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

En una realización, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácidos nucleicos sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas al gen FLG y las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 1 y 2. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de las SEQ ID NO: 1 y 2.

Ciertos oligonucleótidos preferidos de esta invención son oligonucleótidos quiméricos. "Oligonucleótidos quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos normalmente contienen al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas incrementada, captación en células incrementada, afinidad de unión por la diana incrementada) y una región que es un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de ARNasa H, por lo tanto, produce la escisión del ARN diana, potenciando así enormemente la eficiencia de la modulación antisentido de la expresión génica. Por consiguiente, frecuentemente pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxi oligonucleótidos de fosforotioato que hibridan con la misma región diana. La escisión del ARN diana puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y, si fuera necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica. En una realización, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de unión de la diana, y, normalmente, una región que actúa de sustrato para ARNasa H. La afinidad de un oligonucleótido por su diana (en este caso, un ácido nucleico que codifica ras) se determina rutinariamente midiendo la T_m de un par de oligonucleótido/diana, que es la temperatura a la que se disocian el oligonucleótido y la diana; la disociación se detecta espectrofotométricamente. Cuanto mayor sea la T_m , mayor será la afinidad del oligonucleótido por la diana.

Se pueden formar compuestos antisentido quiméricos de la invención como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos, tal como se ha descrito anteriormente. Como tales, estos compuestos también se han referido en la técnica como híbridos o gapmeros. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estas estructuras híbridas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU con nos. 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

En una realización, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, de la forma más preferente un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-flúor. En otra realización, las modificaciones de ARN incluyen modificaciones de 2'-flúor, 2'-amino y 2'-O-metilo en la ribosa de pirimidinas, residuos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Dichas modificaciones se incorporan rutinariamente en oligonucleótidos y se ha demostrado que estos oligonucleótidos tienen una mayor T_m (es decir, mayor afinidad de unión a diana) que los 2'-desoxi oligonucleótidos contra una diana dada. El efecto de tal afinidad incrementada es potenciar enormemente la inhibición por oligonucleótidos de ARNi de la expresión génica. La ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de los dúplex de ARN:ADN; por lo tanto, la activación de esta enzima produce la escisión del ARN diana, y de este modo puede potenciar enormemente la eficiencia de inhibición de ARN. La escisión del ARN diana puede demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En una realización, el oligonucleótido quimérico también se modifica para potenciar la resistencia a nucleasas. Las células contienen diversas exo- y endo-nucleasas que pueden degradar ácidos nucleicos. Se ha demostrado que varias modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido en el que se incorporan sea más resistente a la digestión por nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo. La resistencia a nucleasas se mide rutinariamente incubando oligonucleótidos con extractos celulares o soluciones de nucleasa aisladas y midiendo el grado de oligonucleótido intacto que queda con el tiempo, normalmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que se han modificado para potenciar su resistencia a nucleasas sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos sin modificar. Se ha demostrado que diversas modificaciones de oligonucleótidos potencian o confieren resistencia a nucleasas. Los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato son actualmente más preferidos. En algunos casos, las modificaciones de oligonucleótidos que potencian la afinidad de unión a diana son, también, independientemente, capaces de potenciar la resistencia a nucleasas.

Ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos preferidos concebidos por esta invención incluyen aquellos que comprenden esqueletos modificados, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Los más preferidos son oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y aquellos con esqueletos de heteroátomo, particularmente esqueletos de $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$ [conocido como un esqueleto de metileno(metilimino) o MMI], $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ y $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$, donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como O-P-O-CH_2 . Los esqueletos de amida divulgados por De Mesmaeker y cols., (1995) Acc. Chem. Res. 28:366-374 también se prefieren. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino (Summerton and Weller, patente de EE.UU N.º 5.034.506). En otras realizaciones, tal como el esqueleto de ácido nucleico peptídico (PNA), el esqueleto de fosfodiéster del

oligonucleótido se sustituye por un esqueleto de poliamida, estando los nucleótidos unidos directamente o indirectamente a los átomos de nitrógeno azo del esqueleto de poliamida. Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃ OCH₃, OCH₃ O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂ o O(CH₂)_n CH₃,
 5 donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo inferior de C1 a C10, alcoxialcoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido: Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN: un grupo indicador; un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros
 10 sustituyentes que tienen propiedades similares. Unas modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂ CH₂ OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)]. Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-propoxi(2'-OCH₂ CH₂CH₃) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como
 15 ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden comprender, adicionalmente o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Tal como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados solo poco frecuentemente o
 20 transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y frecuentemente denominada en la técnica 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, además de nucleótidos sintéticos, por ejemplo, 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u
 25 otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N6(6-aminohexil)adenina y 2,6-diaminopurina. Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, por ejemplo, inosina. Se ha demostrado que las sustituciones 5-ME-C aumentan la estabilidad de los dúplex de ácidos nucleicos en 0,6-1,2°C, y actualmente son las sustituciones de base preferidas.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad o captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen pero no se limitan a restos lipídicos como restos de colesterol, restos de colesterilo, una cadena alifática, p. ej. restos de dodecandiol o undecilo, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético. Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y procedimientos para preparar dichos oligonucleótidos, son
 30 conocidos en la técnica, por ejemplo, las patentes de EE.UU N.º. 5.138.045, 5.218.105 y 5.459.255.

No es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido dado estén uniformemente modificadas, y de hecho más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente puede incorporarse en un único oligonucleótido o incluso dentro de un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente invención también incluye
 40 oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos, tal como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En otra realización, la molécula de ácido nucleico de la presente invención está conjugada con otro resto que incluye, aunque no se limita a, nucleótidos abásicos, poliéter, poliamina, poliamidas, péptidos, hidratos de carbono,
 45 lípido, o compuestos de polihidrocarburo. Los expertos en la materia reconocerán que estas moléculas pueden enlazarse a uno o más de cualquiera de los nucleótidos que comprenden la molécula de ácido nucleico en varias posiciones en el azúcar, base o grupo fosfato.

Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta invención pueden prepararse cómoda y rutinariamente mediante la técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. Equipo para dichas síntesis es comercializado por varios proveedores que incluyen Applied Biosystems. También puede emplearse cualquier otro medio para dicha síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos está perfectamente dentro de las aptitudes de un experto en la materia. También es muy conocido usar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados. También es muy conocido usar técnicas similares y amiditos modificados disponibles en el
 50 mercado y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditos modificados con psoraleno y/o CPG (disponible de Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos marcados de forma fluorescente, biotinilados u otros oligonucleótidos modificados tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.

De acuerdo con la invención, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para potenciar la

- potencia, especificidad y duración de la acción y ampliar las vías de administración de oligonucleótidos comprende químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. Esto puede lograrse sustituyendo algunos de los monómeros en los oligonucleótidos actuales por monómeros LNA. El oligonucleótido modificado con LNA puede tener un tamaño similar al compuesto parental o puede ser más grande o preferentemente más pequeño. Se prefiere 5 que dichas oligonucleótidos modificados con LNA contengan menos de aproximadamente el 70%, más preferentemente menos de aproximadamente el 60%, de la manera más preferente menos de aproximadamente el 50% de monómeros de LNA y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.
- 10 Esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos comprenden, aunque no se limitan a, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos que comprenden 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que comprenden 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados en 2'-5' de estos, y aquellos que tienen 15 polaridad invertida, donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los enlaces anteriores que contienen fósforo comprenden, pero no se limitan a, las Patentes de Estados Unidos N.º 3.687.808; 4.469.863; 20 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

Esqueletos de oligonucleótido modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en ellos tienen esqueletos 25 que se forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo mixtos, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Éstos comprenden aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; 30 esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilnimino y metilhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtos.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los oligonucleósidos comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. N.º 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 35 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, el 40 esqueleto, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana apropiado. Dicho compuesto oligomérico, un oligonucleótido mimético que se ha demostrado que tiene excelente propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se 45 unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno azo de la parte de amida del esqueleto. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos PNA comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. N.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262.

Enseñanzas adicionales de compuestos de PNA pueden encontrarse en Nielsen, et al. (1991) Science 254, 1497-50 1500.

En una realización de la invención, los oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y oligonucleótidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-, conocidos como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI, -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂N(CH₃)-N(CH₃)CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂- CH₂- donde el 55 esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como -O-P-O-CH₂- de la patente de EE.UU. N.º 5.489.677, citada anteriormente, y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. N.º 5.602.240. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino de la patente de EE.UU. N.º 5.034.506, citada anteriormente.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos 60 preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S-

o N-alquililo; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C a CO sustituido o sin sustituir o alqueno y alquino C2 a CO. Se prefieren particularmente $O(CH_2)_n OmCH_3$, $O(CH_2)_n$, OCH_3 , $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ y $O(CH_2)_nON(CH_2)_mCH_3$ en las que n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, 5 (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE), es decir un grupo alcóxalcoxi. Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, también conocido como 2-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.

15 Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como 20 restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. N.º. 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.76.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

25 Los oligonucleótidos también pueden comprender modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica simplemente "base"). Tal como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" comprenden las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados comprenden otros nucleótidos sintéticos y naturales 30 tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroxi-metilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halógeno, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros 35 uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Además, los nucleótidos comprenden los divulgados en la patente de Estados Unidos N.º 3.687.808, aquellos divulgados en "The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering", páginas 858-859, Kroschwitz, J.L., 40 ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos divulgados por Englisch et al., "Angewandte Chemie, International Edition", 1991, 30, página 613, y aquellos divulgados por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, "Antisense Research and Applications", páginas 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B. ca., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estos comprenden pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que comprenden 45 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina incrementan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico alrededor de 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y actualmente son las sustituciones base preferidas, de manera aún más particular cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-Ometoxietilo.

50 Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados citados anteriormente, así como otros nucleótidos modificados, comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. N.º. 3.687.808, así como 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.596.091; 5.614.617; 5.750.692, y 5.681.941.

55 Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados, que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido.

Dichos restos comprenden, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un 60 tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o

undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-toxicolesterol.

- 5 Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjugados de oligonucleótidos comprenden, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU N.º. 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717,5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830;
- 10 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241,5.391.723; 5.416.203,5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928y5.688.941.

- Los compuestos de la presente invención también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente invención comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos identificados en el presente documento en un esfuerzo por el descubrimiento de fármacos para esclarecer relaciones que existen entre los polinucleótidos de filagrina (FLG) y una patología, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular los polinucleótidos del gen FLG que comprenden poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente invención, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de los polinucleótidos del gen FLG y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento, y opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o muestra tratada con otro compuesto de la divulgación. Estos procedimientos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.
- 15
20
25

Evaluación de la regulación positiva o inhibición de la expresión génica:

- La transferencia de un ácido nucleico exógeno a una célula u organismo huésped puede evaluarse detectando directamente la presencia del ácido nucleico en la célula u organismo. Dicha detección puede lograrse mediante varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la presencia del ácido nucleico exógeno puede detectarse por Southern blot o por una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores que amplifican específicamente secuencias de nucleótidos asociadas al ácido nucleico. La expresión de los ácidos nucleicos exógenos también puede medirse usando procedimientos convencionales que incluyen análisis de expresión génica. Por ejemplo, el ARNm producido a partir de un ácido nucleico exógeno puede detectarse y cuantificarse usando una Northern blot y PCR con transcripción inversa (RT-PCR).
- 30
35

- La expresión de ARN del ácido nucleico exógeno también puede detectarse midiendo una actividad enzimática o una actividad de proteína reportera. Por ejemplo, puede medirse la actividad moduladora antisentido indirectamente como una disminución o aumento en la expresión de ácido nucleico diana como una indicación de que el ácido nucleico exógeno está produciendo el ARN efector. Basándose en conservación de secuencias, pueden diseñarse cebadores y usarse para amplificar regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante más altamente expresada de cada gen puede usarse para construir un gen de control modelo, aunque puede usarse cualquier región codificante o no codificante. Cada gen de control se ensambla insertando cada región codificante entre una región codificante reportera y su señal de poli(A). Estos plásmidos producirían un ARNm con un gen indicador en la parte cadena arriba del gen y una posible diana de ARNi en la región no codificante 3'. La eficacia de oligonucleótidos antisentido individuales se ensayaría por modulación del gen indicador. Genes indicadores útiles en los procedimientos de la presente invención incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), beta-glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína cian fluorescente (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS), y derivados de los mismos. Están disponibles múltiples marcadores seleccionables que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Los procedimientos de determinación de la modulación de un gen indicador son muy conocidos en la técnica, e incluyen, aunque no se limitan a, procedimientos fluorimétricos (por ejemplo, espectroscopía de fluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de la resistencia a antibióticos.
- 40
45
50
55

- La expresión de la proteína y del ARNm de FLG puede controlarse utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en este documento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos como ELISA
- 60

para medir los niveles de proteína. Los kits de ensayo ELISA para FLG están disponibles comercialmente, p. ej., en R&D Systems (Minneapolis, MN).

5 En unas realizaciones, la expresión del gen FLG (p. ej. ARNm o proteína) en una muestra (p. ej. células o tejidos *in vivo* o *in vitro*) tratados con un oligonucleótido antisentido de la invención se evalúan por comparación con la expresión del gen FLG en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o del ácido nucleico puede compararse usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, con una muestra tratada de forma simulada y sin tratar. De forma alternativa, puede hacerse una comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido control (p. ej., uno que tenga una secuencia modificada o diferente) dependiendo de la información deseada. En otra realización, una diferencia en la expresión de la proteína FLG o su ácido nucleico en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar puede compararse con la diferencia en la expresión de un ácido nucleico diferente (incluyendo cualquier estándar que el investigador considere apropiado, p. ej. un gen de mantenimiento) en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar.

15 Las diferencias observadas pueden expresarse como se desee, p. ej. en forma de proporción o fracción, para su uso en comparación con un control. En realizaciones, el nivel de ARNm o proteína del gen FLG, en una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente invención, aumenta o disminuye entre aproximadamente 1,25 veces a unas 10 veces o más en relación con una muestra sin tratar o una muestra tratada con un ácido nucleico de control. En realizaciones, el nivel de ARNm o proteína del gen FLG aumenta o disminuye en al menos
20 aproximadamente 1,25 veces, al menos aproximadamente 1,3 veces, al menos aproximadamente 1,4 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 1,6 veces, al menos aproximadamente 1,7 veces, al menos aproximadamente 1,8 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 4,5 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 5,5 veces, al
25 menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, o al menos aproximadamente 10 veces o más.

30 **Kits, reactivos de investigación, de diagnóstico y terapéuticos**

Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse para diagnóstico, agentes terapéuticos y profilaxis, y como reactivos de investigación y componentes de kits. Además, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con exquisita especificidad, son usados frecuentemente por los expertos en la materia
35 para aclarar la función de genes particulares o para distinguir entre funciones de diversos miembros de una vía biológica.

Para su uso en kits y diagnósticos y en diversos sistemas biológicos, los compuestos de la presente invención, tanto solos como en combinación con otros compuestos o terapéuticos, son útiles como herramientas en análisis
40 diferenciales y/o combinatorios para aclarar patrones de expresión de una parte o de todo el complemento de genes expresados dentro de células y tejidos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sistema biológico" o "sistema" se define como cualquier organismo, célula, cultivo celular o tejido que expresa, o se ha hecho competente para expresar productos de genes
45 de la familia de la filagrina (FLG). Éstos incluyen, aunque no se limitan a, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

Como un ejemplo no limitante, patrones de expresión dentro de células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido se comparan con células o tejidos de control no tratados con compuestos antisentido y los
50 patrones producidos se analizan para niveles diferenciales de expresión génica, ya que están relacionados, por ejemplo, con asociación de enfermedad, vía de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis pueden realizarse en células estimuladas o sin estimular y en presencia o ausencia de otros compuestos que afectan los patrones de expresión.

55 Ejemplos de procedimientos de análisis de expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices de ADN o microarrays, SAGE (análisis en serie de expresión génica), LEE (amplificación de ADN digerido con enzimas de restricción), TOGA (análisis de expresión génica total), matrices de proteínas y proteómica, etiqueta de secuencia expresada (EST), secuenciación, huella genética de ARN sustractivos (SuRF), clonación sustractiva, presentación diferencial (DD), hibridación genómica comparativa, FISH (hibridación fluorescente *in situ*), técnicas y procedimientos
60 de espectrometría de masas.

Los compuestos de la invención son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos hibridan con ácidos nucleicos que codifican la familia de la filagrina (FLG). Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con dicha eficiencia y en dichas condiciones que se han descrito en el presente documento como moduladores eficaces del gen FLG son cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o detección, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican el gen FLG y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales del gen FLG. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas de la invención con un ácido nucleico que codifica el gen FLG, puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden comprender conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido, o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel del gen FLG en una muestra.

La especificidad y sensibilidad de antisentido también son empleadas por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales, que incluyen seres humanos. Los fármacos de oligonucleótido antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. De este modo, se establece que los compuestos antisentido pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

Para terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, que se sospecha o tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión del gen FLG se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta invención. Por ejemplo, en una realización no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva del modulador del gen FLG. Los moduladores del gen FLG de la presente invención modulan de manera efectiva la actividad del gen FLG o modulan la expresión de la proteína del gen FLG. En una realización, la actividad o expresión del gen FLG en un animal se inhibe en aproximadamente un 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del gen FLG en un animal se inhibe en aproximadamente un 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión del gen FLG en un animal se inhibe el 50 % o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de la filagrina (FLG) al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

En una realización, la actividad o expresión de la familia de la filagrina (FLG) en un animal aumenta aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión de la FLG en un animal aumenta aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión de la FLG en un animal aumenta el 50 % o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm del gen FLG al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

Por ejemplo, la reducción de la expresión de la familia de la filagrina (FLG) puede medirse en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro líquido corporal, tejido u órgano del animal. Preferentemente, las células contenidas dentro de dichos líquidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos del gen FLG y/o la propia proteína FLG.

Los compuestos de la invención pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto a un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. El uso de los compuestos y procedimientos de la invención también pueden ser útiles profilácticamente.

Conjugados

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados, que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden comprender grupos conjugados covalentemente unidos a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas de genes indicadores, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las

- propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o eliminación de los compuestos de la presente invención. Grupos conjugados representativos se describen en la solicitud de patente internacional n.º. PCT/US92/09196, depositada el 23 de 1992, y la patente de EE.UU. No. 6.287.860. Restos conjugados incluyen, aunque no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la invención también pueden conjugarse con principios activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.
- 20 Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estos conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de los EE.UU. Pat. N.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717, 5.580.731; 5.380.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241, 5.391.723; 5.416.203, 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

Formulaciones

- 30 Los compuestos de la invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de estas formulaciones de ayuda en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los EE.UU. Pat. N.º 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.165; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.
- 40 Aunque los oligonucleótidos antisentido no necesitan administrarse en el contexto de un vector con el fin de modular la expresión y/o función de una diana, realizaciones de la invención se refieren a construcciones de vector de expresión para la expresión de oligonucleótidos antisentido, que comprende promotores, secuencias de genes promotores híbridos y poseen una fuerte actividad promotora constitutiva, o una actividad promotora que puede inducirse en el caso deseado.
- 45 En una realización, la práctica de la invención implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de administración de ácidos nucleicos adecuado. En una realización, ese sistema incluye un vector no viral enlazado operativamente al polinucleótido. Ejemplos de dichos vectores no virales incluyen el oligonucleótido solo (por ejemplo, una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 3 a 13) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.
- 50 Sistemas de administración de ácidos nucleicos adecuados adicionales incluyen vector viral, normalmente secuencia de al menos uno de un adenovirus, virus asociado a adenovirus (AAV), adenovirus dependiente de cooperador, retrovirus, o complejo de virus hemaglutinante de Japón-liposoma (HVJ). Preferentemente, el vector viral comprende un promotor de eucariota fuerte operativamente enlazado al polinucleótido, por ejemplo, un promotor del citomegalovirus (CMV).

- 55 Vectores preferidos adicionales incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney y virus basados en el HIV. Un vector viral basado en el HIV preferido comprende al menos dos vectores en los que los genes gag y pol son de un genoma del HIV y el gen

env es de otro virus. Se prefieren vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de pox tales como vectores de ortopox o avipox, vectores del virus del herpes tales como un vector del virus del herpes simple I (HSV), vectores de adenovirus y vectores de virus asociados a adenovirus.

- 5 Los compuestos antisentido de la invención engloban cualquier sal, éster o sal de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, que incluye un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU No. 6.287.860.

- 15 La presente invención también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido de la divulgación. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en varias formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas que incluyen administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluye por nebulizador;
- 20 intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular.

Para el tratamiento de los tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede realizarse, p. ej. por inyección o perfusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en el líquido cefalorraquídeo se describe, p. ej. en la solicitud de patente de EE.UU . Pub. N.º 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression».

Cuando lo que se pretende es que los oligonucleótidos antisentido de la presente invención pueden administrarse a células del sistema nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de facilitar la penetración de los oligonucleótidos antisentido a través de la barrera hematoencefálica del sujeto. La inyección puede realizarse, por ejemplo, en la corteza entorrinal o en el hipocampo. La aplicación de factores neurotróficos mediante la administración de un vector adenovirus en las neuronas motoras del tejido muscular se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU N.º 6.632.427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons». La distribución de vectores directamente al cerebro, por ejemplo, el cuerpo estriado, el tálamo, el hipocampo, o la sustancia negra, se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 6.756.523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain". La administración puede ser rápida como por inyección o realizarse a lo largo de un período de tiempo ya sea por perfusión lenta o mediante la administración de formulaciones de liberación lenta.

40 El oligonucleótidos antisentido sujeto también pueden unirse o conjugarse con agentes que proporcionen unas propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse a cualquier sustancia, conocida en la técnica por favorecer la penetración o el transporte a través de la barrera hematoencefálica, como un anticuerpo contra el receptor de la transferrina, y administrarse por inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede enlazarse con un vector viral, por ejemplo, que hace al compuesto antisentido más eficaz y/o aumenta el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La alteración de la barrera hematoencefálica osmótica también puede llevarse a cabo mediante perfusión, p. ej. de azúcares incluyendo, pero sin limitarse a, mesoeritritol, xilitol, D(+)-galactosa, D(+)-lactosa, D(+)-xilosa, dulcitol, mioinositol, L(-)-fructosa, D(-)-manitol, D(+)-glucosa, D(+)-arabinosa, D(-)-arabinosa, celobiosa, D(+)-maltosa, D(+)-

50 rafinosa, L(+)-ramnosa, D(+)-melibiosa, D(-)-ribosa, adonitol, D(+)-arabitol, L(-)-arabitol, D(+)-fucosa, L(-)-fucosa, D(-)-lixosa, L(+)-lixosa y L(-)-lixosa o aminoácidos, incluyendo, pero sin limitarse a, glutamina, lisina, arginina, asparagina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, Valina, tirosina y taurina. Los procedimientos y material para aumentar la penetración en la barrera hematoencefálica se describen, p. ej. en las patentes de EE.UU. N.º 4.866.042, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier," 6.294.520, "Material for passage through the blood-brain barrier," y 6.936.589, "Parenteral delivery systems"

Los compuestos antisentido sujetos también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o

absorción. Por ejemplo, pueden incluirse lípidos catiónicos en la formulación para facilitar la absorción de oligonucleótidos. Una de dichas composiciones que se ha demostrado que facilita la absorción es LIPOFECTIN (disponible en GIBCO BRL, Bethesda, MD).

5 Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para administración por vía oral. Composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden comprender parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, espráis, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares.

10 Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales muy conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el (los) vehículo(s) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e
15 íntimamente los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto.

La composición de la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, aunque no se limitan a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles
20 blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

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

30 Las emulsiones normalmente son sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que normalmente superan 0,1 ~~micras~~ ^{micras}; además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente como una solución en o bien la fase acuosa, fase oleosa o bien él mismo como una fase independiente. Las microemulsiones están incluidas como una realización de la presente invención. Las emulsiones y sus usos son muy conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en
35 la patente de EE.UU N.º 6.287.860.

Formulaciones de la presente invención incluyen formulaciones liposomales. Tal como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada
40 por un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que va a administrarse. Los liposomas catiónicos son liposomas positivamente cargados que se cree que interactúan con moléculas de ADN negativamente cargadas para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente atrapan el ADN en vez de complejarse con él. Se han usado tanto liposomas catiónicos como no catiónicos para administrar ADN a células.

45 Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", una expresión que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan en liposomas, estos lípidos especializados producen liposomas con vidas en circulación mejoradas con respecto a los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estéricamente
50 estabilizados son aquellos en los que parte de la parte de lípido formado de vesícula del liposoma comprende uno o más glucolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU N.º 6.287.860.

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender
55 tensioactivos. El uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la técnica. Los agentes tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. Pat. N.º 6.287.860.

En una realización, la presente invención emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar la
60 administración eficiente de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar en la difusión de

fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes. Los mejoradores de penetración y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. Pat. N.º 6.287.860.

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

- 10 Formulaciones preferidas para administración tópica incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención están en mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo, dioleoil-fosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina) negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoil-fosfatidiletanolamina DOTMA).

Para administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la invención pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden estar complejados con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Ácidos grasos y ésteres preferidos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU N.º 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicomprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Formulaciones orales preferidas son aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención se administran conjuntamente con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Ácidos biliares/sales y ácidos grasos preferidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU N.º 6.287.860. También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Potenciadores de la penetración adicionales incluyen éter polioxietileno-9-laurílico, éter polioxietileno-20-cetilico. Los oligonucleótidos de la invención pueden administrarse por vía oral, en forma granulada que incluye partículas secadas por pulverización, o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU N.º 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden comprender soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, aunque no se limitan a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables

Ciertas realizaciones de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque no se limitan a, fármacos quimioterapéuticos para el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, esorrubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetilnitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperóxido-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la divulgación, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más de otros de dichos agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Fármacos antiinflamatorios, que incluyen, aunque no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, aunque no se limitan a, ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la invención. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros

fármacos no antisentido también están dentro del alcance de la presente invención. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

En otra realización relacionado, las composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular de la filagrina (FLG), y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la invención pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana de la filagrina (FLG). Se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido en el presente documento y otros pueden seleccionarse de entre compuestos adecuados conocidos en la técnica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

Dosificación:

Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) están dentro de la experiencia de los expertos en la materia. La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad de la patología que va a tratarse, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución de la patología. Pueden calcularse programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden estimarse basándose en las CE50 que se ha descubierto que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la materia pueden estimar fácilmente tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos corporales o tejidos. Tras el tratamiento satisfactorio, puede desearse que el paciente reciba terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la patología, en el que el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que oscilan de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 20 años.

En realizaciones, un paciente se trata con una dosificación de fármaco que es al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90, o al menos aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Ciertas dosis inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, p. ej., en la patente de EE.UU. Pat. N.º 7.563.884, "Antisense modulation of PTP1B 8 expression".

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos no limitantes sirven para ilustrar realizaciones seleccionadas de la invención.

Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido al gen de la Filagrina (FLG) y/o una hebra sentido del polinucleótido FLG.

Tal como se ha indicado anteriormente, la expresión «oligonucleótido específico para» o «dianas de oligonucleótido» se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una parte del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una parte de un transcrito de ARNm del gen elegido como diana.

La selección de los oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácido nucleico e indican regiones de identidad u homología. Dichos programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo de especies permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no han sido secuenciados. Se realizan Southern blots para

5 permitir una determinación del grado de identidad entre genes de especies diana y otras especies. Realizando Southern blots a grados de astringencia variables, tal como es muy conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que muestran un alto grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico diana en un sujeto a controlar y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico correspondientes en otras especies. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente invención.

10 Un compuesto antisentido es "específicamente hibridable" cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico diana para causar una modulación de la función y/o la actividad, y existe un grado de complementariedad suficiente para evitar unión inespecífica del compuesto antisentido a secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que se realizan ensayos en el caso de ensayos *in vitro*

15 Las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden determinarse por uno o más ensayos in vitro, tal como se conoce en la técnica. Por ejemplo, las propiedades de los oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden obtenerse por determinación de la intensidad de unión entre el antisentido natural diana y una posible molécula de fármaco usando el ensayo de la curva de fusión.

20 La intensidad de unión entre el antisentido natural diana y una posible molécula de fármaco (Molécula) puede estimarse usando cualquiera de los procedimientos establecidos de medición de la intensidad de interacciones intermoleculares, por ejemplo, un ensayo de la curva de fusión.

25 El ensayo de la curva de fusión determina la temperatura a la que se produce una rápida transición de conformación bicatenaria a monocatenaria para el complejo de antisentido natural/molécula. Esta temperatura es ampliamente aceptada como una medida fiable de la intensidad de interacción entre las dos moléculas.

30 Puede realizarse un ensayo de la curva de fusión usando una copia de ADNc de la molécula de ARN antisentido natural real o un nucleótido de ADN o ARN sintético correspondiente al sitio de unión de la molécula. Están disponibles múltiples kits que contienen todos los reactivos necesarios para realizar este ensayo (por ejemplo, kit MeltDoctor de Applied Biosystems Inc.). Estos kits incluyen una solución tampón adecuada que contiene uno de los colorantes de unión a ADN bicatenario (ADNdc) (tales como los colorantes ABI HRM, SYBR Green, SYTO, etc.). Las propiedades de los colorantes de ADNdc son tales que casi no emiten fluorescencia en forma libre, pero son altamente fluorescentes cuando se unen a ADNdc.

35 Para realizar el ensayo, el ADNc o un oligonucleótido correspondiente se mezclan con la molécula en concentraciones definidas por los protocolos del fabricante particulares. La mezcla se calienta a 95 °C para disociar todos los complejos de ADNdc previamente formados, luego se enfría lentamente a temperatura ambiente u otra temperatura menor definida por el fabricante del kit para permitir que se hibriden las moléculas de ADN. Entonces, los complejos recientemente formados se calientan lentamente a 95 °C con recopilación de datos continua simultánea sobre la cantidad de fluorescencia que se produce por la reacción. La intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional a las cantidades de ADNdc presentes en la reacción. Los datos pueden recogerse usando un instrumento de PCR en tiempo real compatible con el kit (por ejemplo, sistema de PCR en tiempo real 45 StepOne Plus de ABI o el instrumento LightTyper, Roche Diagnostics, Lewes, Reino Unido).

50 Los picos de fusión se construyen representando la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura (-d(Fluorescencia)/dT) sobre el eje y) contra la temperatura (eje x) usando software apropiado (por ejemplo, LightTyper (Roche) o SDS Dissociation Curve, ABI). Los datos se analizan para identificar la temperatura de la rápida transición del complejo de ADNdc a moléculas monocatenarias. Esta temperatura se llama T_m y es directamente proporcional a la intensidad de la interacción entre las dos moléculas. Normalmente, la T_m superará los 40 °C.

55 **Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos del gen FLG**

Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido

60 Se cultivaron células HepG2 de ATCC (nº de cat HB-8065) en medio de cultivo (MEM/EBSS (Hyclone nº de cat SH30024, o Mediatech nº de cat MT-10-010-CV) +10 % FBS (Mediatech nº de cat MT35- 011-CV)+ penicilina/estreptomycin (Mediatech nº de cat MT30-002-CI)) a 37°C y el 5 % de CO₂. El día del experimento, el

medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de cultivo fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 μ M. Se incubaron dos μ l de esta solución con 400 μ l de medio Opti-MEM (Gibco, n° de cat 31985-070) y 4 μ l de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, n° de cat 11668039) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HEPG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 μ l de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector simulado. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y el 5% de CO₂, el medio se cambió a medio de cultivo fresco 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (n° de cat Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (n° de cat 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (n° de cat AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (n° de cat 4368813) tal como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (n.º de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems; Hs00856927 gl de Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando el termociclador Mx4000 (Stratagene). El cambio de veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferente de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada. *Resultados:* los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de FLG1 en células HepG2 se incrementan significativamente con dos de los oligos diseñados para BGAK056431 antisentido del FLG1 (Fig 1).

Tratamiento de células 518A2 con oligonucleótidos antisentido

Se cultivaron células 518A2 obtenidas del Albert Einstein-Montefiore Cancer Center, NY en medio de cultivo (MEM/EBSS (Hyclone n° de cat SH30024, o Mediatech n° de cat MT-10-010-CV) +10% FBS (Mediatech n° de cat MT35- 011-CV)+ penicilina/estreptomina (Mediatech n° de cat MT30-002-CI)) a 37°C y el 5% de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de 1,5 x 10⁵/ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y el 5 % de CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de cultivo fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 μ M Se incubaron dos μ l de esta solución con 400 μ l de medio Opti-MEM (Gibco, n° de cat 31985-070) y 4 μ l de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, n° de cat 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células 518A2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 μ l de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector simulado. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y el 5 % de CO₂, el medio se cambió a medio de cultivo fresco 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (n.º de cat Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (n.º de cat 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (n° de cat AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (n° de cat 4368813) tal como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (n.º de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00856927 gl de Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems). El cambio de veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferente de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada. *Resultados:* los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de FLG en células 518A2 se incrementan significativamente con dos de los oligos diseñados para AK056431 antisentido del FLG1 (Fig 2). Otro conjunto de resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de FLG en células 518A2 se incrementan significativamente con dos de los oligos diseñados para AK056431 antisentido del FLG1 (Fig 3).

Ejemplo 3: Modulación de la expresión y actividad del gen FLG

Tratamiento de células 518A2 con compuestos pequeños

Se cultivaron células 518A2 en medio de cultivo ((Mediatech n.º de cat 10-013-CV) +5 % FBS (Mediatech n.º de cat MT35-011-CV) + penicilina/estreptomina (Mediatech n.º de cat MT30-002-C1)) a 37 °C con el 5 % de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de aproximadamente 1x10⁴/ml (o una dilución de aproximadamente 1/5 a partir del 90 % de confluencia) en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante la noche. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a 2 ml de medio

- de cultivo fresco. Los compuestos pequeños se diluyeron en DMSO a una concentración de 1000 uM. El día del experimento, esta solución se diluyó 1:100 en medio de crecimiento fresco. El DMSO puro se diluyó en medio a la misma proporción (1:100) para tratar las muestras del vehículo control. Para dosificar un pocillo, se añadieron 200 µl del compuesto o solución de DMSO puro directamente al pocillo de una placa de 6 pocillos. La concentración final de compuestos fue 1 uM. El volumen de dosificación se ajustó si se deseaba una concentración diferente de compuesto. Después de la dosificación se incubaron las placas durante la noche a 37 °C y el 5 % de CO₂. 24 h después de la adición de compuestos pequeños, el medio se reemplazó por medio de cultivo nuevo y la dosificación se repitió como se describió anteriormente. 24 h después de la segunda dosificación, el ARN se extrajo de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (n.º de cat Z3105) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN total a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc de alta capacidad de Applied Biosystems (n.º de cat 4368813) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica mediante PCR en tiempo real usando ABI. Mezcla de expresión génica Taqman (n.º de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (por ejemplo, ensayo n.º de ID Hs00856927_g1 para FLG). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando el termociclador StepOne (ABI). El ensayo para 18S usado para normalizar los niveles de ARNm fue fabricado por ABI (n.º de cat 4319413E). El cambio de veces en la expresión génica después del tratamiento con compuestos pequeños se calculó basándose en la diferencia en valores de dCt 18S normalizados entre muestras tratadas y transfectadas de manera simulada.
- 20 *Resultados*: los resultados de la PCR en tiempo real muestran un cambio de veces en la expresión del ARNm de la filagrina en células 518A2 tratadas con moléculas pequeñas (Fig. 4)

Tratamiento de queratinocitos primarios con compuestos pequeños

- 25 Los queratinocitos primarios (de Promocell) crecieron en un medio de crecimiento (Keratinocyte Growth Media, Promocell n.º de cat C-20011) a 37 °C con 5 % de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de aproximadamente 5x10⁴/ml (o una dilución de aproximadamente 1/3 a partir del 90 % de confluencia) en placas recubiertas de colágeno de 24 pocillos (placas Beckton Dickinson BioCoat n.º de cat 35 6408) y se incubaron a 37 °C y el 5 % de CO₂ durante la noche. El día del experimento, el medio en las placas de 24 pocillos se cambió a 1 ml de medio de cultivo fresco. Los compuestos pequeños se diluyeron en DMSO a una concentración de 1000 uM. El día del experimento, esta solución se diluyó 1:100 en medio de crecimiento fresco. El DMSO puro se diluyó en los medios a la misma proporción (1: 100) para tratar muestras del vehículo control. Para dosificar un pocillo, se añadieron 100 µl del compuesto o solución de DMSO puro directamente al pocillo de una placa de 24 pocillos. La concentración final de compuestos fue 1 uM. El volumen de dosificación se ajustó si se deseaba una concentración diferente de compuesto. Después de la dosificación, las placas se incubaron durante la noche a 37 °C y 5 % de CO₂, 24 h después de la adición de compuestos pequeños, el medio se reemplazó por medio de cultivo nuevo y la dosificación se repitió como se describió anteriormente, 24 h después de la segunda dosificación, el ARN se extrajo de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (n.º de cat Z3105) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ADN total a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc de alta capacidad de Applied Biosystems (n.º de cat 4368813) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica mediante PCR en tiempo real usando Mezcla de expresión génica Taqman de ABI (n.º de cat 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (por ejemplo, ensayo n.º de ID Hs0856927_g1 para FLG). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 oC durante 2 min, 95 oC durante 10 min, 40 ciclos de (95oC durante 15 segundos, 60 oC durante 1 min) usando el termociclador StepOne (ABI). El ensayo para 18S usado para normalizar los niveles de ARNm fue fabricado por AB1 (n.º de cat 4319413E). El cambio de veces en la expresión génica después del tratamiento con compuestos pequeños se calculó basándose en la diferencia en valores de dCt 18S-normalizados entre muestras tratadas y transfectadas de manera simulada. *Resultados*: los resultados de la PCR en tiempo real muestran un cambio de veces en la expresión de ARNm de la Filagrina en queratinocitos primarios tratados con moléculas pequeñas (Fig. 4). Otro conjunto de resultados de PCR en tiempo real muestra que los niveles de transcritos naturales antisentido del gen FLG en los queratinocitos primarios disminuyen significativamente después del tratamiento con moléculas pequeñas de Bupropión, Bendipino y Topiramato (Fig. 5).

- A pesar de que la invención se ha ilustrado y descrito con respecto a una o más implementaciones, a otros expertos en la materia se le ocurrirán alteraciones y modificaciones equivalentes después de la lectura y comprensión de esta memoria descriptiva y los dibujos adjuntos. Además, aunque se ha descrito una característica particular de la divulgación con respecto a solo una de varias implementaciones, dicha característica puede combinarse con una o más de otras características de las otras implementaciones, ya que puede desearse y ser ventajoso para cualquier aplicación dada o particular.

60

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> CuRNA, Inc.
- 5 <120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA FILAGRINA (FLG) MEDIANTE LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DEL GEN FLG
- <130> FLG
- <150>US61/246.080
- <151> 25/09/2009
- 10 <150>US61/307.654
- <151> 24/02/2010
- <160> 13
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 15 <211> 12747
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <300>
- <308> NM_002016
- 20 <309> 08/08/2010
- <313> (1)..(12747)
- <400> 1

```

cttttggtga acaaggttca catttattgc caaaagatgt ctactctcct ggaaaacatc      60
tttgccataa ttaatctttt caagcaatat tcaaaaaaag ataaaaaacac tgacacattg      120
agtaaaaaag agctgaagga acttctggaa aaggaatttc ggcaaatcct gaagaatcca      180
gatgaccagc atatggttga tgtcttcatg gatcacttgg atatagacca caacaagaaa      240
attgacttca ctgagtttct tctgatggta ttcaagttgg ctcaagcata ttatgagtct      300
accagaaaag agaatttacc gatatcagga cacaagcaca gaaagcacag tcatcatgat      360
aaacatgaag ataataaaca ggaagaaaac aaagaaaaca gaaaaagacc ctcaagtctg      420
gaaagaagaa acaatagaaa agggaataag ggaagatcca agagcccaag agaaacaggg      480
gggaaaaggc atgaatctag ttctgaaaaa aaagaaagaa aaggatattc acctactcat      540
agagaagaag aatatggaaa aaacatcat aactcaagta aaaaagagaa aaacaagact      600
gaaaatacta gattaggaga caataggaag aggctaagtg aaagacttga agagaagaa      660
gacaatgaag aaggagtata tgattatgaa aatacaggaa gaatgactca aaaatggata      720
caatcaggcc atattgccac atattacaca atccaggatg aagcctatga caccactgat      780
agtctattag aagaaaacaa aatatatgaa agatcaaggt catctgatgg caaatcatca      840
tctcaagtga acaggtcaag acatgaaaat acaagccagg taccattgca ggagtccagg      900
acaagaaagc gtaggggatc cagagttagc caggacaggg acagtgaggg aactcagaa      960
gactctgaga ggcactctgg gtcggttcc agaaacatc atggatctgc gtgggagcag     1020
tcaagagatg gctccagaca cccaggtcc catgatgaag acagagccag tcatgggcac     1080

```

25

ES 2 664 591 T3

tctgcagaca gctccagaca atcaggcaact cgtcaccgag agacttcctc tcgtggacag 1140
 actgcatcat cccatgaaca ggcaagatca agtccaggag aaagacatgg atccggccac 1200
 cagcagtcag cagacagctc cagacactca gccactgggc gcgggcaagc ttcattctgca 1260
 gtcagcagtc gtggacaccg ggggtctagc ggtagtcagg ccagtgacag tgagggacat 1320
 tcagaaaact cagacacaca atcagtgta ggcacaggaa aggctgggct gagacagcag 1380
 agccaccaag agtccacacg tggccggta ggggaacggc ctggacgttc agggctcttc 1440
 ctctaccagg tgagcactca tgaacagcct gactctgccc atggacggac cgggaccagc 1500
 actggaggaa gacaaggatc gcaccacgag caggcacgag acagctccag gcattcagcg 1560
 toccaagagg gtcaggacac cattcgtgga cccccgggt caagcagagg aggaaggcag 1620
 ggatcccacc acgagcaatc ggtaaatagg tctggacact caggttcca tcacagccac 1680
 accacatccc aggggaaggtc tgatgcctcc catgggcagt caggatccag aagtgcaagc 1740
 agacaaaac gaaatgagga acaatcagga gacggcacca ggactcagg gtcacgtcat 1800
 catgaagctt cctctcaggc tgacagctct agacactcac aggtgggcca gggacaatca 1860
 tcggggccca ggacaagtag gaaccaggga tccagtgta gccaggacag tgacagtcag 1920
 ggacactcag aagactctga gaggtggtct ggtctgctt ccagaaacca tcatggatct 1980
 gctcaggagc agtcaagaga tggctccaga cacoccaggc cccatcacga agacagagct 2040
 ggtcatgggc actctgcaga cagctccaga aaatcaggca ctcgtcacac acagaattcc 2100
 tctagtggac aggctgcgtc atcccatgaa caggcaagat caagtgcagg agaaaagacat 2160
 ggatcccgcc accagctcca gtcagcagac agtccagac actcaggcac tgggcacgga 2220
 caagcttcat ctgcagtcag agacagtgga caccgagggt ccagtggtag tcaggccact 2280
 gacagtgagg gacattcaga agactcagac acacagtcag tgtcaggcca tggacaggct 2340
 ggtcaccatc agcagagcca ccaagagtcc gcaogtgacc ggtcagggga aaggtctcga 2400
 cgttcagggc ctttcctcta ccaggtgagc actcataaac agtctgagtc ctcccatgga 2460
 tggacagggc ccagcactgg agtaagacaa ggatcccacc atgagcaggc acgagacaac 2520
 tccaggcaact cagcatcca agatggtcag gacaccatc gtggacacc ggggtcaagc 2580
 agaagaggaa ggcaggggtc ccaccacgag caatcggtag ataggctctgg aactcaggg 2640
 tccatcaca gccacaccac atcccaggga aggtctgatg cctcccgtgg gcagtcagga 2700
 tccagaagtg caagcagaac aacacgtaat gaggaacaat caagagacgg ctccaggcac 2760
 tcagggtcac gtcacatga agcttcctct catgccgaca tctctagaca ctcacaggca 2820
 ggccagggac aatcagaggg gtccaggaca agcaggcgc agggatccag tgttagccag 2880
 gacagtgaca gtgagggaca ttcagaagac tctgagaggt ggtctgggtc tgcttccaga 2940
 aaccatogtg gatctgctca ggagcagta agaatggct ccagacacc caggctccat 3000

ES 2 664 591 T3

cacgaagaca gagccgggtca cgggcactct gcagacagct ccagacaatc aggaactcct 3060
cacgcagaga cttcctctgy tggacaggct gcgtcatccc atgaacaggc aagatcaagt 3120
ccaggagaaa gacacggatc ccgccaccag cagtcagcag acagctccag acactcaggc 3180
attccgcgca gacaagcttc atctgcagtc agagacagtg gacactgggg gtccagtggg 3240
agtcaggcca gtgatagtga gggacattca gaggagttag acacacagtc agtgtcaggc 3300
catggcagag atgggcccc tccagcagag caccaagagt ccgcacgtga ctggtcaggg 3360
ggaaggtctg gacgttcagg gtctttcctc taccaggtga gcactcatga acagtctgag 3420
tctgccatg ggcggaccag gaccagcact ggacgaagac aaggatcccc ccacgagcag 3480
gcacgagaca gctccaggca ctcagcgtcc caagagggtc aggacacccat tcgtgcacac 3540
ccggggtcaa ggagaggagg aaggcaggga tcccaccatg agcaatcggg agatagatct 3600
ggacactcag ggtcccatca cagccacacc acatcccagg gaaggtctga tgccctccat 3660
gggcagtcag gatccagaag tgcaagcaga caaactcgtc aggacaaaac atcaggagac 3720
ggctccaggc actcagggtc acgtcaccat gaagctgcct cttgggctga cagctctaga 3780
cactcacagg tgggacagga acaatcatcg gggccagga caagcaggca ccagggatcc 3840
agtgtagacc aggacagtga cagttagaga cactcagacg actccgagag gttgtctggg 3900
tctgcttcca gaaaccatca tggatcttct cgggagcagt caagagatgg ctccagacac 3960
cctgggttcc atcaagaaga cagagccagt caccggcact ctgcagacag ctccagacaa 4020
tcaggcactc atcacacaga gtcttctctc catggacagg ctgtgtcctc ccatgaacag 4080
gcaagatcaa gtccaggaga aagacatgga tcccgccacc agcagtcagc agacagctcc 4140
agacactcag gcattgggca cagacaagct tcactctgag tcagagacag tggacaccga 4200
gggtccagtg gtagtcaggt cactaacagt gaggacatt cagaagactc agacacacag 4260
tcagtgtcag cccacggaca agctgggccc catcagcaga gccacaaaag gtccgcacgt 4320
ggccagtcag gggaaagctc tggacgttca aggtcttcc tctaccaggt gagctctcat 4380
gaacagtctg agtccacaca cggacagact gcacccagca ctggagggaag acaaggatcc 4440
cgccatgagc aggcacgaaa cagctctagg cactcagcat cccaagacgg tcaggacacc 4500
attcgtggac acccggggtc aagcagagga ggaaggcagg gatcctacca cgagcaatca 4560
gtagataggt ctggacactc aggtaccat cacagccaca ccacacccca gggagggtct 4620
gatgcctccc atgggcagtc aggaccaga agtgcaagca ggcaaacaag aatgaggaa 4680
caatcaggag acggctccag gcaactcagg tcacgtcacc atgaacctc cactcgggcc 4740
ggcagctcta gacactcaca ggtgggcccag ggagaatcag cgggggtcaa gacaagcagg 4800
cgccagggat ccagtgttag tcaggacagg gacagttagg gacactcaga agactctgag 4860
agggcgtctg agtcggcttc cagaaacat tatggatctg ctccgggagca gtcaagacat 4920
ggctccagga accccaggtc ccatcaagaa gatagagcca gtcattgggca ctctgcagag 4980

ES 2 664 591 T3

agctccagac aatcaggcac tcgtcatgca gagacttcct ctggtggaca ggctgcatca 5040
 tcccaggaac aggcaaggtc aagtccagga gaaagacatg gatcccgccca ccagcagtc 5100
 gcagacagct ccacagactc aggcactggg cgcagacaag attcatctgt agtcggagac 5160
 agtggaaacc gaggggccag tggtagccag gccagtgaca gcgagggaca ctcagaagag 5220
 tcagacacac agtcagtgtc agcccacgga caggctgggc cccatcagca gagccaccaa 5280
 gagtccacac gtggccagtc aggggaaagg tctggacggt cagggtcttt cctctaccag 5340
 gtgagcactc atgaacagtc tgagtccgcc catggacgca cagggccccag cactggagga 5400
 agacaaagat cccgccacga gcaggcacga gacagctcca ggcaactcagc gtcccaagag 5460
 ggtcaggaca ccattcgtgg acaccagggt tcaagcagag gaggaaggca gggatcccac 5520
 tatgagcaat cggtagatag ttctggacac tcagggtctc atcacagcca caccacgtcc 5580
 caggaaaggt ctgatgtctc ccgtgggcag tcaggatcca gaagtgtcag cagacaaaca 5640
 cgtaatgaga aacaatcagg agacggctcc aggcactcag ggtcgcgtca ccatgaagct 5700
 tcctctcggg ccgacagctc tagacactcg cagggtgggc agggacaatc atcagggccc 5760
 aggacaagca ggaaccaggg atccagtgtt agccaggaca gtgacagtca gggacactca 5820
 gaagactctg agaggtggtc tgggtctgct tccagaaacc atcttgatc tgcttgggag 5880
 cagtcaagag atggctccag acaccctggg tcccatcacg aagacagagc cggtcacggg 5940
 cactctgcag acagctccag acaatcaggc actcgtcaca cagagtcttc ctctcgtgga 6000
 caggctgcgt catcccatga acaggcaaga tcaagtgcag gagaagaca tggatcccac 6060
 caccagctcc agtcagcaga cagctccaga cactcaggca ttgggcatgg acaagcttca 6120
 tctgcagtca gagacagtgg acaccgaggg tacagtggta gtcaggccag tgacagtgag 6180
 ggacattcag aagactcaga cacacagtca gtgtcagcac agggaaaagc tgggcccacat 6240
 cagcagagcc acaaagagtc cgcacgtggc cagtcagggg aaagctctgg acgttcaggg 6300
 tctttcctct accaggtgag cactcatgaa cagtctgagt ccaccatgg acagtctgcy 6360
 cccagcactg gaggaagaca aggatcccat tatgatcagg cacaagacag ctccaggcac 6420
 tcagcatccc aagagggtca ggacaccatt cgtggacacc cggggccaag cagaggagga 6480
 agacaggggt cccaccaaga gcaatcggta gataggtctg gacactcagc gtctcatcac 6540
 agccacacca catcccaggg aaggtctgat gcctcccgtg ggcagtcagc atccagaagt 6600
 gcaagcagaa aaacatatga caaggaacaa tcaggagatg gctctaggca ctcagggtcg 6660
 catcatcatg aagcttctc ttgggccgac agctctagac actcactggt gggccagggg 6720
 caatcatcag ggcccaggac aagcaggccc cggggatcca gtgttagcca ggacagtgac 6780
 agtgagggac actcagaaga ttctgagagg cggctctgggt ctgcgtccag aaaccatcat 6840
 ggatctgctc aggagcagtc aagagatggc tccagacacc ccagggtcca tcacgaagac 6900

ES 2 664 591 T3

agagccggtc atgggcactc tgcagagagc tccagacaat caggcactca tcatgcagag 6960
 aattcctctg gtggacaggc tgcacatcc catgaacagg caagatcaag tgcaggagag 7020
 agacacggat cccaccacca gcagtcagca gacagctcca gacactcagg cattgggcac 7080
 ggacaagctt catctgcagt cagagacagt ggacaccgag ggtccagtgg tagtcaggcc 7140
 agtgacagtg agggacattc agaagactca gacacacagt cagtgtcagc ccacggacag 7200
 gctgggcccc atcagcagag ccaccaagag tccacacgtg gccggtcagc aggaaggtct 7260
 ggacgttcag ggtctttcct ctaccaggtg agcactcatg aacagtctga gtccgccat 7320
 ggacggaccg ggaccagcac tggaggaaga caaggatccc accacaagca ggcacgagac 7380
 agctccaggc actcaacgtc ccaagagggt caggacacca ttcattggaca cccggggtca 7440
 agcagtggag gaaggcaggg atcccactac gagcaattgg tagatagatc tggacactca 7500
 gggctctcct acagccacac cacatcccag ggaaggtctg atgcctccca tgggactca 7560
 ggatccagaa gtgcaagcag acaaactcgt aacgatgaac aatcaggaga cggctccagg 7620
 cactcagggt cgcgtcacca tgaagcttcc tctcgggccc acagctctgg aactcgcag 7680
 gtgggccagg gacaatcaga ggggccagg acaagcagga actggggatc cagttttagc 7740
 caggacagtg acagtcaggg aactcagaa gactctgaga ggtggtctgg gtctgtctcc 7800
 agaaaccatc atggatctgc tcaggagcag ctaagagatg gctccagaca ccccaggctc 7860
 catcaagaag acagagctgg tcatgggcac tctgcagaca gctccagaca atcaggcact 7920
 cgtcacacac agacttcctc tgggtggacag gctgcatcat cccatgaaca ggcaagatca 7980
 agtgcaggag aaagacatgg atcccaccac cagcagtcag cagacagctc cagacactca 8040
 ggcatctggc acggacaagc ttcactctgca gtcagagaca gtggacaccg agggtagcag 8100
 ggtagtccag ccagtgacaa tgagggacat tcagaagact cagacacaca gtcagtgtca 8160
 gccccaggac aggtctgggtc ccatcagcag agccaccaag agtccgcacg tggccggctc 8220
 ggggaaacgt ctggacattc aggatcttct ctctaccagg tgagcactca tgaacagtct 8280
 gagtctctcc atggatggac ggggccagc actagaggaa gacaaggatc ccgcatgag 8340
 caggcacaag acagctccag gcactcagca tcccagagc gtcaggacac cattcgtgga 8400
 caccgggggt caagcagagg aggaaggcag gggtagcacc acgagcattc ggtagatagc 8460
 tctggacact cagggtccca tcacagccac accacatccc agggagggtc tgatgcctcc 8520
 cgtgggcagt caggatccag aagtgcaagc agaacaacac gtaatgagga acaatcagga 8580
 gacggctcca ggcactcagg gtcgcgtcac catgaagctt ccaactcatg cgacatctct 8640
 agacactcac aggcagtcca gggacaatca gaggggtcca ggagaagcag gcgccaggga 8700
 tccagtgtga gccaggacag tgacagtgag ggacattcag aagactctga gaggtgtct 8760
 gggctctgct ccagaaacca tcatggatct gctcaggagc agctaagaga tggctccaga 8820
 caccacaggt cccatcaaga agacagagct ggtcatgggc actctgcaga cagctccaga 8880

ES 2 664 591 T3

caatcaggca ctcgtcacac acagacttoc tctggtaggac aggetgcatc atcccatgaa 8940
 caggcaagat caagtgcagg agaaagacat ggatcccacc accagcagtc agcagacagc 9000
 tccagacact caggcattgg gcacggacaa gcttcatctg cagtcagaga cagtgagcac 9060
 cgagggtaca gtggtagtca ggccagtgac aatgagggac attcagaaga ctcagacaca 9120
 cagtcagtggt cagcccacgg acaggctggg tcccatcagc agagccacca agagtccgca 9180
 cgtggccggg caggggaaac gtctggacat tcaggatctt tectctacca ggtgagcact 9240
 catgaacagt ctgagtcctc ccatggatgg acggggccca gcactagagg aagacaagga 9300
 tcccgccatg agcaggcaca agacagctcc aggcactcag catcccaata cggtcaggac 9360
 accattcgtg gacaccggg gtcaagcaga ggaggaaggc aggggtacca ccacgagcat 9420
 tcggtagata gctctggaca ctcagggtcc catcacagcc acaccacatc ccagggaagg 9480
 tctgatgcct cccgtgggca gtcaggatcc agaagtgcaa gcagaacaac acgtaatgag 9540
 gaacaatcag gagacagctc caggcactca gtgtcacgtc accatgaagc ttccactcat 9600
 gccgacatct ctagacactc acaggcagtc cagggacaat cagaggggtc caggagaagc 9660
 aggcgccagg gatccagtgt gagccaggac agtgacagtg agggacattc agaagactct 9720
 gagaggtggt ctgggtctgc ttccagaaac catcgtggat ctgttcagga gcagtcaagg 9780
 cacggctcca gacaccccag gtcccatcac gaagacagag ccggtcacgg gcactctgca 9840
 gaccgctcca gacaatcagg cactcgtcac gcagagactt cctctgggtg acaggetgca 9900
 tcatcccatg aacaggcaag atcaagtcca ggagagagac acggatcccg ccaccagcag 9960
 tcagcagaca gctccagaca ctcaggcatt ccgctgggac aagcttcac tgcagtcaga 10020
 gacagtagac actgggggtc cagtggtagt caggccagtg atagtgaggg acattcagaa 10080
 gagtcagaca cacagtcagt gtcaggccat ggacaggctg ggccccatca gcagagccac 10140
 caagagtccg cacgtgaccg gtcaggggga aggtctggac gttcagggtc tttcctctac 10200
 caggtgagca ctcatgaaca gtctgagtct gcccatgggc ggaccaggac cagcactgga 10260
 cgaagacaag gatcccacca cgagcaggca cgagacagct ccaggcactc agcgtcccaa 10320
 gagggtcagg acaccattcg tggacaccog ggtcaagca gaagaggaag gcagggatcc 10380
 cactacgagc aatcggtaga taggtctgga cactcagggt cccatcacag ccacaccaca 10440
 tcccagggaa ggtctgatgc ctcccgtggg cagtcaggat ccagaagtgc cagcagacaa 10500
 actcgtaatg acgaacaatc aggagatggc tccaggcact catggtcaca tcaccatgaa 10560
 gcttccactc aggcggacag ctctagacac tcacagtcog gccagggaca atcagcgggg 10620
 cccaggacaa gcaggaacca gggatccagt gttagccagg acagtgacag tcagggacac 10680
 tcagaagact ctgagaggtg gtctgggtct gcttcagaa accatcgtgg atctgctcag 10740
 gagcagtcaa gagatggctc cagacacccc acgtcccatc acgaagacag agccggctac 10800

ES 2 664 591 T3

gggcactctg cagagagctc cagacaatca ggcactcatc atgcagagaa ttcctctggt 10860
 ggacaggctg catcatccca tgaacaggca agatcaagtg caggagagag acatggatcc 10920
 caccaccagc agtcagcaga cagetccaga caetcaggca ttgggcacgg acaagcttca 10980
 tctgcagtca gagacagtgg acaccgaggg tccagtggta gtcaggccag tgacagtgag 11040
 ggacattcag aagactcaga cacacagtca gtgtcagccc acggacaggc tgggccccat 11100
 cagcagagcc accaagagtc cacacgtggc cggtcagcag gaaggtctgg acgttcaggg 11160
 tctttcctct accaggtgag cactcatgaa cagtctgagt ctgccatgg acgggtctgg 11220
 cccagtactg gaggaagaca aggatcccgc cagcagcagg cacgagacag ctccaggcac 11280
 tcagcgtccc aagagggtea ggacaccatt cgtggacacc cggggtaag gagaggagga 11340
 agacagggat cctaccacga gcaatcggta gataggtctg gacactcagg gtccatcac 11400
 agccacacca catcccaggg aaggtctgat gcctcccatg ggcagtccag atccagaagt 11460
 gcaagcagag aaacacgtaa tgaggaacag tcaggagacg gctccaggca ctcagggtcg 11520
 cgtcaccatg aagcttccac tcaggctgac agctctagac actcacagtc cggccagggt 11580
 gaatcagcgg ggtccaggag aagcaggcgc cagggatcca gtgttagcca ggacagtgac 11640
 agtgaggcat acccagagga ctctgagagg cgatctgagt ctgcttccag aaaccatcat 11700
 ggatcttctc gggagcagtc aagagatggc tccagacacc cggatcctc tcaccgcgat 11760
 acagccagtc atgtacagtc ttcacctgta cagtcagact ctagtaccgc taaggaacat 11820
 ggtcacttta gtagtcttcc acaagattct gcgtatcact caggaatata gtcacgtggc 11880
 agtcctcaca gttctagttc ttatcattat caatctgagg gcaactgaaag gcaaaaagg 11940
 caatcagggt tagtttgag acatggcagc tatggtagtg cagattatga ttatggtgaa 12000
 tccgggttta gacactctca gcacggaagt gttagttaca attccaatcc tgttgttttc 12060
 aaggaagat ctgatctctg taaagcaagt gcgtttggta aagatcatcc aaggtattat 12120
 gcaacgtata ttaataagga cccagggtta tgtggccatt ctagtatat atcgaaacaa 12180
 ctgggattta gtcagtcaca gagatactat tactatgagt aagaaattaa tggcaaagga 12240
 attaatccaa gaatagaaga atgaagcaag ttcactttca atcaagaaac ttcataatac 12300
 tttcaggga gttatctttt cctgtcaatc tgtttaaaat atgctatagt atttcattag 12360
 tttggtgta gcttattttt attgtgtaat gatctttaa cgctatattt cagaaatatt 12420
 aatggaaga aatcaatctc atggagagct aactttagaa aactagctgg agtattttag 12480
 gagattctgg gtcaagtaat gttttatggt tttgaaagt taagttttag aactcccca 12540
 aatttctaaa ttaatctttt tcagaaatat cgaaggagcc aaaaataaa aacagtctcg 12600
 tataccaaag tggtatatc aacatcaggc ctagcacatc tttctctatt atccttctat 12660
 tggaattcta gtattctgta ttcaaaaaat catcttgac ataattaata ttatagtaag 12720
 ctgcatctaa attaaaaata aactatt 12747

<210> 2
 <211> 4629
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 664 591 T3

<400> 2

aaatgctcca	catggcccca	gtcacccctgc	agaaaagaaa	tcatcagctt	tctgcagcat	60
cagacttagc	agcatcttcc	tgtcccaaga	gaagagggga	tgggaggatg	gcatggttca	120
gggcttaggg	gaggataggg	gagaaaaagt	ggaagcaaag	ggagaggccc	aggaaggatc	180
ttgttgcgac	atgttacctg	ggctgcacct	gctgtatgca	agagaagagg	ctgggagtcc	240
cctctgcagg	gtgttcatgc	cccatctctg	tgccacgagg	agttgggctg	ctgaaggata	300
tatcagcaca	acttctctgc	tccaactagt	ctacattgca	aagcatctcc	tagtgtcttt	360
ggaagaagga	tctatgtcat	gagtgtctac	ctggtagagg	gaagaccctg	aacgtccaga	420
ccgttcccct	gaccggccac	gtgtggactc	ttggtggctc	tgctgtctca	gcccagcctt	480
tccgtggcct	gacactgatt	gtgtgtctga	gttttctgaa	tgtccctcac	tgtcactggc	540
ctgactaccg	ctagaccccc	gggtgccacg	atcgetgact	gcagatgaag	cttccccgcg	600
cccagtggct	gagtgtctgg	agctgtctgc	tgactgctgg	tggccggatc	catgtctttc	660
tcctggactt	gatcttgccct	gttcatggga	tgatgcagtc	tgtccacgag	aggaagtctc	720
tgcgtgacga	gtgcctgatt	gtctggagct	gtctgcagag	tgcccatgac	tggctctgtc	780
ttcatcatgg	gacctgggggt	gtctggagcc	atctcttgac	tgctcccacg	cagatccatg	840
atggtttctg	gaagccgacc	cagagtgcct	ctcagagtct	tctgagtgtc	cctcactgtc	900
cctgtcctgg	ctaactctgg	atcccctacg	ctttcttgtc	ctggactcct	gcaatgactc	960
ataatatgct	tgagccaact	tgaataccat	cagaagaaac	tcagtgaagt	caattttctt	1020
gttgtggctct	atatccaagt	gatccatgaa	gacatcaacc	atatctgggt	catctggatt	1080
ctgtacagag	ggaagtcaca	gagggagact	gcacagaca	gaatcacatt	atcagccaat	1140
taattcaaag	ttaatttaag	gaacctgac	tttgagtatt	aaaaagtggg	acaaaatctt	1200
ttttttttta	agactttttt	gtctcactct	cattcaggtg	ttatatgtga	acaaagatgt	1260
agactagtaa	ggtatcaaga	tttgatgggg	atatccagac	aacttgagc	caagtcccca	1320
cagctggatc	agacaacttt	tgggtgacatc	tcacagtgctg	gattatcaag	ccagtgtatc	1380
agtctggagc	ctaggttttt	ttgcctttag	ctttgctcag	gatgacttct	gctcttctat	1440
ggcaatactt	gagaagctac	agctttgatt	agacgagagg	ctatttcaat	aactttctcc	1500
tgataagaag	accaccgacc	gtggacggat	tctggccagt	ttacaaaggc	tgcataccat	1560
agggcagggc	acccactat	ggcaaacact	aataatgata	ttgctcctga	ttttgtttct	1620
gaagggaatg	cctctaagat	ttcttcatta	attataagag	actgggtctc	actctgttgc	1680
ccaagctgga	gaacagtggc	accatcatag	ctcactgcag	ccttcaactt	ctgggctcaa	1740

ES 2 664 591 T3

gtgcttctcc cacctcagcc tcccaagtag ctgggacaac aggtgaaatt gaaggccagc 1800
 ttttggaact caaccttcaa aggaacttaa aatttccatt atgtagagtc cctgaggaaa 1860
 ctggatccac tagctacact ggctgagaat gctctcacc caggatttca tttttatfff 1920
 accacatcat tgttggatc ttaagatcaa tgtactggag cagcggggtc tcacaaagag 1980
 gatacctggg gacacgcca ggctttcaga atgcactata gggctttagt gacttgtcca 2040
 ggctcagctg aaatgtgcca tctgggacct actaatgctt gttgaaacttt actggatctc 2100
 agaagctggg tctcagaagc tcagatgttc ctcagagcta cgatatcaac aacctgtgat 2160
 gacagagaga aggttgctcc atgatggatt tggaaactta ctggctagct aaacctgact 2220
 gaatgggaag gaatgtggat agctttggaa ctctagtttc actagatgag ctggaatttg 2280
 tttttgaca aattgcacgt tatgattatt aagtaatgca actgattttt tttccctta 2340
 aaacaaacaa tctagaatct gtgtaatcaa aataatttct ctaaaaggct gcaagtatat 2400
 gcttaaagtg ttggggcatt cagagcattt ggaacattac attcttttga atgtcaattg 2460
 gtagatgaaa ataccagctt ttaagtcata catttgattt ttgaaacaa tatgcattta 2520
 gagtttgtaa gtcaagtгаа taactgataa ggtaaaaaaa agggggagtt cattgttgag 2580
 tatgaattta aagtaaccag actgcctttt gtcagtggc tgtcagtaat ttacttcagc 2640
 aggcattttt ttttttgag gctgttctat gatatcatga cccttcttgt aggaatgtgc 2700
 ttccagtggt gaggcagtct gagaatgtgt gaagcagtat aatgaagcca gaccaagatg 2760
 gaagcttggc ctgggatttg agcatcagga aaactgttga agggttatgt atacatcaca 2820
 cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca ctctcttcca tactcctata 2880
 acaacgtata gtatttacta tacctgggga caggatttta ctatacattg ttgaagatct 2940
 ataacatgga atgcctagtg ctaagtgcag tgtccttagt gaaattgtat tggtttgaa 3000
 ttatttatga gtttgggatt atttgtcact acccttaaat gatcttgaca ctcacctatt 3060
 tgaaaagata ttgaggattt gccatttgat attgaccagg gtgtatttg cacaatatt 3120
 gtgaatatac atctgtctgt ccttaaatca ctgtaagttt taactggaat agatttgctc 3180
 cacattactc ggtagggtcg atatttcatg cctcatggat gagaaaagaa taggcaaaaa 3240
 ttatatctcg ggctgcctca cacatctttt aacaggataa gggaaaaata aatataagac 3300
 ctatgagtta tggcatcagg cttgaaacttt aatttatgaa ttaaaccaac aatattattg 3360
 attattgcaa ttatctatct taatttcatt tgttctcctt ttaaaaatta attatgttta 3420
 ttttacctat tgtgaataaa gtcactcctc ccatgtgctt atttcttgac tctggcacta 3480
 attattcttc agtgcctaga tttcctggga ctgctcagtt taagtaactt ctgaacattg 3540
 gtctctgaga gaaaagacag tgaagtggga tctgtggaaa aacacatctg caaatgtctc 3600
 attttttctc tcaggggtaa gttttcttcc ttggagactc ttgtcttgaa aaagtgatac 3660

ES 2 664 591 T3

tagatcacca tttggcaaga taattacaaa aggcagatag agtaattatt ttacatagct 3720
 gttatagggg gactaagatc tcagggaatg actgtgttct gtaatccact tgccccactc 3780
 aataccccaa gttttataca agccaaagat gcttggagca gaatctgcta cctgaggctc 3840
 cagggccttg gcctagggaa actaatactt aactttttaa gtggtcattg atgacatccc 3900
 actcctttct gagatgggta tgatttgaag ggcagggtga ttcattggaga gcagggcttg 3960
 ggacctttgc tgcaagagga ggaactatta gcctagactt ttctaataag gactttctca 4020
 tacctgtttc ctatagctgg tccacataga agaaatcagg gaacacacag ggtaggactc 4080
 ttaaaggagt atgtttcttg gctttttcct aaaaactaaa acaaaaacat tcatagcaaa 4140
 gcagtttagc ccagtgacta agagtataga cattggaatc tgaaagatct gggttggaat 4200
 tctgcttcag ccatttacta attatgtaac ttcacatctc tgagaatggg ggaaattttc 4260
 tttgcagggt tgttacaaag cttaaaagag ttaagtcaag tgcctggaac agaacagcca 4320
 ttcaataaat catagaaatt tttgttttta cacaaatttt taaaaagtaa tattttttgc 4380
 atttgttaga aagactatat tttctgttta gtggatgaca tcatcatcat aaaaatcact 4440
 gttacaagtt ttgttttgag aattaaaatc atatattaat cccaatcaca ttgtgttggg 4500
 attaatcaac atctctgggc atctaatact gtaaaaacat ggcctgtgat tggctctgctt 4560
 ggaagtgcac cttggttctg gctcagttgg ctagtgggcc acattgatta aagatgaata 4620
 caatgccaa 4629

<210> 3

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 3

10 ctccctctgt gactccctc t 21

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 4

20 gctatccaca ttcttcca 20

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 5

gcagagccac caagagtcca 20

30 <210> 6

<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 5 <400> 6
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 20

 <210> 7
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 7
 15 tccacattcc tccccattca 20

 <210> 8
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 8
 ccctctgtga cttccctc 18
 25
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 9
 ccacattcct tccattcag 20

 35 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 10
 mumcmcmcmu ctgtgacttc mcmcmumcmu 30

 <210> 11
 45 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 50 <400> 11
 mcmumcmcmc tctgtgactt cmcmcmumcm u 31

 <210> 12
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 12
 60 ctccctctgt gacttcctc t 21

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Oligonucleótido antisentido
<400> 13
tccacattcc ttccattca 20
10

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de Filagrina (FLG) para uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión de Filagrina (FLG) y donde el transcrito antisentido natural de la Filagrina (FLG) tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que retiene la función del transcrito antisentido natural de SEQ ID NO: 2.
2. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de Filagrina (FLG) para uso en la prevención o el tratamiento de dermatitis atópica (AD), ictiosis vulgaris (IV), eccema, asma, rinitis alérgica o psoriasis, donde oligonucleótido modula la expresión de Filagrina (FLG) y donde el transcrito antisentido natural de Filagrina (FLG) tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que retiene la función del transcrito antisentido natural de SEQ ID NO: 2.
3. Uso de un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de Filagrina (FLG) para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de dermatitis atópica (AD), ictiosis vulgaris (IV), eccema, asma, rinitis alérgica o psoriasis, donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión Filagrina (FLG) y donde el transcrito antisentido natural de Filagrina (FLG) tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que retiene la función del transcrito antisentido natural de SEQ ID NO: 2.
4. Un procedimiento in vitro de aumento de la expresión de Filagrina (FLG) en células o tejidos de un paciente que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de la Filagrina (FLG); aumentando de este modo la expresión de la Filagrina (FLG), donde el transcrito antisentido natural de Filagrina (FLG) tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que retiene la función del transcrito antisentido natural de SEQ ID NO: 2.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, o un oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, donde el oligonucleótido es monocatenario.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, o un oligonucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, donde el oligonucleótido es un compuesto de ARNsi.
7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 o 6, o un oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 6, o un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde el oligonucleótido comprende al menos una de las SEQ ID NO: 3, 5, 9 a 11 y 13.
8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 7, o un oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 5 a 7, o un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde la expresión de Filagrina (FLG) aumenta al menos un 10 %.
9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 8, o un oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5 a 8, o un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, donde el oligonucleótido comprende además una o más modificaciones que comprenden:
- a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, alquilfosfonato, fosfoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster carboximetílico y combinaciones de los mismos;
- b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico, un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
- c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, un resto de 2'-fluoro, y combinaciones de los mismos.
10. Un oligonucleótido que tiene las características de un oligonucleótido definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el oligonucleótido no comprende la SEQ ID NO: 6.
11. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 10, donde:
- a. el oligonucleótido tiene entre 10 y 30 nucleótidos de longitud; y/o
- b. el oligonucleótido tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia de un transcrito antisentido natural de Filagrina (FLG).

12. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5 13. Un procedimiento cosmético que usa un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de Filagrina (FLG), donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión de Filagrina (FLG) y donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico tal como se expone en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que retiene la función del transcrito antisentido natural de SEQ ID NO: 2.
- 10 14. Un procedimiento cosmético de acuerdo con la reivindicación 13, para tratar una indicación cosmética seleccionada de un signo de envejecimiento cutáneo, una afección de la piel causada por agresión externa, piel seca, arrugas y líneas de expresión, piel flácida, piel floja, piel de apariencia delgada, pérdida de elasticidad y/o tono de la piel, piel opaca, piel sin brillo y envejecimiento natural.
- 15 15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, donde el oligonucleótido es un oligonucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

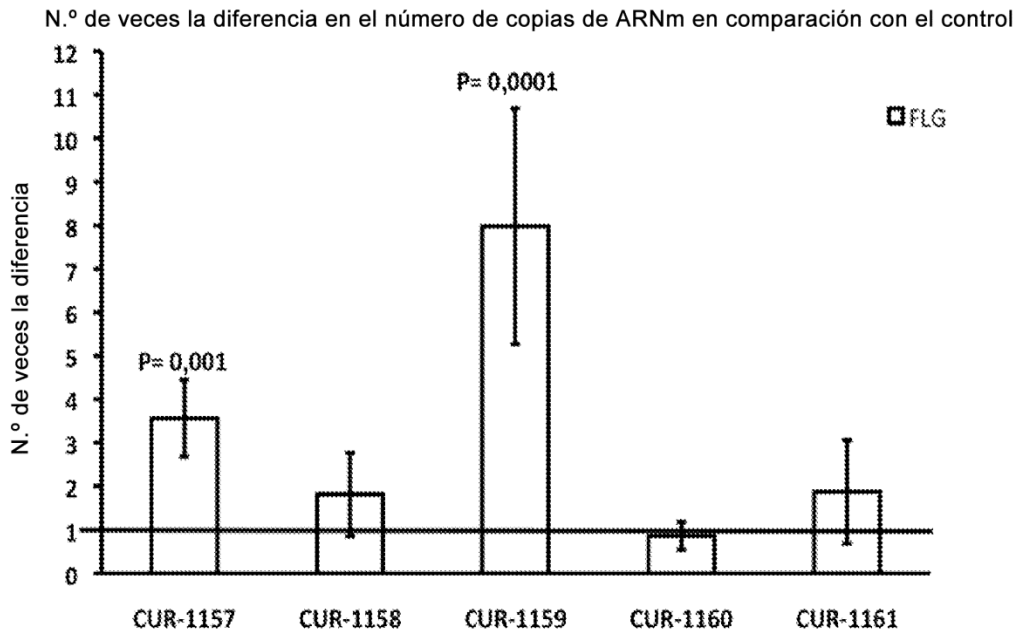


FIGURA 1

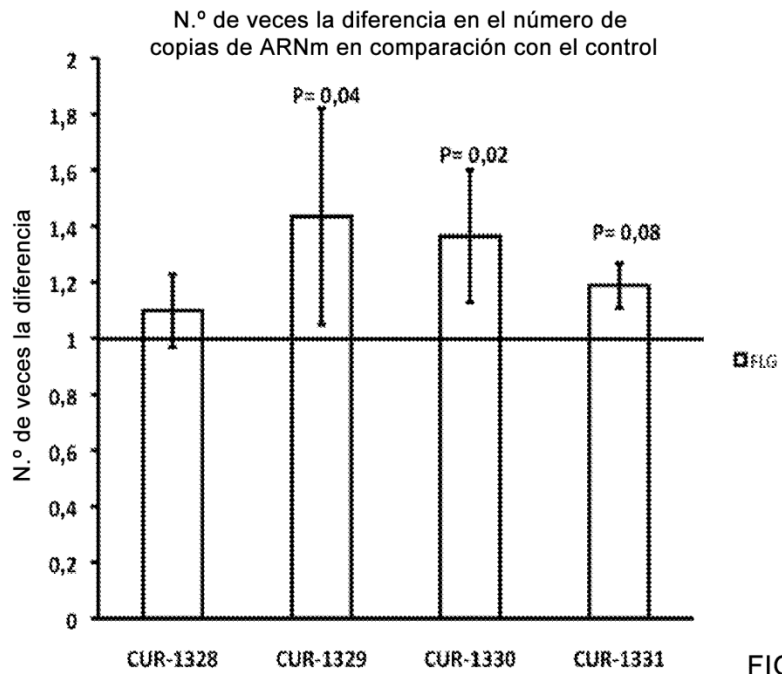


FIGURA 2

N.º de veces la diferencia en el número de copias de ARNm en comparación con el control

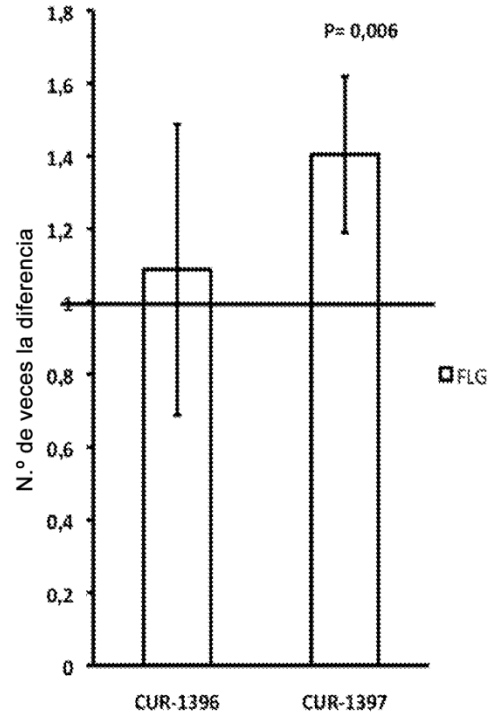


FIGURA 3

Diferencia en veces en el número de copias de ARNm de FLG en comparación con el vehículo control

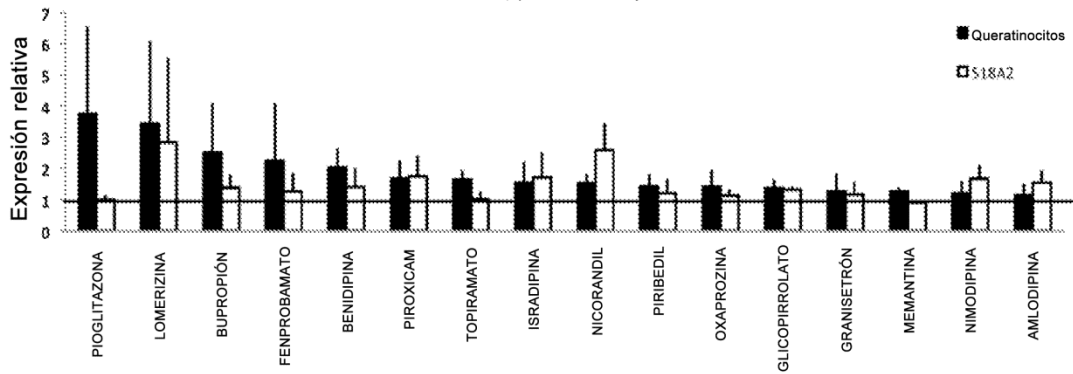


FIGURA 4

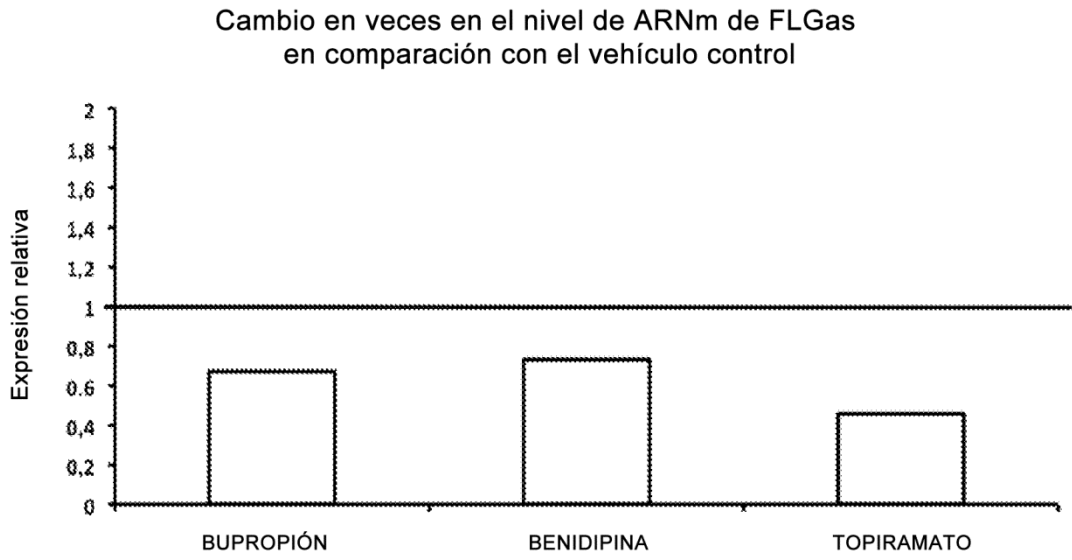


FIGURA 5