

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 392 449**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05857292 .6**

(96) Fecha de presentación: **20.10.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1809302**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2007**

(54) Título: **Modulación antisentido de la expresión de la integrina alfa-4**

(30) Prioridad:

20.10.2004 US 620792 P
31.01.2005 US 648820 P

(73) Titular/es:

ANTISENSE THERAPEUTICS LTD (100.0%)
LEVEL 1 10 WALLACE AVENUE
TOORAK, VIC 3142, AU

(72) Inventor/es:

TACHAS, GEORGE;
KARRAS, JAMES, G.;
GREGORY, SUSAN;
CROSBY, JEFFREY, R.;
DOBIE, KENNETH, W. y
BENNETT, C., FRANK

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 392 449 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modulación antisentido de la expresión de la integrina alfa-4

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones útiles para tratar afecciones respiratorias, en particular a compuestos oligonucleótidos, particularmente antisentido, que se hibridan específicamente con ácidos nucleicos que codifican la integrina $\alpha 4$ humana.

10

Antecedentes de la invención

La inflamación es una respuesta protectora localizada provocada por tejidos en respuesta a una lesión, infección o destrucción del tejido que da como resultado la destrucción del agente infeccioso o pernicioso del tejido dañado. Una respuesta inflamatoria típica procede como sigue: reconocimiento de un antígeno como extraño o reconocimiento de una lesión del tejido, síntesis y liberación de mediadores inflamatorios solubles, reclutamiento de células inflamatorias al sitio de infección o de lesión del tejido, destrucción y eliminación del organismo invasor o del tejido dañado y desactivación del sistema una vez que se ha declarado el organismo invasor o la lesión. En muchas enfermedades humanas con un componente inflamatorio, los mecanismos homeostáticos normales que atenúan las respuestas inflamatorias son defectuosos, dando como resultado una lesión y destrucción de tejido normal.

20

Interacciones célula-célula están implicadas en la activación de la respuesta inmune en cada una de las fases descritas anteriormente. Uno de los fenómenos detectables más tempranamente en una respuesta inflamatoria normal es la adhesión de leucocitos al endotelio vascular, seguido de la migración de leucocitos desde la vasculatura al sitio de infección o lesión. La adhesión de estos leucocitos, o glóbulos blancos, al endotelio vascular es una etapa obligada en migración desde la vasculatura (Harlan, J. M., Blood 1985, 65, 513-525). Esta respuesta es mediada por la interacción de moléculas de adhesión expresadas sobre la superficie de la célula de leucocitos y células endoteliales vasculares.

30

El antígeno integrante muy tardío-4 (también denominado VLA-4, $\alpha 4\beta 1$ o CD49d/CD29) es una integrina expresada en la superficie de linfocitos, monocitos, macrófagos, células mastoides, basófilos y eosinófilos. En un receptor de la adhesión heterodimérico que está constituido por subunidades $\alpha 4$ y $\beta 1$ enlazadas de forma no covalente y que sirve para mediar en la adhesión de leucocitos a la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) que es expresada en células endoteliales estimuladas por citoquinas. Esta interacción entre VCAM-1 y VLA-4 contribuye a la extravasación de leucocitos en condiciones inflamatorias agudas y crónicas que incluyen la esclerosis múltiple (MS – siglas en inglés), artritis reumatoide, asma, psoriasis y alergia.

35

La subunidad integrina $\alpha 4$ también puede heterodimerizarse con una cadena de integrina $\beta 7$ para formar la integrina $\alpha 4\beta 7$ que se conoce como un receptor mensajero mucosal, ya que su ligando primario es la molécula de adhesión vascular mucosal MadCAM-1. La integrina $\alpha 4\beta 7$ identifica un subconjunto de células T de la memoria con un tropismo para el tracto intestinal, mientras que la integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) es expresada constitutivamente en la mayoría de los leucocitos mononucleares, pero no en neutrófilos en circulación. La interacción de VCAM-1 con VLA-4 sugiere que VLA-4 es una diana terapéutica potencial para enfermedades inflamatorias, incluidas muchas afecciones respiratorias, por ejemplo asma y bronquitis (Kassner, P. D., et al, Adv. Exp. Med. Biol. 1992, 323, 163-170).

45

El asma es una enfermedad inflamatoria asociada con la infiltración de eosinófilos en los pulmones. VLA-4 se expresa en eosinófilos. Metzger, W. J. (Springer Semin. Immunopathol. 1995, 16, 467-478) utilizó un modelo de asma en conejos para demostrar que tanto un anticuerpo anti-VLA-4 como un péptido CS-1 podrían reducir la infiltración de eosinófilos en los pulmones y reducir el desarrollo del asma.

50

Mientras que esteroides y otros fármacos antiinflamatorios son eficaces para tratar enfermedades y afecciones inflamatorias, el uso a largo plazo conduce a menudo a efectos secundarios tales como un riesgo incrementado de infección causada por una deficiencia de la migración y función de leucocitos fagocíticos. Existe una cierta preocupación de que la inhibición de la función de la cadena de integrina $\beta 1$ pueda asociarse con una susceptibilidad incrementada a infecciones, tal como se demuestra por un anticuerpo monoclonal $\beta 1$ (también denominado CD18) en conejos (Foster, C. A., 1996, J. Allergy Clin. Immunol., 98, 270-277). Se piensa que la inhibición selectiva de la cadena $\alpha 4$ puede ser una estrategia más deseable. Se piensa que es probable que la inhibición de la cadena $\alpha 4$ reduzca los niveles del heterodímero VLA-4 así como del heterodímero $\alpha 4\beta 7$.

- Intervenciones terapéuticas potenciales que fijan como objetivo VLA-4 incluyen anticuerpos monoclonales y antagonistas peptídicos. Anticuerpos específicos para VLA-4 han sido eficaces para atenuar la inflamación de las vías respiratorias impulsada por alérgenos y la hiperreactividad en varios modelos de asma experimentales, incluido el ratón. Leger, O. J. P. et al. (Human Antibodies, 1997, 8, 3-16) describen un anticuerpo monoclonal contra VLA-4 que se encuentra en ensayos clínicos de fase III para la esclerosis múltiple. Se han descrito antagonistas de péptidos CS-1 por Jackson, D. Y., et al. (J. Med. Chem. 1997, 40, 3359-3369). Hayashi et al. (Cell Struct. Funct. 1991, 16, 241-249) han utilizado un vector que expresa ARN complementario a la integrina β 1 de pollo para reducir la expresión de la integrina β 1, dando como resultado una fijación y forma alterada de las células.
- Oligonucleótidos antisentido ("ASOs" – siglas en inglés) que fijan como objetivo diversas integrinas han sido utilizados como herramientas para diseccionar las interacciones funcionales de integrinas en estipulaciones complejas. Lallier y Bronner-Fraser (Science, 1993, 259, 692-695) han utilizado oligonucleótidos de fosforotioato que fijan como objetivo regiones conservadas y no conservadas de integrinas β 1 de pollo, α 4 humanas, α 1 de rata y β 5 humanas para determinar los efectos de estas integrinas sobre la fijación de células. Estos mismos oligonucleótidos fueron también inyectados en las vías migratorias de la cresta neural craneal en embriones de aves, y se demostró que esos oligonucleótidos, que inhibían la fijación de células *in vitro*, provocaban también anomalías en la cresta neural y/o tubo neural *in vivo* (Kil et al., Devel. Biol. 1996, 179, 91-101).
- La solicitud de patente EP 688 784 (Carolus et al.) describe análogos de oligonucleótidos 3'-derivatizados, que incluyen una secuencia que fija como objetivo la subunidad β 1 de VLA-4.
- Los documentos US 5.968.926 y US 6.258.790 (Bennett et al.) describen modular la expresión de integrina α 4 mediante el uso de oligonucleótidos antisentido que fijan como objetivo ácidos nucleicos que codifican integrina α 4. El documento US 5.968.826 describe que estos oligonucleótidos antisentido se pueden utilizar para tratar una amplia diversidad de enfermedades inflamatorias asociadas con la expresión de VLA-4, incluido el asma. De acuerdo con este documento, en general, para tratar las enfermedades inflamatorias se puede utilizar una dosificación de 0,01 μ g a 100 μ g de oligonucleótido antisentido por kg de peso corporal, que puede ser administrada una vez o más veces al día, semana, mes o año, o incluso cada 2 a 20 años. El intervalo de dosificaciones ejemplificado para las diversas enfermedades inflamatorias es de 0,01 mg a 20 mg de oligonucleótido antisentido por kg de peso corporal. El Ejemplo 30 describe el uso profético de oligonucleótidos antisentido en un modelo para asma murino, en el que a los ratones se les inyecta por vía intravenosa dosis de 1 mg/kg a 5 mg/kg de oligonucleótidos antisentido dirigidos a integrina α 4.
- Sumario de la invención
- Los autores de la invención han encontrado ahora que enfermedades y afecciones respiratorias asociadas con una hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o una supra-producción de mucus pueden ser tratadas o prevenidas con éxito utilizando dosis muy bajas de compuestos antisentido que fijan como objetivo ácidos nucleicos que codifican la integrina α 4.
- Así, la invención proporciona un compuesto antisentido que fija como objetivo una molécula de ácido nucleico que codifica integrina α 4 para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con una hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus, en que el compuesto se ha de administrar por vía tópica al sistema respiratorio o a las vías respiratorias a un nivel de dosificación diaria que iguala a 0,01 hasta menos de 500 μ g del compuesto antisentido por kg de peso corporal del animal.
- La invención proporciona, además, el uso de un compuesto antisentido que fija como objetivo una molécula de ácido nucleico que codifica integrina α 4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con una hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus, en que el medicamento se ha de administrar por vía tópica a un nivel de dosificación diaria que iguala a 0,01 hasta menos de 500 μ g del compuesto antisentido por kg de peso corporal del animal.
- El uso de dosificaciones bajas de este tipo proporciona beneficios significativos, que incluyen una reducción significativa del potencial para efectos secundarios indeseados y proporcionar un ahorro en costes considerable en términos del coste de fabricación por dosis unitaria. Además, permite una mayor flexibilidad en los dispositivos de administración potenciales.

- 5 De manera adecuada, el compuesto antisentido se dosifica a un nivel de al menos 0,05, más preferiblemente al menos 0,1, más preferiblemente al menos 0,5, todavía más preferiblemente al menos 1 y todavía más preferiblemente al menos 2 μ g por kg de peso corporal del animal individual. El compuesto antisentido se puede dosificar a niveles más elevados tales como, por ejemplo, al menos 5 μ g por kg de peso corporal del animal individual.
- 10 De manera adecuada, el compuesto antisentido se dosifica a un nivel menor que 200, más preferiblemente menor que 150, más preferiblemente menor que 100, más preferiblemente menor que 75, más preferiblemente menor que 50, más preferiblemente menor que 20 y todavía más preferiblemente menor que 10 μ g por kg de peso corporal del animal individual. El compuesto antisentido se puede dosificar a niveles menores tales como, por ejemplo, menores que 7, menores que 5, menores que 2 o menores que 1 μ g por kg de peso corporal del animal individual.
- 15 De manera adecuada, el compuesto antisentido se dosifica a un nivel no mayor que 200, más preferiblemente no mayor que 150, más preferiblemente no mayor que 100, más preferiblemente no mayor que 75, más preferiblemente no mayor que 50, más preferiblemente no mayor que 20 y todavía más preferiblemente no mayor que 10 μ g por kg de peso corporal del animal individual. El compuesto antisentido se puede dosificar a concentraciones menores tales como, por ejemplo, no más de 7, no más de 5, no más de 2 o no más de 1 μ g por kg de peso corporal del animal individual. Intervalos de dosificación preferidos son 0,01 a 200 μ g y 0,5 a 50 μ g por kg de peso corporal del animal.
- 20 25 Además de ello, los autores de la invención han encontrado que compuestos antisentido que fijan como objetivo ácidos nucleicos que codifican integrina $\alpha 4$ son especialmente eficaces cuando se suministran por vía tópica. El hallazgo de que la administración tópica es particularmente eficaz es sorprendente, dada la farmacocinética del mecanismo antisentido y/o el mecanismo de acción predominante de integrina $\alpha 4$ para modular la adhesión y la transmigración de leucocitos desde la sangre a los órganos.
- 30 35 Se puede utilizar cualquier método adecuado de administración tópica al sistema respiratorio o vías respiratorias, incluido a través de la boca o nariz. La administración tópica puede ser a cualquier parte del sistema respiratorio que comprende la nariz, garganta, laringe, tráquea, tubos bronquiales y los pulmones o a vías respiratorias que incluyen la boca y los senos. La inhalación o insuflación son particularmente preferidas. Vías preferidas son la administración pulmonar, intranasal e intratraqueal.
- 40 45 Así, la composición puede ser adecuada para inhalación o insuflación, o adecuada para la administración intranasal, intrapulmonar o intratraqueal.
- 50 55 Preferiblemente, la composición que contiene el compuesto antisentido está en forma de polvo o aerosol y es inhalada por el individuo. Adecuadamente, la composición se administra a través de un inhalador de dosis medida (MDI – siglas en inglés), nebulizador, inhalador de polvo seco (DPI – siglas en inglés), inhalador nasal o en forma de gotas nasales. Esto ofrece ventajas significativas en términos de facilidad y simplicidad de uso. La elección del dispositivo permite también el suministro a diferentes partes del sistema respiratorio. Gotas nasales o inhaladores nasales se utilizan a menudo para el suministro al tracto respiratorio superior tal como la nariz para el tratamiento de afecciones nasales tales como rinitis, mientras que los MDI y DPI se utilizan a menudo para el suministro al tracto respiratorio inferior para el tratamiento de afecciones tales como el asma.
- 4 La capacidad de dosis bajas de oligonucleótidos de actuar cuando se administran por vía tópica sugiere que existen uno o más mecanismos que se efectúan a un nivel local, predominantemente tópico. A pesar de que no se desea estar ligado a mecanismos, se propone que el mecanismo de acción predominante de integrina $\alpha 4$ sea modular la adhesión y transmigración de glóbulos blancos desde la sangre a los órganos. Una vía intravenosa, intraperitoneal o subcutánea para el suministro del fármaco antisentido a integrina $\alpha 4$ a los glóbulos blancos interferirá predominantemente con la adhesión de glóbulos blancos $\alpha 4$ positivos al endotelio vascular para interferir con ello con la etapa obligada de migración de los glóbulos blancos de integrina $\alpha 4$ positivos desde la vasculatura al sistema respiratorio, siendo los pulmones el sitio del asma. El uso de una vía pulmonar proporciona beneficios significativos, que incluyen una especificidad mejorada para que la integrina $\alpha 4$ sea expresada en los pulmones o una reducción significativa del potencial de efectos secundarios sistémicos indeseados implicados en la modulación de integrina $\alpha 4$ en los glóbulos blancos que están implicados en la supervivencia normal de órganos que no sean los pulmones tales como el cerebro, las rodillas y la piel. Claramente, la capacidad de lograr un efecto local es altamente beneficiosa, teniendo respuestas sistémicas el potencial de producir efectos secundarios indeseados.

Inhibidores de integrina $\alpha 4$ previos, descritos en la técnica anterior, se han basado típicamente en regímenes de

dosificación que requieren administrar más de una dosis diariamente. Además, típicamente se han basado en unidades de dosificación considerablemente mayores que las de la presente invención. Por ejemplo, Koo G. C. et al. (Am. J. Respiratory Crit Care Med, vol. 167, págs 1400-1409, 2003), realizaron la dosificación dos veces al día con una composición tópica y reseñaron que la entrega era buena cuando se dosificaba a razón de 1 y 3 mg/kg.

5 Los autores de esta invención encontraron que la presente invención puede proporcionar un tratamiento eficaz de enfermedades o afecciones respiratorias cuando la dosificación se realiza una vez al día e incluso una vez cada dos días. Esto es importante, debido a que la investigación indica que existe una deficiente tasa de complacencia (aproximadamente 30-70%) en el caso de fármacos tales como corticosteroides, que han de ser inhalados dos veces 10 o más (posiblemente hasta cinco veces) al día.

15 La invención proporciona, además, un kit para uso en el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad o afección respiratoria según se define antes, que contiene una composición que comprende un compuesto antisentido que fija como objetivo una molécula de ácido nucleico que codifica integrina $\alpha 4$ y un dispositivo que permite que la 20 composición sea administrada por vía tópica mediante inhalación o insuflación a un nivel de dosificación diaria de 0,01 a menos de 500 μ g del compuesto antisentido por kg de peso corporal del animal.

25 La invención proporciona, además, un kit para uso en el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad o afección respiratoria según se define antes, que contiene una composición que comprende un compuesto antisentido que fija como objetivo una molécula de ácido nucleico que codifica integrina $\alpha 4$ e instrucciones de que la composición se ha de administrar por vía tópica al sistema respiratorio a un intervalo de dosificación diario de 0,01 a menos de 500 μ g 30 del compuesto antisentido por kg de peso corporal del animal que esté siendo tratado.

35 Los compuestos antisentido útiles en la invención pueden comprender un oligonucleótido antisentido. Un oligonucleótido de este tipo puede comprender al menos una parte de 8 nucleobases de una de SEQ ID N°s 103 a 178. Preferiblemente, el oligonucleótido antisentido comprende al menos una parte de 10, más preferiblemente al menos una parte de 13 y todavía más preferiblemente al menos una parte de 15 nucleobases de una cualquiera de SEQ ID N°s 103 a 178. Oligonucleótidos antisentido preferidos son como se recogen en SEQ ID N°s 81, 117, 120, 121, 122, 128, 130, 131, 132, 136, 137, 138, 141, 149, 150, 159, 160, 161, 167 y 168.

40 30 Sin estar limitados por la teoría, se piensa que VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) está implicado en varios procesos patofisiológicos en los que se fundamenta la enfermedad asma y otras afecciones del sistema respiratorio, y $\alpha 4\beta 7$ también puede jugar un papel en estas afecciones. El mecanismo predominante de acción de integrina $\alpha 4$ consiste en modular la adhesión y transmigración de glóbulos blancos, es decir, leucocitos, desde la sangre a los órganos tales como los pulmones. El VLA-4 se une a VCAM en células endoteliales estimuladas por citoquinas, lo cual es importante en la 45 transmigración de los glóbulos blancos, particularmente eosinófilos, a los pulmones y vías nasales. Una vez que se encuentran en los pulmones o en las vías nasales, el papel de integrina $\alpha 4$ es menos claro. La activación de VLA-4 y/o $\alpha 4\beta 7$ puede contribuir a procesos inflamatorios locales, bronco-constricción y producción de mucus, exacerbando síntomas por un cierto número de mecanismos potenciales (véase la Figura 10). Células mastoides ($\alpha 4\beta 1/\alpha 4\beta 1$) y basófilos ($\alpha 4\beta 1$) liberan agentes implicados en la bronco-constricción y la activación de neutrófilos y activación de eosinófilos ($\alpha 4\beta 1/\alpha 4\beta 17$) que conducen a una inflamación de las vías respiratorias. Macrófagos ($\alpha 4\beta 1$), células B ($\alpha 4\beta 1$) y células T, incluidos leucocitos Th2 positivos ($\alpha 4\beta 1/\alpha 4\beta 7$) junto con eosinófilos también pueden estar implicados en la inflamación de las vías respiratorias como lo están las células epiteliales de las vías respiratorias ($\alpha 4\beta 1$). Se piensa también que los leucocitos se fijan a células de la musculatura lisa local en los pulmones a través de VLA-4, lo cual puede contribuir a un bronco-espasmo. Finalmente, VLA-4 está implicado en la neovascularización, y la angiogénesis es importante en la remodelación de los pulmones que se produce en varias enfermedades de los pulmones y de las vías nasales.

50 55 Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para tratar cualquier enfermedad o afección respiratoria asociada con una hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus. Enfermedades o afecciones de este tipo resultarán evidentes para la persona experta. Ejemplos de afecciones o enfermedades respiratorias, que ya se conoce que están asociadas con una supra-producción de mucus y que se pueden tratar mediante las composiciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, afecciones respiratorias crónicas tales como asma, fibrosis quística, deficiencia en alfa-1 antitripsina, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y bronquitis crónica. Se entenderá que la referencia a respiratorio en esta memoria incluye la nariz, garganta, laringe, tráquea, tubos bronquiales y los pulmones o a las vías llenas de aire tales como las vías respiratorias que incluyen la boca y los senos, y que las composiciones de la invención se pueden utilizar para tratar enfermedades y afecciones asociadas con cualquiera de las antes mencionadas. Por ejemplo, las composiciones son útiles para tratar afecciones tales como rinitis, en donde algunos de los efectos de la

enfermedad se manifiestan por sí mismos en el tracto respiratorio superior, y para tratar sinusitis y para tratar enfermedades o afecciones asociadas con leucocitos, neutrófilos, eosinofilia o dependientes de la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR – siglas en inglés).

5 Se entenderá que, en relación con las composiciones, compuestos, componentes, ingredientes o similares descritos en esta memoria, cualquier límite de intervalo inferior descrito en relación con una composición, compuesto, componente, ingrediente o similar particular se puede combinar con cualquier límite de intervalo superior descrito en relación con la misma composición, compuesto, componente, ingrediente o similar para definir un intervalo adecuado para esa composición, compuesto, componente, ingrediente o similar particular.

10 A lo largo de esta memoria descriptiva, la palabra "comprenden" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se entiende que implicarán la inclusión de un elemento, número entero o etapa establecido, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

15 Cualquier discusión de documentos, obras, materiales, dispositivos, artículos o similares que se han incluido en la presente memoria descriptiva es únicamente con fines de proporcionar un contexto para la presente invención. No se han de tomar como una admisión de que cualquiera o la totalidad de estas materias forman parte de la base de la técnica anterior o eran conocimiento general común en el sector relevante para la presente invención tal como existía 20 antes de la fecha prioritaria de cada una de las reivindicadas en esta solicitud.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1: muestra los efectos de dosis de 0,01, 1 y 100 µg/kg de ASOs de integrina alfa4 aerosolizados (ISIS 348592 ó 348574) sobre Pen H a diversas dosis de metacolina en un modelo de asma con OVA. El tratamiento con ASO consistía en (1) -♦- es 348592 a 0,01 µg/kg; (2) -■- es 348592 a 1 µg/kg; (3) -▲- es 348592 a 100 µg/kg; (4) -x- es 348574 a 0,01 µg/kg; (5) - *- es 348574 a 1 µg/kg; (6) -●- es 348574 a 100 µg/kg; (7) -| - es el vehículo; (8) - es el no tratado anteriormente con el medicamento.

30 Figura 2: muestra los efectos de dosis de 0,01, 1 y 100 µg/kg de ASOs de integrina alfa4 aerosolizada (ISIS 348592 ó 348574) sobre Pen H a 100 mg/ml de metacolina en un modelo de asma con OVA.

Figura 3: muestra los efectos de dosis de 0,01, 1 y 100 µg/kg de ASOs de integrina $\alpha 4$ aerosolizada (ISIS 348592 ó 348574) sobre Pen H a 100 mg/ml de metacolina sobre los ratones individuales procedentes del estudio a los que se alude en la Figura 2.

35 Figura 4: muestra los efectos de ASOs de integrina $\alpha 4$ aerosolizada (ISIS 348592 ó 348574) frente a testigo vehículo sobre la respuesta Pen H en la línea de referencia en un modelo de asma con OVA.

Figura 5: muestra los efectos de dosis de 0,01, 1 y 100 µg/kg de ASOs de integrina $\alpha 4$ aerosolizada (ISIS 348592 ó 348574) sobre el reclutamiento de células BAL en un modelo de asma con OVA. Muestra el porcentaje de células (macrófagos, linfocitos, eosinóficos y neutrófilos) en las vías respiratorias pulmones (lavado de las vías respiratorias bronquiales). En cada conjunto de 4 barras, de izquierda a derecha, la primera barra es macrófagos, la segunda barra es linfocitos, la tercera barra es eosinóficos y la cuarta barra es neutrófilos.

40 Figura 6: muestra los efectos de dosis de 0,01, 1 y 100 µg/kg de ASOs de integrina $\alpha 4$ aerosolizada (ISIS 348592 ó 348574) sobre el reclutamiento de eosinófagos en un modelo de asma con OVA. Muestra el porcentaje de eosinófagos en la vía respiratoria pulmón.

45 Figura 7: muestra los efectos de las dosis de 0,01, 1 y 100 µg/kg de ASOs de integrina $\alpha 4$ aerosolizada (ISIS 348592 ó 348574) sobre el reclutamiento de eosinófagos en la vía respiratoria pulmón en los ratones individuales para el estudio al que se alude en la Figura 6.

Figura 8a: muestra los efectos de dosis de 0,01, 1 y 100 µg/kg de ASOs de integrina $\alpha 4$ aerosolizada (ISIS 348592 ó 348574) sobre las respuestas de IgE con OVA.

50 Figura 8b: muestra los efectos de dosis de 0,01, 1 y 100 µg/kg de ASOs de integrina $\alpha 4$ aerosolizada (ISIS 348592 ó 348574) sobre las respuestas de IgG1 con OVA.

Figura 9: muestra los efectos de dosis de 0,01, 1 y 100 µg/kg de ASO de integrina $\alpha 4$ aerosolizada (ISIS 348574) frente al oligonucleótido testigo ISIS 358342 sobre el número de vías respiratorias PAS positivas en un modelo de asma con OVA.

55 Figura 10: representación esquemática de la posible respuesta celular implicada en la inflamación de las vías respiratorias y el perfil de expresión de la integrina alfa4 de las diversas células.

Figura 11: muestra los efectos de dosis de 0,01 y 1 µg/kg de ASO de integrina $\alpha 4$ aerosolizada (ISIS 348574) y un oligonucleótido testigo de apareamiento erróneo negativo (ISIS 358342) sobre el porcentaje de células cadherina E positivas (células epiteliales) en la vía respiratoria pulmón que también expresan integrina $\alpha 4$.

Descripción detallada de la invención

La presente invención emplea compuestos antisentido, preferiblemente oligonucleótidos antisentido, para uso en la modulación de la función de moléculas de ácido nucleico que codifican integrina $\alpha 4$, modulando en última instancia la cantidad de integrina $\alpha 4$ producida. Esto se consigue proporcionando compuestos antisentido que específicamente se hibridan con uno o más ácidos nucleicos que codifican integrina $\alpha 4$. Tal como se utiliza en esta memoria, las expresiones "ácido nucleico diana" y "ácido nucleico que codifica integrina $\alpha 4$ " abarcan ADN que codifica integrina $\alpha 4$, ARN (incluido pre-ARNm y ARNm) transcrita a partir de dicho ADN, y también ADNc derivado de dicho ARN. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico. A esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por parte de compuestos que se hibridan específicamente al mismo se la alude generalmente como "antisentido". Las funciones del ADN con las que se debe interferir incluyen la replicación y transcripción. Las funciones de ARN con las que se debe interferir incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, la translocación del ARN al sitio de traducción de la proteína, traducción de la proteína a partir del ARN, corte y empalme del ARN para proporcionar una o más especies de ARNm y actividad catalítica que puede ser ajustada en o facilitada por el ARN. El efecto global de una interferencia de este tipo con la función del ácido nucleico es la modulación de la expresión de la integrina $\alpha 4$. En el contexto de la presente invención, "modulación" significa un incremento (estimulación) o una disminución (inhibición) en la expresión de un gen. En el contexto de la presente invención, la inhibición es la forma preferida de modulación de la expresión del gen y ARNm es una diana preferida. En una realización, el compuesto antisentido inhibe la expresión de integrina $\alpha 4$ en al menos un 50%.

Se prefiere fijar como objetivo ácidos nucleicos específicos para antisentido. "Fijar como objetivo" un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular, en el contexto de esta invención, es un proceso de múltiples etapas. El proceso comienza habitualmente con la identificación de una secuencia de ácido nucleico cuya función se ha de modular. Ésta puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrita a partir del gen) cuya expresión se asocia con un trastorno o estado patológico particular, o una molécula de ácido nucleico procedente de un agente infeccioso. En la presente invención, la diana es una molécula de ácido nucleico que codifica integrina $\alpha 4$. El proceso de fijación como objetivo incluye también la determinación de un sitio o sitios dentro de este gen para que se produzca la interacción antisentido de modo que resulte el efecto deseado, p. ej. la detección o modulación de la expresión de la proteína. Dentro del contexto de la presente invención, un sitio intragénico preferido es la región que abarca el codón de iniciación o terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF – siglas en inglés) del gen. Dado que, como es conocido en la técnica, el codón de iniciación de la traducción es típicamente 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcritas; 5'-ATG en la correspondiente molécula de ADN), al codón de iniciación de la traducción se le alude también como el "codón AUG", el "codón de partida" o "el codón de partida AUG". Una minoría de genes tienen un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y han demostrado funcionar *in vivo* 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG. Así, las expresiones "codón de iniciación de la traducción" y "codón de partida" pueden abarcar muchas secuencias de codones, incluso a pesar de que el aminoácido iniciador en cada caso es típicamente metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Se conoce también en la técnica que genes eucarióticos y procarióticos pueden tener dos o más codones de partida alternativos, uno cualquiera de los cuales puede ser utilizado preferentemente para la iniciación de la traducción en un tipo de célula o tejido particular, o bajo un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la invención, "codón de partida" y "codón de iniciación de la traducción" se refieren al codón o codones que se utilizan *in vivo* para iniciar la traducción de una molécula de ARNm transcrita a partir de un gen que codifica integrina $\alpha 4$, independientemente de la o las secuencias de este tipo de codones.

Es también conocido en la técnica que un codón de terminación de la traducción (o "codón de parada") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las correspondientes secuencias de ADN son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente). Las expresiones "región del codón de partida" y "región del codón de iniciación de la traducción" se refieren a una parte de un ARNm o gen de este tipo que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir 5' ó 3') a partir de un codón de iniciación de la traducción. De manera similar, las expresiones "región del codón de parada" y "región del codón de terminación de la traducción" se refieren a una parte de un ARNm o gen de este tipo que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' ó 3') a partir de un codón de terminación de la traducción.

El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificadora", que es conocida en la técnica para aludir a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción, es también una región que puede ser fijada eficazmente como objetivo. Otras regiones diana incluyen la región 5' no traducida (5'UTR), conocida en la técnica para aludir a la parte de un ARNm en la dirección 5' a partir del codón de iniciación de la traducción y que

incluye, así, los nucleótidos entre el sitio de casquete 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen, y la región 3' no traducida (3'UTR), conocida en la técnica para aludir a la parte de un ARNm en la dirección 3' a partir del codón de terminación de la traducción y, así, que incluye los nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen. El casquete 5' de un ARNm comprende un residuo guanosina N7-metilado unido al residuo 5'-superior del ARNm a través de un enlace 5'-5'-trifosfato. Se considera que la región del casquete 5' de un ARNm incluye la estructura del casquete 5' propiamente dicha así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al casquete. La región del casquete 5' también puede ser una región diana preferida.

- 5 10 A pesar de que algunos transcritos de ARNm eucarióticos son traducidos directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", que son escindidas de un transcrto antes de ser éste traducido. Las regiones remanentes (y por lo tanto traducidas) son conocidas como "exones" y son cortadas y empalmadas juntas para formar una secuencia de ARNm continua. Sitos de corte y empalme de ARNm, es decir, uniones intrón-exón, también pueden ser regiones diana preferidas, y son particularmente útiles en situaciones en las que está implicado un corte y empalme aberrante en la enfermedad, o en los casos en los que está implicada una supra-producción de un producto de corte y empalme de ARNm particular en la enfermedad. Uniones de fusión aberrantes debido a re-disposiciones o delecciones son también dianas preferidas. Se ha encontrado también que los intrones pueden ser 15 20 también regiones diana eficaces y, por lo tanto, preferidas para compuestos antisentido fijados como objetivo, por ejemplo a ADN o pre-ARNm.
- Una vez que se han identificado uno o más sitios diana, se eligen oligonucleótidos que son lo suficientemente complementarios a la diana, es decir, se hibridan lo suficientemente bien y con una especificidad suficiente para dar el efecto deseado.
- 25 30 35 40 45 50 En el contexto de esta invención, "hibridación" significa la unión de hidrógeno que puede ser una unión de hidrógeno según Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido, entre bases de nucleósidos o nucleótidos complementarios. Por ejemplo, adenina y timina son nucleobases complementarias que se emparejan a través de la formación de enlaces hidrógeno. "Complementarias", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la capacidad de un apareamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una determinada posición de un oligonucleótido es capaz de la unión de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de ADN o ARN, entonces el oligonucleótido y el ADN o ARN se consideran complementarios uno con otro en esa posición. El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios uno a otro cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada una de las moléculas está ocupado por nucleótidos que pueden ser unidos mediante hidrógeno uno con otro. Así, "específicamente hibridable" y "complementario" son expresiones y términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de complementariedad o de apareamiento preciso de modo que se produce una unión estable y específica entre el oligonucleótido y la diana de ADN o ARN. Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto antisentido no necesita ser 100% complementaria a la de su ácido nucleico diana a hibridar específicamente. Un compuesto antisentido se puede hibridar específicamente cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para determinar una pérdida de utilidad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar una unión no específica del compuesto antisentido a las secuencias no diana bajo condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o de tratamiento terapéutico, o en el caso de ensayos *in vitro*, bajo condiciones en las que se realizan los ensayos.
- Compuestos antisentido se utilizan comúnmente como reactivos y agentes de diagnóstico para investigación. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido que son capaces de inhibir la expresión del gen con una especificidad exquisita se utilizan a menudo por parte del experto ordinario para provocar la función de genes particulares. También se utilizan compuestos antisentido, por ejemplo, para distinguir entre funciones de diversos miembros de una vía biológica. Por lo tanto, la modulación antisentido ha sido aprovechada para el uso de investigación.
- La especificidad y sensibilidad de antisentido también es aprovechada por los expertos en la técnica para usos terapéuticos. Oligonucleótidos antisentido se han empleado en restos terapéuticos en el tratamiento de estados patológicos en animales y el hombre. Oligonucleótidos antisentido han sido administrados de forma segura y eficaz a seres humanos y actualmente se encuentran en desarrollo numerosos ensayos clínicos. Así, se establece que los oligonucleótidos 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.

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 compuestos miméticos de los mismos. Este término incluye

oligonucleótidos compuestos por nucleobases que se producen de forma natural, azúcares y enlaces internucleósidos (cadena principal) covalentes, así como oligonucleótidos que tienen porciones que no se producen de forma natural que actúan de manera similar. Oligonucleótidos modificados o sustituidos de este tipo son a menudo preferidos frente a formas nativas, debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, una captación celular

5 potencial, afinidad mejorada para la diana ácido nucleico y estabilidad incrementada en presencia de nucleasas. La referencia en esta memoria a un oligonucleótido de una secuencia especificada y/o SEQ ID N° incluye, por lo tanto, oligonucleótidos compuestos por las nucleobases que se producen de forma natural, azúcares y enlaces internucleósidos (cadena principal) covalentes correspondientes a la secuencia especificada y/o SEQ ID N°, así como oligonucleótidos que tienen partes que no se producen de forma natural que se basan en la secuencia 10 especificada y/o SEQ ID N° y que actúan de manera similar. Partes que se producen de forma no natural adecuadas se describen en esta memoria y resultarán evidentes para la persona experta, e incluyen oligonucleótidos modificados o sustituidos, en los que una o más de las nucleobases, azúcares y/o enlaces de la cadena principal covalentes han sido modificados o sustituidos de alguna manera.

15 Los compuestos antisentido de acuerdo con esta invención comprenden preferiblemente al menos aproximadamente 5, más preferiblemente al menos aproximadamente 8, más preferiblemente al menos aproximadamente 10, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 13 nucleobases, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 15 nucleobases y todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 18 nucleobases. Los compuestos antisentido comprenden preferiblemente hasta aproximadamente 50, más preferiblemente hasta 20 aproximadamente 40, más preferiblemente hasta aproximadamente 30 nucleobases y todavía más preferiblemente hasta aproximadamente 25 nucleobases. Preferiblemente, los compuestos antisentido de acuerdo con esta invención comprenden de aproximadamente 8 hasta aproximadamente 30 nucleobases, más preferiblemente de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 nucleobases y todavía más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleobases. Aunque los oligonucleótidos antisentido son una forma preferida de un 25 compuesto antisentido, la presente invención comprende otros compuestos antisentido oligoméricos que incluyen, pero no se limitan a compuestos miméticos de oligonucleótidos tal como se describen más abajo. Particularmente preferidos son oligonucleótidos antisentido que comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 30 nucleobases, más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleobases (es decir, de 30 aproximadamente 8 a aproximadamente 30, más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleosidos enlazados). Tal como se conoce en la técnica, un nucleosido es una combinación de una base y un azúcar. La parte de base del nucleosido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de bases heterocíclicas de este tipo son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos con nucleosidos que incluyen, además, un grupo fosfato enlazado covalentemente a la parte de azúcar del nucleosido. Para aquellos nucleosidos que incluyan un azúcar pentafuranosilo, el grupo fosfato puede estar enlazado al resto 2'-, 3'- ó 5'-hidroxilo del 35 azúcar. En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato enlazan covalentemente nucleosidos adyacentes uno con otro para formar un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de esta estructura polimérica lineal pueden unirse adicionalmente para formar una estructura circular, pero generalmente se prefieren estructuras lineales abiertas. Dentro de la estructura del oligonucleótido, a los grupos fosfato se les alude 40 comúnmente como formadores de la cadena principal de internucleósidos del oligonucleótido. El enlace normal o la cadena principal de ARN y ADN es un enlace 3' a 5'-fosfodiéster.

Mientras que la forma preferida del compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido de cadena sencilla, en muchas especies la introducción de estructuras de doble cadena tales como moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc) han demostrado inducir una reducción mediada por antisentido, potente y específica, de la función de un 45 gen o de sus productos génicos asociados. Este fenómeno se produce tanto en plantas como en animales y se piensa que tiene una relación evolutiva con la defensa viral y el silenciamiento del transposón.

La primera evidencia de que ARNdc podría conducir al silenciamiento del gen en animales se produjo en 1995 a 50 partir de un trabajo en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Guo y Kempheus, *Cell*, 1995, 81, 611-620). Montgomery et al. han demostrado que los efectos de interferencia primaria de ARNdc son post-transcripcionales (Montgomery et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 15502-15507). El mecanismo antisentido post-transcripcional definido en *Caenorhabditis elegans*, que resulta de la exposición a ARN de doble cadena (ARNdc) ha sido designado desde entonces como ARN de interferencia (ARNi). Esta expresión ha sido generalizada para dar a entender el silenciamiento del gen mediado por antisentido, que implica la introducción de ARNdc que conduce a una reducción específica para la secuencia de niveles de ARNm fijados como objetivo endógenos (Fire et al., *Nature*, 1998, 391, 806-811). Recientemente, se ha demostrado que, de hecho, los oligómeros de ARN de cadena sencilla de polaridad antisentido de los ARNdc son los potentes inductores del ARNi (Tijsterman et al., *Science*, 2002, 295, 694-697). La inhibición por parte de ARN de cadena sencilla y de doble cadena (ARNi) de la expresión de integrina $\alpha 4$ y, en particular, de la expresión de integrina $\alpha 4$ humana, está también dentro del alcance de la presente invención.

Ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos, útiles en esta invención, incluyen oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces internucleósido no naturales. Según se define en esta memoria descriptiva, oligonucleótidos con cadenas principales modificadas incluyen aquellos que conservan un átomo de fósforo en la cadena principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Para los fines de esta memoria descriptiva y como a veces se alude en la técnica, oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal de internucleósidos también pueden considerarse oligonucleósidos.

Cadenas principales de oligonucleótidos modificadas preferidas incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil- y otros alquil-fosfonatos incluidos fosfonatos de 3'-alquíleno y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforoamidatos, incluido 3'-amino-fosforoamidato y aminoalquilfosfatoamidatos, tionofosfatoamidatos, tioalquilfosfatos, tioalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados 2'-5' de éstos y aquellos que tienen una polaridad invertida, en la que los pares adyacentes de unidades nucleósido están enlazados 3'-5' a 5'-3' ó 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los enlaces con contenido en fósforo anteriores incluyen, pero no se limitan a: patentes de EE.UU. n°s: 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361 y 5.625.050.

Cadenas principales de oligonucleótidos modificadas preferidas que no incluyen un átomo de fósforo en su interior tienen cadenas principales que se forman mediante enlaces internucleósidos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósidos de heteroátomos mixtos y de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Éstos incluyen aquellos con enlaces morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido), cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metilen-formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilenimino y metilenhidrazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otras que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂ mixtas.

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

En otros compuestos miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleósido, es decir, la cadena principal de las unidades nucleótidas están reemplazados por nuevos grupos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. A un compuesto oligomérico de este tipo, un compuesto mimético de oligonucleótido que ha demostrado excelentes propiedades de hibridación, se le alude como un ácido nucleico peptídico (PNA – siglas en inglés). En compuestos de PNA, la cadena principal del azúcar de un oligonucleótido está reemplazada por una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se conservan y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte amida de la cadena principal. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a las patentes de EE.UU. n°s: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Una enseñanza adicional de compuestos de PNA se puede encontrar en Nielsen et al., (Science, 1991, 254, 1497-1500).

Realizaciones más preferidas de la invención son oligonucleótidos con cadenas principales de fosforotioato y oligonucleósidos con cadenas principales de heteroátomos y, en particular, -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [conocidos como una cadena principal de metileno (metilimino) o MMI], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- [en que la cadena principal de fosfodiéster nativa se representa como -O-P-O-CH₂-] de la patente de EE.UU. n° 5.489.677 arriba referenciada, y las cadenas principales de amida de la patente de EE.UU. n° 5.602.240 arriba referenciada. Se prefieren también oligonucleótidos con estructuras de cadena principal morfolino de la patente de EE.UU. 5.034.506 arriba referenciada.

Oligonucleótidos modificados pueden también contener uno o más restos azúcares sustituidos. Oligonucleótidos

preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; u O-alquil-O-alquilo, en el que el alquilo, alquenilo y alquinilo puede ser alquilo C₁ a C₁₀, o alquenilo y alquinilo C₂ a C₁₀ sustituido o no sustituido. Particularmente preferidos son O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, en que n y m son de 1 a aproximadamente 10.

5 Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-arylquilo, 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 informador, 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 con propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504), es decir, un grupo alcoxi-alcoxi. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilamino-oxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, según se describe en la solicitud de patente de EE.UU. nº 6127533.

10 15 Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-O-CH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). Modificaciones similares también se pueden realizar en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal, o en oligonucleótidos 2'-5' enlazados y la posición 5' del nucleótido 5'-terminal. Oligonucleótidos pueden tener también compuestos miméticos de azúcar tales como restos 20 ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de estructuras de azúcar modificadas de este tipo incluyen, pero no se limitan a las patentes de EE.UU. nºs: 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722, 5.597.909; 5.610.300; 5.627.0531; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.700.920; y 5.859.221.

25 30 Los oligonucleótidos pueden incluir también modificaciones o sustituciones de nucleobases (a las que se alude a menudo en la técnica simplemente como "base"). Tal como se utiliza en esta memoria, nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases púricas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil-citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil-uracilo y citosina, 6-azo-uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas. 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 35 40 45 8-azaguanina y 8-aza-adenina, 7-deazaguanina y 7-deaza-adenina y 3-deazaguanina y 3-deaza-adenina. Nucleobases adicionales incluyen las descritas en la patente de EE.UU. nº 3.687.808, las descritas en *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, Kroschwitz, J. I., comp. John Wiley & Sons, 1990, 858-859, las descritas por Englisch et al., (*Angewandte Chemie, IE*, 1991, 30, 613) y las descritas por Sanghvi, Y. S., (*Antisense Research and Applications*, 15, 289-302) y Crooke, S. T. y Lebleu, B., comp. (CRC Press, 1993). Ciertas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Éstas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y 06 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Sustituciones 5-metilcitosina han demostrado aumentar la estabilidad dúplex del ácido nucleico en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., comps. *Antisense Research and Applications* 1993, 276-278) y actualmente son sustituciones de bases preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcares de 2'-O-metoxietilo.

50 Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de determinadas de las nucleobases modificadas arriba reseñadas así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a la patente de EE.UU. nº 3.687.808; así como las patentes de EE.UU. nºs 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.596.091; 5.614.617; 5.681.941; y 5.750.692 arriba señaladas.

55 Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Restos de este tipo incluyen, pero no se limitan a restos de lípidos tales como un resto de colesterol (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 1994, 4, 1053-1060), un tioéster, p. ej. hexil-S-tritíliol (Manoharan et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.* 1993, 3, 2765-2770), un tiocolosterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.* 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, p. ej. residuos dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*; 1991,

10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett, 1990, 59, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, p. ej., di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973) o ácido adamantanacético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un resto palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237) o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicoleserol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).

5 Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de conjugados de oligonucleótidos de este tipo incluyen, pero no se limitan a las patentes de EE.UU. n°s 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 10 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; 5.1138.045; 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; 15 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.

20 No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado estén uniformemente modificadas y, de hecho, más de una de las modificaciones antes mencionadas puede incorporarse en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente invención incluye también compuestos antisentido que son compuestos químicos. Compuestos antisentido "químicos" o "quimeras" en el contexto de esta invención son compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una de ellas constituida por al menos una unidad monómera, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado con el fin de conferir al oligonucleótido una resistencia incrementada a la degradación por nucleasa, captación celular incrementada y/o afinidad de unión incrementada para el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o de ARN:ARN. A modo de ejemplo, RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de RNasa H, por lo tanto, resulta en la escisión de la diana de ARN, potenciando con ello grandemente la eficacia de la inhibición por oligonucleótidos de la expresión del gen. 25 Por consiguiente, resultados equiparables pueden obtenerse a menudo con oligonucleótidos más cortos cuando se utilizan oligonucleótidos químicos en comparación con desoxi oligonucleótidos fosforotioato que se hibridan a la misma región diana. La escisión de la diana de ARN puede detectarse de forma rutinaria mediante electroforesis en gel y, si es necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociados, conocidas en la técnica.

30 35 Compuestos antisentido químicos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o compuestos miméticos de oligonucleótidos según se describe antes. A compuestos de este tipo también se les ha aludido en la técnica como híbridos o gapmers. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de estructuras híbridas de este tipo incluyen, pero no se limitan a las patentes de EE.UU. n°s: 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 40 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; 5.700.922; y 5.955.589.

45 Los compuestos antisentido utilizados de acuerdo con esta invención pueden prepararse de manera conveniente y rutinaria a través de la técnica bien conocida de la síntesis en fase sólida. El equipo para una síntesis de este tipo es comercializado por varios vendedores, que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Adicional o alternativamente se pueden emplear cualesquier otros medios para síntesis de este tipo, conocidos en la técnica. Es bien conocido utilizar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

50 Los compuestos antisentido de la invención se sintetizan in vitro y no incluyen composiciones antisentido de origen biológico ni construcciones de vectores genéticas, diseñadas para dirigir la síntesis in vivo de moléculas antisentido.

55 Se describen en esta memoria nuevos compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, que están fijados como objetivo a un ácido nucleico que codifica integrina $\alpha 4$. En particular, se describen compuestos antisentido fijados como objetivo a una molécula de ácido nucleico que codifica integrina $\alpha 4$, en donde el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido que comprende al menos una parte de 8 nucleobases de una de SEQ ID Nos 103 a 178. Preferiblemente, el oligonucleótido antisentido comprende al menos una parte de 10, más preferiblemente al menos una parte de 13 y todavía más preferiblemente al menos una parte de 15 nucleobases de una de SEQ ID Nos 103 a 178. En una realización preferida, el oligonucleótido antisentido comprende una de las SEQ ID N°s 103 a 178.

- Oligonucleótidos antisentido preferidos se seleccionan de las SEQ ID N°s 103, 104, 107, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 171, 172, 173, 174, 177 y 178 o una parte de las mismas. Preferiblemente, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido antisentido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID N°s: 107, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 124, 126, 128, 130, 131, 132, 134, 135, 136, 137, 138, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 171, 172, 177 y 178 o una parte de las mismas. Más preferiblemente, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido antisentido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID N°s. 111, 112, 113, 117, 119, 120, 121, 122, 130, 131, 132, 136, 138, 141, 144, 146, 147, 150, 151, 153, 154, 155, 156, 159, 160, 167, 169, 172 y 177 o una parte de las mismas. Todavía más preferiblemente, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido antisentido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID N°s: 117, 120, 121, 122, 128, 130, 131, 132, 136, 138, 141, 150, 159, 160, 167 y 169 o una parte de las mismas.
- Además de los nuevos oligonucleótidos antisentido descritos, ejemplos de otros oligonucleótidos antisentido y secuencias de oligonucleótidos antisentido adecuados para uso en las composiciones y métodos de la presente invención se pueden encontrar en las patentes de EE.UU. n°s 5.968.826 y 6.258.790.
- En particular, los oligonucleótidos antisentido descritos en las Tablas 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 y 24 de las patentes de EE.UU. antes mencionadas son potencialmente útiles en la presente invención. Un oligonucleótido antisentido particularmente preferido de la patente de EE.UU. n° 6.258.790 es ISIS 107248 (CTGAGTCTGTTTCCATTCT: SEQ ID NO: 81).
- En una realización preferida, compuestos antisentido y, en particular, oligonucleótidos antisentido son fijados como objetivo a una molécula de ácido nucleico que codifica integrina $\alpha 4$ humana. Esto incluye compuestos antisentido y, en particular, oligonucleótidos antisentido que reaccionan de forma cruzada con moléculas de ácido nucleico que codifican integrina $\alpha 4$ humana. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido preferidos que reaccionan de forma cruzada incluyen oligonucleótidos antisentido seleccionados de las SEQ ID N°s: 117, 120, 121, 122, 128, 130, 131, 132, 136, 137, 138, 141, 149, 150, 159, 160, 161, 167, 168 y 81.
- En una realización preferida, el compuesto antisentido y, en particular, el oligonucleótido antisentido inhibe la expresión de integrina $\alpha 4$, preferiblemente integrina $\alpha 4$ humana en al menos 20, preferiblemente al menos 30, más preferiblemente al menos 40 y todavía más preferiblemente al menos 50%.
- Secuencias de oligonucleótidos antisentido particularmente preferidas son ISIS 348592 (GCAGCATATTGTCACCTCC: SEQ ID NO: 136) e ISIS 107248 (CTGAGTCTGTTTCCATTCT: SEQ ID NO:81).
- Los compuestos de la invención también se pueden mezclar, encapsular, conjugar o asociar de otra manera con otras moléculas, estructuras de moléculas o mezclas de compuestos tales como, por ejemplo, liposomas y moléculas fijadas como objetivo al receptor para ayudar a la captación, distribución y/o absorción. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de formulaciones que ayudan a la captación, distribución y/o absorción de este tipo incluyen, pero no se limitan a las patentes de EE.UU. n°s: 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575 y 5.595.756.
- Los compuestos antisentido de la invención abarcan cualesquiera sales, ésteres o sales de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, incluido un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o residuo del mismo biológicamente activo. Por consiguiente, por ejemplo, la descripción se dirige a profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, sales farmacéuticamente aceptables de profármacos de este tipo y otros bioequivalentes.
- El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, un fármaco) dentro del cuerpo o células del mismo mediante la acción de enzimas endógenas u otros productos químicos y/o condiciones. En particular, versiones de profármaco de los oligonucleótidos de la invención se preparan como derivados SATE [(S-acetil-2-tioetil)fosfato] de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 93/24510 expedido a Gosselin et al., publicado el 9 de diciembre de 1993, o en el documento WO 94/26764 expedido a Imbach et al.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto parental y que no imparten efectos toxicológicos indeseados al mismo.

5 Sales por adición de bases farmacéuticamente aceptables se forman con metales o aminas tales como metales alcalinos y alcalinotérreos o aminas orgánicas. Ejemplos de metales utilizados como cationes son sodio, potasio, magnesio, calcio y similares. Ejemplos de aminas adecuadas son N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, diciclohexilamina, etilendiamina, N-metilglucamina y procaína (véase, por ejemplo, Berge et al. *J. of Pharma Sci.*, 1977, 66, 1-19). Las sales por adición de bases de dichos compuestos de carácter ácido se preparan 10 poniendo en contacto la forma ácido libre con una cantidad suficiente de la base deseada para producir la sal de la manera convencional. La forma de ácido libre puede regenerarse poniendo en contacto la forma de sal con un ácido y aislando el ácido libre de la manera convencional. Las formas de ácido libre difieren de sus respectivas formas de sal de alguna manera en determinadas propiedades físicas tales como solubilidad en disolventes polares, pero, por 15 lo demás, las sales son equivalentes a sus ácidos libres respectivos para los fines de la presente invención. Tal como se utiliza en esta memoria, una "sal por adición farmacéutica" incluye una sal farmacéuticamente aceptable de una forma ácida de uno de los componentes de las composiciones de la invención. Éstas incluyen sales de las aminas de ácidos orgánicos o inorgánicos. Sales de ácidos preferidos son los hidrocloruros, acetatos, salicilatos, nitratos y fosfatos. Otras sales farmacéuticamente aceptables adecuadas son bien conocidas por los expertos en la 20 técnica e incluyen sales de carácter básico de una diversidad de ácidos inorgánicos y orgánicos tales como, por ejemplo, con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; con ácidos orgánicos carboxílicos, sulfónicos, sulfo o fosfo o ácidos sulfámicos N-sustituidos, por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido malico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido glucónico, ácido 25 glucárico, ácido glucurónico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido embónico, ácido nicotínico o ácido isonicotínico; y con aminoácidos tales como los 20 alfa-aminoácidos implicados en la síntesis de proteínas en la naturaleza, por ejemplo ácido glutámico o ácido aspártico, y también con ácido fenilacético, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 30 4-metilbencenosulfónico, ácido naftalen-2-sulfónico, ácido naftalen-1,5-disulfónico, 2- ó 3-fosfoglicerato, glucosa-6-fosfato, ácido N-ciclohexilsulfámico (con la formación de ciclamatos) o con otros compuestos orgánicos ácidos tales como ácido ascórbico. Sales farmacéuticamente aceptables de compuestos también se pueden preparar con un cation farmacéuticamente aceptable. Cationes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos por los 35 expertos en la técnica e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio y de amonio cuaternario. También son posibles carbonatos o hidrógeno-carbonatos.

Para los oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc.; (b) sales por adición de ácidos formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmitíco, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico, y similares; (d) sales formadas a partir de aniones elementales tales 45 cloro, bromo y yodo.

Los compuestos antisentido de la presente invención se pueden utilizar en productos terapéuticos, profilácticos o paliativos. Para los productos terapéuticos, un animal, preferiblemente un ser humano, del que se sospecha que tiene una enfermedad, afección o trastorno que puede ser tratado reduciendo la capacidad de hiperreactividad de las 50 vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus, preferiblemente modulando la expresión de integrina $\alpha 4$, es tratado administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta invención. Los compuestos de la invención se pueden utilizar en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto antisentido a un diluyente o soporte farmacéuticamente aceptable, adecuado. El uso de los compuestos antisentido y métodos de la invención también puede ser útil profilácticamente, p. ej. para prevenir o retardar la infección, inflamación o formación del tumor, por ejemplo.

Los métodos y composiciones de la presente invención pueden utilizarse para tratar cualquier enfermedad o afección respiratoria asociada con una capacidad de hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus. Enfermedades o afecciones de este tipo resultarán evidentes para la

- persona experta e incluyen por ejemplo, enfermedades o afecciones inflamatorias, inmunes, de mucus y angiogénicas, de hiperreactividad de las vías respiratorias. Ejemplos de afecciones o enfermedades respiratorias asociadas con una supra-producción de mucus que pueden ser tratadas por los métodos y composiciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, afecciones respiratorias crónicas tales como asma, fibrosis quística, deficiencia en alfa-1 antitripsina, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y bronquitis crónica. Las composiciones también se pueden utilizar para tratar enfermedades o afecciones más asociadas con el tracto respiratorio superior tal como las vías nasales y los senos. Por ejemplo, se pueden tratar afecciones tales como rinitis, en donde algunos de los efectos de la enfermedad se manifiestan por sí mismos en el tracto respiratorio superior, y sinusitis. Además, las composiciones se pueden utilizar para tratar enfermedades o afecciones asociadas con la eosinofilia o que dependen de una hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR).
- En una realización preferida, los compuestos antisentido que fijan como objetivo integrina $\alpha 4$ pueden utilizarse para prevenir, mejorar y/o tratar una afección o enfermedad del sistema respiratorio o de las vías respiratorias asociado con la hiperreactividad de las vías respiratorias. Por ejemplo, el antisentido se puede utilizar para prevenir, mejorar y/o tratar el asma.
- En otra realización, los compuestos antisentido que fijan como objetivo integrina $\alpha 4$ pueden utilizarse para prevenir, mejorar y/o tratar una afección o enfermedad del sistema respiratorio y de las vías respiratorias asociado con una inflamación alérgica.
- En otra realización, los compuestos antisentido que fijan como objetivo integrina $\alpha 4$ pueden utilizarse para prevenir, mejorar y/o tratar una afección o enfermedad del sistema respiratorio o de las vías respiratorias asociado con la infiltración de células inflamatorias. Por ejemplo, los compuestos antisentido se pueden utilizar para prevenir, mejorar y/o tratar la infiltración de eosinófilos, infiltración de neutrófilos y/o leucocitos.
- En otra realización preferida, los compuestos antisentido que fijan como objetivo integrina $\alpha 4$ pueden utilizarse para prevenir, mejorar y/o tratar una afección o enfermedad del sistema respiratorio o de las vías respiratorias asociado con la supra-producción de mucus.
- La presente invención incluye también composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por vía tópica al sistema respiratorio o a la vía respiratoria.
- Se piensa que oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para la administración por vía oral.
- Composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir sprays, líquidos y polvos. Soportes, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares, farmacéuticos convencionales, pueden ser necesarios o deseables.
- Medicaciones para la administración tópica al sistema respiratorio o las vías respiratorias se administran generalmente por vía oral o por inhalación. Preferiblemente, las composiciones de la invención se inhalan o insuflan utilizando un dispositivo de dosificación adecuado. La composición se encuentra preferiblemente en forma de polvo o aerosolizada. Dispositivos de dosificación adecuados resultarán evidentes para la persona experta e incluyen, por ejemplo, inhaladores de dosis medida (MDI), nebulizadores, inhaladores de polvo seco (DPI), inhaladores nasales o en forma de gotas nasales. También se pueden utilizar dispositivos de spray nasal convencionales. La elección del dispositivo depende a qué parte del sistema respiratorio se desee el suministro. Gotas nasales o inhaladores nasales servirán a menudo para el suministro al tracto respiratorio superior tal como la nariz para tratar afecciones nasales tales como rinitis, mientras que MDI y DPI se utilizan a menudo para el suministro al tracto respiratorio inferior para afecciones tales como asma.
- Preferiblemente, la administración es tópica a zonas afectadas por la enfermedad o afección respiratoria. Adecuadamente, la administración es por vía pulmonar, p. ej. por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluidos mediante nebulizador, intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdermal.
- Composiciones y/o formulaciones farmacéuticas que comprenden los compuestos antisentido de la presente invención también pueden incluir potenciadores de la penetración con el fin de potenciar el suministro alimentario de los compuestos antisentido. Potenciadores de la penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco grandes categorías, es decir, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, tensioactivos y no tensioactivos

(Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 8, 91-192; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Pueden incluirse uno o más potenciadores de la penetración procedente de una o más de estas grandes categorías. Potenciadores de la penetración se describen en la patente de EE.UU. nº 6.083.923.

- 5 Diversos ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmitico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, recinleato, monooleína (también conocido como 1-mono-oleil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, mono- y di-glicéridos y sales fisiológicamente aceptables de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 8, 91-192; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El-Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654). Ejemplos de algunos ácidos grasos actualmente preferidos son caprato de sodio y laurato de sodio, utilizados por sí solos o en combinación a concentraciones de 0,5 a 5%.
- 10 15 Los papeles fisiológicos de la bilis incluyen facilitar la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas solubles en grasas (Brunton, Capítulo 38 En: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9^a ed., Hardman et al., comps. McGraw-Hill, Nueva York, N.Y. 1996, páginas 934-935). Diversas sales biliares naturales y sus derivados sintéticos actúan como potenciadores de la penetración. Así, la expresión "sal biliar" incluye cualquiera de los 20 componentes de la bilis que se producen de forma natural, así como cualquiera de sus derivados sintéticos. Una sal biliar actualmente preferida es ácido quenodesoxicólico (CDCA) (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.), generalmente utilizado a concentraciones de 0,5 a 2%.
- 25 30 Se pueden utilizar formulaciones de complejos que comprenden uno o más potenciadores de la penetración. Por ejemplo, sales biliares se pueden utilizar en combinación con ácidos grasos para preparar formulaciones complejas. Combinaciones preferidas incluyen CDCA combinada con caprato de sodio o laurato de sodio (generalmente 0,5 a 5%).
- 35 Agentes quelantes incluyen, pero no se limitan a etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (p. ej. salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), derivados N-acilados de colágeno, lauret-9 y N-aminoacilo, derivados de beta-dicetonas (enaminas) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 8, 92-192; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control. Rel.* 1990, 14, 43-51). Agentes quelantes tienen la ventaja añadida de servir también como inhibidores de DNasa.
- 40 45 Tensioactivos incluyen, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, polioxietilen-9-lauril-éter y polioxietilen-20-cetil-éter (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 8, 92-191); y emulsiones perfluoroquímicas tales como FC-43 (Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252-257).
- 50 55 Compuestos no tensioactivos incluyen, por ejemplo, ureas cílicas insaturadas, derivados de 1-alquil- y 1-alquenil-azaciclo-alcanona (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 8, 92-191); y agentes antiinflamatorios no esteroides tales como diclofenac sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).
- Tal como se utiliza en esta memoria, "compuesto soporte" se refiere a un ácido nucleico o análogo del mismo que es inerte (es decir, no posee actividad biológica per se) pero que es reconocido como un ácido nucleico por procesos *in vivo* que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico con actividad biológica, por ejemplo degradando el ácido nucleico biológicamente activo o fomentando su separación de la circulación. La co-administración de un ácido nucleico y un compuesto de soporte, típicamente con un exceso de esta última sustancia, puede dar como resultado una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperada en el hígado, riñón u otros depósitos extracirculatorios, presumiblemente debido a la competencia entre el compuesto de soporte y el ácido nucleico por un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un oligonucleótido parcialmente fosforotioado en tejido hepático se reduce cuando se co-administra con ácido poli-inosínico, sulfato de dextrano, ácido policitídico o ácido 4-acetamido-4'-isotiocianostilbeno-2,2'-disulfónico (Miyao et al., *Antisense Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

En contraposición a un compuesto de soporte, un "soporte farmacéuticamente aceptable" (excipiente) es un disolvente, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El soporte farmacéuticamente aceptable puede ser líquido o sólido y se selecciona

teniendo en mente la manera planificada de administración con el fin de proporcionar el volumen, consistencia, etc., deseado cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Soportes farmacéuticamente aceptables típicos incluyen, pero no se limitan a agentes de unión (p. ej. almidón de maíz pregelatinizado, polivinil-pirrolidona o hidroxipropil-metilcelulosa, etc.); cargas (p. ej. lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrógeno-fosfato de calcio, etc.); lubricantes (p. ej. estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico; estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de cereales, polietilenglicoles, benzoato sódico, acetato sódico, etc.); desintegrantes (p. ej. almidón, almidón-glicolato de sodio, etc.); o agentes humectantes (p. ej. lauril-sulfato de sodio, etc.). Sistemas de suministro oral de liberación controlada y/o revestimientos entéricos para formas de dosificación administradas por vía oral se describen en las patentes de EE.UU. n°s 4.704.295; 4.556.552; 4.309.406; y 4.309.404.

Las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos, que se encuentran convencionalmente en composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos por la técnica. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos compatibles adicionales tales como, p. ej., agentes anti-prurito, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de diversas formas de dosificación de la composición de la presente invención tales como colorantes, agentes saboreantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes de espesamiento y estabilizadores. Sin embargo, materiales de este tipo, cuando se añaden, no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la invención.

Independientemente del método mediante el cual los compuestos antisentido de la invención se introducen en un paciente, se pueden utilizar sistemas de dispersión coloidal como vehículos de suministro para potenciar la estabilidad in vivo de los compuestos y/o para fijar como objetivo los compuestos a un órgano, tejido o tipo de célula particular. Sistemas de dispersión coloidal incluyen, pero no se limitan a complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, liposomas y complejos de lípidos:oligonucleótidos de estructura no caracterizada. Un sistema de dispersión coloidal preferido es una pluralidad de liposomas. Los liposomas son esferas microscópicas que tienen un núcleo acuoso rodeado por una o más capas externas constituidas por lípidos dispuestos en una configuración bicapa (véase, generalmente, Chonn et al., Current Op. Biotech., 1995, 6, 698-708). La preparación de liposomas se describe en la patente de EE.UU. n° 6.083.923.

Determinadas realizaciones de la invención proporcionan liposomas y otras composiciones que contienen (a) uno o más compuestos antisentido y (b) uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que actúan mediante un mecanismo antisentido. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos de este tipo incluyen, pero no se limitan a fármacos anticáncer, tales como daunorubicina, dactinomicina, doxorubicina, bleomicina, mitomicina, nitrógeno mostaza, clorambucilo, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina (CA), 5-fluorouracilo (5-FU), floxuridina (5-FUDR), metotrexato (MTX), colchicina, vincristina, vinblastina, etopósido, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Véase, generalmente, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 1987, Berkow et al., comps. Rahway, N.J., 1206-1228. Fármacos antiinflamatorios, que incluyen pero no se limitan a fármacos anti-inflamatorios no esteroides y corticosteroides, y fármacos antivirales que incluyen, pero no se limitan a ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también se pueden combinar en composiciones de la composición. Véase, generalmente, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 1987, Berkow et al., comps. Rahway, N.J., 2499-2506 y 46-49, respectivamente). Otros agentes quimioterapéuticos no antisentido se encuentran también dentro del alcance de esta invención. Dos o más compuestos combinados se pueden utilizar juntos o secuencialmente.

En otra realización, relacionada, composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, fijados como objetivo a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales fijados como objetivo a un segundo ácido nucleico diana. Dos o más compuestos combinados se pueden utilizar juntos o secuencialmente.

La formulación de composiciones terapéuticas y su subsiguiente administración se piensa que está dentro de la experiencia de aquellos en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y capacidad de respuesta del estado patológico a tratar, durando el curso del tratamiento desde varios días a varios meses, o hasta que se efectúa una cura o se alcanza una disminución del estado patológico. Programas de dosificación óptimos se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente. Personas de experiencia ordinaria pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. Dosificaciones óptimas pueden variar en función de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales y pueden estimarse, generalmente, en base a las CEs₅₀ que se encuentran eficaces en modelos con animales *in vitro* e *in vivo*.

5 Preferiblemente, la dosificación se encuentra en el intervalo de 0,005 a 200 µg, más preferiblemente de 0,01 a 200 µg, más preferiblemente de 0,1 a 5 µg y, todavía más preferiblemente, de 0,5 a 1 µg por kg de peso corporal. Las dosificaciones se pueden administrar una vez o más veces al día, semana, mes, o año, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Preferiblemente, las dosis se administran no más frecuentemente que una vez al día, más preferiblemente no más frecuentemente que una vez cada dos días.

10 Aunque la presente invención ha sido descrita con especificidad de acuerdo con determinas realizaciones preferidas de la misma, los siguientes ejemplos sirven únicamente para ilustrar la invención y no pretenden limitar la misma.

15 EJEMPLOS

15 Se confirmó la capacidad de oligonucleótidos antisentido (ASOs) específicos para la integrina α4 de inhibir la respuesta inflamatoria alérgica al enfrentamiento con antígenos en el pulmón de ratones.

20 **Rastreo de oligonucleótidos en cuanto a su capacidad para suprimir la expresión de ARNm de integrina α4**

25 Se rastreó una serie de oligonucleótidos antisentido fijados como objetivo a integrina α4 en células bEND de ratón en cuanto a su capacidad para reducir los niveles de ARN de integrina α4 ("% de inhibición"). El diseño, modificación, síntesis y ensayo de compuestos antisentido se describe en la técnica anterior, por ejemplo en la patente de EE.UU. nº 6.743.909.

30 En síntesis, las células fueron transfectadas con lipofectina. La concentración de oligonucleótidos era 30 nM. Todos los compuestos mostrados son gapmers 5-10-5 MOE (es decir, azúcares de 2'-O-metoxietilo en los cinco nucleósidos contiguos en cualquier extremo de la molécula y nucleósidos 2' desoxi en los 10 nucleósidos centrales) con cadena principal de fosforotioato y 5-metilcitosina para cada C.

35 El conjunto de cebador/sonda utilizado era RTS2137 (todos están no modificados, excepto las etiquetas en la sonda).

- 30 • Directo: ISIS 348635 GAAAGGTAAAAGCTTGGCTCATACT (desoxi, cadena principal diéster) (SEQ ID NO: 100)
- Inverso: ISIS 348636 TCTGAGAACCCATCTGCATTGA (SEQ ID NO: 101)
- Sonda: ISIS 348637 5'FAM-TGGAGCTTCTGTCTGCGCTGTGGATAMRA3' (SEQ ID NO: 102)

35 Los resultados se presentan en la Tabla 1

Tabla 1: Inhibición de los niveles de ARN de integrina α4

Nº ISIS	Secuencia	SEQ ID Nº	% de inhibición	Coincidencias Oligo en especies
348558	AGAGCTTCAGTGTGTTGCTT	103	17,9	Ratón
348559	TATATGTACATACACACAAG	104	25,8	Ratón
348560	AGTGGCACCCACCTCCTCTT	105	5,0	Ratón
348561	TCAACCTCACCTTAGCAACA	106	0,4	Ratón
348562	CTTGGGATGCAATTAAATGC	107	42,7	Ratón
348563	AAATGCTTACCCCTGAGAGG	108	13,0	Ratón
348564	TCATGCAATACTTGAAAAGA	109	13,3	Ratón
348565	GGCCACTGACCAGAGTTGCA	110	43,8	Ratón/Rata
348566	CCGCAGCCATGCGCTCTTGG	111	65,4	Ratón
348567	CGCTTCCGCAGCCATGCGCT	112	61,1	Ratón
348568	CACCTCGCTCCGCAGCCAT	113	53,8	Ratón
348569	CCAGGTTGAGGTGCCCCG	114	47,3	Ratón/Rata
348570	AGTAGCCAAACAGCGTGCCG	115	46,0	Ratón/Rata
348571	GTGGCTGTGCAGCACCAACCG	116	40,0	Ratón/Rata
348572	CCCAGCTGGAGCTGTTGCGA	117	52,8	Ser humano/Ratón/Rata
348573	GGCTACCCAGCTGGAGCTGT	118	31,3	Ser humano/Ratón
348574	ATATTTTCCACCTGTGCCC	119	60,3	Ratón/Rata
348575	GCAAAATTTCTCCAAATT	120	50,3	Ser humano/Ratón/Rata
348576	ATGATGCAAAATTTCTCCA	121	57,3	Ser humano/Ratón
348578	CCAGCTTGACATGATGCAAA	122	56,2	Ser humano/Ratón
348579	ATATTCCAGCTTGACATGAT	123	20,6	Ser humano/Ratón
348580	GCCCCCATCACAATTAAATC	124	33,8	Ser humano/Ratón
348581	GTAGTTATATTGTAGACAAA	125	29,2	Ser humano/Ratón
348582	ACTGAGTAGCCTAAGTAGCT	126	39,4	Ratón
348583	CTATCTGTTGTTGAGGG	127	21,2	Ratón/Rata
348584	CCAAGCTTTTACCTTTCAT	128	71,0	Ser humano/Ratón/Rata
348585	CAGACAGAAGCTCCAAAGTA	129	25,7	Ser humano/Ratón/Rata
348586	CCATCTGCATTGAGGTCCAC	130	65,4	Ser humano/Ratón/Rata
348587	AGAAGCCATCTGCATTGAGG	131	64,3	Ser humano/Ratón/Rata
348588	ATCTGAGAAGCCATCTGCAT	132	62,5	Ser humano/Ratón/Rata
348589	CTGATGGTGTCTGCATGGG	133	13,7	Ser humano/Ratón
348590	CCATGCCAGAGTTGATGTAC	134	45,2	Ratón/Rata
348591	CATTTCAACCATCACAGCTC	135	40,1	Ratón/Rata
348592	GCAGCATATTGCACTTCC	136	70,7	Ser humano/Ratón/Rata
348593	ATCTGCGACATATTGTCA	137	44,3	Ser humano/Ratón
348594	CCCAAATCTGCGACATATT	138	52,9	Ser humano/Ratón
348595	TTGTCAATGTCGCCAAGATT	139	21,1	Ser humano/Ratón/Rata
348596	CCATTGTAATGTAGACAGC	140	27,1	Ratón/Rata
348597	GTCCTTCAATTCTCTGTGAG	141	66,9	Ser humano/Ratón
348598	TCTGCATCAATTGTCCTGA	142	44,9	Ser humano/Ratón/Rata
348599	CATATCCATTGTTGCTGCA	143	46,8	Ratón/Rata
348600	TCCTTAGCAACACTGCAGAA	144	56,2	Ratón/Rata
348601	GATGCTTCAACAATCACTAC	145	44,5	Ratón/Rata
348602	ATGGCTTAAAGATGCTCAA	146	55,5	Ratón/Rata
348603	TAGCCTGGGACCTCTTGCC	147	52,1	Ratón/Rata
348604	CAAAACGATGTAGCCTGGGA	148	44,9	Ratón/Rata
348605	CCTGTAATCACGTCAGAAGT	149	47,7	Ser humano/Ratón
348606	TGCTTCCGTAAATCACGTCA	150	63,7	Ser humano/Ratón
348607	CCACTGCTTGAAGACTCGTAT	151	52,8	Ratón/Rata
348608	GGTGTGTCTACATTCTCT	152	43,0	Ratón/Rata
348609	GTCTTCCGCATGAATGCCT	153	52,1	Ratón/Rata
348610	CCAAGGTGGTATGTGGCCTC	154	51,2	Ratón/Rata

Nº ISIS	Secuencia	SEQ ID Nº	% de inhibición	Coincidencias Oligo en especies
348611	CACATGATGCCAAGGTGGT	155	58,3	Ratón/Rata
348612	GTTTGTGATCACATGATGC	156	52,9	Ratón/Rata
348613	CAAAACCTTGCAAAGTTAT	157	33,0	Ser humano/Ratón
348614	ACATCCAGGAGAAAGCTAAT	158	20,2	Ser humano/Ratón
348615	AGCTCACATCCAGGAGAAAG	159	59,7	Ser humano/Ratón
348616	GAGTGAGCTCACATCCAGGA	160	54,4	Ser humano/Ratón
348617	CTGCTGAGTGAGCTCACATC	161	48,7	Ser humano/Ratón
348618	GTTCACAAAGCCATGAACAG	162	29,1	Ratón
348619	TACACAAATGAAGTTGGGTT	163	33,8	Ser humano/Ratón
348620	ATCCATACACAAATGAAGTT	164	40,5	Ser humano/Ratón
348621	AGAATTGGTACCATTTATT	165	39,4	Ser humano/Ratón
348622	TCATGCAATACAGGAGTCTC	166	34,2	Ratón
348623	CGTTGGGTCTTGATGATG	167	52,2	Ser humano/Ratón
348624	ATAAGTCCAAGTAGCAAGCT	168	46,6	Ser humano/Ratón
348625	GTACAATAAGTCCAAGTAGC	169	59,1	Ser humano/Ratón
348626	TCTTGTAGGATAGATTGTA	170	14,8	Ser humano/Ratón
348627	TAGAAGTCTTCAGTCATCAT	171	42,3	Ratón
348628	GATTCCCCTGCACTAAGAG	172	53,5	Ratón
348629	AAGCCACCTTGGGTAGCTT	173	24,2	Ratón
348630	GACGGTTGGCCAAAGAGAAAG	174	21,3	Ratón
348631	CACGATGAGCCTCCTCTTCC	175	0,5	Ratón
348632	CACACATGCATGATTATATT	176	-	Ratón
348633	GCCCCAAAGGAGATGTGATA	177	50,6	Ratón
348634	CGAGGCGAGCATTACCAGC	178	37,7	Ratón

Tal como se indica en la Tabla 1, un cierto número de los oligonucleótidos eran compuestos entre especies que son perfectamente homólogos a la integrina $\alpha 4$ de rata y/o humana así como a la secuencia de ratón. A partir de la Tabla 1 resulta evidente que muchos compuestos inhibían los niveles de ARN de integrina $\alpha 4$ en un 50% o más.

5 Los siguientes dos oligonucleótidos antisentido de integrina $\alpha 4$ no solapantes se seleccionaron para una evaluación ulterior:

- 10 ISIS 348592 (GCAGCATATTGTCACTTCC: SEQ ID NO: 136), un gapmer 5-10-5 MOE (es decir, azúcares de 2'-O-metoxietilo en los cinco nucleósidos contiguos en cualquier extremo de la molécula y nucleósidos 2'-desoxi en los 10 nucleósidos centrales) con cadena principal de fosforotriato y 5-metilcistosina para cada C que es totalmente complementario a integrina $\alpha 4$ humana, de ratón y rata.
- 15 ISIS 348574 (ATATTTTCCACCTGTGCC: SEQ ID NO: 119), un gapmer 5-10-5 MOE con cadena principal de fosforotriato y 5-metilcistosina para cada C que es totalmente complementario a integrina $\alpha 4$ humana, de ratón y rata.

20 También se realizó un oligonucleótido de apareamiento erróneo de 8 pares de bases para ISIS 348574. Éste era ISIS 358342 (ACAGTGTACCTCCTTTCTC: SEQ ID NO: 179), un gapmer 5-10-5 MOE con cadena principal de fosforotriato.

EJEMPLO 1: Estudio *in vivo* sobre la capacidad de ASOs administrados en aerosol para reducir el nivel de la proteína integrina $\alpha 4$ expresada en ratones enfrentados a alérgenos

- 25 La inflamación de las vías respiratorias se observa en pacientes con asma alérgico. Este estudio evaluó la eficacia de ISIS 348592 e ISIS 348574 en un modelo murino *in vivo* de asma alérgico. En la técnica anterior se describen modelos de inflamación de los pulmones inducida por ovoalbúmina y la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR). Por ejemplo, éstos se describen en la patente de EE.UU. nº 6.136.603. Un modelo preferido es el desarrollado por Hessel et al. (*J. Immunol.* 1998, 160, 2998-3005). La sensibilización de ratones BALB/c con ovoalbúmina induce un alto nivel de IgE específica para ovoalbúmina en suero. La inhalación de ovoalbúmina en ratones sensibilizados provoca una respuesta broncoconstrictiva inmediata. La inhalación repetida de ovoalbúmina en animales sensibilizados induce una hiperreactividad de las vías respiratorias no específica *in vivo* y la infiltración

de leucocitos en el tejido de las vías respiratorias.

En síntesis, ratones BALB/c machos fueron activamente sensibilizados mediante inyección IP de 20 µg de ovoalbúmina en adyuvante de hidróxido de aluminio los días 0 y 14. Diez días después de la última inyección, los ratones fueron expuestos a aerosoles de ovoalbúmina (OVA al 1% en solución salina) una vez al día durante 3 días (días 24, 25 y 26). El aerosol fue generado con un nebulizador tal como Medix 8001 (Sussex, Reino Unido). Los animales fueron expuestos durante 30 minutos por cada enfrentamiento al aerosol.

Los oligonucleótidos antisentido fueron administrados a los ratones durante el período de enfrentamiento. Los días 17, 19, 21, 24 y 26 los ratones sensibilizados fueron dosificados con 0,01, 1 ó 100 µg/kg de ISIS 348592 o ISIS 348574 mediante administración por aerosol.

Los grupos de tratamiento eran como sigue:

Grupo	Tratamiento (ASO)	Dosis (µg/kg de peso corporal)
1	ISIS 348592	0,01
2	ISIS 348592	1
3	ISIS 348592	100
4	ISIS 348574	0,01
5	ISIS 348574	1
6	ISIS 348574	100
7	Vehículo	
8	No tratado anteriormente	

En cada uno de los grupos de tratamiento había 10 animales, y todos los animales fueron sacrificados el día 28. Existían dos grupos testigo, recibiendo uno el vehículo de aerosol solo (Grupo 7) y siendo el otro grupo testigo un testigo no tratado anteriormente con el medicamento (Grupo 8).

La capacidad de respuesta de las vías respiratorias a metacolina se midió *in vivo* 48 horas después de la última exposición con aerosol utilizando el método de presión por sobreflujo de aire en el que se midió la resistencia bronquial al inflamamiento. Se construyeron curvas de dosis-respuesta de metacolina nebulizada en la línea de referencia el día 0 antes de la sensibilización con antígenos para todos los grupos de animales. La función pulmonar se vigiló utilizando un pleitismógrafo Buxco BioSystem (Buxco, Troy, N.Y.) y se expresó como el aumento de pausa (Penh) que se correlaciona con la resistencia de las vías respiratorias medida (Hamelmann et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1997, 156, 766-775).

Los ratones fueron anestesiados mediante inyección IP de uretano y se dispusieron en una manta caldeada. La tráquea se canuló y un pequeño catéter de polietileno se colocó en la vena yugular para las administraciones intravenosas. Se suprimió la respiración espontánea mediante inyección intravenosa de cloruro de tubocurarina. Cuando se detuvo, la cánula traqueal se fijó a una bomba de respiración. La capacidad de respuesta de las vías respiratorias se midió a las 48 horas después del enfrentamiento a los antígenos midiendo la respuesta de las vías respiratorias a metacolina en cada una de las dosis. Los registros post-enfrentamiento se compararon con los registros de la línea de referencia para cada uno de los grupos para generar un índice de estimulación del Penh. Los resultados se presentan en las Figuras 1 a 4.

La Figura 1 representa los índices de estimulación del Penh medios en cada uno de los grupos para concentraciones crecientes de metacolina ((1) -♦- es 348592 a 0,01 µg/kg; (2) -■- es 348592 a 1 µg/kg; (3) -▲- es 348592 a 100 µg/kg; (4) -x- es 348574 a 0,01 µg/kg; (5) -*- es 348574 a 1 µg/kg; (6) -●- es 348574 a 100 µg/kg; (7) -|- es el vehículo; (8) – es el no tratado anteriormente con el medicamento).

Utilizando el paquete estadístico JMP para comparar las curvas completas, HSD de Tukey muestra que el grupo vehículo es diferente a todos los otros grupos, que el grupo no tratado anteriormente con el medicamento es similar a los grupos de animales que recibieron ASO ISIS 348574 (a 0,01, 1 y 100 µg/kg) (es decir, grupos 4 (-x-), 5 (-*) y 6 (-●-)) y que el grupo no tratado anteriormente con el medicamento es diferente a los grupos de animales que recibieron ASO ISIS 348592 (a 0,01, 1 y 100 µg/kg) (es decir, grupos 1 (-♦-), 2 (-■-) y 3 (-▲-)). Los análisis T de Student demostraron lo mismo que HSD de Tukey.

La Figura 2 es un diagrama de barras que muestra los índices de estimulación del Penh para cada uno de los grupos a una concentración de metacolina de 100 mg/ml. De nuevo, con respecto a los grupos ISIS 348574 (4, 5 y 6), existe una reducción significativa en los índices de estimulación del Penh ($P \leq 0,05$ frente al grupo de vehículo). La Figura 3

muestra los índices de estimulación del Penh para cada uno de los animales individuales de cada uno de los grupos a una concentración de metacolina de 100 mg/ml. La Figura 4 muestra los valores de la línea de referencia para cada uno de los grupos de tratamiento.

5 Estos resultados demuestran claramente que los ASOs inhibían la hiperreactividad de las vías respiratorias alérgicas inducida por metacolina, reduciendo el índice del Penh pico desde aproximadamente 7,5 (sin oligo) hasta aproximadamente 4,5 (ISIS 348574 a 0,01 y 1 μ g/kg), aproximadamente 4 (ISIS 348574 a 100 μ g/kg), aproximadamente 5,5 (ISIS 348592 a 0,01 μ g/kg), aproximadamente 5,0 (ISIS 348592 a 1 μ g/kg) y aproximadamente 6,25 (ISIS 348592 a 100 μ g/kg). Este estudio es la prueba del concepto de la actividad de compuesto antisentido 10 integrina α 4 en un modelo de asma con ratones, y demuestra que una dosis muy baja (p. ej 0,01 μ g/kg) es muy eficaz para inhibir la AHR. Demuestra, además que la administración con aerosol parece ser una vía de administración muy eficaz de los compuestos antisentido para el tratamiento de afecciones respiratorias de este tipo.

15 El lavado broncoalveolar (BAL – siglas en inglés) se utilizó para medir la infiltración de células de tejido de las vías respiratorias. 48 horas después del último aerosol, los ratones fueron anestesiados, se realizó una canulación traqueal y se recogieron los líquidos de lavado con solución salina. Los ratones fueron lavados cinco veces con partes alícuotas de 1 ml de solución salina apirógena. Las células derivadas de cada uno de los lavados se agruparon, se lavaron con PBS fría y se resuspendieron en 200 μ l de PBS fría. El número total de células se recontó y categorizó. Los resultados se presentan en las Figuras 5 a 8.

20 25 La Figura 5 es un diagrama de barras que representa el número medio de células macrófagos ("Mac"), linfocitos ("Lym"), eosinófilos ("Eos") y neutrófilos ("Neu") como un porcentaje de las células en las vías respiratorias para cada uno de los grupos de tratamiento. Se observó una disminución significativa en el reclutamiento de eosinófilos en todos los grupos tratados con compuestos antisentido. Adicionalmente, también parecía existir una disminución en todos los grupos tratados con antisentido de reclutamiento de linfocitos y neutrófilos.

30 35 La Figura 6 es un diagrama de barras que muestra el número medio de eosinófilos para cada uno de los grupos. Para la totalidad de los grupos tratados con ASOs (es decir, grupos 1-3, tratados con 0,01, 1 y 100 μ g/kg de ISIS 348592, respectivamente, y los grupos 4-6 tratados con 0,01, 1 y 100 μ g/kg de ISIS 348574, respectivamente) existía una disminución significativa en el reclutamiento de eosinófilos ($P \leq 0,05$ frente al grupo de vehículo). La Figura 7 muestra el número de eosinófilos para cada uno de los animales individuales en cada uno de los grupos.

35 40 Las Figuras 8a y 8b muestran los niveles de IgE e IgG1 específicos para ovoalbúmina para cada uno de los grupos de tratamiento 1 a 8.

EJEMPLO 2: Estudio *in vivo* sobre la capacidad de ASOs administrados con aerosol para reducir el número de vías respiratorias PAS-positivas en ratones enfrentados a alérgenos

Este estudio evaluó la capacidad de ISIS 348574 de reducir el nivel de mucus producido en un modelo murino *in vivo* 40 de asma alérgica y se comparó con un testigo de 8 apareamientos erróneos ASO ISIS 358342. El nivel de mucus se confirmó mediante tinción con reactivo de ácido peryódico Schiff (PAS).

45 Los ratones fueron sensibilizados, enfrentados y tratados con ASOs exactamente como se describe en el estudio 1. Los grupos de tratamiento eran como sigue:

Grupo	Tratamiento (ASO)	Dosis (μ g/kg de peso corporal)
1	ISIS 348574	0,01
2	ISIS 348574	1
3	ISIS 348574	100
4	ISIS 358342	0,01
5	ISIS 358342	1
6	ISIS 358342	100
7	Vehículo	
8	No tratado anteriormente con medicamento	

50 En cada uno de los grupos de tratamiento había 15 animales. Había dos grupos testigo, recibiendo uno el vehículo de aerosol solo (Grupo 7) y siendo el otro grupo testigo un grupo no tratado anteriormente con el medicamento (Grupo 8). El día 27, cinco animales de cada uno de los grupos fueron sometidos a FACS. El día 28, los 10 animales restantes de cada uno de los grupos fueron sacrificados.

Los pulmones se inflaron y fijaron en formalina, se cortaron y montaron secciones parasagitales, los portaobjetos se tiñeron con PAS y se recogieron imágenes (x5) (dos imágenes por ratón). Se compararon los grupos de vehículo y de 1 µg/kg. Los resultados se presentan en la Figura 9.

- 5 La Figura 9 es un diagrama de barras que muestra el número medio de vías respiratorias PAS positivas para cada uno de los grupos de tratamiento. Se observa una clara disminución en las vías respiratorias PAS positivas en los grupos de tratamiento 1-3, es decir, aquellos grupos que recibieron ASO ISIS 348574, en los que la disminución era significativa a niveles de dosis de 0,01 y 1 µg/kg ($P \leq 0,05$ frente al grupo de vehículo). Esto indica una reducción en 10 el mucus de las vías respiratorias después del tratamiento con antisentido.

EJEMPLO 3: Estudio *in vivo* de la actividad farmacológica mediada por diana de un ASO administrado con aerosol en un modelo de asma con ratones

- 15 Células cadherina E positivas son células epiteliales en las que aproximadamente el 25% son células calciformes productoras de mucus. Este estudio evaluó la capacidad de ISIS 348574 de fijar como objetivo la producción de integrina α4 en células cadherina E positivas y la comparó con el testigo de 8 apareamientos erróneos (MM – siglas en inglés) de ASO ISIS 358342.
- 20 Los ratones fueron sensibilizados, enfrentados y tratados con ASOs exactamente como se describe en el estudio 1. Los grupos de tratamiento eran como sigue:

Grupo	Tratamiento	Dosis (µg/kg de peso corporal)
1	ISIS 348574 (ASO)	0,01
2	ISIS 348574 (ASO)	1
3	ISIS 358342 (MM)	0,01
4	ISIS 358342 (MM)	1
5	Vehículo	
6	No tratado anteriormente	

- 25 En cada uno de los grupos de tratamiento había 15 animales. Había dos grupos testigo, recibiendo uno el vehículo de aerosol solo (Grupo 5) y siendo el otro grupo testigo un grupo no tratado anteriormente con el medicamento (Grupo 6). El día 27, cinco animales de cada uno de los grupos fueron sometidos a FACS. El día 28, los 10 animales restantes de cada uno de los grupos fueron sacrificados. Los pulmones se recuperaron y digirieron con colagenasa. La composición de las células y la expresión de la proteína VLA-4 en células de pulmones recuperadas se determinó mediante inmunotinción con anticuerpos monoclonales específicos, seguido de análisis citométrico de flujo (FACS).

- 30 30 Las células fueron expuestas a anticuerpos marcados contra cadherina E e integrina α4. Los resultados se muestran en la Figura 11. La población de células cadherina E positivas mostró una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de células también positivas para integrina α4, a dosificaciones tanto de 0,01 como de 1 µg/kg antisentido ($*P < 0,05$ frente al vehículo).

- 35 35 Así, dosis bajas de ASO parecen reducir específicamente los niveles de integrina α4 en la población de células cadherina E positivas.

- 40 40 En resumen, la administración con aerosol de ASO de integrina α4 a ratones sensibilizados con ovoalbúmina antes del enfrentamiento local a alérgenos, redujo el nivel de proteína integrina α4 expresada sobre la superficie de las células de los pulmones, inhibía la AHR (Figuras 1-4), suprimía una infiltración de eosinófilos y linfocitos inducida por alérgenos de las vías respiratorias (Figuras 5-7) y reducía el número de vías respiratorias PAS positivas (Figura 9), siendo esto indicativo de una reducción en el mucus. Una secuencia de oligonucleótidos testigo con apareamientos erróneos de 8 pares de bases no tenía efecto.

- 45 45 El potencial de la integrina α4 de inhibir procesos múltiples que juegan importantes papeles en la inflamación sugiere que compuestos antisentido de integrina α4, suministrados a dosis bajas, pueden ser eficaces productos terapéuticos para el tratamiento de afecciones respiratorias tales como asma crónica. Además de ello, los resultados obtenidos por los autores de esta invención demuestran que el suministro tópico, especialmente mediante aerosol, 50 es un medio de administración muy eficaz. Los resultados obtenidos por los autores de esta invención confirman también que la integrina α4 juega un papel vital en la AHR y en el reclutamiento de eosinófilos a las vías respiratorias en un modelo de asma con ratones.

Se apreciará por personas expertas en la técnica que se pueden realizar numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención tal como se muestra en las realizaciones específicas. Por lo tanto, las presentes realizaciones se han de considerar en todos los respectos como ilustrativas y no restrictivas.

5

Listado de secuencias

- <160> Número de SEQ ID Nºs: 179
- 10 <210> SEQ ID Nº: 1
<211> LONGITUD: 3567
<212> TIPO: ADN
<213> ORGANISMO: Homo sapiens
<221> NOMBRE/CLAVE: CDS
- 15 <222> LOCALIZACIÓN: (411).... (3527)
<300> INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:
<308> NÚMERO DE ACCESO A LA BASE DE DATOS: L12002 Genbank
<309> FECHA DE ENTRADA EN LA BASE DE DATOS: 15-02-1996
<400> SECUENCIA: 1

ES 2 392 449 T3

cgccatcccc	cgctctgcgg	actgggaggc	ccgggcccagg	acgcgagtct	gcgcagccga	60	
ggttccccag	cgccccctgc	agccgcgcgt	aggcagagac	ggagcccgcc	cctgcgcctc	120	
cgcaccacgc	ccgggaccgg	acccagcgcc	ccgtaccgg	agaagcagcg	cgagcacccg	180	
aagctcccg	ctcggcggca	gaaaccggga	gtggggccgg	gcgagtgccg	ggcatcccg	240	
gccggcccg	acgtccgccc	gcggtgggccc	gacttccct	cctcttccct	ctctcattcc	300	
tttagcccg	tggcgccgga	cacgctgcgc	ctcatctctt	ggggcgttct	tccccgttgg	360	
ccaaccgtcg	catcccggtgc	aactttgggg	tagtgccgc	ttagtgttga	atg ttc	416	
					Met Phe		
					1		
ccc acc gag	agc gca tgg	ctt ggg	aag cga	ggc gcg	aac ccg	ggc ccc	464
Pro Thr Glu	Ser Ala Trp	Leu Gly	Lys Arg	Gly Ala	Asn Pro	Gly Pro	
5	10	15					
gaa gcc gcc gtc	cgg gag acg	gtg atg	ctg ttg	ctg tgc	ctg ggg	gtc	512
Glu Ala Ala Val	Arg Glu Thr	Val Met	Leu Leu	Leu Cys	Leu Gly	Val	
20	25	30					
ccg acc ggc cgc	ccc tac aac	gtg gac	act gag	agc gcg	ctg ctt	tac	560
Pro Thr Gly Arg	Pro Tyr Asn	Val Asp	Thr Glu	Ser Ala	Leu Leu	Tyr	
35	40	45	50				
cag ggc ccc cac	aac acg ctg ttc	ggc tac	tcg gtc	gtg ctg	cac agc		608
Gln Gly Pro His	Asn Thr Leu	Phe Gly	Tyr Ser	Val Val	Leu His	Ser	
55	60	65					
cac ggg gcg aac	cgt tgg ctc	cta gtg	ggt gcg	ccc act	gcc aac	tgg	656
His Gly Ala Asn	Arg Trp Leu	Leu Val	Gly Ala	Pro Thr	Ala Asn	Trp	
70	75	80					
ctc gcc aac gct	tca gtg atc	aat ccc	ggg gcg	att tac	aga tgc	agg	704
Leu Ala Asn Ala	Ser Val Ile	Asn Pro	Gly Ala	Ile Tyr	Arg Cys	Arg	
85	90	95					
atc gga aag aat	ccc ggc cag	acg tgc	gaa cag	ctc cag	ctg ggt	agc	752
Ile Gly Lys Asn	Pro Gly Gln	Thr Cys	Glu Gln	Leu Gln	Leu Gly	Ser	

ES 2 392 449 T3

100	105	110	
cct aat gga gaa cct tgt gga aag act tgt ttg gaa gag aga gac aat Pro Asn Gly Pro Cys Gly Lys Thr Cys Leu Glu Glu Arg Asp Asn 115 120 125 130 800			
cag tgg ttg ggg gtc aca ctt tcc aga cag cca gga gaa aat gga tcc Gln Trp Leu Gly Val Thr Leu Ser Arg Gln Pro Gly Glu Asn Gly Ser 135 140 145 848			
atc gtg act tgt ggg cat aga tgg aaa aat ata ttt tac ata aag aat Ile Val Thr Cys Gly His Arg Trp Lys Asn Ile Phe Tyr Ile Lys Asn 150 155 160 896			
gaa aat aag ctc ccc act ggt ggt tgc tat gga gtg ccc cct gat tta Glu Asn Lys Leu Pro Thr Gly Cys Tyr Gly Val Pro Pro Asp Leu 165 170 175 944			
cga aca gaa ctg agt aaa aga ata gct ccg tgt tat caa gat tat gtg Arg Thr Glu Leu Ser Lys Arg Ile Ala Pro Cys Tyr Gln Asp Tyr Val 180 185 190 992			
aaa aaa ttt gga gaa aat ttt gca tca tgt caa gct gga ata tcc agt Lys Lys Phe Gly Glu Asn Phe Ala Ser Cys Gln Ala Gly Ile Ser Ser 195 200 205 210 1040			
ttt tac aca aag gat tta att gtg atg ggg gcc cca gga tca tct tac Phe Tyr Thr Lys Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Pro Gly Ser Ser Tyr 215 220 225 1088			
tgg act ggc tct ctt gtc tac aat ata act aca aat aaa tac aag Trp Thr Gly Ser Leu Phe Val Tyr Asn Ile Thr Thr Asn Lys Tyr Lys 230 235 240 1136			
gct ttt tta gac aaa caa aat caa gta aaa ttt gga agt tat tta gga Ala Phe Leu Asp Lys Gln Asn Gln Val Lys Phe Gly Ser Tyr Leu Gly 245 250 255 1184			
tat tca gtc gga gct ggt cat ttt cgg agc cag cat act acc gaa gta Tyr Ser Val Gly Ala Gly His Phe Arg Ser Gln His Thr Thr Glu Val 260 265 270 1232			
gtc gga gga gct cct caa cat gag cag att ggt aag gca tat ata ttc Val Gly Gly Ala Pro Gln His Glu Gln Ile Gly Lys Ala Tyr Ile Phe 275 280 285 290 1280			
agc att gat gaa aaa gaa cta aat atc tta cat gaa atg aaa ggt aaa Ser Ile Asp Glu Lys Glu Leu Asn Ile Leu His Glu Met Lys Gly Lys 295 300 305 1328			
aag ctt gga tcg tac ttt gga gct tct gtc tgt gct gtg gac ctc aat Lys Leu Gly Ser Tyr Phe Gly Ala Ser Val Cys Ala Val Asp Leu Asn 310 315 320 1376			
gca gat ggc ttc tca gat ctg ctc gtg gga gca ccc atg cag agc acc Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Gln Ser Thr 325 330 335 1424			

ES 2 392 449 T3

atc aga gag gaa gga aga gtg ttt gtg tac atc aac tct ggc tcg gga Ile Arg Glu Glu Gly Arg Val Phe Val Tyr Ile Asn Ser Gly Ser Gly	1472
340 345 350	
gca gta atg aat gca atg gaa aca aac ctc gtt gga agt gac aaa tat Ala Val Met Asn Ala Met Glu Thr Asn Leu Val Gly Ser Asp Lys Tyr	1520
355 360 365 370	
gct gca aga ttt ggg gaa tct ata gtt aat ctt ggc gac att gac aat Ala Ala Arg Phe Gly Glu Ser Ile Val Asn Leu Gly Asp Ile Asp Asn	1568
375 380 385	
gat ggc ttt gaa gat gtt gct atc gga gct cca caa gaa gat gac ttg Asp Gly Phe Glu Asp Val Ala Ile Gly Ala Pro Gln Glu Asp Asp Leu	1616
390 395 400	
caa ggt gct att tat att tac aat ggc cgt gca gat ggg atc tcg tca Gln Gly Ala Ile Tyr Ile Tyr Asn Gly Arg Ala Asp Gly Ile Ser Ser	1664
405 410 415	
acc ttc tca cag aga att gaa gga ctt cag atc agc aaa tcg tta agt Thr Phe Ser Gln Arg Ile Glu Gly Leu Gln Ile Ser Lys Ser Leu Ser	1712
420 425 430	
atg ttt gga cag tct ata tca gga caa att gat gca gat aat aat ggc Met Phe Gly Gln Ser Ile Ser Gly Gln Ile Asp Ala Asp Asn Asn Gly	1760
435 440 445 450	
tat gta gat gta gca gtt ggt gct ttt cgg tct gat tct gct gtc ttg Tyr Val Asp Val Ala Val Gly Ala Phe Arg Ser Asp Ser Ala Val Leu	1808
455 460 465	
cta agg aca aga cct gta gta att gtt gac gct tct tta agc cac cct Leu Arg Thr Arg Pro Val Val Ile Val Asp Ala Ser Leu Ser His Pro	1856
470 475 480	
gag tca gta aat aga acg aaa ttt gac tgt gtt gaa aat gga tgg cct Glu Ser Val Asn Arg Thr Lys Phe Asp Cys Val Glu Asn Gly Trp Pro	1904
485 490 495	
tct gtg tgc ata gat cta aca ctt tgt ttc tca tat aag ggc aag gaa Ser Val Cys Ile Asp Leu Thr Leu Cys Phe Ser Tyr Lys Gly Lys Glu	1952
500 505 510	
gtt cca ggt tac att gtt ttg ttt tat aac atg agt ttg gat gtg aac Val Pro Gly Tyr Ile Val Leu Phe Tyr Asn Met Ser Leu Asp Val Asn	2000
515 520 525 530	
aga aag gca gag tct cca cca aga ttc tat ttc tct tct aat gga act Arg Lys Ala Glu Ser Pro Pro Arg Phe Tyr Phe Ser Ser Asn Gly Thr	2048
535 540 545	
tct gac gtg att aca gga agc ata cag gtg tcc agc aga gaa gct aac Ser Asp Val Ile Thr Gly Ser Ile Gln Val Ser Ser Arg Glu Ala Asn	2096
550 555 560	

ES 2 392 449 T3

tgt aga aca cat caa gca ttt atg cg ^g aaa gat gtg cg ^g gac atc ctc	2144
Cys Arg Thr His Gln Ala Phe Met Arg Lys Asp Val Arg Asp Ile Leu	
565 570 575	
acc cca att ca ^g att gaa gct gct tac cac ctt ggt cct cat gtc atc	2192
Thr Pro Ile Gln Ile Glu Ala Ala Tyr His Leu Gly Pro His Val Ile	
580 585 590	
agt aaa cga agt aca gag gaa ttc cca cca ctt cag cca att ctt cag	2240
Ser Lys Arg Ser Thr Glu Glu Phe Pro Pro Leu Gln Pro Ile Leu Gln	
595 600 605 610	
cag aag aaa gaa aaa gac ata atg aaa aaa aca ata aac ttt gca agg	2288
Gln Lys Lys Glu Lys Asp Ile Met Lys Lys Thr Ile Asn Phe Ala Arg	
615 620 625	
ttt tgt gcc cat gaa aat tgt tct gct gat tta cag gtt tct gca aag	2336
Phe Cys Ala His Glu Asn Cys Ser Ala Asp Leu Gln Val Ser Ala Lys	
630 635 640	
att ggg ttt ttg aag ccc cat gaa aat aaa aca tat ctt gct gtt ggg	2384
Ile Gly Phe Leu Lys Pro His Glu Asn Lys Thr Tyr Leu Ala Val Gly	
645 650 655	
agt atg aag aca ttg atg ttg aat gtg tcc ttg ttt aat gct gga gat	2432
Ser Met Lys Thr Leu Met Leu Asn Val Ser Leu Phe Asn Ala Gly Asp	
660 665 670	
gat gca tat gaa acg act cta cat gtc aaa cta ccc gtg ggt ctt tat	2480
Asp Ala Tyr Glu Thr Thr Leu His Val Lys Leu Pro Val Gly Leu Tyr	
675 680 685 690	
ttc att aag att tta gag ctg gaa gag aag caa ata aac tgt gaa gtc	2528
Phe Ile Lys Ile Leu Glu Leu Glu Lys Gln Ile Asn Cys Glu Val	
695 700 705	
aca gat aac tct ggc gtg gta caa ctt gac tgc agt att ggc tat ata	2576
Thr Asp Asn Ser Gly Val Val Gln Leu Asp Cys Ser Ile Gly Tyr Ile	
710 715 720	
tat gta gat cat ctc tca agg ata gat att agc ttt ctc ctg gat gtg	2624
Tyr Val Asp His Leu Ser Arg Ile Asp Ile Ser Phe Leu Leu Asp Val	
725 730 735	
agc tca ctc agc aga gcg gaa gag gac ctc agt atc aca gtg cat gct	2672
Ser Ser Leu Ser Arg Ala Glu Glu Asp Leu Ser Ile Thr Val His Ala	
740 745 750	
acc tgt gaa aat gaa gag gaa atg gac aat cta aag cac agc aga gtg	2720
Thr Cys Glu Asn Glu Glu Met Asp Asn Leu Lys His Ser Arg Val	
755 760 765 770	
act gta gca ata cct tta aaa tat gag gtt aag ctg act gtt cat ggg	768
Thr Val Ala Ile Pro Leu Lys Tyr Glu Val Lys Leu Thr Val His Gly	
775 780 785	
ttt gta aac cca act tca ttt gtg tat gga tca aat gat gaa aat gag	2816

ES 2 392 449 T3

Phe Val Asn Pro Thr Ser Phe Val Tyr Gly Ser Asn Asp Glu Asn Glu			
790	795	800	
cct gaa acg tgc atg gtg gag aaa atg aac tta act ttc cat gtt atc		2864	
Pro Glu Thr Cys Met Val Glu Lys Met Asn Leu Thr Phe His Val Ile			
805	810	815	
aac act ggc aat agt atg gct ccc aat gtt agt gtg gaa ata atg gta		2912	
Asn Thr Gly Asn Ser Met Ala Pro Asn Val Ser Val Glu Ile Met Val			
820	825	830	
cca aat tct ttt agc ccc caa act gat aag ctg ttc aac att ttg gat		2960	
Pro Asn Ser Phe Ser Pro Gln Thr Asp Lys Leu Phe Asn Ile Leu Asp			
835	840	845	850
gtc cag act act act gga gaa tgc cac ttt gaa aat tat caa aga gtg		3008	
Val Gln Thr Thr Gly Glu Cys His Phe Glu Asn Tyr Gln Arg Val			
855	860	865	
tgt gca tta gag cag caa aag agt gca atg cag acc ttg aaa ggc ata		3056	
Cys Ala Leu Glu Gln Gln Lys Ser Ala Met Gln Thr Leu Lys Gly Ile			
870	875	880	
gtc cag ttc ttg tcc aag act gat aag agg cta ttg tac tgc ata aaa		3104	
Val Gln Phe Leu Ser Lys Thr Asp Lys Arg Leu Leu Tyr Cys Ile Lys			
885	890	895	
gct gat cca cat tgt tta aat ttc ttg tgt aat ttt ggg aaa atg gaa		3152	
Ala Asp Pro His Cys Leu Asn Phe Leu Cys Asn Phe Gly Lys Met Glu			
900	905	910	
agt gga aaa gaa gcc agt gtt cat atc caa ctg gaa ggc cgg cca tcc		3200	
Ser Gly Lys Glu Ala Ser Val His Ile Gln Leu Glu Gly Arg Pro Ser			
915	920	925	930
att tta gaa atg gat gag act tca gca ctc aag ttt gaa ata aga gca		3248	
Ile Leu Glu Met Asp Glu Thr Ser Ala Leu Lys Phe Glu Ile Arg Ala			
935	940	945	
aca ggt ttt cca gag cca aat cca aga gta att gaa cta aac aag gat		3296	
Thr Gly Phe Pro Glu Pro Asn Pro Arg Val Ile Glu Leu Asn Lys Asp			
950	955	960	
gag aat gtt gcg cat gtt cta ctg gaa gga cta cat cat caa aga ccc		3344	
Glu Asn Val Ala His Val Leu Leu Glu Gly Leu His His Gln Arg Pro			
965	970	975	
aaa cgt tat ttc acc ata gtg att att tca agt agc ttg cta ctt gga		3392	
Lys Arg Tyr Phe Thr Ile Val Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Gly			
980	985	990	
ctt att gta ctt ctg ttg atc tca tat gtt atg tgg aag gct ggc ttc		3440	
Leu Ile Val Leu Leu Ile Ser Tyr Val Met Trp Lys Ala Gly Phe			
995	1000	1005	1010
ttt aaa aga caa tac aaa tct atc cta caa gaa aac aga aga gac		3488	
Phe Lys Arg Gln Tyr Lys Ser Ile Leu Gln Glu Glu Asn Arg Arg Asp			

	1015	1020	1025	
	agt tgg agt tat atc aac agt aaa agc aat gat gat taa ggacttcttt			3537
	Ser Trp Ser Tyr Ile Asn Ser Lys Ser Asn Asp Asp			
	1030	1035		
	caaattgaga gaatggaaaa cagcccgccc			3567
	<210> SEQ ID N°: 2			
5	<211> LONGITUD: 18			
	<212> TIPO: ADN			
	<213> ORGANISMO: Secuencia artificial			
	<223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido			
	<400> SECUENCIA: 2			
10	ctccgtctct gcctacgc 18			
	<210> SEQ ID N°: 3			
	<211> LONGITUD: 18			
	<212> TIPO: ADN			
15	<213> ORGANISMO: Secuencia artificial			
	<223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido			
	<400> SECUENCIA: 3			
	cgggtgctcg cgctgctt 18			
20	<210> SEQ ID N°: 4			
	<211> LONGITUD: 18			
	<212> TIPO: ADN			
	<213> ORGANISMO: Secuencia artificial			
	<223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido			
25	<400> SECUENCIA: 4			
	cctgggatgc cgcgact 18			
	<210> SEQ ID N°: 5			
	<211> LONGITUD: 18			
30	<212> TIPO: ADN			
	<213> ORGANISMO: Secuencia artificial			
	<223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido			
	<400> SECUENCIA: 5			
	atgaggcgca gcgtgtcc 18			
35	<210> SEQ ID N°: 6			
	<211> LONGITUD: 18			
	<212> TIPO: ADN			
	<213> ORGANISMO: Secuencia artificial			
40	<223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido			
	<400> SECUENCIA: 6			
	caaagttgca cggatgc 18			
	<210> SEQ ID N°: 7			
45	<211> LONGITUD: 18			
	<212> TIPO: ADN			
	<213> ORGANISMO: Secuencia artificial			
	<223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido			
	<400> SECUENCIA: 7			
50	ggaacattca acactaag 18			
	<210> SEQ ID N°: 8			
	<211> LONGITUD: 18			

5 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 8
 cccgggttcg cgcctcgc 18

10 <210> SEQ ID Nº: 9
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 9
 gcgcgtctc agtgtcca 18

15 <210> SEQ ID Nº: 10
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 20 <400> SECUENCIA: 10
 gtggctgtgc agcacgac 18

25 <210> SEQ ID Nº: 11
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 11
 30 actgaagcgt tggcgagc 18

35 <210> SEQ ID Nº: 12
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 12
 40 gcacgtctgg ccgggatt 18

45 <210> SEQ ID Nº: 13
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 13
 ccactgattt tctctctc 18

50 <210> SEQ ID Nº: 14
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 14
 55 gatatccattt tctccctgg 18

<210> SEQ ID Nº: 15
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 15
 gcttatttc attctta 18

5 <210> SEQ ID Nº: 16
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 10 <400> SECUENCIA: 16
 ttctttact cagttctg 18

<210> SEQ ID Nº: 17
 <211> LONGITUD: 18
 15 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 17
 tcacataatc ttgataac 18

20 <210> SEQ ID Nº: 18
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 25 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 18
 cccatcacaa ttaaatcc 18

<210> SEQ ID Nº: 19
 30 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 19
 35 ttatttgtat ttatattg 18

<210> SEQ ID Nº: 20
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 40 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 20
 cctaaataac ttccaaat 18

<210> SEQ ID Nº: 21
 45 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 21
 50 gaaaatgacc agctccga 18

<210> SEQ ID Nº: 22
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 55 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 22
 tttcatgtaa gatattta 18

5 <210> SEQ ID N°: 23
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 5 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 23
 ccacagcaca gacagaag 18

10 <210> SEQ ID N°: 24
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 24
 15 tggtgctctg catgggtg 18

20 <210> SEQ ID N°: 25
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 25
 tacacaaaaca ctcttcct 18

25 <210> SEQ ID N°: 26
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 30 <400> SECUENCIA: 26
 ttgtttcca ttgcattc 18

35 <210> SEQ ID N°: 27
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 27
 40 tgcagcatat ttgtcact 18

45 <210> SEQ ID N°: 28
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 28
 ttgtcaatgt cgccaaga 18

50 <210> SEQ ID N°: 29
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 29
 55 tcatcttctt gtggagct 18

<210> SEQ ID N°: 30
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN

5 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 30
 ccatctgcac ggccattg 18

10 <210> SEQ ID Nº: 31
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 31
 gtccaaacat actaacg 18

15 <210> SEQ ID Nº: 32
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 32

20 tatctgcac aatttgtc 18

<210> SEQ ID Nº: 33
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN

25 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 33
 accgaaaagc accaactg . 18

30 <210> SEQ ID Nº: 34
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido

35 <400> SECUENCIA: 34
 ctgtcctta gcaagaca 18

<210> SEQ ID Nº: 35
 <211> LONGITUD: 18

40 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 35
 tcagggtgc taaaagaa 18

45 <210> SEQ ID Nº: 36
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

50 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 36
 atccatttc aacacagt 18

<210> SEQ ID Nº: 37
 55 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 37

gcccttatat gagaaaca 18

5 <210> SEQ ID Nº: 38
<211> LONGITUD: 18
<212> TIPO: ADN
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial
<223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
<400> SECUENCIA: 38
caatttgaaa gaagtctt 18

10 <210> SEQ ID Nº: 39
<211> LONGITUD: 18
<212> TIPO: ADN
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial
15 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
<400> SECUENCIA: 39
tccattctct caatttga 18

20 <210> SEQ ID Nº: 40
<211> LONGITUD: 18
<212> TIPO: ADN
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial
<223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
25 <400> SECUENCIA: 40
ggcgccgtgt tttccatt 18

<210> SEQ ID Nº: 41
<211> LONGITUD: 1300
<212> TIPO: ADN
30 <213> ORGANISMO: Homo sapiens
<221> NOMBRE/CLAVE: CDS
<222> LOCALIZACIÓN: (1152)... (1283)
<300> INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:
<308> NÚMERO DE ACCESO A LA BASE DE DATOS: M62841Genbank
35 <309> FECHA DE ENTRADA EN LA BASE DE DATOS: 30-10-1994
<400> SECUENCIA: 41

ggcagggcac acctggattg cattagaatg agactcacta cccagtttag gtgtgttgcg 60
 ttgtgggtct ccggcacatt tcagaggctg attaggaccc tgacccca cttgggttta 120
 cacccctaaa agcaggtgtg tccctgtggca actgagtgaa tgctgtgaaaa ggggggatca 180
 tcaattacca gctggagcaa tcgaatcggt taaatgtgaa tcaagtcaca gtgcttcctt 240
 aacccaaacct ctctgttggg gtcagccaca gcctaaaccg cctgcccgttc agcctgagag 300
 gctgctgcta gcctgctcac gcatgcagcc cgggctgcag aggaagtgtg gggaggaagg 360
 aagtgggtat agaagggtgc tgagatgtgg gtcttgaaga gaatagccat aacgtctttg 420
 tcactaaaat gttccccagg ggccttcggc gagttttttt gttgggtttt ttgttttaa 480
 tctgtggctc ttgataattt atctagtgtt tgcctacacc taaaaacaa gacacagtgt 540
 ttaactatca acgaaagaac tggacggctc cccgcccgcag tcccactccc cgagtttgcg 600
 gctggcattt gggccacgccc gggctggcg gtcacagcg agggggcgcgc agtttgggt 660
 cacacagctc cgcttctagg ccccaaccac cgtaaaaagg ggaagccgt gccccatcag 720
 gtccgctctt gctgagccca gagccatccc gcgcctgcg ggctgggagg cccggccag 780
 acgcgagtcc tgcgcagccg aggttccca gcgccttcgt cagccgcgcg taggcagaga 840
 cggagcccg ccctgcgcct ccgcaccacg cccggaccc caccagcgg cccgtacccg 900
 gagaagcagc gcgagcaccc gaagctcccg gctggcggc agaaaccggg agtggggccg 960
 ggcgagtgcg cggcatccca ggcggcccg aacgtccgccc cgccgtggc cgacttcccc 1020
 tcctttcccc tctctccttc ctttagcccg ctggcgcggc acacgctgcg cctcatctct 1080
 tggggcgttc ttccccgttg gccaaccgtc gcatccctgt caactttggg gtagtggccg 1140
 cttagtgttg a atg ttc ccc acc gag agc gca tgg ctt ggg aag cga ggc 1190
 Met Phe Pro Thr Glu Ser Ala Trp Leu Gly Lys Arg Gly
 1 5 10

 gcg aac ccg ggc ccc gaa gcc gcc gtc cgg gag ggc ccc cac aac acg 1238
 Ala Asn Pro Gly Pro Glu Ala Ala Val Arg Glu Gly Pro His Asn Thr
 15 20 25

 ctg ttc ggc tac tcg gtc gtg ctg cac agc cac ggg gcg aac cga 1283
 Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser His Gly Ala Asn Arg
 30 35 40

 tggtgagtag agttgga 1300

5 <210> SEQ ID N°: 42
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 42

ttagtgaca aagacgttat 20

5 <210> SEQ ID Nº: 43
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 43
 gaaggccccct ggggaacatt 20

10 <210> SEQ ID Nº: 44
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 15 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 44
 agacgttatg gctattctct 20

20 <210> SEQ ID Nº: 45
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 25 <400> SECUENCIA: 45
 ttgcccttat atgagaaaca 20

30 <210> SEQ ID Nº: 46
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 35 <400> SECUENCIA: 46
 cccaagccat gcgcctcgg 20

40 <210> SEQ ID Nº: 47
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 45 <400> SECUENCIA: 47
 ccgcagccat gcgccttg 20

50 <210> SEQ ID Nº: 48
 <211> LONGITUD: 1771
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Mus musculus
 <221> NOMBRE/CLAVE: CDS
 <222> LOCALIZACIÓN: (1193).... (1387)
 <221> NOMBRE/CLAVE: CDS
 55 <222> LOCALIZACIÓN: (1709).... (1771)
 <300> INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:
 <308> NÚMERO DE ACCESO A LA BASE DE DATOS: L20788 Genbank
 <309> FECHA DE ENTRADA EN LA BASE DE DATOS: 18-04-1996
 <400> SECUENCIA: 48

ccagcacttg cctcctgctc cagcgtgaaa agcagggaat ggaatatgga gtgtaaagaca 60
 taaaataaaa ataaaataaa attaaaaaaa aaaaaagaaa agcagcacac aaggagtatg 120
 ttcagcagag gccccatctcc tggcttaggt gtgctgtgac tctgatctct ggtggcttt 180
 tagaaggctg ttatgaccctt gtcttaggct gtgtctacac atctggtggt aggtatgtcc 240
 tggggtaact gagtgtgtac atggggacta gttatgaaga agtgagcaag gggtgaggc 300
 tgctaagtga ggcaagtac agaatttcct tagcttgccct gggtttctg tggtaggcta 360
 ttgcctggct tgctcatgct tataactctt atttaaaggagg aagtgtatag agaggaagga 420
 agcctgcata aaaggctgca ggcctggag ttttgaagag actagccata tactttgtc 480
 accaaatgct ccaataggc tggggcggga gggggggggg cagcagttt ggcttcttgc 540
 aaactgtgtat atttctgtat gctacacagc acataagtga cagaggaagt tctggaaggt 600
 tctccacagt cttagttccc aaattattgg ccactggac tggccctgga ggccagtcac 660
 ttggtaagt cccgcaaggc atcaagcctt agccaacttt caaaaggaa tccccctgatc 720
 tgttttgtgt tcccccaagg gttatttttctggccccc gaagccagag ccactgtgt 780
 tgatgtctgc cagggtgtga gtccatgcaa cctaggtccc ctacgcctt ctacagctgc 840
 tgcggggcgg ggtatgggat cgggttgggg agagggaggc caggctgtga gccactgcac 900
 cacacccagg acccccaccca gatccttagga gcacccggcc cctggctccg gggccacaga 960
 aacggggcgt gggccagagc ctgaagcatc cctggccact acgatcgctc cgcctgtggc 1020

caccaattcc cctcctcttc tggcgccct ctctccgccc ctgtcgccctg ccagcacccgg 1080
 acacgctgct gcacttcatc tcttggggcg ctcttctctt tggccaaccg tcgcacccctg 1140
 tgcaactctg gtcagtggcc gttttgtgtt gaatgttctc caccaagagc gc atg gct 1198
 Met Ala
 1

gcg gaa gcg agg tgc aga ccg agg tcc cga ggg atc gcc ctc cgg gaa 1246
 Ala Glu Ala Arg Cys Arg Pro Arg Ser Arg Gly Ile Ala Leu Arg Glu
 5 10 15

gcg gtg atg ctg ttg ttg tac ttc ggg gtg cca acc ggg cac tcc tac 1294
 Ala Val Met Leu Leu Leu Tyr Phe Gly Val Pro Thr Gly His Ser Tyr
 20 25 30

aac ctg gac ccg gag aat gca ctg ctg tac cag ggc ccc tcc ggc acg 1342
 Asn Leu Asp Pro Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Gln Gly Pro Ser Gly Thr
 35 40 45 50

ctg ttt ggc tac tcg gtg gtg ctg cac agc cac ggg tcg aag cgc 1387
 Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser His Gly Ser Lys Arg
 55 60 65

tggtgagtgc gccctccca agaggcatgt cacagcgctt ccgcctctgg gattccttgt 1447
 atgaatcaaa ctttccgccc tcctggagg tcagagaaag acctggcttc agccagctgc 1507
 ctcactggag agccttggaa ctaacttatac ttggatggc agccccagg gtgctcctga 1567
 gtcctgggtc tccagtcatg ggaagaggag gtgggtgcca cttcccttgc tgaccactgc 1627
 acagctgtca caagccaaca cggggcagag tgggtggca gactggttca cgtctgagcg 1687
 aacttgcatg gtttttgctt t agg ctc atc gtg ggg gct ccc act gcc agc 1738
 Trp Leu Ile Val Gly Ala Pro Thr Ala Ser
 70 75

tgg ctc tct aat gcc tca gtg gtc aat cct ggg 1771
 Trp Leu Ser Asn Ala Ser Val Val Asn Pro Gly
 80 85

5 <210> SEQ ID N°: 49
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 49
 10 cacgccccgt ttctgtggcc 20

15 <210> SEQ ID N°: 50
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 50
 20 ggatgcttca ggctctggcc 20
 <210> SEQ ID N°: 51
 <211> LONGITUD: 20

5 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 51
 ggagcgatcg tagtggccag 20

10 <210> SEQ ID Nº: 52
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 52
 ccggtgctgg caggcgacag 20

15 <210> SEQ ID Nº: 53
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 20 <400> SECUENCIA: 53
 gatgaagtgc agcagcgtgt 20

25 <210> SEQ ID Nº: 54
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 54
 gcccactgac cagagttgca 20

30 <210> SEQ ID Nº: 55
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 35 <400> SECUENCIA: 55
 cacctcgctt ccgcagccat 20

40 <210> SEQ ID Nº: 56
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia control
 <400> SECUENCIA: 56
 45 cggaccagta ccagggtac 20

50 <210> SEQ ID Nº: 57
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia control
 <400> SECUENCIA: 57
 gccgacaccc gttcggtcg 20

55 <210> SEQ ID Nº: 58
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia control

<223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 65
 agcgacggtt ggccaacgg 19

5 <210> SEQ ID Nº: 66
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 10 <400> SECUENCIA: 66
 cccagcacat cggctctcg 20

<210> SEQ ID Nº: 67
 <211> LONGITUD: 20
 15 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 67
 cttcccaagc catgcgtct 20

20 <210> SEQ ID Nº: 68
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 25 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 68
 tcgctccca agccatgcgc 20

<210> SEQ ID Nº: 69
 30 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 69
 35 gcctcgcttc ccaagccatg 20

<210> SEQ ID Nº: 70
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 40 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 70
 cgccgcctcg 20

45 <210> SEQ ID Nº: 71
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 50 <400> SECUENCIA: 71
 tccttgccct tatatgagaa 20

<210> SEQ ID Nº: 72
 <211> LONGITUD: 20
 55 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 72
 acttccttgc ccttatatga 20

5 <210> SEQ ID N°: 73
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 73
 agagttatct tgacttcac 20

10 <210> SEQ ID N°: 74
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 15 <400> SECUENCIA: 74
 gatactgagg tcctctccg 20

20 <210> SEQ ID N°: 75
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 75
 tgagatcaac agaagtacaa 20

25 <210> SEQ ID N°: 76
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 76
 ccagccttcc acataacata 20

30 <210> SEQ ID N°: 77
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 77
 aggatagatt tgtattgtct 20

35 <210> SEQ ID N°: 78
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 78
 40 gttgatataaa ctccaactgt 20

45 <210> SEQ ID N°: 79
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 79
 taatcatcat tgctttact 20

50 <210> SEQ ID N°: 80
 <211> LONGITUD: 20

<212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 80
 5 aagaagtcct taatcatcat 20

 <210> SEQ ID Nº: 81
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 10 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 81
 ctgagtcgt ttccattct 20

 15 <210> SEQ ID Nº: 82
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 20 <400> SECUENCIA: 82
 cttgtaaaca gtgtctttta 20

 <210> SEQ ID Nº: 83
 <211> LONGITUD: 20
 25 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 83
 gagtaaaaaga agtccaaaca 20

 30 <210> SEQ ID Nº: 84
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 35 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 84
 ctttgcatga agacataata 20

 <210> SEQ ID Nº: 85
 40 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 85
 45 aagagtaatc attgctgaga 20

 <210> SEQ ID Nº: 86
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 50 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 86
 tcctggctg tattattacc 20

 55 <210> SEQ ID Nº: 87
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido

<400> SECUENCIA: 87
 tgcttagtg ttctctacc 20

5 <210> SEQ ID Nº: 88
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 88
 10 aagtctaaga ctctccagt 20

<210> SEQ ID Nº: 89
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 15 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 89
 gaggcaagca catatggtaa 20

20 <210> SEQ ID Nº: 90
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 25 <400> SECUENCIA: 90
 tgaaatgaac ctctgcccac 20

<210> SEQ ID Nº: 91
 <211> LONGITUD: 20
 30 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 91
 ttaaagtgtat aatggtccac 20

35 <210> SEQ ID Nº: 92
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 40 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 92
 ggaacacagc ccgttagaaaa 20

<210> SEQ ID Nº: 93
 45 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 93
 50 ttgccagtt tggctataa 20

<210> SEQ ID Nº: 94
 <211> LONGITUD: 17
 <212> TIPO: ADN
 55 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 94
 gacacgctgc gcctcat 17

5 <210> SEQ ID N°: 95
 <211> LONGITUD: 22
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 5 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 95
 attcaacact aaggccac tg22

10 <210> SEQ ID N°: 96
 <211> LONGITUD: 22
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 96
 15 ccaaccgtcg catccgtgc aa22

20 <210> SEQ ID N°: 97
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 97
 gaaggtgaag gtcggagtc 19

25 <210> SEQ ID N°: 98
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 98
 30 gaagatggtg atggatttc 20

35 <210> SEQ ID N°: 99
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> OTRA INFORMACIÓN: secuencia antisentido
 <400> SECUENCIA: 99
 40 caagcttccc gtttcagcc 20

45 <210> SEQ ID N°: 100
 <211> LONGITUD: 26
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 100
 gaaaggtaaa aagctggct catac 26

50 <210> SEQ ID N°: 101
 <211> LONGITUD: 22
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 101
 55 tctgagaagc catctgcatt ga 22

<210> SEQ ID N°: 102
 <211> LONGITUD: 24
 <211> TIPO: ADN

5 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Sonda de oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 102
 tggagcttct gtctgcgctg tgg 24

10 <210> SEQ ID Nº: 103
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 15 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 103
 agagcttcag tgtttgctt 20

20 <210> SEQ ID Nº: 104
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 104
 25 tatatgtaca tacacacaag 20

30 <210> SEQ ID Nº: 105
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 105
 35 agtggcaccc acctcccttt 20

40 <210> SEQ ID Nº: 106
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 106
 45 tcaacctcac cttagcaaca 20

50 <210> SEQ ID Nº: 107
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 107
 55 cttgggatgc aattaaatgc 20

55 <210> SEQ ID Nº: 108
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 108
 aaatgcttac ccttgagagg 20

55 <210> SEQ ID Nº: 109
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 109

5 tcatgcaata ctggaaaaga 20

10 <210> SEQ ID N°: 110
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 110
 ggccactgac cagagttca 20

15 <210> SEQ ID N°: 111
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 111
 ccgcagccat gcgcctctgg 20

20 <210> SEQ ID N°: 112
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 112
 cgctccgca gccatgcgt 20

25 <210> SEQ ID N°: 113
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 113
 cacctcgctt ccgcagccat 20

30 <210> SEQ ID N°: 114
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 114
 ccaggttgta ggagtccccg 20

35 <210> SEQ ID N°: 115
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 115
 agtagccaaa cagcgtgccg 20

40 <210> SEQ ID N°: 116
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 116
 gtggctgtgc agcaccacccg 20

45 <210> SEQ ID N°: 117

5 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 117
 cccagctgga gctgttcgca 20

10 <210> SEQ ID Nº: 118
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 118
 ggctacccag ctggagctgt 20

15 <210> SEQ ID Nº: 119
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 119
 atattttcc acctgtgcc 20

20 <210> SEQ ID Nº: 120
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 120
 gcaaaaatttt ctccaaattt 20

25 <210> SEQ ID Nº: 121
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 121
 atgatgcaaa atttctcca 20

30 <210> SEQ ID Nº: 122
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 122
 ccagcttgac atgatgcaaa 20

35 <210> SEQ ID Nº: 123
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 123
 atattccagc ttgacatgtat 20

40 <210> SEQ ID Nº: 124
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 124
 <210> SEQ ID Nº: 125
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 124
 gcccccatca caatcaa 20

5 <210> SEQ ID Nº: 125
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 10 <400> SECUENCIA: 125
 gtagttatat ttagacaaa 20

<210> SEQ ID Nº: 126
 <211> LONGITUD: 20
 15 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 126
 actgagtagc ctaagttagct 20

20 <210> SEQ ID Nº: 127
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 25 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 127
 ctatctgttc gtgttgagg 20

<210> SEQ ID Nº: 128
 30 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 128
 35 ccaagcttt tactttcat 20

<210> SEQ ID Nº: 129
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 40 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 129
 cagacagaag ctccaaagta 20

45 <210> SEQ ID Nº: 130
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 50 <400> SECUENCIA: 130
 ccatctgcat tgaggtccac 20

<210> SEQ ID Nº: 131
 <211> LONGITUD: 20
 55 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 131
 agaagccatc tgcattgagg 20

5 <210> SEQ ID N°: 132
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 132
 atctgagaag ccatctgcat 20

10 <210> SEQ ID N°: 133
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 15 <400> SECUENCIA: 133
 ctgatggtgc tctgcattgg 20

20 <210> SEQ ID N°: 134
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 134
 25 ccatgccaga gttgtatgtac 20

25 <210> SEQ ID N°: 135
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 30 <400> SECUENCIA: 135
 catttcaacc atcacagtc 20

35 <210> SEQ ID N°: 136
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 136
 40 gcacgcatatt tgtcacttcc 20

45 <210> SEQ ID N°: 137
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 137
 atcttcacgc atatggtca 20

50 <210> SEQ ID N°: 138
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 55 <400> SECUENCIA: 138
 cccaaatctt gcacgcatatt 20

<210> SEQ ID N°: 139
 <211> LONGITUD: 20

5 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 139
 ttgtcaatgt cgccaagatt 20

10 <210> SEQ ID Nº: 140
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 140
 ccatgttaaa ttagacagc 20

15 <210> SEQ ID Nº: 141
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 141
 gtccttcaat tctcttgag 20

20 <210> SEQ ID Nº: 142
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 142
 tctgcatcaa ttgtcctga 20

25 <210> SEQ ID Nº: 143
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 143
 catatccatt gttgtctgca 20

30 <210> SEQ ID Nº: 144
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 144
 tccttagcaa cactgcagaa 20

35 <210> SEQ ID Nº: 145
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 145
 gatgctcaa caatcactac 20

40 <210> SEQ ID Nº: 146
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido

45 <210> SEQ ID Nº: 147
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido

50 <210> SEQ ID Nº: 148
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 148
 gatgctcaa caatcactac 20

55 <210> SEQ ID Nº: 149
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido

<400> SECUENCIA: 146
 atggcttaaa gatgctcaa 20

5 <210> SEQ ID Nº: 147
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 147
 10 tagcctggaa cctcttgcc 20

<210> SEQ ID Nº: 148
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 15 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 148
 caaaacgatg tagcctggaa 20

20 <210> SEQ ID Nº: 149
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 25 <400> SECUENCIA: 149
 cctgtaatca cgtcagaagt 20

<210> SEQ ID Nº: 150
 <211> LONGITUD: 20
 30 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 150
 tgcttcctgt aatcacgtca 20

35 <210> SEQ ID Nº: 151
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 40 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 151
 ccactgcttg aaactcgtat 20

<210> SEQ ID Nº: 152
 45 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 152
 50 ggtgtgtcct acatttct 20

<210> SEQ ID Nº: 153
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 55 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 153
 gtcttccgc atgaatgcct 20

5 <210> SEQ ID N°: 154
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 154
 ccaaggtggt atgtggcctc 20

10 <210> SEQ ID N°: 155
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 155
 15 cacatgatgc ccaaggtggt 20

20 <210> SEQ ID N°: 156
 <211> LONGITUD: 19
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 156
 gtttgtatc acatgatgc 19

25 <210> SEQ ID N°: 157
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 157
 30 caaaaaccttg caaagttat 20

35 <210> SEQ ID N°: 158
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 158
 acatccagga gaaagctaat 20

40 <210> SEQ ID N°: 159
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 159
 45 agtcacatc caggagaaag 20

50 <210> SEQ ID N°: 160
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 160
 55 gagtgagctc acatccagga 20

<210> SEQ ID N°: 161
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN

5 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 161
 ctgctgagtg agtcacatc 20

10 <210> SEQ ID Nº: 162
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 10 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 162
 gttcacaaggc ccatgaacag 20

15 <210> SEQ ID Nº: 163
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 163
 20 tacacaaatg aagttgggtt 20

25 <210> SEQ ID Nº: 164
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 164
 atccatacac aatgaagg 20

30 <210> SEQ ID Nº: 165
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 165
 35 agaatttggc accattatt 20

40 <210> SEQ ID Nº: 166
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 166
 tcatcaata caggagtc 20

45 <210> SEQ ID Nº: 167
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 167
 50 cgttgggtc ttgtatgtat 20

55 <210> SEQ ID Nº: 168
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 168

ataagtccaa gtagcaagct 20

5 <210> SEQ ID N°: 169
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 169
 gtacaataag tcacaaggtagc 20

10 <210> SEQ ID N°: 170
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 15 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 170
 tctttaggaa tagatttta 20

20 <210> SEQ ID N°: 171
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 171
 25 tagaagtctt cagtcatcat 20

30 <210> SEQ ID N°: 172
 <211> LONGITUD: 19
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 172
 gattcccttg cactaagag 19

35 <210> SEQ ID N°: 173
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 40 <400> SECUENCIA: 173
 aagccacctt tggtagctt 20

45 <210> SEQ ID N°: 174
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 174
 50 gacgggtggc caaagagaag 20

55 <210> SEQ ID N°: 175
 <211> LONGITUD: 20
 <211> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido
 <400> SECUENCIA: 175
 cacatgagc ctccctttcc 20

 <210> SEQ ID N°: 176

5 <211> LONGITUD: 20
<211> TIPO: ADN
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido
<400> SECUENCIA: 176
cacacatgca tgattatatt 20

10 <210> SEQ ID Nº: 177
<211> LONGITUD: 20
<211> TIPO: ADN
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido
<400> SECUENCIA: 177
gccccaaagg agatgtgata 20

15 <210> SEQ ID Nº: 178
<211> LONGITUD: 20
<211> TIPO: ADN
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido
<400> SECUENCIA: 178
cgaggcgagc atttaccagc 20

20 <210> SEQ ID Nº: 179
<211> LONGITUD: 20
<211> TIPO: ADN
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido
<400> SECUENCIA: 179
acagtgtacc tcctttctc...20

25 <210> SEQ ID Nº: 179
<211> LONGITUD: 20
<211> TIPO: ADN
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido
<400> SECUENCIA: 179
acagtgtacc tcctttctc...20

30 <210> SEQ ID Nº: 179
<211> LONGITUD: 20
<211> TIPO: ADN
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido
<400> SECUENCIA: 179
acagtgtacc tcctttctc...20

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un compuesto antisentido que fija como objetivo una molécula de ácido nucleico que codifica integrina $\alpha 4$ para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con una hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus, en que el compuesto se ha de administrar por vía tópica al sistema respiratorio o a las vías respiratorias a un nivel de dosificación diario que iguala a desde 0,01 a menos de 500 μg del compuesto antisentido por kg de peso corporal del animal.
- 10 2.- El compuesto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que se ha de dosificar al animal a un nivel de 0,01 a 200 μg por kg de peso corporal del animal individual.
- 15 3.- El compuesto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus de acuerdo con la reivindicación 2, que se ha de dosificar al animal a un nivel de 0,5 a 50 μg por kg de peso corporal del animal individual.
- 20 4.- El compuesto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que se ha de dosificar al animal a un nivel de no más de 5 μg por kg de peso corporal del animal individual.
- 25 5.- El compuesto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus de acuerdo con la reivindicación 4, que se ha de dosificar al animal a un nivel de no más de 1 μg por kg de peso corporal del animal individual.
- 30 6.- El compuesto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se ha de administrar por vía tópica a través de un inhalación o insuflación.
- 35 7.- El compuesto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se ha de administrar por vía intrapulmonar, intranasal o intratraqueal.
- 40 8.- El compuesto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus de acuerdo con la reivindicación 7, que se ha de administrar a través de un inhalador de dosis medida (MDI), un nebulizador o un inhalador de polvo seco (DPI).
- 45 9.- El compuesto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que la enfermedad o afección se selecciona de asma, fibrosis quística, deficiencia en alfa-1 antitripsina, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica y rinitis.
- 50 10.- El compuesto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus de acuerdo con la reivindicación 9, en que la enfermedad o afección es asma.
- 55 11.- Un kit para uso en el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad o afección respiratoria según se define en la reivindicación 1, que contiene una composición que comprende un compuesto antisentido que fija como objetivo una molécula de ácido nucleico que codifica integrina $\alpha 4$ y un dispositivo que permite que la composición sea administrada por vía tópica mediante inhalación o insuflación a un nivel de dosificación diaria de 0,01 a menos de 500 μg del compuesto antisentido por kg de peso corporal del animal.

12.- Un kit para uso en el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad o afección respiratoria según se define en la reivindicación 1, que contiene una composición que comprende un compuesto antisentido que fija como objetivo una molécula de ácido nucleico que codifica integrina $\alpha 4$ e instrucciones de que la composición se ha de administrar por

5 vía tópica al sistema respiratorio a un nivel de dosificación diaria de 0,01 a menos de 500 μg del compuesto antisentido por kg de peso corporal del animal que está siendo tratado.

13.- El compuesto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de 10 mucus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o el kit de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido antisentido.

14.- El compuesto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de 15 mucus de acuerdo con la reivindicación 13, en que el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido antisentido seleccionado de SEQ ID N°s 81, 117, 120, 121, 122, 128, 130, 131, 132, 136, 137, 138, 141, 149, 150, 159, 160, 161, 167 y 168.

20 15.- El compuesto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus, o kit de acuerdo con la reivindicación 14, en que el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO 81.

25 16.- El compuesto para uso en el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de 30 mucus, o kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el compuesto antisentido inhibe la expresión de integrina $\alpha 4$ en al menos un 50%.

35 17.- Uso de un compuesto antisentido que fija como objetivo una molécula de ácido nucleico que codifica integrina $\alpha 4$ en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de un animal con una enfermedad o afección respiratoria asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, eosinofilia, neutrofilia, leucocitos o supra-producción de mucus, en que el medicamento se ha de administrar por vía tópica al sistema respiratorio a un nivel de dosificación diaria que equivale a 0,01 a menos de 500 μg del compuesto antisentido por kg de peso corporal del animal.

35 18.- El uso de acuerdo con la reivindicación 17, modificado por las características de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10 y 13 a 16.

Figura 1

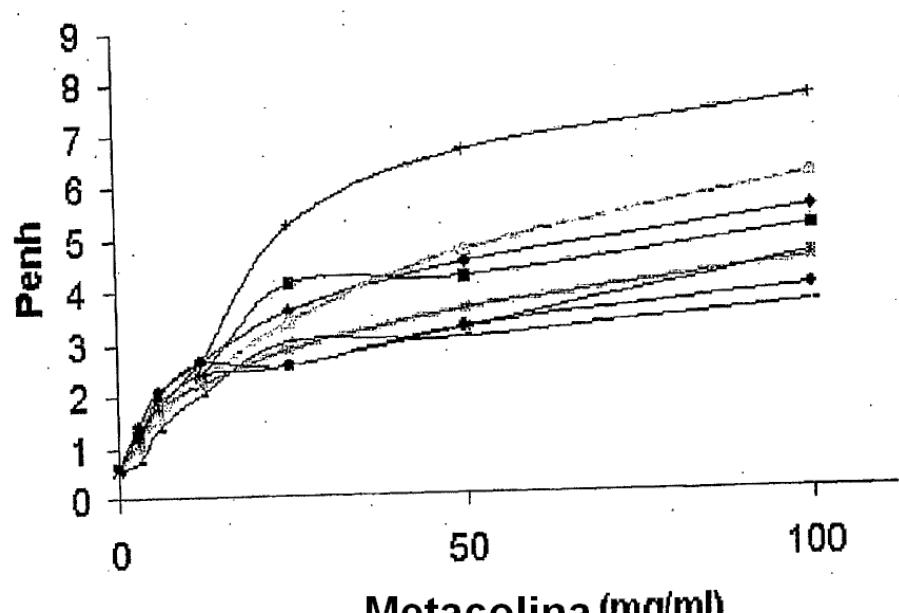
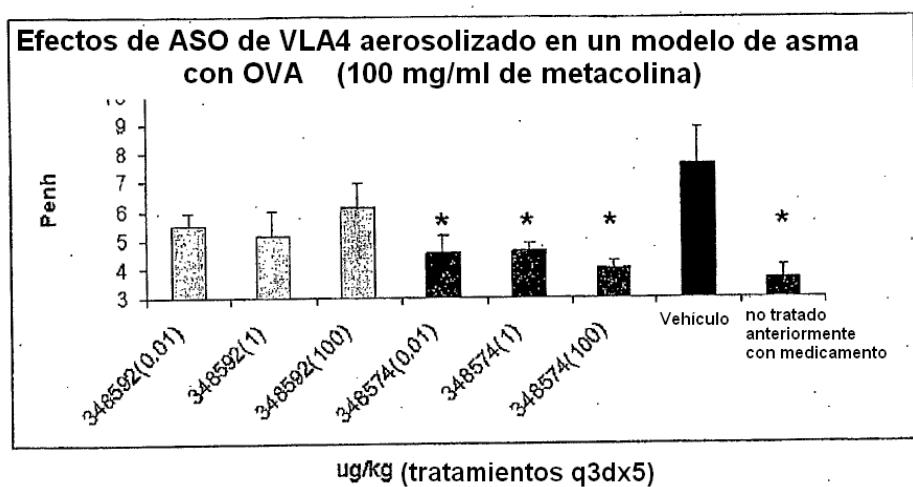


Figura 2



*P ≤ 0.05 frente a Vehículo

Figura 3

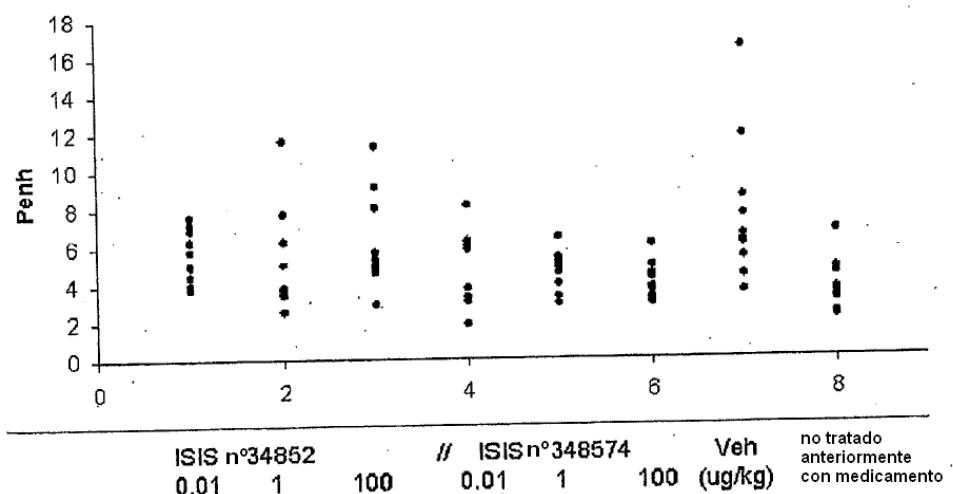


Figura 4

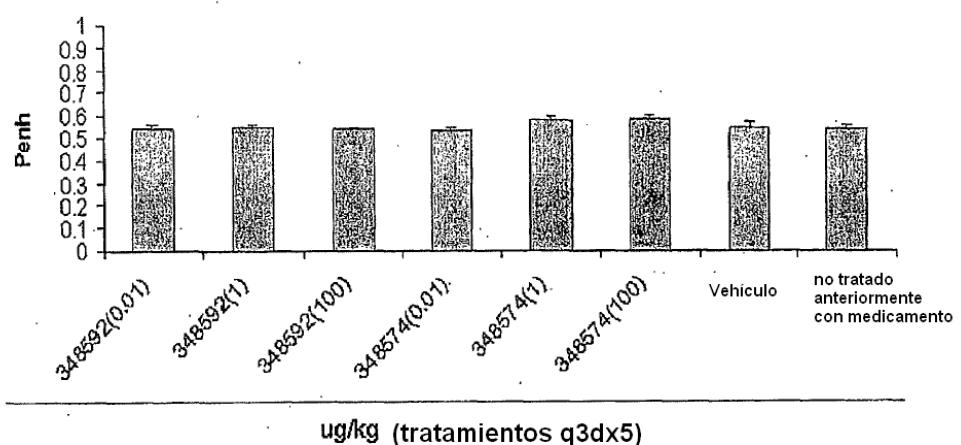


Figura 5

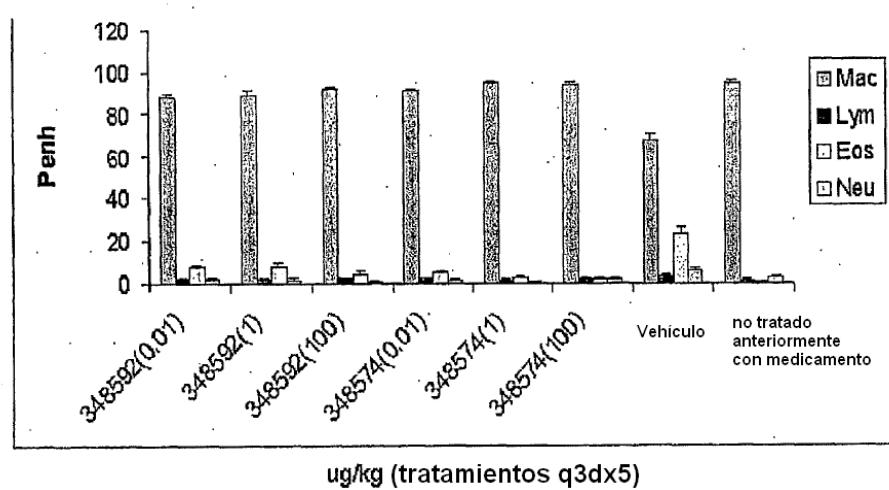


Figura 6

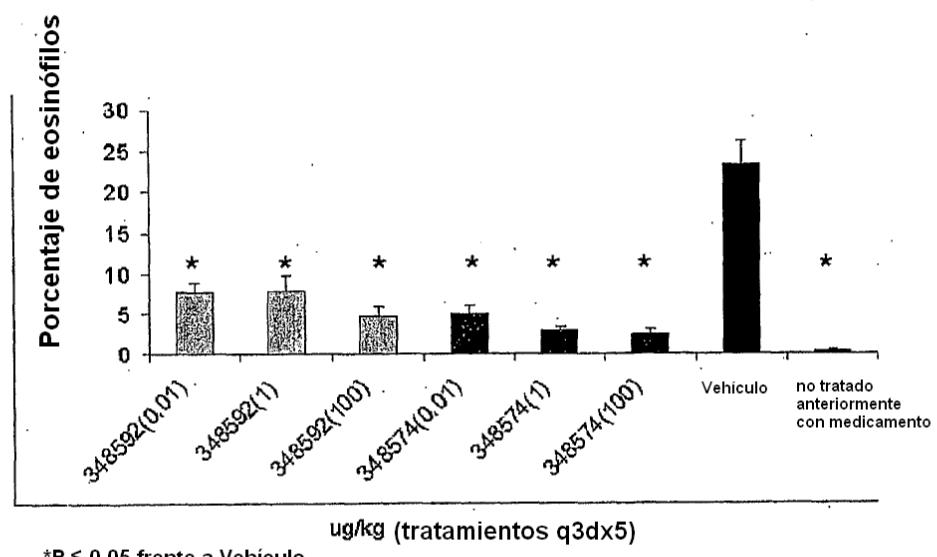


Figura 7

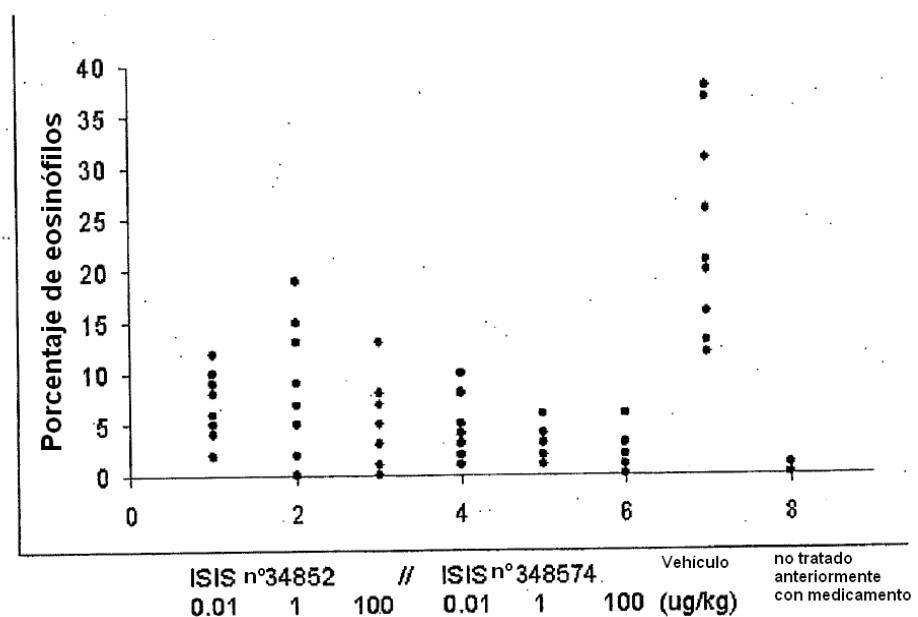


Figura 8

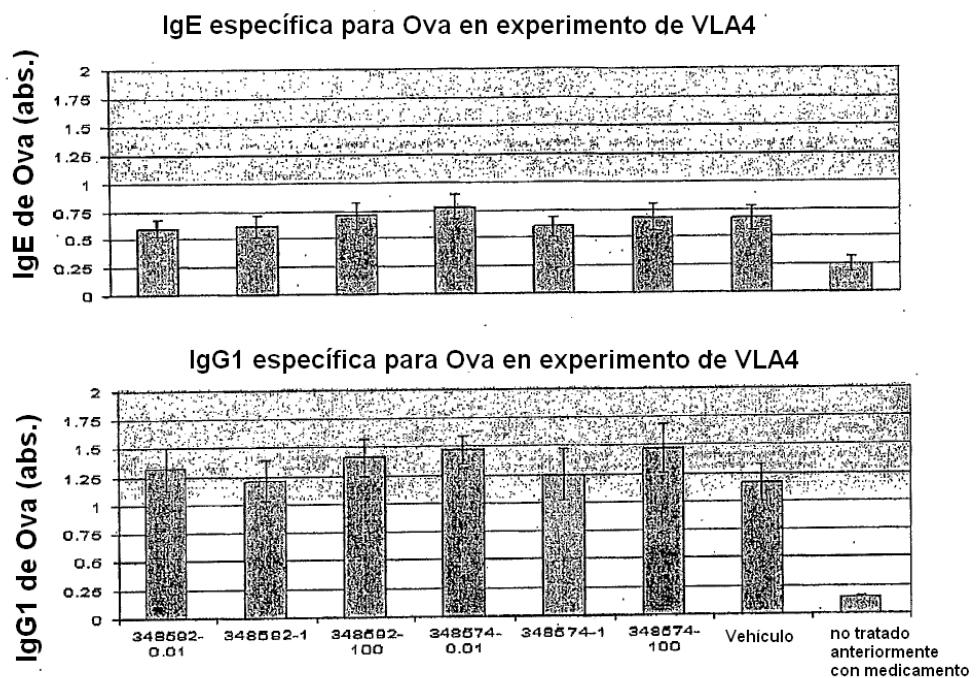


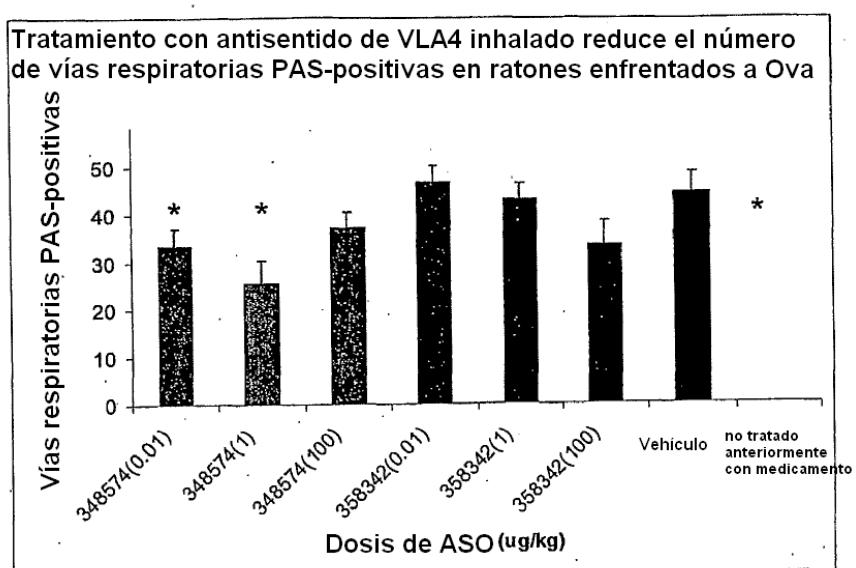
Figura 9

Figura 10

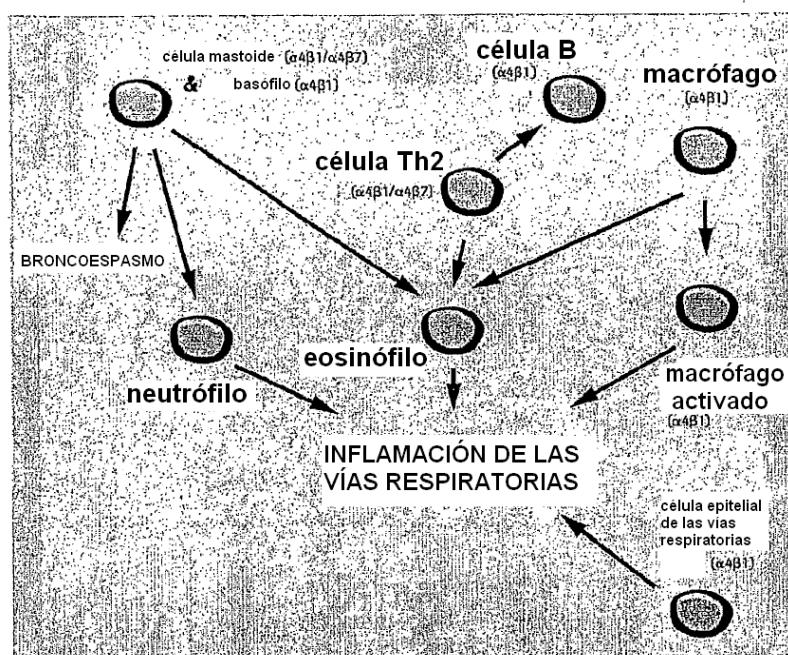


Figura 11

