(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 351 996**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06830566 .3**
(96) Fecha de presentación : **12.12.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1963507**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

(54) Título: **ARNsi anti-miosina Va y despigmentación de la piel.**

(30) Prioridad: **12.12.2005 FR 05 12553**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.02.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.02.2011

(73) Titular/es: **PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE**
45, place Abel-Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR

(72) Inventor/es: **Schmitt-Milas, Anne-Marie;**
Lambert, Jo;
Westbroek, Wendy y
Van Gele, Mireille

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

ARNsi anti-miosina Va y despigmentación de la piel.

La presente invención se refiere a nuevos ARNsi aislados que comprenden una hebra de ARN sentido y una hebra de ARN antisentido complementario que forman juntas un dúplex de ARN, comprendiendo la hebra de ARN sentido una secuencia que contiene como máximo un nucleótido distinto con respecto a un fragmento de 14 a 30 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va, caracterizado porque dicho fragmento de 14 a 30 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va está constituido por una secuencia nucleotídica seleccionada de entre la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 3; así como a unas composiciones que comprenden por lo menos dicho ARNsi, y a la utilización de por lo menos dicho ARNsi como agente cosmético o terapéutico para la despigmentación de la piel.

La pigmentación de la piel es un proceso complejo que comprende numerosas etapas. Los melanocitos que están situados en la capa basal de la epidermis, pueden ser activados por unos estímulos internos o externos (por ejemplo, una exposición a los ultravioletas (UV)) para producir melanina en unos orgánulos especializados emparentados con los lisosomas denominados melanosomas. Después de la maduración, los melanosomas perinucleares son transportados a lo largo de los microtubos y del citoesqueleto de actina hasta la periferia de las dendritas de los melanocitos (Lambert J *et al*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand): 45: 905-18, 1999; Hara M *et al*. J Invest Dermatol.: 114: 438-43, 2000; Vancoillie G *et al*. J Invest Dermatol.: 114: 421-9, 2000). Los melanosomas, que contienen la melanina, son transferidos a continuación a los queratinocitos adyacentes desde los extremos de las dendritas mediante un mecanismo todavía desconocido.

Cualquier alteración de una etapa de este proceso complejo puede conducir a unos trastornos de la pigmentación de la piel. En particular, un aumento del número de melanocitos activos, y/o un aumento de la producción de melanina, y/o un aumento de la transferencia de melanosomas de los melanocitos hacia los queratinocitos pueden conducir a una hiperpigmentación (o discromatosis) de la piel. Dicha hiperpigmentación puede ser inducida por numerosos factores, tales como los medicamentos, el Sol, unos disfuncionamientos metabólicos o nutricionales, o también por enfermedades genéticas o auto-inmunes. Esto implica generalmente unas consecuencias cosméticas y psicológicas importantes para el paciente, que en numerosos casos buscará un tratamiento adecuado.

Se han llevado a cabo numerosos esfuerzos por lo tanto para realizar unos tratamientos eficaces contra la hiperpigmentación. La mayoría de los tratamientos químicos que existen comprenden unos agentes despigmentantes que apuntan a la vía de síntesis de la melanina, en particular inhibiendo la actividad de la enzima tirosina que es necesaria para la síntesis de la melanina. Dichos agentes despigmentantes incluyen en particular la hidroquinona y sus derivados, el retinol o la tretinoina, el ácido ascórbico y sus derivados, unos extractos de placenta, el ácido kójico, el ácido ferúlico, la arbutina, unos derivados de dihidroxibenceno (WO 00/47045), unos derivados del guayacol (WO 00/47179), el 4-(2,3-dihidroxifenil)-ciclohexanol (WO 00/56279), unos derivados del resorcinol (WO 00/56702), o unas amidas fenólicas (WO 99/32077). Estas sustancias pueden adolecer de algunos inconvenientes. Pueden ser inestables, necesitar una utilización a concentraciones elevadas, carecer de especificidad en cuanto a su modo de acción, o presentar un poder citotóxico o irritante.

Se han realizado asimismo unos tratamientos de tipo físico, tales como la exfoliación de profundidad media, la dermoabrasión o la terapia láser. Sin embargo, estos tratamientos son generalmente menos eficaces y pueden causar unos efectos secundarios molestos tales como unos riesgos de hipo- o de hiperpigmentación posinflamatorias, una ocronosis, o una cicatrización que pueden provocar unos efectos carcinógenos (Briganti S *et al*. Pigment Cell Res.: 16: 101-10, 2003; Halder RM, Nootheti PK. J Am Acad Dermatol.: 48: S 143-48, 2003; Halder RM, Richards GM. Skin Therapy Lett.: 9: 1-3, 2004).

Existe por lo tanto una necesidad de realizar nuevos tratamientos cosméticos y/o terapéuticos de la hiperpigmentación que sean eficaces y seguros.

Además de los tratamientos químicos, otra posibilidad para obtener la inhibición de la expresión de un gen determinado consiste en utilizar unos ácidos nucleicos antisentido o en aprovechar un proceso denominado ARN de interferencia (Dykxhoorn DM *et al*. Nat Rev Mol Cell Biol.: 4: 457-67, 2003; Soutschek J *et al*. Nature: 432: 173-8, 2004).

El ARN de interferencia (denominado a continuación ARNi) es el proceso por el cual un ARN bicatenario (ARNds) de secuencia nucleica sentido determinada induce la degradación de todos los ARN mensajeros (ARNm) que comprenden dicha secuencia nucleica, de una manera específica de dicha secuencia nucleica. Aunque el proceso de ARNi haya sido inicialmente demostrado en *Caenorhabditis elegans*, está claro ahora que el proceso de ARNi es un fenómeno muy general, y que se ha obtenido la inhibición de la expresión de genes humanos por ARNi.

El proceso de ARNi se puede obtener utilizando pequeños ARN interferentes (o ARNsi). Estos ARNsi son unos ARNds de menos de 30 nucleótidos que comprenden en su secuencia sentido una secuencia plásmica altamente homóloga, preferentemente idéntica, a un fragmento del ARNm diana. Cuando un ARNsi atraviesa la membrana plásmica, la reacción de la célula es destruir el ARNsi así como todas las secuencias que comprenden una secuencia idéntica o altamente homóloga. Así, un ARNm que contiene un fragmento idéntico o altamente homólogo a la secuencia de ARNsi será destruido, siendo inhibida así la expresión de este gen.

Para el tratamiento de la hiperpigmentación, se ha propuesto en la técnica anterior utilizar unos oligonucleótidos antisentido dirigidos contra los genes de la tirosina o de la proteína TRP-1 (WO 01/58918) o contra el gen de la proteína PKC β1 que está implicada en el proceso de fosforilación de la tirosinasa (WO 2005/073243). Se ha propuesto asimismo utilizar unos ARNsi que apuntan al gen de la tirosinasa (WO 2005/060536).

Sin embargo, todos estos genes están implicados en la vía de síntesis de la melanina, y no se ha dado a conocer ni sugerido nunca ningún ARNsi que apunte a un gen implicado, no en la vía de síntesis de la melanina, sino en el transporte de los melanosomas en el seno de los melanocitos y su transferencia hacia los queratinocitos.

Se ha demostrado, en particular por los inventores, que la proteína miosina Va está implicada en el transporte de los melanosomas en el seno de los melanocitos (Lambert J *et al*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand): 45: 905-18, 1999; Lambert *et al*. J Invest Dermatol.: 111: 835-40, 1998). Más precisamente, la proteína miosina Va contiene varias variantes de corte y empalme, y la variante que comprende el exón F es necesaria para el transporte de los melanosomas (Westbroek W *et al*. J Jnvest Dermatol.: 120: 465-75, 2003).

Alastair J. Edgar *et al*. (J Anat. agosto 1999; 195 (Pt 2):173-84) describen la utilización de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la proteína miosina Va de ratón con el fin de reducir su expresión, así como su influencia sobre la extensión de nuevas dendritas por los melanocitos. Los oligonucleótidos antisentido utilizados no están situados en el exón F de la proteína miosina Va de ratón.

Sin embargo hasta la actualidad, no se había realizado ninguna tentativa para inhibir la expresión de la variante de la proteína miosina Va que comprende el exón F utilizando unos ARNsi, ni para aplicar este enfoque al tratamiento cosmético o terapéutico de la hiperpigmentación.

Los inventores han descubierto que era posible sintetizar unos ARNsi que apuntan al exón F de la proteína miosina Va e inducir gracias a estos ARNsi un proceso de ARNi específico del exón F de la proteína miosina Va. Han demostrado asimismo que dichos ARNsi son eficaces para inhibir la expresión de la variante de la proteína miosina Va que comprende el exón F a unas concentraciones de ARNsi que no inducen ningún descenso de la viabilidad celular y que el efecto es dosis-dependiente. Además, los inventores han descubierto asimismo que la presencia de ARNsi que apuntan al exón F de la proteína miosina Va permite inhibir la transferencia de los melanosomas de los melanocitos hacia los queratinocitos.

La invención se refiere por lo tanto a un ARNsi aislado que comprende una hebra de ARN sentido y una hebra de ARN antisentido complementaria que forman juntas un dúplex de ARN, comprendiendo la hebra de ARN sentido una secuencia que contiene como máximo un nucleótido distinto con respecto a un fragmento de 14 a 30, ventajosamente 15 a 29, 16 a 28, 17 a 27, 18 a 25, 18 a 23 ó 19 a 21 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va, caracterizado porque dicho fragmento de 14 a 30 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va está constituido por una secuencia nucleotídica seleccionada de entre la SEC ID nº 2 y la SED ID nº 3. Mediante la expresión "que comprende un fragmento de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va" se entiende en toda la descripción de la invención el hecho de que comprende una secuencia de ARN que corresponde a la secuencia génica, es decir, una secuencia de ARN que corresponde a la secuencia génica en la que las T son sustituidas por unas U.

La hebra sentido de un ARNsi según la invención comprende por lo tanto un fragmento de 14 a 30, ventajosamente 15 a 29, 16 a 28, 17 a 27, 18 a 25, 18 a 23 ó 18 a 21 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va, es decir, una secuencia que presenta un nucleótido distinto con respecto a dicho fragmento, caracterizado porque dicho fragmento de 14 a 30 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va está constituido por una secuencia nucleotídica seleccionada de entre la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 3. En efecto, el proceso de ARNi es específico de la secuencia, y se necesita una fuerte homología de secuencia para obtener ARNi eficaz. De manera ventajosa, la hebra de ARN sentido comprende una secuencia idéntica a un fragmento de 14 a 30, ventajosamente 15 a 29, 16 a 18, 17 a 27 ó 18 a 25 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va, caracterizado porque dicho fragmento de 14 a 30 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va está constituido por una secuencia nucleotídica seleccionada de entre la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 3.

La proteína miosina Va ha sido descrita en diferentes especies, en particular en el ser humano, el ratón y la rata. La secuencia de la proteína miosina Va humana se representa en la figura 1A, estando subrayada la porción que corresponde al exón F (SEC ID nº 1).

La eficacia de cualquier ARNsi que apunta al exón F de la proteína miosina Va según la invención se puede verificar mediante diferentes ensayos, en particular los descritos en detalle en los ejemplos 1 y 2.

Los inventores han sintetizado y ensayado varios ARNsi particulares que apuntan a diferentes fragmentos del exón F de la proteína miosina Va humana. En un modo de realización ventajoso de un ARNsi según la invención, el fragmento de 14 a 30, ventajosamente 15 a 29, 16 a 28, 17 a 27, 18 a 25, 18 a 23 ó 18 a 21 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va humana está constituido por una secuencia nucleotídica seleccionada de entre la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 3. La posición de las tres secuencias SEC

ID nº 2, SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4 se precisa en la figura 1B. En un modo de realización particularmente ventajoso, el fragmento de 14 a 30, ventajosamente 15 a 29, 16 a 28, 17 a 27, 18 a 25, 18 a 23 ó 18 a 21 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va humana está constituido por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 3.

Un ARNsi según la invención es un pequeño ARN bicatenario cuyas hebras sentido y antisentido están apareadas por unos enlaces de tipo Watson-Crick, y cuya secuencia de la hebra sentido está constituida por o comprende un fragmento de 14 a 30, ventajosamente 15 a 29, 16 a 28, 17 a 27, 18 a 25, 18 a 23 ó 18 a 21 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F de la proteína miosina Va.

Se sabe que los ARNsi cuya secuencia está compuesta por 30 a 50% de guaninas y citosinas son más eficaces que las secuencias con una proporción más importante de guaninas y de citosinas. Los ARNsi según la invención contienen por lo tanto ventajosamente una secuencia compuesta por 30 a 50% de guaninas y de citosinas.

Se debe entender que un ARNsi según la invención puede comprender de manera indiferente dos moléculas de ARN monocatenario complementarias, o bien una sola molécula de ARN monocatenario en la que dos porciones complementarias están apareadas mediante unos enlaces de tipo Watson-Crick y están unidas por un lado de manera covalente por una estructura de tipo horquilla (se habla entonces más precisamente de ARNsh (por "short hairpin RNA"), que puede ser considerado como una sub-categoría de ARNsi). En toda la descripción, se entenderá por lo tanto el término ARNsi en su sentido amplio incluyendo los ARNsh, salvo que se indique lo contrario. En un modo de realización ventajoso, un ARNsi según la invención comprende dos moléculas de ARN monocatenario complementarias. En otro modo de realización ventajoso, un ARNsi según la invención comprende o está constituido por una sola molécula de ARN monocatenario en la que dos porciones complementarias están apareadas mediante unos enlaces de tipo Watson-Crick y están unidas por un lado de manera covalente por una estructura de tipo horquilla, es decir, un ARNsh.

Además, las hebras de ARN sentido y/o antisentido pueden comprender además un fragmento 3' en resalte de 2 a 4 nucleótidos, en particular cuando un ARNsi según la invención comprende dos moléculas de ARN monocatenario complementarias. Mediante la expresión "fragmento 3' en resalte de 2 a 4 nucleótidos", se entiende la presencia en por lo menos una hebra del dúplex de ARN de 2 a 4 nucleótidos no apareados a la hebra complementaria en el extremo 3' de dicha hebra. Los nucleótidos utilizados en el fragmento 3' en resalte pueden ser unos nucleótidos naturales (ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos), o unos nucleótidos modificados tales como los LNA (Locked Nucleic Acid) que comprenden un puente metileno entre las posiciones 2' y 4' de la ribosa (Soutschek J. *et al*. Nature. 11 noviembre 2004; 432(7014): 173-8). El fragmento 3' en resalte puede asimismo haber sufrido cualquier tipo de modificación química descrita en el párrafo siguiente para la hebra de ARN sentido y/o la hebra de ARN antisentido de un ARNsi según la invención. Ventajosamente, el fragmento 3' en resalte está constituido por 2 nucleótidos. En este caso, unas secuencias preferidas para el fragmento 3' en resalte son "TT" (en el que T representa la desoxitimidina) o "UU" (en el que U representa el uracilo). Ventajosamente también, las dos hebras complementarias de un ARNsi según la invención comprenden un fragmento 3' en resalte. En este caso, la longitud y la secuencia de los dos fragmentos 3' en resalte pueden ser idénticas o diferentes. De manera ventajosa, las dos hebras complementarias de un ARNsi según la invención comprenden cada una el mismo fragmento 3' en resalte de 2 nucleótidos de secuencia "TT". Dichos ARNsi que comprenden las secuencias ARN que corresponden a la SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4 y sobre cada hebra un fragmento 3' en resalte de secuencia "TT" están representados en la figura 1C y corresponden a unos modos de realización ventajosos de la invención. Corresponden:

- al ARNsi MioVa nº 1 que comprende la secuencia ARN de la secuencia génica SEC ID nº 2 cuyas hebras tienen por secuencias precisas:

  hebra sentido: 5'-UGACCCUAAGAAGUAUCAATT-3' (SEC ID nº 9)

  hebra antisentido: 5'-UUGAUACUUCUUAGGGUCATT-3' (SEC ID nº 10);

- al ARNsi MioVa nº 2 que comprende la secuencia ARN de la secuencia génica SEC ID nº 3 cuyas hebras tienen por secuencias precisas:

  hebra sentido: 5'-GUAUCAAUCAUAUCGGAUUTT-3' (SEC ID nº 11)

  hebra antisentido: 5'-AAUCCGAUAUGAUUGAUACTT-3' (SEC ID nº 12);

- al ARNsi nº 3 que comprende la secuencia ARN de la secuencia génica SEC ID nº 4 cuyas hebras tienen por secuencias precisas:

  hebra sentido: 5'-UCAUAUCGGAUUUCCCUUUTT-3' (SEC ID nº 13)

  hebra antisentido: 5'-AAAGGGAAAUCCGAUAUGATT-3' (SEC ID nº 14);

Cuando un ARNsi según la invención es un ARNsh constituido por una sola molécula de ARN monocatenario en la que dos porciones complementarias están apareadas por unos enlaces de tipo Watson-Crick y están unidas por un lado de manera covalente por una estructura de tipo horquilla, es decir, cuando el ARNsi según la invención es un ARNsh, dicho ARNsh comprende o está constituido preferentemente por la secuencia siguiente:

5'-**GUAUCAAUCAUAUCGGAUUCUCAAGAGAAAUCCGAUAUGAUUGAUAC**-3' (SEC ID nº 17), en la que las porciones en negrita corresponden a dos porciones complementarias apareadas por unos enlaces de tipo Watson-Crick, que corresponden al ARN de secuencia génica SEC ID nº 3 comprendida en la hebra sentido del ARNsi MioVa nº2 y su secuencia complementaria, y la porción que no está en negrita corresponde a la secuencia de la estructura de tipo horquilla que une las dos hebras complementarias.

Además, en un ARNsi según la invención, la hebra de ARN sentido y/o la hebra de ARN antisentido pueden comprender asimismo por lo menos una modificación química a nivel de sus partes azúcar, de sus partes nucleobases o de su esqueleto internucleotídico. Dichas modificaciones pueden permitir en particular inhibir la degradación de los ARNsi por las nucleasas *in vivo*. Todas las modificaciones químicas que permiten mejorar la estabilidad y la biodisponibilidad *in vivo* de los ARNsi según la invención están así incluidas en el alcance de la invención. Entre las modificaciones ventajosas en las partes azúcar, se pueden citar en particular las modificaciones que intervienen en la posición 2' de la ribosa, tales como las modificaciones 2'-dexosi, 2'-fluoro, 2'-amino, 2'-tio, o 2'-O-alquilo, en particular 2'-O-metilo, en lugar del grupo 2'-OH normal sobre los ribonucleótidos, o también la presencia de un puente metileno entre las posiciones 2' y 4' de la ribosa (LNA). En lo que se refiere a las nucleobases, es posible utilizar unas bases modificadas, tales como en particular la 5-bromo-uridina, la 5-yodo-uridina, la N^3-metil-uridina, una 2,6-diaminopurina (DAP), la 5-metil-2'-desoxicitidina, la 5-(1-propinil)-2'-desoxi-uridina (pdU), la 5-(1-propinil)-2'-desoxicitidina (pdC), o unas bases conjugadas con colesterol. Por último, unas modificaciones ventajosas del esqueleto internucleotídico comprenden la sustitución de grupos fosfodiésteres de este esqueleto por unos grupos fosforotioato, metilfosfonato, fosforodiamidato, o la utilización de un esqueleto compuesto por unidades de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por unos enlaces peptídicos (PNA, Peptide Nucleic Acid). Las diferentes modificaciones (base, azúcar, esqueleto) pueden evidentemente ser combinadas para dar unos ácidos nucleicos modificados de tipo morfolino (bases fijadas sobre un ciclo morfolino y unidas por unos grupos fosforodiamidato) o PNA (bases fijadas sobre unas unidades de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por unos enlaces peptídicos).

Los ARNsi según la invención están "aislados", lo cual significa que no están en un estado natural sino que han sido obtenidos mediante cualquier medio que implica una intervención humana. En particular, los ARNsi según la invención pueden haber sido obtenidos mediante purificación de ARNsi preexistentes, mediante síntesis química, mediante amplificación de las secuencias nucleotídicas deseadas, mediante una reacción de polimerización en cadena (PCR) o mediante síntesis recombinante. Numerosas compañías proponen asimismo la síntesis de ARNsi por encargo, tales como en particular las compañías Eurogentec, Ambion, Dharmacon o Qiagen.

La invención se refiere asimismo a los ARNsi según la invención, como agente cosmético. Mediante la expresión "agente cosmético" se entiende una sustancia que permite mantener o mejorar el aspecto estético de una parte externa del cuerpo humano o animal.

La invención se refiere además a los ARNsi según la invención, como medicamento. En efecto, los ARNsi según la invención son nuevos como medicamento.

La invención tiene asimismo por objeto una composición que comprende por lo menos un ARNsi según la invención y un soporte aceptable. Mediante la expresión "soporte aceptable" se entiende cualquier soporte cosmetológica o farmacéuticamente aceptable conocido por el experto en la materia.

Una composición según la invención está destinada al tratamiento cosmético y/o terapéutico de la piel y se administra por lo tanto ventajosamente por vía tópica.

Una composición para aplicación tópica según la invención puede ser formulada en cualquier forma galénica utilizada habitualmente para una aplicación tópica, como por ejemplo en forma de una disolución acuosa, de una crema blanca o coloreada, de una pomada, de una leche, de una loción, de un gel, de un ungüento, de un suero, de una pasta, de una emulsión aceite en agua o agua en aceite, o de una espuma. Puede eventualmente ser aplicada sobre la piel en forma de aerosol. Puede asimismo presentarse en forma sólida pulverulenta o no, por ejemplo en forma de barra. También se puede presentar en forma de parches, de lápiz, de pinceles o de aplicadores que permiten una aplicación localizada sobre las manchas de la cara o de las manos.

Una composición según la invención puede comprender además cualquier tipo de vehículo conocido por el experto en la materia que permite mejorar el suministro y la biodisponiblidad de los ARNsi según la invención. Unos vehículos particulares que se pueden utilizar con unos ARNsi comprenden en particular los liposomas y los péptidos capaces de franquear la membrana celular (denominados CPP por "Cell-permeables peptides"). Por el término "liposoma" se entiende una vesícula lipídica artificial cuya membrana está constituida por una o varias biocapas lipídicas y que tiene la capacidad de encapsular y proteger unas proteínas o unos ácidos nucleicos y fusionarse con la membrana celular, permitiendo así suministrar el producto encapsulado al interior de las células. La utilización de liposomas permite por lo tanto proteger los ARNsi y facilitar su penetración en el seno de las células. Por CPP se entienden unos péptidos capaces de ser internalizados y alcanzar a continuación los compartimientos citoplásmicos y/o nucleares de células

vivas. Unos ejemplos de dichos CPP comprenden los péptidos Pénétratine, Transportan, Tat, MAP y SynBl. Unos ejemplos particularmente útiles de CPP consisten en unos péptidos anfipáticos derivados de virus que interactúan directamente con los ácidos nucleicos a suministrar para formar unas nanocápsulas capaces de difundirse a través de la membrana plásmica. La conjugación de los ARNsi según la invención con cualquier CPP puede por lo tanto permitir asimismo proteger los ARNsi y facilitar su entrada en las células *in vivo*.

Una composición según la invención puede comprender asimismo uno o varios agentes activos que prevén reforzar los efectos buscados. En un modo de realización particular, una composición según la invención puede en particular comprender además por lo menos otro agente despigmentante. Mediante la expresión "agente despigmentante" se entiende cualquier sustancia que actúa directamente sobre los melanocitos inhibiendo su actividad, o bien una de las etapas de la vía de síntesis de la melanina, o también el transporte de los melanosomas hacia las dendritas y su transferencia hacia los queratinocitos. Entre los agentes despigmentantes conocidos susceptibles de ser añadidos a una composición según la invención, se pueden citar en particular la hidroquinona y sus derivados, el retinol o la tretinoina, el ácido ascórbico y sus derivados, unos extractos de placenta, el ácido kójico, el ácido ferúlico, la arbutina, unos derivados de dihidroxibenceno (WO 00/47045), unos derivados del guayacol (WO 00/47179), el 4-(2,3-dihidroxifenil)-ciclohexanol (WO 00/56279), unos derivados del resorcinol (WO 00/56702), unas amidas fenólicas (WO 99/32077). Otros agentes despigmentantes susceptibles de ser añadidos a una composición según la invención comprenden unos oligonucleótidos antisentido o unos ARNsi dirigidos contra otros genes diferentes al que codifica para la proteína miosina Va implicados en una etapa de la vía de síntesis de la melanina o en el transporte de los melanosomas hacia las dendritas y su transferencia hacia los queratinocitos, tales como en particular unos oligonucleótidos antisentido o unos ARNsi que apuntan a la tirosinasa (véanse los documentos WO 01/58918 y WO 2005/060536), la proteína TRP-1 (véase el documento WO 01/58918) o la proteína PKC β1 (véase el documento WO 2005/073243).

Las composiciones según la invención pueden contener asimismo otras sustancias activas o excipientes utilizados habitualmente en unas composiciones tópicas destinadas al cuidado de la piel tales como, por ejemplo, unos filtros solares químicos o físicos (tales como, por ejemplo, el metoxicinamato de octilo, el butil-metoxidibenzol-metano, el óxido de titanio y el óxido de zinc), unos agentes antiglicación y/o antioxidantes considerados solos o en asociación (tales como, por ejemplo, el tocoferol y sus derivados, la ergotioneina, la tiotaurina, la hipotaurina, la aminoguanidina, la tiamina pirofosfatasa, la piridoxamina, la lisina, la histidina, la arginina, la fenilalanina, la piridoxina, la adenosina trifosfato), unos agentes anti-inflamatorios (tales como, por ejemplo, el estearilglicirretinato), unos agentes tranquilizantes y sus mezclas, unos agentes conservantes (antibacterianos o antifúngicos), unos agentes hidratantes, unos modificadores de pH, unos agentes queratolíticos y/o desescamantes (tales como, por ejemplo, el ácido salicílico y sus derivados), unas vitaminas, unos espesantes, unos agentes emolientes, unas aguas termales, unos tensoactivos, unos polímeros, unos aceites de silicona, unos aceites vegetales, unos aceites esenciales, unos perfumes, unas materias colorantes o unos pigmentos, etc.

La invención se refiere asimismo a la utilización de por lo menos un ARNsi o de una composición según la invención como agente cosmético para la despigmentación o el blanqueamiento de la piel. Los ARNsi y las composiciones según la invención pueden ser utilizados como agente cosmético o para la despigmentación o el blanqueamiento de la piel, o bien de manera global para disminuir la pigmentación de la piel en su conjunto, a nivel de zonas hiperpigmentadas, sea cual sea el origen de la hiperpigmentación de dichas zonas. Dicha utilización permite en efecto homogeneizar la pigmentación de la piel, mejorando así su aspecto estético. Además, incluso en ausencia de zonas hiperpigmentadas, algunas personas pueden desear una pigmentación global más clara, lo cual se puede obtener mediante una utilización cosmética según la invención.

La invención se refiere además a la utilización de por lo menos un ARNsi o de una composición según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de la hiperpigmentación de la piel, en particular unas hiperpigmentaciones epidérmicas, unos melasmas y unas hiperpigmentaciones posinflamatorias. La hiperpigmentación puede tener por origen numerosos trastornos diferentes. Se pueden citar en particular las melanosis de la cara y del cuello, tales como el cloasma, la melanosis de Riehl, la poikilodermia reticulada pigmentaria de la cara y del cuello, o la poikilodermia hereditaria acroquerastásica; las efelidas; las manchas café con leche; las naevus de Sutton; las hiperpigmentaciones debidas a unas causas metabólicas tales como la hemocromatosis, la enfermedad de Adisson, el síndrome de Cushing o la hipertireosa; y las hiperpigmentaciones que se deben a causas exógenas tales como las hiperpigmentaciones de origen medicamentoso (sustancias tales como la cloropromazina, las fenotiazinas, la hidantoína, el arsénico inorgánico, los antimalariales) o a los metales pesados (plata, oro, mercurio); las hiperpigmentaciones posinflamatorias inducidas después de traumatismos, erupciones eczematosas, liquen simple crónico, lupus eritematosos, y dermatosis que incluyen pitiriasis rosea, soriasis, dermatitis herpetiforme, eritema pigmentado fijo, y foto-dermatitis; el síndrome de Rothmund-Thomson; la acantosis nigricans benigna o la acantosis nigricans maligna. La utilización de un ARNsi o de una composición según la invención para la preparación de un medicamento permite tratar estas diferentes patologías y hacer desaparecer las zonas de hiperpigmentación inducidas por estos trastornos. Permite asimismo prevenir la aparición de zonas de hiperpigmentación inducidas por estos diferentes trastornos.

La presente descripción se refiere asimismo a un método de tratamiento cosmético destinado a la despigmentación y al blanqueamiento de la piel, que comprende la administración por vía tópica de una composición según la invención.

La presente descripción se refiere además a un método de tratamiento terapéutico de las hiperpigmentaciones de la piel, que comprende la administración por vía tópica de una composición según la invención.

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención sin por ello limitarla.

Descripción de las figuras

Figura 1. Diseño de 3 ARNsi que apuntan al exón F de la proteína miosina Va humana. A. Secuencia nucleotídica que codifica los transcritos de la proteína miosina Va humana que comprenden el exón F (que comprenden los exones ABCDEF). La parte que corresponde al exón G está subrayada. B. Detalle de la secuencia del exón F. Las posiciones que corresponden a los tres ARNsi seleccionados están subrayadas (ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3)) o bien resaltadas (ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2), o MioVa nº 3 (SEC ID nº 4)). C. Estructura de los 3 ARNsi seleccionados que apuntan al exón F de la proteína miosina Va humana.

Figura 2. Reducción de la cantidad de transcritos de la proteína miosina Va que comprende el exón F en las células MEHP electroporadas con 2 μM de ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3). Unas células MEHP han sido electroporadas con 2 μM de ARNsi de control negativo, de ARNsi que apunta al gen GAPDH o de ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3). El efecto de los diferentes ARNsi se mide a nivel de ARN mediante QPCR. A. Nivel de expresión relativo del gen GAPDH en función del ARNsi electroporado. B. Nivel de expresión de los transcritos de la proteína miosina Va que comprende el exón F en función del ARNsi electroporado.

Figura 3. Reducción específica de la cantidad de transcritos de la proteína miosina Va que comprenden el exón F, pero no unos transcritos que no comprenden el exón F. A. Nivel de expresión relativo de los transcritos de la proteína miosina Va que comprenden el exón F en función del ARNsi electroporado. B. Nivel de expresión relativo de todos los transcritos de la proteína miosina Va mediante la detección de la parte globular (GP) en función del ARNsi electroporado.

Figura 4. Determinación de la concentración mínima que tiene una eficacia máxima para los ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2) y MioVa nº 2 (SEC ID nº 3). Diferentes concentraciones de ARNsi que apuntan al exón F de la proteína miosina Va han sido ensayadas para los ARNsi. A. MioVa nº 1 (SEC ID nº 2) y B. MioVa nº 2 (SEC ID nº 3). Para MioVa nº 2, los resultados se representan en forma de media con error estándar.

Figura 5. Efecto de la concentración en ARNsi sobre la viabilidad de las células. El nivel de expresión relativo de los transcritos que comprenden el exón F y la viabilidad de las células han sido determinados en paralelo para diferentes concentraciones del ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3). Las concentraciones en ARNsi están indicadas en abscisas, el nivel de expresión relativo de los transcritos que comprenden el exón F y la viabilidad de las células en ordenadas, respectivamente en forma de un histograma (barras grises) y de una curva que representa el valor medio y el error estándar.

Figura 6. Eficacia de los ARNsi que apuntan al exón F de la proteína miosina Va a lo largo del tiempo. Las células MEHP han sido analizadas a diferentes tiempos después de la electroporación de 0,5 μM de ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2) o MioVa nº 2 (SEC ID nº 3). A. Nivel de expresión relativo para MioVa nº 1 (SEC ID nº 2). B. Nivel de expresión relativo para MioVa nº 2 (SEC ID nº 3).

Figura 7. Principio del ensayo de inhibición *in vitro* de la transferencia de los melanosomas de los melanocitos hacia los queratinocitos por los ARNsi que apuntan al exón F de la proteína miosina Va humana.

Figura 8. Evaluación de la inhibición a nivel de los transcritos que comprenden el exón F (transcritos MioVa exF) y de los transcritos totales de la proteína miosina Va detectados a nivel de la parte GP (transcritos MioVa GP) en unos MEHP transfectados con 25 nM o 10 nM de ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3 exF) o el de oligonucleótido BLOCK-iT™ Fluorescent oligo, (siNEG) y 12 ó 18 μl de agente reactivo HiPerFect. A. Transcritos MioVa exF, 12 μl de agente reactivo HiPerFect. B. Transcritos MioVa GP, 12 μl de agente reactivo HiPerFect. C. Transcritos MioVa exF, 18 μl de agente reactivo HiPerFect. D. Transcritos MioVa GP, 18 μl de agente reactivo HiPerFect.

Figura 9. Evaluación de la inhibición a nivel del ARN y a nivel proteico durante un experimento a largo lazo (D2, D4, D6, D8 después de la transfección). A. Análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real a nivel del ARN. B. Análisis a nivel proteico mediante transferencia Western con un anticuerpo dirigido específicamente contra las isoformas de la proteína miosina Va que contienen el exón F. C. Cuantificación establecida con el programa Quantity One software con normalización con respecto a la tubulina, a partir de los resultados brutos.

Figura 10. Evaluación de la inhibición a nivel de los transcritos que comprenden el exón F (transcritos MioVa exF) en unos MEHP transfectados con el ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2, exF) o el oligonucleótido BLOCK-iT™ Fluorescent oligo (siNEG) y 18 μl de agente reactivo HiPerFect.

Ejemplos

Ejemplo 1

Diseño, síntesis y estudio de 3 ARNsi que apuntan al exón F de la miosina Va humana

1.1 *Diseño y síntesis de los 3 ARNsi*

La secuencia de la variante de corte y empalme de la proteína miosina Va humana que comprende el exón F (que comprende realmente los exones ABCDEF) se representa en la figura 1A.

En el seno del exón F, tres ARNsi que apuntan al exón F de la proteína miosina Va humana han sido diseñados y sintetizados recurriendo al servicio de diseño y síntesis de ARNsi de la compañía Eurogentec. Las porciones del exón F de las cuales estos ARNsi son específicos están indicadas en la figura 1B.

Los tres ARNsi han sido sintetizados con unos fragmentos 3' en resalte de secuencia "TT", tal como se representa en la figura 1C. Estos tres ARNsi se denominan a continuación MioVa nº 1 (hebra sentido que comprende la SEC ID nº 2), MioVa nº 2 (hebra sentido que comprende la SEC ID nº 3) o MioVa nº 3 (hebra sentido que comprende la SEC ID nº 4), correspondiendo el número de SEC ID indicado entre paréntesis a la secuencia del fragmento del exón F de la proteína miosina Va humana comprendida en la hebra de ARN sentido del ARNsi.

1.2. *Ensayo de la eficacia de los ARNsi después de la electroporación en unos melanocitos epidérmicos humanos primarios (MEHP)*

1.2.1 *Elección del programa de electroporación*

Unos melanocitos epidérmicos humanos primarios (MEHP) han sido cultivados en medio Ham's F10 (Gibco, Invitrogen Ltd, Paisley, UK) suplementado con 2,5% de suero de ternera fetal (SVF), 1% de Ultroser, 5 ng/ml de factor de crecimiento básico de los fibroblastos (bFGF), 10 ng/ml de endotelina-1 (ET-1), 0,33 nM de toxina colérica (TC), 0,033 mM de isobutil-metil-xantina (IBMX) y 5,3 nM de forbol-13-acetato de 12-O-tetradecanoilo (TPA). Las células han sido cultivadas hasta una confluencia de 40-70% y utilizadas entre las pasadas 2 y 5.

En un primer tiempo, se ha utilizado el plásmido pMAX-GFP (3 μg) para ensayar tres programas diferentes de electroporación de los melanocitos, a saber, los programas U16, U20 y U24. Se han utilizado 500.000 células por electroporación. Se ha utilizado el kit NHEM-Neo Nucleofector (Amaxa, #VDP-1 003) para melanocitos humanos epidérmicos normales - Neonatal para todas las electroporaciones.

Las células electroporadas en unos frascos T25 han sido evaluadas vivas a 24-48 horas con un microscopio Arcturus (LCM) equipado con un filtro fluorescente capaz de detectar las señales de fluorescencia verde emitidas por el plásmido pMAX-GFP.

Las células electroporadas han sido cultivadas asimismo sobre unas láminas de vidrio. Las células han sido fijadas 24 horas después de la electroporación en metanol helado y montadas sobre unas láminas de vidrio con fluido de montaje (DAKO). El análisis de las células que se refiere a la expresión de señales de fluorescencia verde ha sido realizado bajo microscopio de fluorescencia Zeiss.

Los resultados obtenidos sobre las células vivas han mostrado que se observa una cantidad igual de células muertas sea cual sea el programa de electroporación, pero que la mejor eficacia de electroporación se obtiene con el programa U24. Los resultados obtenidos sobre las células fijadas han confirmado que el programa U24 proporciona la mejor eficacia de electroporación. El programa U24 ha sido por lo tanto utilizado a continuación en todos los demás experimentos.

1.2.2 *Análisis preliminar de la eficacia del ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3)*

Se han electroporado 500.000 células MEHP con el plásmido pMAX-GFP (3 μg) y los dúplex de ARNsi siguientes: un control positivo que apunta al GADPH marcado FAM (3 μg o 2 μM, Ambion), un control negativo BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo (Invitrogen), y el dúplex de ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3) específico del exón F del gen de la proteína miosina Va. El programa U24 ha sido utilizado para la electroporación y las células han sido recuperadas 24 horas después de la electroporación.

El análisis ha sido realizado después a nivel ARN por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR). Brevemente, después de la extracción del ARN, las muestras han sido tratadas con ADNasa y el ADNc ha sido sintetizado utilizando la transcriptasa inversa iScript (Biorad). Los cebadores de QPCR para el exón F de la proteína miosina Va (cebador sentido: 5' CAGCCTGCAGCACGAGATC 3', SEC ID nº 5, cebador antisentido: 5' TCTTAGGGTCATCTGCATA TAATTCCT 3', SEC ID nº 6) y el GAPDH han sido diseñados utilizando el programa PrimerExpress 2.0 (Applied Biosystems) con los parámetros Taqman por defecto, modificando sólo la limitación de tamaño mínimo del amplicón

(75 pb). Los niveles relativos de expresión de los genes han sido determinados con la ayuda de un ensayo SYBR green IRT-PCR en dos etapas optimizado. El método de comparación de los valores Ct ha sido utilizado para la cuantificación. Las reacciones de PCR han sido llevadas a cabo en un ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Para corregir las diferencias en cantidad de ARN extraído y en eficacia de síntesis del ADNc, los niveles relativos de expresión de los genes han sido normalizados con respecto a la media geométrica de tres genes domésticos (RPL13a, SDHA y UBC) que ya han sido utilizados para unos análisis sobre unos melanocitos (Vandesompele J *et al*. Genome Biol.: 3: researchoo34.001 - research0034.001, 2002).

Los resultados obtenidos muestran que los ARNsi utilizados inducen una reducción de la expresión de ARN de los genes diana después de la electroporación en unas células MEHP. En efecto, se ha observado una reducción de 75% para el GAPDH (figura 2A) y de 62% para los transcritos de la proteína miosina Va que comprende el exón F (figura 2B) con respecto al control negativo.

1.2.3 *Expresión de los transcritos del gen de la proteína miosina Va en unas células MEHP después de la electroporación con los ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2), MioVa nº 2 (SEC ID nº 3), o MioVa 3 (SEC ID nº 4)*

Se han electroporado 500.000 células MEHP con el agente reactivo Nucleofector solo (MOCK), el ARNsi que apunta al GAPDH (1 μM), un ARNsi de control negativo, o uno de los tres ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2), MioVa nº 2 (SEC ID nº 3) o MioVa 3 (SEC ID nº 4) específicos del exón F del gen de la proteína miosina Va. El programa U24 ha sido utilizado para la electroporación y las células han sido recuperadas 48 horas después de la electroporación.

El análisis ha sido efectuado a continuación a nivel del ARN mediante QPCR tal como se ha descrito anteriormente sobre los transcritos que comprenden el exón F (detección del exón F) o sobre el conjunto de los transcritos detectando la parte globular (GP) de la proteína miosina Va. Se han diseñado los cebadores de QPCR para la parte globular (GP) de la proteína miosina Va (cebador sentido: 5' GCAGTCAATTTGATTCCAGGATT 3', SEC ID nº 7; cebador antisentido: 5' TGATCATCATTCAGGTAGTCAGCAT 3', SEC ID nº 8) utilizando el programa PrimerExpress 2.0 (Applied Biosystems), tal como se ha descrito anteriormente.

Para los transcritos que comprenden el exón F de la proteína miosina Va, se han observado unas inhibiciones de 85%, 94% y 60% para los ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2), MioVa nº 2 (SEC ID nº 3) y MioVa 3 (SEC ID nº 4) respectivamente (figura 3A). La inhibición máxima ha sido por lo tanto obtenida con el ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3).

En lo que se refiere al conjunto de los transcritos de la proteína miosina Va, detectados por la parte globular (GO), se han observado unas inhibiciones de 39%, 56% y 0% para los ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2), MioVa nº 2 (SEC ID nº 3) y MioVa 3 (SEC ID nº 4) respectivamente (figura 3B). Esta inhibición reducida puede explicarse en particular por el hecho de que los ARNsi utilizados apuntan específicamente al exón F y por lo tanto no inducen la degradación de los transcritos que no comprenden el exón F.

1.2.3 *Conclusiones*

Estos primeros resultados muestran claramente que es posible reducir específica y significativamente la cantidad de transcritos de la proteína miosina Va humana que comprenden el exón F utilizando los tres ARNsi sintetizados, sin afectar sin embargo a los transcritos que no comprenden el exón F.

Los resultados más significativos se han obtenido con el ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3).

1.3. *Optimización de la concentración de ARNsi*

1.3.1 *Determinación de una concentración mínima de máxima eficacia*

Con el objetivo de determinar la concentración mínima en ARNsi que permite una eficacia máxima, se han ensayado diferentes concentraciones comprendidas entre 0,05 y 2 μM por el mismo protocolo que el descrito anteriormente. Se han utilizado el ARNsi de control negativo y el ARNsi que apunta al GADPH a una concentración de 1 μM.

Se ha utilizado el programa U24 y se han analizado las células 48 horas después de la electroporación.

El análisis ha sido realizado mediante QPCR tal como se ha descrito anteriormente sobre los transcritos que comprenden el exón F (detección específica del exón F).

Para el ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2), se ha observado una reducción en transcritos que comprenden el exón F de 47,5%, 31%, 73%, 73% y 79% con respecto al control negativo para las concentraciones de 0,05; 0,1; 0,35, 0,5 y 1 μM respectivamente (figura 4A). La mejor eficacia se obtiene por lo tanto con una concentración de 1 μM, pero se obtiene una inhibición casi tan eficaz con las concentraciones de 0,25 y 0,5 μM.

En lo que se refiere al ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3), se ha observado una fuerte reducción a todas las concentraciones ensayadas (figura 4B). Se ha observado la eficacia máxima para una concentración de 1 μM, pero la inhibición obtenida con una concentración de 0,5 μM es casi tan fuerte.

Una concentración óptima en ARNsi se sitúa por lo tanto alrededor de 0,5-1 μM.

1.3.2 *Influencia de la concentración en ARNsi sobre la viabilidad de las células*

La influencia de la concentración en ARNsi sobre la viabilidad de las células ha sido analizada a continuación con el ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3). Para ello, la misma gama de concentraciones (0,05 a 2 μM) ha sido analizada en paralelo con un ensayo MTS (Promega Benelux) que permite determinar el número de células viables. Las células han sido analizadas 48 horas después de la electroporación mediante el programa U24.

Los resultados están representados en la figura 5 y muestran que la viabilidad de las células está significativamente reducida (aproximadamente 20%) sólo para unas concentraciones en ARNsi de 1 ó 2 μM. Por debajo de 1 μM, la viabilidad de las células es superior a 90%.

1.3.3 *Conclusiones*

Estos resultados muestran que el efecto de los ARNsi que apuntan al exón F de la proteína miosina Va es dosis-dependiente, y que se puede obtener una eficacia máxima para una concentración comprendida entre 0,5 y 1 μM.

Además, por debajo de 1 μM, la presencia de los ARNsi no afecta a la viabilidad de las células MEHP.

Una concentración de 0,5 μM parece por lo tanto óptima, puesto que combina una gran eficacia y una elevada viabilidad celular. Esta concentración ha sido utilizada en todos los experimentos siguientes descritos a continuación.

1.4. *Análisis a lo largo del tiempo*

Para analizar el efecto en el tiempo de los ARNsi según la invención, unas células MEHP electroporadas con 0,5 μM de ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2) o MioVa nº 2 (SEC ID nº 3) han sido analizadas mediante QPCR como se ha descrito anteriormente a 24, 48, 72 y 96 horas después de la electroporación. Las células tratadas con los controles positivo o negativo (0,5 μM) han sido analizadas 48 horas después de la electroporación.

Para el ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2), la reducción en transcritos que comprenden el exón F es máxima a 24 h (más del 90%) y disminuye después a 48 h (65%) y 72 h (60%), volviendo el nivel de expresión a la normal a 96 h (véase la figura 6A).

En lo que se refiere al ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3), se ha observado una reducción de más de 85% a 24 y 48 horas, que disminuye a continuación a 72 y 96 horas, siendo al mismo tiempo significativa con respecto al control negativo (figura 6B).

Así, estos resultados muestran que la eficacia máxima se obtiene 24-48 horas después de la electroporación, y que la eficacia del ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3) es superior en el tiempo a la del ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2).

1.5 *Conclusiones*

Así, los resultados presentados anteriormente muestran claramente que es posible reducir en gran medida la cantidad de transcritos de la proteína miosina Va que comprende el exón F utilizando unos ARNsi que apuntan a dicho exón F. Tres ARNsi diferentes han sido ensayados, y cada uno de estos ARNsi permite reducir la cantidad de transcritos de la proteína miosina Va que comprenden el exón F. El ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2) y sobretodo el ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3), son particularmente eficaces.

Además, el efecto de estos ARNsi que apuntan al exón F de la proteína miosina Va es dosis-dependiente y se puede obtener con una eficacia máxima a una concentración que no afecta a la viabilidad de las células.

La eficacia varía asimismo a lo largo del tiempo y es máxima a 24-48 horas después de la electroporación.

Ejemplo 2

Influencia de la presencia de un ARNsi que apunta al exón F de la proteína miosina Va sobre la transferencia de los melanosomas de los melanocitos hacia los queratinocitos in vitro

2.1. *Principio del ensayo*

Con el fin de ensayar la influencia de los ARNsi según la invención que apuntan al exón F de la proteína miosina Va sobre la transferencia de la melanina de los melanocitos hacia los queratinocitos, se ha realizado un ensayo *in vitro*.

El principio de este ensayo se representa en la figura 7.

Unos melanocitos (MC) humanos normales son electroporados o no con un ARNsi que apunta al exón F de la proteína miosina Va a las concentraciones de 0,1 μM; 0,25 μM y 0,5 μM. Después, los melanocitos electroporados (ARNsi MC) o no (MC) se cultivan en un medio TFA enriquecido en presencia de 2[2-^{14}C]tiouracilo, que se incorpora a la melanina producida por los MC, lo cual permite obtener unos melanocitos que contienen melanina marcada con ^{14}C(MC* o ARNsi MC*).

Los MC* o ARNsi MC* se cultivan en un medio para queratinocitos sin suero y con un bajo contenido en calcio (K-SFM, Gibco) con unos queratinocitos (KC) que han sufrido 1 ó 2 pasadas por este mismo medio. Los MC* o ARNsi MC* y los KC se cultivan en un ratio de 1 por 3.

El co-cultivo se irradia a continuación opcionalmente con UV para estimular la transferencia de los melanosomas de los MC* o ARNsi MC* hacia los KC. En efecto, se sabe que la irradiación por los UV estimula la transferencia de los melanosomas de los melanocitos hacia los queratinocitos. Después del co-cultivo y de la irradiación UV eventual, los queratinocitos son radiactivos al ^{14}C (KC*) proporcionalmente a la cantidad de melanina transferida a partir de los MC* o ARNsi MC*.

A continuación, los KC* son purificados por selección negativa utilizando la tecnología MACS (Miltenyi Biotech), con la ayuda de un anticuerpo anti-CD117 PE que se fija sobre los melanocitos y de bolas anti-PE.

Por último, se mide la radiactividad ^{14}C de los KC* purificados.

2.2 *Resultados*

Los resultados obtenidos muestran que en ausencia de electroporación con un ARNsi que apunta al exón F de la proteína miosina Va, la irradiación UV permite estimular eficazmente la transferencia de la melanina de los melanocitos hacia los queratinocitos.

En cambio, en caso de electroporación con un ARNsi que apunta al exón F de la proteína miosina Va, la cantidad de melanina radiactiva al ^{14}C transferida a los queratinocitos después de la irradiación UV se reduce con respecto al control sin electroporación.

2.3 *Conclusiones*

Estos resultados muestran claramente que la utilización de ARNsi que apunta al exón F de la proteína miosina Va permite reducir la transferencia de la melanina de los melanocitos hacia los queratinocitos, validando así la estrategia utilizada por los inventores para reducir la pigmentación de la piel.

Ejemplo 3

Eficacia de los ARNsi que apuntan al exón F de la proteína miosina Va después de la transfección en unos melanocitos epidérmicos humanos primarios (MEHP)

3.1 *Transfección de MEHP con unos ARNsi que apuntan al exón F de la proteína miosina Va*

3.1.1 *Optimización de la transfección con los agentes reactivos de transfección HiPerFect*

Se han transfectado 200.000 MEHP (en 0,5 ml de medio/placa de 6 pocillos) con el ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3) y el oligonucleótido BLOCK-iT™ Fluorescent oligo (Invitrogen) como control negativo para cada transfección, y se ha utilizado 25 nM o 10 nM de cada ARNsi en combinación o bien con 12 o bien con 18 μl de agente reactivo HiPerFect (Qiagen).

Se ha medido la evaluación de la inhibición a nivel del ARN, o bien únicamente para los transcritos que comprenden el exón F (transcritos MioVa exF), o bien para el conjunto de los transcritos de la proteína miosina Va detectados

a nivel de la parte GP (transcritos MioVa GP) mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se ha descrito anteriormente en el párrafo Ejemplo 1.2.2.

Los resultados obtenidos con 12 μl o 18 μl de agente reactivo HiPerFect sobre los transcritos MioVa exF o MioVa GP se representan en la figura 8, y muestran que:

- para los transcritos MioVa exF con 12 μl de agente reactivo HiPerFect, se observa una inhibición de 80% y 85% para 25 nM y 10 nM de ARNsi MyoVa nº 2 (SEQ ID nº 3) respectivamente (figura 8A).
- para los transcritos MyoVa GP con 12 μl de agente reactivo HiPerFect, se observa una inhibición de 50% y 60% para 25 nM y 10 nM de ARNsi MyoVa nº 2 (SEQ ID nº 3) respectivamente (figura 8B).
- para los transcritos MyoVa exF con 18 μl de agente reactivo HiPerFect, se observa una inhibición de 90% y 85% para 25 nM y 10 nM de ARNsi MyoVa nº 2 (SEQ ID nº 3) respectivamente (figura 8C).
- para los transcritos MyoVa GP con 18 μl de agente reactivo HiPerFect, se observa una inhibición de 63% y 58% para 25 nM y 10 nM de ARNsi MyoVa nº 2 (SEQ ID nº 3) respectivamente (figura 8D).

3.1.2 *Conclusión*

Estos resultados muestran una inhibición significativa y específica del número de transcritos de proteína miosina Va que comprenden el exón F (transcritos MioVa exF) por transfección de MEHP con el ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3) y el agente reactivo HiPerFect. La inhibición más eficaz se obtiene con 25 nM de ARNsi nº 2 (SEC ID nº 3), y 18 μl de agente reactivo HiPerFect.

Estas condiciones óptimas se utilizan en todos los experimentos del ejemplo 3 descritos a continuación.

3.2 *Evaluación de la inhibición obtenida después de la transfección de MEHP con el ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3)*

3.2.1 *Evaluación de la inhibición a nivel del ARN y a nivel proteico durante un experimento a largo plazo*

Se han transfectado 800.000 MEHP (en 2,5 ml de medio/placa P60) con 18 μl de agente reactivo HiPerFect y 25 nM de ARNsi moVa nº 2 (SEC ID nº 3) o con 25 nM de oligonucleótido BLOCK-iT™ Fluorescente oligo (control negativo). El efecto de la inhibición ha sido evaluado en un periodo de 8 días. Se ha utilizado 1/3 de las células para la purificación de ARN y 2/3 de las células para purificar los lisados celulares.

La evaluación de la inhibición a nivel del ARN para los transcritos que comprenden el exón F (transcritos MioVa exF) se ha medido mediante PCR cuantitativa en tiempo real tal como se ha descrito anteriormente en el párrafo ejemplo 1.2.2.

Para correlacionar la inhibición observada a nivel del ARN con la expresión a nivel proteico, un anticuerpo policlonal dirigido específicamente contra las isoformas de la proteína miosina Va que contienen el exón F ha sido desarrollado por la compañía Eurogentec. La reactividad y la especificidad del anticuerpo purificado han sido ensayadas mediante análisis de transferencia Western y mediante inmunohistoquímica.

A continuación, los lisados celulares obtenidos durante el experimento han sido analizados por transferencia Western.

<u>A nivel del ARN</u>

Los resultados se presentan en la figura 9A y muestran que, en comparación con los controles negativos, se ha observado una reducción de 72%, 81%, 78% y 82% para los transcritos MioVa exF en los diferentes puntos en el tiempo (D2, D4, D6 y D8 respectivamente).

<u>A nivel proteico</u>

Los resultados del análisis de los lisados celulares por transferencia Western se presentan en las figuras 9B y C que representan respectivamente los resultados brutos de la transferencia Western y la cuantificación obtenida con el programa Quantity One software (Biorad) con normalización con respecto a la tubulina.

Estos resultados muestran que, con respecto a los controles negativos, se ha observado una reducción de 35%, 40%, 70% y 75% para los transcritos MioVa exF en los diferentes puntos en el tiempo (D2, D4, D6 y D8 respectivamente).

3.2.2 *Efecto de la inhibición inducida por el ARNsi MioVa exF nº 2 (SEC ID nº 3) sobre la localización/distribución de los melanosomas en los MEHP*

Se ha mostrado anteriormente que los transcritos MioVa exF están implicados en la captura de los melanosomas en la red de actina subcortical. La inhibición de los transcritos MioVa exF podría por lo tanto resultar en una captura disminuida de los melanosomas en la periferia de las dendritas de los melanocitos, y eventualmente en una acumulación perinuclear de los melanosomas.

Para ensayar esta hipótesis, se han realizado unas transfecciones con 25 nM de ARNsi MioVa exF nº 2 (SEC ID nº 3) y 25 nM de un ARNsi de control negativo sobre 300.000 MEHP inoculados sobre unas láminas redondas de vidrio. Los MEHP han sido fijados en paraformaldehído al 3% en diferentes puntos en el tiempo después de la transfección (día 3, día 6 y día 8).

A continuación, para los experimentos de inmunohistoquímica, se ha utilizado el anticuerpo específico del exón F de la proteína miosina Va (dilución 1/500) (véase anteriormente) con un anticuerpo monoclonal NKI-beteb (dilución 1/40) dirigido contra la proteína (pre)-melanosomal *silver* (Sanbio B.V., Uden, Holanda). El análisis ha sido realizado entonces mediante microscopía confocal.

Resultados

Día 3 después de la transfección

No se ha observado ninguna diferencia en la distribución de los melanosomas (presentes en la periferia y en los extremos de las dendritas) entre los MEHP transfectados con el ARNsi de control negativo y los MEHP transfectados con el ARNsi MioVa exF nº 2 (SEC ID nº 3).

Día 6 después de la transfección

El co-marcaje con el anticuerpo anti NKI-beteb y el anticuerpo anti-exón F de la proteína miosina Va muestra un cambio en la distribución de los melanosomas en los MEHP transfectados con el ARNsi MioVa exF nº 2 (SEC ID nº 3): los melanosomas están situados principalmente en la zona perinuclear. Además, el marcaje para las isoformas de la proteína miosina Va que comprenden el exón F está ausente o es débil a nivel de los extremos de las dendritas.

Día 8 después de la transfección

Se observan los mismos resultados que los observados en el día 6.

Conclusión

El análisis inmunohistoquímico de MEHP transfectados por el ARNsi MioVa exF nº 2 (SEC ID nº 3) o por ARNsi de control con el anticuerpo anti-NKI-beteb y el anticuerpo anti-exón F de la proteína miosina Va permite visualizar el transporte intracelular de los melanosomas (por NKI-beteb) y detectar asimismo la expresión de las isoformas de la proteína miosina Va que contienen el exón F.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la inhibición de las isoformas de la proteína miosina Va que contienen el exón F conduce a una distribución anormal de los melanosomas en los MEHP, es decir, una distribución perinuclear en lugar de una localización periférica con presencia a nivel de los extremos de las dendritas en los controles negativos, en los días 6 y 8 después de la transfección.

3.3 *Confirmación del efecto de inhibición de los transcritos MioVa exF después de la transfección de MEHP con el ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2)*

En estos experimentos, se ha utilizado un ARNsi diferente, a saber el ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2) para la transfección de los MEHP para confirmar que la inhibición es específica del exón F de la proteína miosina Va y para excluir un efecto específico de tipo artefactual.

3.3.1 *Evaluación de la inhibición a nivel de ARN y a nivel proteico durante un experimento a largo plazo*

Se ha reproducido el mismo experimento que en el párrafo 3.2.1 con el ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2) en lugar del ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3).

Los resultados a nivel del ARN se representan en la figura 10 y muestran una reducción de 58%, 59%, 41% y 51% en los diferentes puntos en el tiempo (D2, D4, D6 y D8 respectivamente).

Además, los resultados obtenidos a nivel proteico estaban en correlación con los obtenidos a nivel del ARN (datos no mostrados).

3.3.2 *Efecto de la inhibición inducida por el ARNsi MioVa exF nº 1 (SEC ID nº 2) sobre la localización/distribución de los melanosomas en los MEHP*

Se ha reproducido el mismo experimento que en el párrafo 3.2.2 con el ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2) en lugar del ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3).

Los resultados obtenidos el día 8 después de la transfección con el ARNsi MioVa nº 1 (SEC ID nº 2) muestran, tal como para el ARNsi MioVa nº 2 (SEC ID nº 3), una distribución perinuclear de los melanosomas en los MEHP en comparación con los controles negativos (datos no mostrados).

3.3.3 *Conclusiones*

Aunque la inhibición de las isoformas de la proteína miosina Va que comprenden el exón F (transcritos MioVa exF) sea menos eficaz con el ARNsi MioVa exF nº 1 (SEC ID nº 2) que con el ARNsi MioVa exF nº 2 (SEC ID nº 3), la expresión de los transcritos MioVa exF sigue siendo significativamente reducida utilizando el ARNsi MioVa exF nº 1 (SEC ID nº 2), tanto a nivel del ARN como a nivel proteico.

Además, el análisis inmunohistoquímico sobre unos MEHP transfectados fijados revela asimismo una localización y un transporte perturbados de los melanosomas en los MEHP. Se puede concluir por lo tanto que la inhibición de las isoformas de la proteína miosina Va que comprenden el exón F y el efecto fenotípico observado inducidos por la utilización de los ARNsi MioVa exF nº 1 y 2 (SEC ID nºs 2 y 3) son específicos y no artefactuales.

Ejemplo 4

Inducción de un efecto fenotípico por inhibición a largo plazo de los transcritos de la proteína miosina Va que comprenden el exón F (transcritos MioVa exF)

Para obtener en unos MEHP una inhibición estable a largo plazo de las isoformas de la proteína miosina Va que comprenden el exón F, se han construido unos vectores lentivíricos que expresan pequeños ARN en horquilla (short hairpin RNA, o ARNsh) dirigidos contra el exón F de la proteína miosina Va.

4.1. *Materiales y métodos*

Las secuencias de los ARNsh han sido desarrolladas a partir de la secuencia ARNsi del ARNsi más eficaz para inhibir los transcritos MioVa exF, es decir, el ARNsi MioVa nº 2 (que comprende la secuencia ARN de la secuencia génica SEC ID nº 3). Más precisamente, se ha sintetizado un oligonucleótido bicatenario constituido por las secuencias siguientes:

- hebra sentido:

5'-GATC**GTATCAATCATATCGGATT**CTCAAGAGAA**ATCCGATATGATTGATAC***TTTTT***-3'
(SEC ID nº 15)

- hebra antisentido:

5'-AGCT*AAAAA***GTATCAATCATATCGGATT**TCTCTTGAG**AATCCGATATGATTGATAC**-3'
(SEC ID nº 16),

en las que:

- las porciones en negrita corresponden a las dos porciones complementarias del ARNsh apareadas mediante unos enlaces de tipo Watson-Crick, que corresponden a la secuencia ARN de la secuencia génica SEC ID nº 3 de la hebra sentido del ARNsi MioVa nº 2 y su secuencia complementaria,
- la porción de secuencia no modificada corresponde a la secuencia de la estructura de tipo horquilla que une las dos hebras complementarias,

- la porción subrayada corresponde a un fragmento 5' en resalte que permite clonar el oligonucleótido bicatenario en un vector de expresión, y

- la porción en cursiva corresponde a una secuencia de terminación de la transcripción iniciada por un promotor ARNpolIII tipo H1.

Este oligonucleótido bicatenario ha sido entonces clonado en un vector lentivírico bajo el control de un promotor ARNpolIII tipo H1.

Esto permite producir en las células transfectadas unos ARNsh de secuencia:

5'-**GUAUCAAUCAUAUCGGAUU**CUCAAGAGA**AAUCCGAUAUGAUUGAUAC**-3' (SEC ID nº 17), en la que las porciones en negrita corresponden a las dos porciones complementarias apareadas mediante unos enlaces de tipo Watson-Crick (que corresponden a la secuencia ARN de la secuencia génica SEC ID nº 3 de la hebra sentido del ARNsi MioVa nº 2 y a su secuencia complementaria), y la porción sin modificación corresponde a la secuencia de la estructura de tipo horquilla que une las dos hebras complementarias.

Unos vectores lentivírivos que expresan unos ARNsh aleatorios han sido generados asimismo para ser utilizados como control negativo. En este caso, las secuencias hebra sentido y antisentido del oligonucleótido clonado en el vector lentivírivo bajo el control de un promotor ARNpolIII tipo H1 eran las secuencias siguientes:

- hebra sentido:

5'-GATC**ATTATCTAGGAGATATCAC**CTCAAGAGA**GTGATATCTCCTAGATAA***TTTTT***-3'
(SEC ID nº 18)

- hebra antisentido:

5'-AGCT***AAAAA*****ATTATCTAGGAGATATCAC**TCTCTTGAG**GTGATATCTCCTAGATAAT**-3'
(SEC ID nº 19)

en las que:

- las porciones en negrita corresponden a las dos porciones complementarias del ARNsh apareadas mediante unos enlaces de tipo Watson-Crick, que corresponden a las bases en el desorden de la secuencia ARN de la secuencia génica SEC ID nº 3 de la hebra sentido del ARNsi MioVa nº 2 y su secuencia complementaria,

- la porción de secuencia no modificada corresponde a la secuencia de la estructura de tipo horquilla que une las dos hebras complementarias,

- la porción subrayada corresponde a un fragmento 5' en resalte que permite clonar el oligonucleótido bicatenario en un vector de expresión, y

- la porción en cursiva corresponde a una secuencia de terminación de la transcripción iniciada por un promotor ARNpolIII tipo H1.

Esto permite producir en las células transfectadas unos ARNsh de secuencia:

5'-A**UUAUCUAGGAGAUAUCAC**CUCAAGAGA**GUGAUAUCUCCUAGAUAA**-3' (SEC ID nº 20), en la que las porciones en negrita corresponden a las dos porciones complementarias apareadas mediante unos enlaces de tipo Watson-Crick (que corresponden a las bases en el desorden de la secuencia ARN de la secuencia génica SEC ID nº 3 de la hebra sentido del ARNsi MioVa nº 2 y a su secuencia complementaria), y la porción sin modificación corresponde a la secuencia de la estructura de tipo horquilla que une las dos hebras complementarias.

4.2 *Eficacia de transducción*

La eficacia de transducción en unos MEHP ha sido determinada mediante análisis por FACS en base a la presencia de un marcador GFP en los vectores lentivíricos mencionados anteriormente.

La transducción de 100.000 MEHP con unos lentivirus con una multiplicidad de infección (Mi) de 10 conduce a una eficacia de transducción de 90% después de dos series de infección.

4.3 *Evaluación de la inhibición a nivel del ARN y a nivel proteico*

Para evaluar el efecto de inhibición a nivel del ARN y a nivel proteico, se han transducido 600.000 MEHP a una Mi de 10 con unos vectores lentivíricos que contienen unos ARNsh MioVa exF nº 2 o unos ARNsh aleatorios (control negativo), respectivamente.

Los resultados muestran, tanto a nivel del ARN como a nivel proteico, una fuerte reducción de las isoformas de la proteína miosina Va que comprenden el exón F en las células transducidas con los vectores lentivíricos que contienen unos ARNsh MioVa exF nº 2 con respecto al control negativo.

4.4 *Efecto de la inhibición sobre el transporte de los melanosomas*

A continuación, se ha realizado un análisis inmunohistoquímico de MEHP transducidos con unos vectores lentivíricos que contienen unos ARNsh MioVa exF nº 2 o unos ARNsh aleatorios (control negativo). Los resultados muestran una distribución perinuclear de los melanosomas en los MEHP transducidos con los vectores lentivíricos que contienen unos ARNsh MioVa exF nº 2 con respecto al control negativo.

Estos resultados confirman los efectos observados anteriormente en caso de inhibición de los transcritos MioVa exF mediante la utilización de ARNsi sintéticos.

4.5 *Efecto de la inhibición de los transcritos MioVa exF sobre la transferencia de la melanina de los melanocitos a los queratinocitos en un modelo 3D de epidermis reconstruida*

Se han transducido 50.000 MEHP con los vectores lentivíricos que expresan los ARNsh MioVa exF nº 2. Estos MEHP transducidos de manera estable han sido introducidos, con 500.000 queratinocitos, en un modelo de piel reconstruida. Se han utilizado unos MEHP transducidos de manera estable con unos vectores lentivíricos que expresan unos ARNsh aleatorios como controles negativos. Las pieles reconstruidas han sido irradiadas a continuación o no con unos UV que simulan el Sol.

La inspección visual de las pieles reconstruidas muestra entonces que no se observa ningún aumento de la pigmentación después de la irradiación a nivel de las pieles que contienen unos MEHP transducidos con los vectores lentivíricos que expresan los ARNsh MioVa exF nº 2, al contrario de las pieles que contienen unos MEHP transducidos con los vectores lentivíricos que expresan los ARNsh aleatorios. Una evaluación cuantitativa de la pigmentación mediante un marcaje Fontana-Masson y análisis de imagen colorimétrico digital permitió después confirmar estas observaciones.

La distribución de los melanosomas en los melanocitos y los queratinocitos ha sido examinada a continuación por microscopia electrónica. Estos análisis han mostrado una estimulación de la transferencia de pigmentos de los melanocitos hacia los queratinocitos en las pieles reconstruidas irradiadas con UV que contienen unos MEHP transducidos con los vectores lentivíricos que expresan los ARNsh aleatorios, con respecto a las mismas pieles no irradiadas. Por el contrario, en las pieles reconstruidas irradiadas con UV que contienen unos MEHP transducidos con los vectores lentivíricos que expresan unos ARNsh MioVa exF nº 2, sólo se ha observado una transferencia reducida de melanina con respecto a las pieles de control no irradiadas.

4.6 *Conclusiones*

Así, estos resultados demuestran que una transfección estable de MEHP con unos vectores lentivíricos que expresan un ARNsh que apunta específicamente al exón F de la proteína miosina Va humana permite interferir de manera significativa con la cantidad de transcritos MioVa exF y de isoformas de la proteína miosina Va que comprenden el exón F, así como con el transporte de los melanosomas y su transferencia de los melanocitos hacia los queratinocitos.

REIVINDICACIONES

1. ARNsi aislado que comprende una hebra de ARN sentido y una hebra de ARN antisentido complementaria que forman juntas un dúplex de ARN, comprendiendo la hebra de ARN sentido una secuencia que contiene como máximo un nucleótido distinto con respecto a un fragmento de 14 a 30 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va, **caracterizado** porque dicho fragmento de 14 a 30 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va está constituido por una secuencia nucleotídica seleccionada de entre la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 3.

2. ARNsi según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la hebra de ARN sentido comprende una secuencia idéntica a un fragmento de 14 a 30 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va constituido por una secuencia nucleotídica seleccionada de entre la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 3.

3. ARNsi según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque dicho fragmento de 14 a 30 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del exón F del gen que codifica para la proteína miosina Va está constituido por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 3.

4. ARNsi según la reivindicación 3, **caracterizado** porque dicho ARNsi es un ARNsh constituido por una sola molécula de ARN monocatenario en la que dos porciones complementarias están apareadas mediante unos enlaces de tipo Watson-Crick y están unidas por un lado de manera covalente por una estructura de tipo horquilla, en el que dicho ARNsh comprende o está constituido por la secuencia SEC ID nº 17.

5. ARNsi según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque las hebras de ARN sentido y/o antisentido comprenden además un fragmento 3' en resalte de 2 a 4 nucleótidos naturales o modificados de tipo LNA.

6. ARNsi según la reivindicación 5, **caracterizado** porque se trata del ARNsi que comprende la secuencia ARN de la secuencia génica SEC ID nº 2 y cuyas hebras tienen por secuencias precisas:

hebra sentido: 5'-UGACCCUAAGAAGUAUCAATT-3' (SEC ID nº 9)

hebra antisentido: 5'-UUGAUACUUCUUAGGGUCATT-3' (SEC ID nº 10).

7. ARNsi según la reivindicación 5, **caracterizado** porque se trata del ARNsi que comprende la secuencia ARN de la secuencia génica SEC ID nº 3 y cuyas hebras tienen por secuencias precisas:

hebra sentido: 5'-GUAUCAAUCAUAUCGGAUUTT-3' (SEC ID nº 11)

hebra antisentido: 5'-AAUCCGAUAUGAUUGAUACTT-3' (SEC ID nº 12).

8. ARNsi según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque la hebra de ARN sentido y/o la hebra de ARN antisentido comprenden por lo menos una modificación química a nivel de sus partes azúcares, de sus partes nucleobases o de su esqueleto internucleotídico.

9. ARNsi según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, como agente cosmético.

10. ARNsi según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, como medicamento.

11. Composición que comprende por lo menos un ARNsi según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un soporte aceptable.

12. Composición según la reivindicación 11, **caracterizada** porque se administra por vía tópica.

13. Composición según las reivindicaciones 11 ó 12, **caracterizada** porque comprende además por lo menos otro agente de despigmentación.

14. Utilización de por lo menos un ARNsi según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, como agente cosmético para la despigmentación o el blanqueamiento de la piel.

15. Utilización de por lo menos un ARNsi según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de la hiperpigmentación de la piel.

A

```
  1 cgtcaagaac tagaatcaga aaacaaaaca ctgaagaatg agctaaatga gttgcgcaag
 61 gccctcagtg agaaaagtgc cccagaggtg accgccccag gtgcacctgc ctaccgtgtc
121 ctcatggagc agctgaccct tgtgagcgag gagcttgatg tccgcaagga ggaagtcctc
181 atcttaaggt ctcaactggt gagccagaaa gaggccatcc aacccaagga tgacaagaat
241 acaatgacag attccacaat actttgtgaa gatgtacaaa aaatgaaaga taaaggtgaa
301 atagcacaag catacattgg tttgaaagaa acaaatagat catctgctct ggattaccat
361 gagttgaatg aggatggaga gctgtggctg gtttatgaag ggttaaaaca agccaacagg
421 ctcctggaat cccagctgca gtcacagaag aggagccatg agaatgaggc cgaggccctc
481 cgtggggaga tccagagcct gaaggaggag aacaaccgac agcagcagct gctggcccag
541 aacctgcagc tgccccaga ggcccgcatt gaggccagcc tgcagcacga gatcaccgg
601 ctgaccaacg aaaacttgta ttttgaggaa ttatatgcag atgaccctaa gaagtatcaa
661 tcatatcgga tttcccttta caaacggatg att
```

exón F

B

ARNsi 1 ARNsi 3

5' tattttgaggaattatatgcagatgaccctaagaagtatcaatcatatcggatttcccttacaaacggatgatt 3'

ARNsi 2

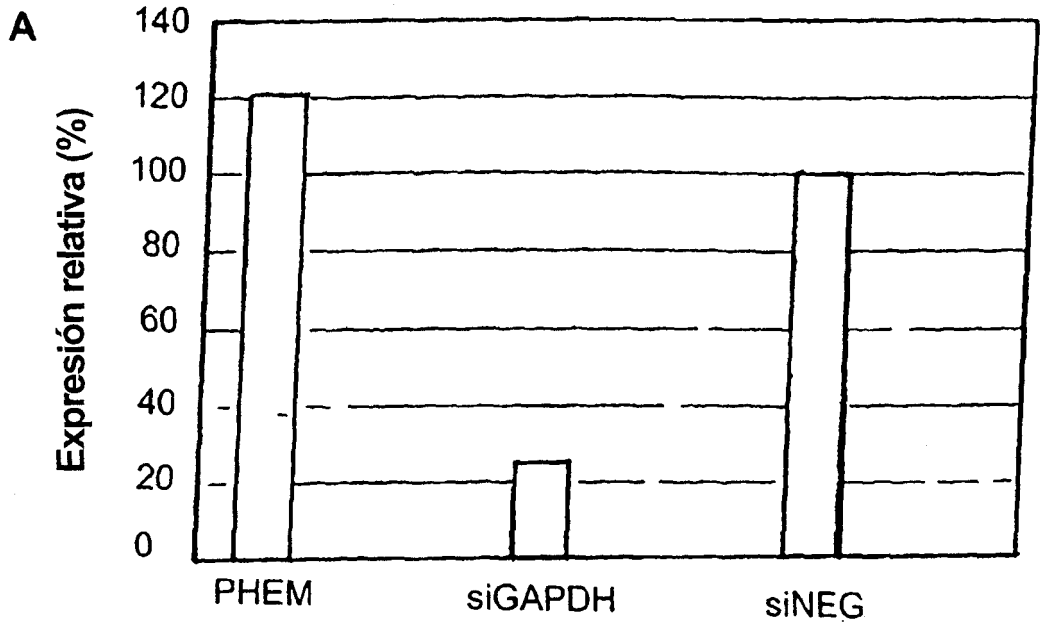
C

ARNsi 1 = UGACCCUAAGAAGUAUCAAdTdT
dTdTACUGGGAUUCUUCAUAGUU

ARNsi 2 = GUAUCAAUCAUAUCGGAUUdTdT
dTdTCAUAGUUAGUAUAGCCUAA

ARNsi 3 = UCAUAUCGGAUUUCCCUUUdTdT
dTdTAGUAUAGCCUAAAGGGAAA

Figura 1


A
140
120
100
80
60
40
20
0
Expresión relativa (%)
PHEM
siGAPDH
siNEG

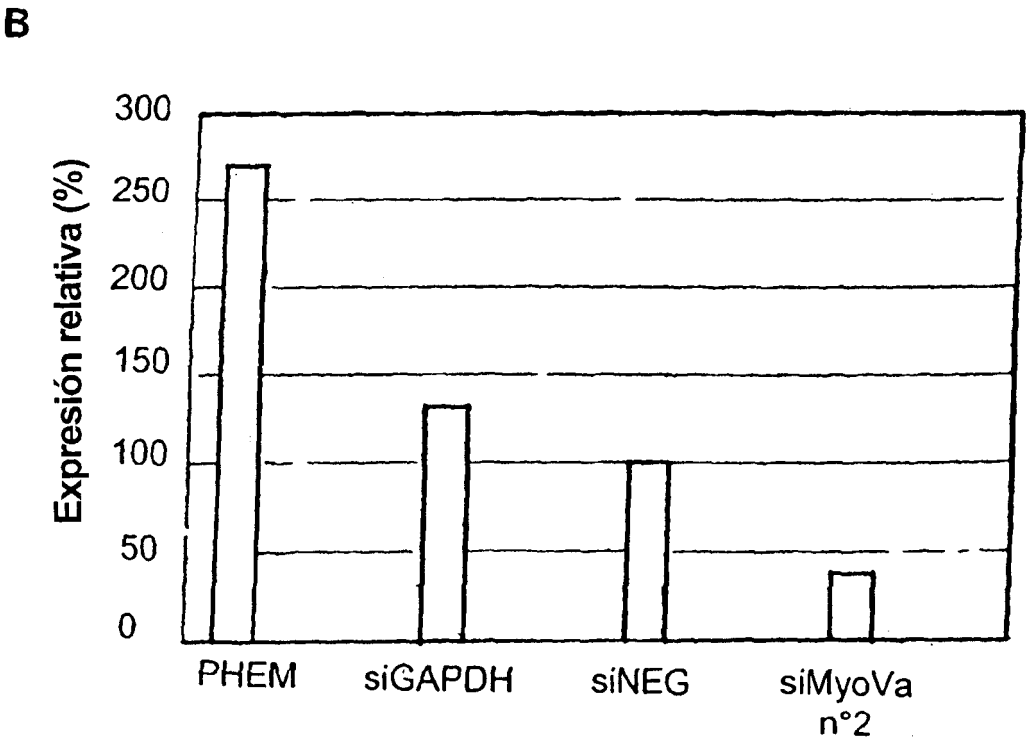

B
300
250
200
150
100
50
0
Expresión relativa (%)
PHEM
siGAPDH
siNEG
siMyoVa
n°2

Figura 2

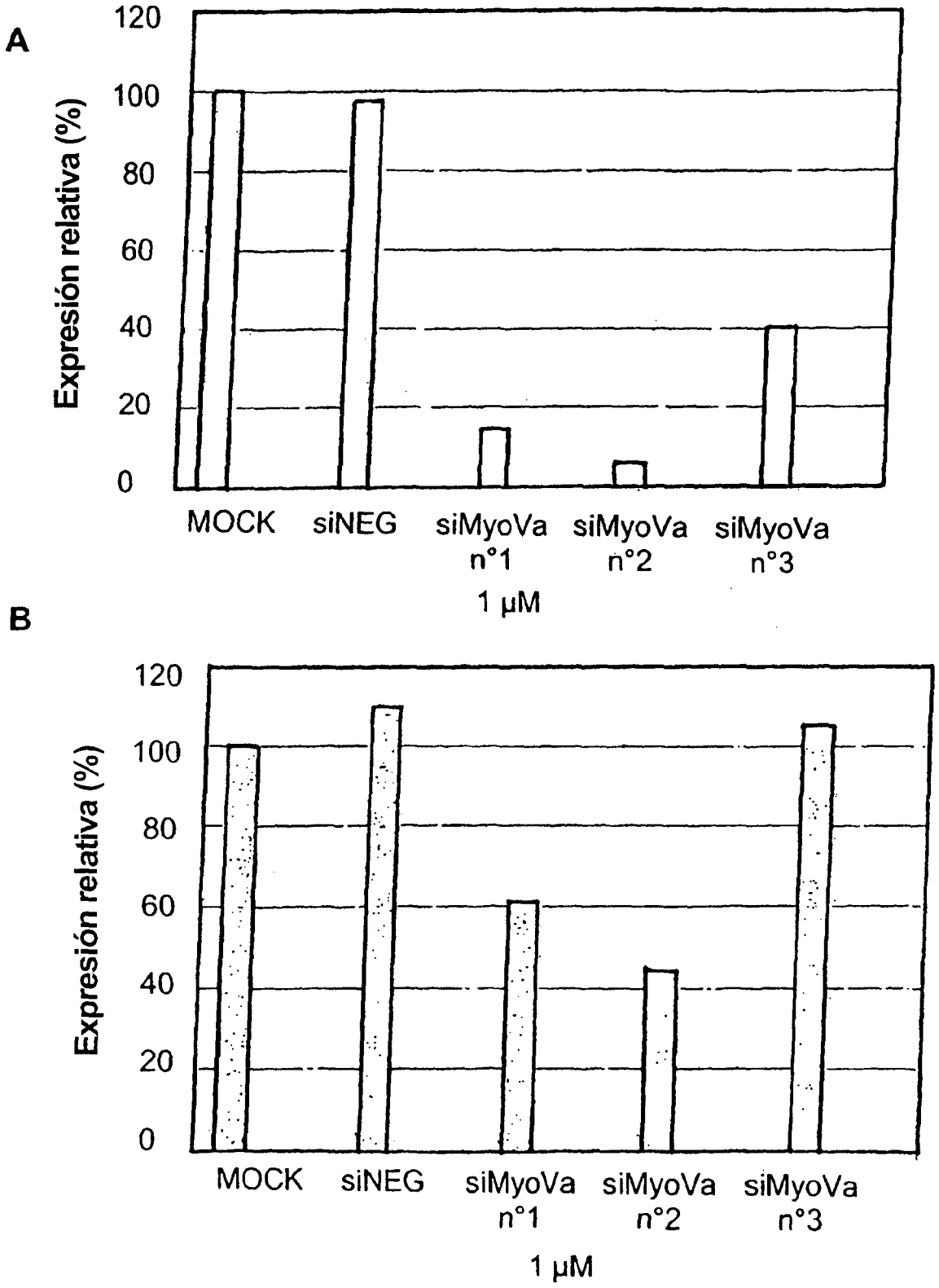
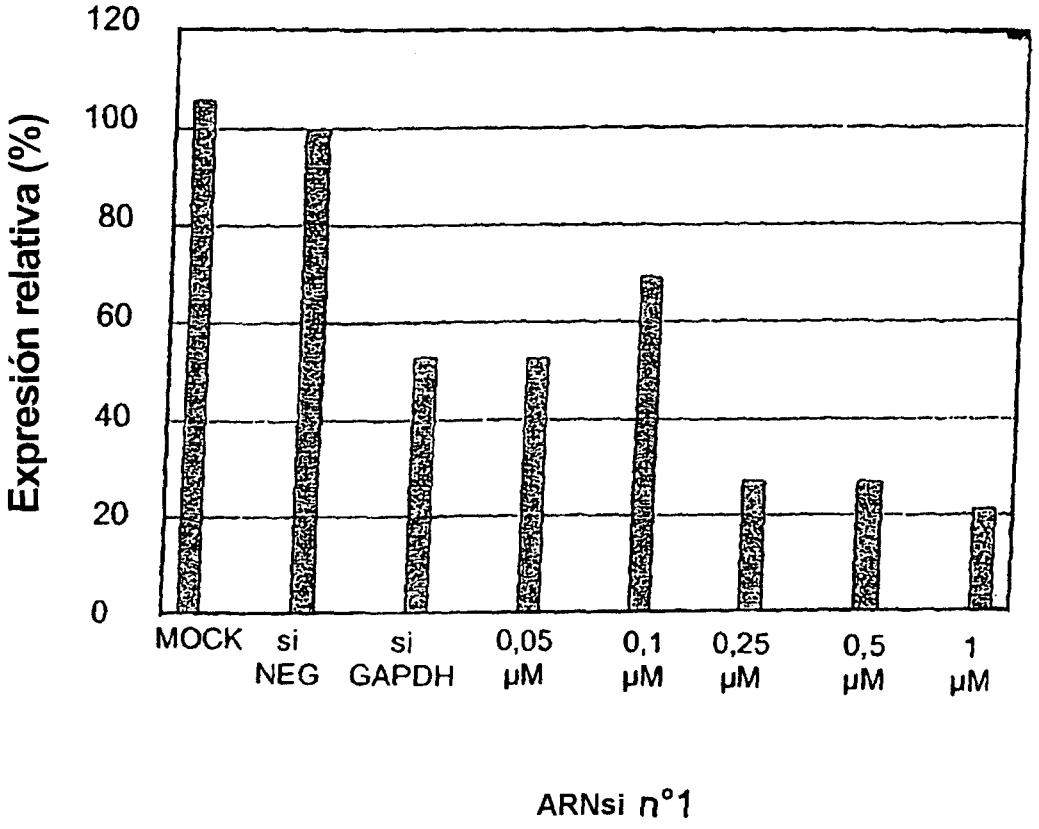

A
120
100
80
60
40
20
0
Expresión relativa (%)
MOCK
siNEG
siMyoVa n°1
siMyoVa n°2
siMyoVa n°3
1 µM
B
120
100
80
60
40
20
0
Expresión relativa (%)
MOCK
siNEG
siMyoVa n°1
siMyoVa n°2
siMyoVa n°3
1 µM

Figura 3

A


120
100
80
60
40
20
0
Expresión relativa (%)
MOCK
si NEG
si GAPDH
0,05 µM
0,1 µM
0,25 µM
0,5 µM
1 µM
ARNsi n°1

B

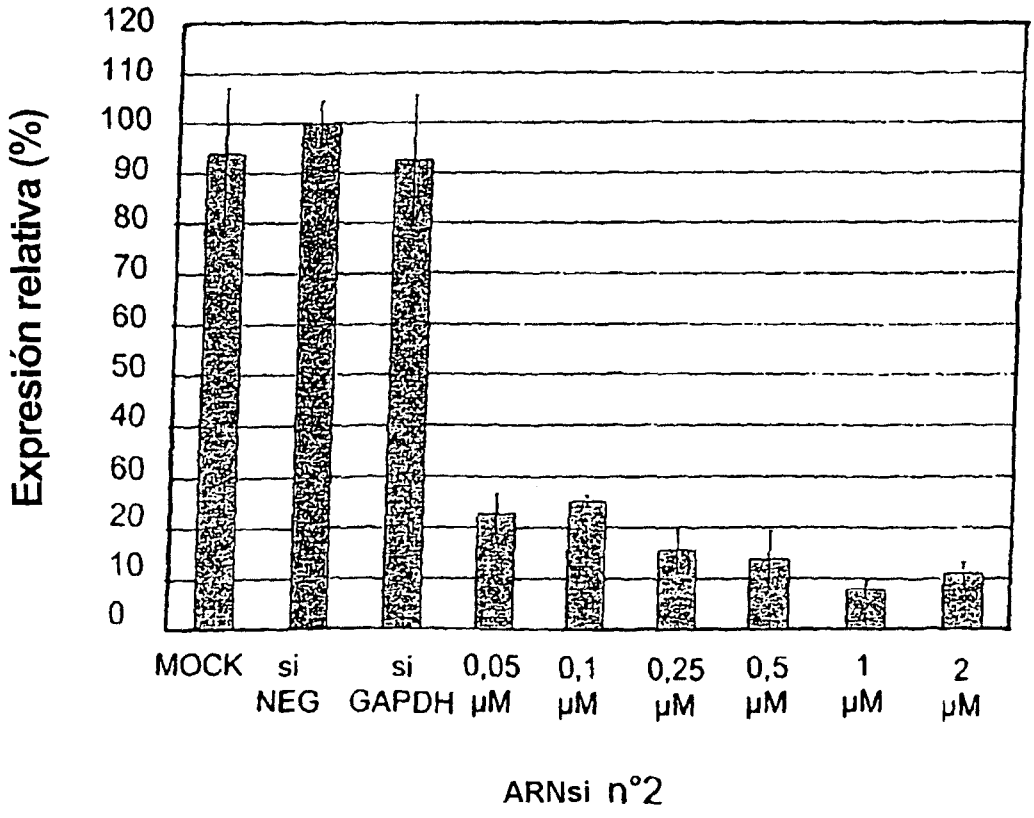
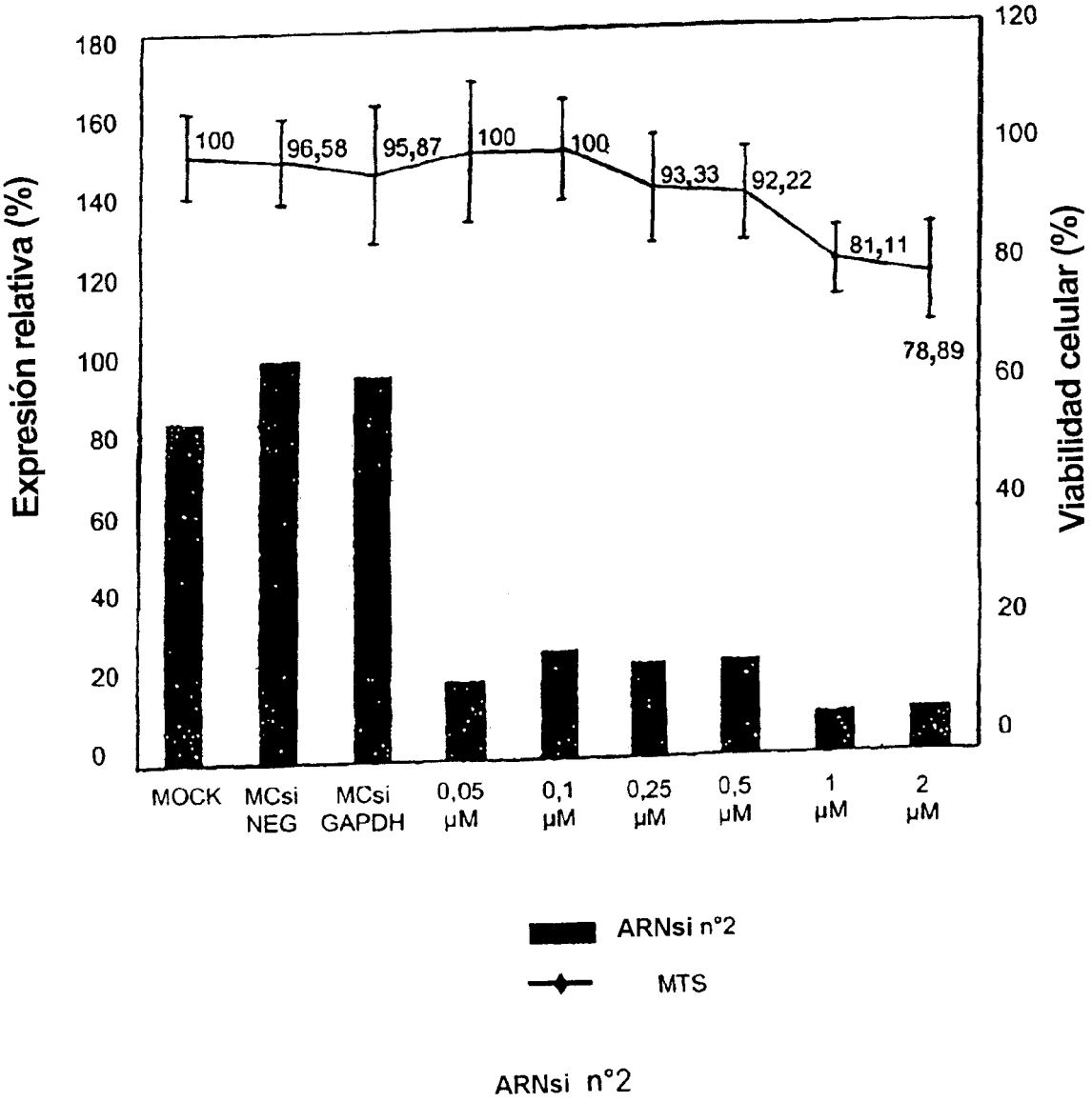

120
110
100
90
80
70
60
50
40
60
20
10
0
Expresión relativa (%)
MOCK
si NEG
si GAPDH
0,05 µM
0,1 µM
0,25 µM
0,5 µM
1 µM
2 µM
ARNsi n°2

Figura 4



ARNsi n°2

Figura 5

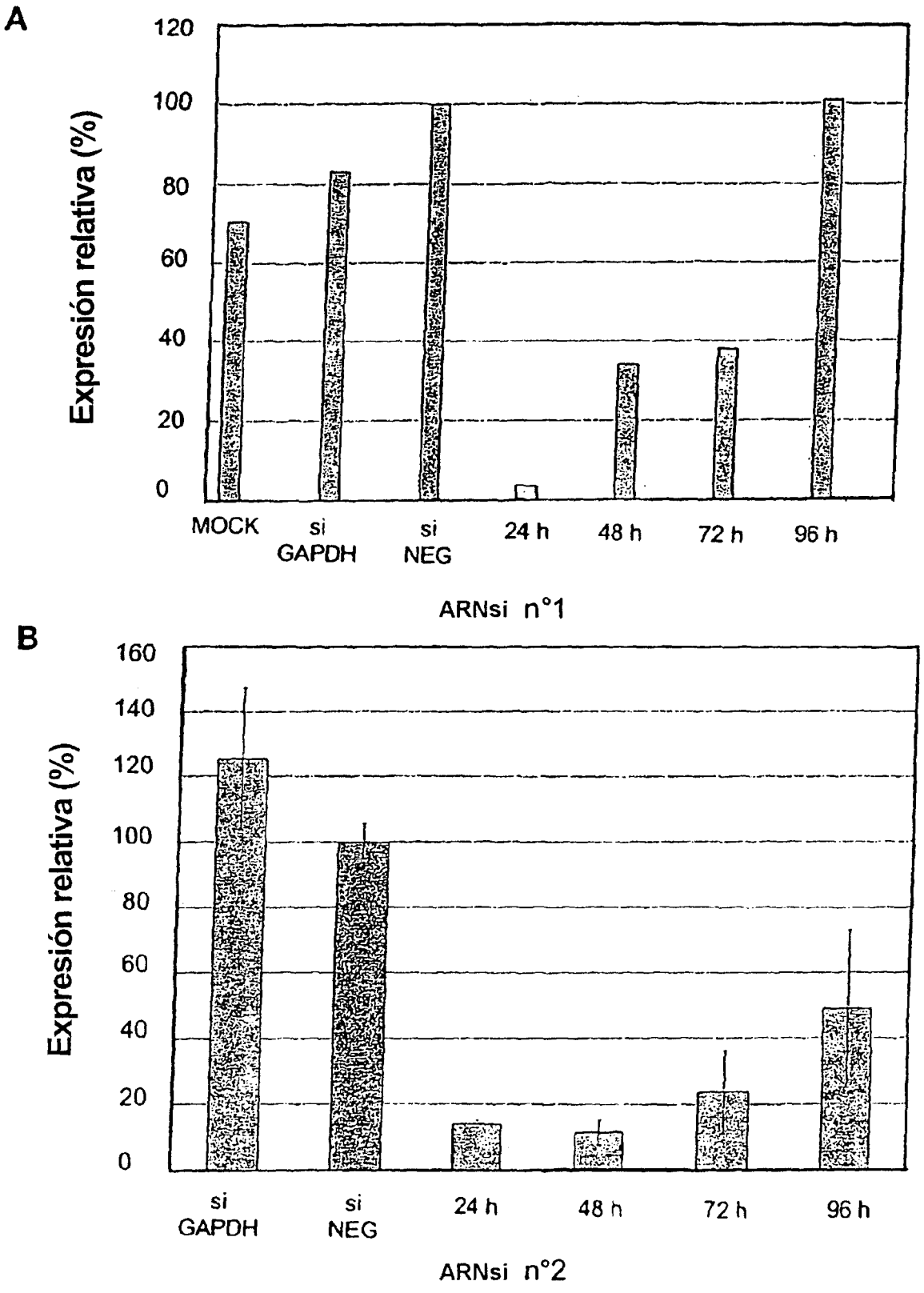

A
Expresión relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
MOCK
si GAPDH
si NEG
24 h
48 h
72 h
96 h
ARNsi n°1
B
Expresión relativa (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
si GAPDH
si NEG
24 h
48 h
72 h
96 h
ARNsi n°2

Figura 6

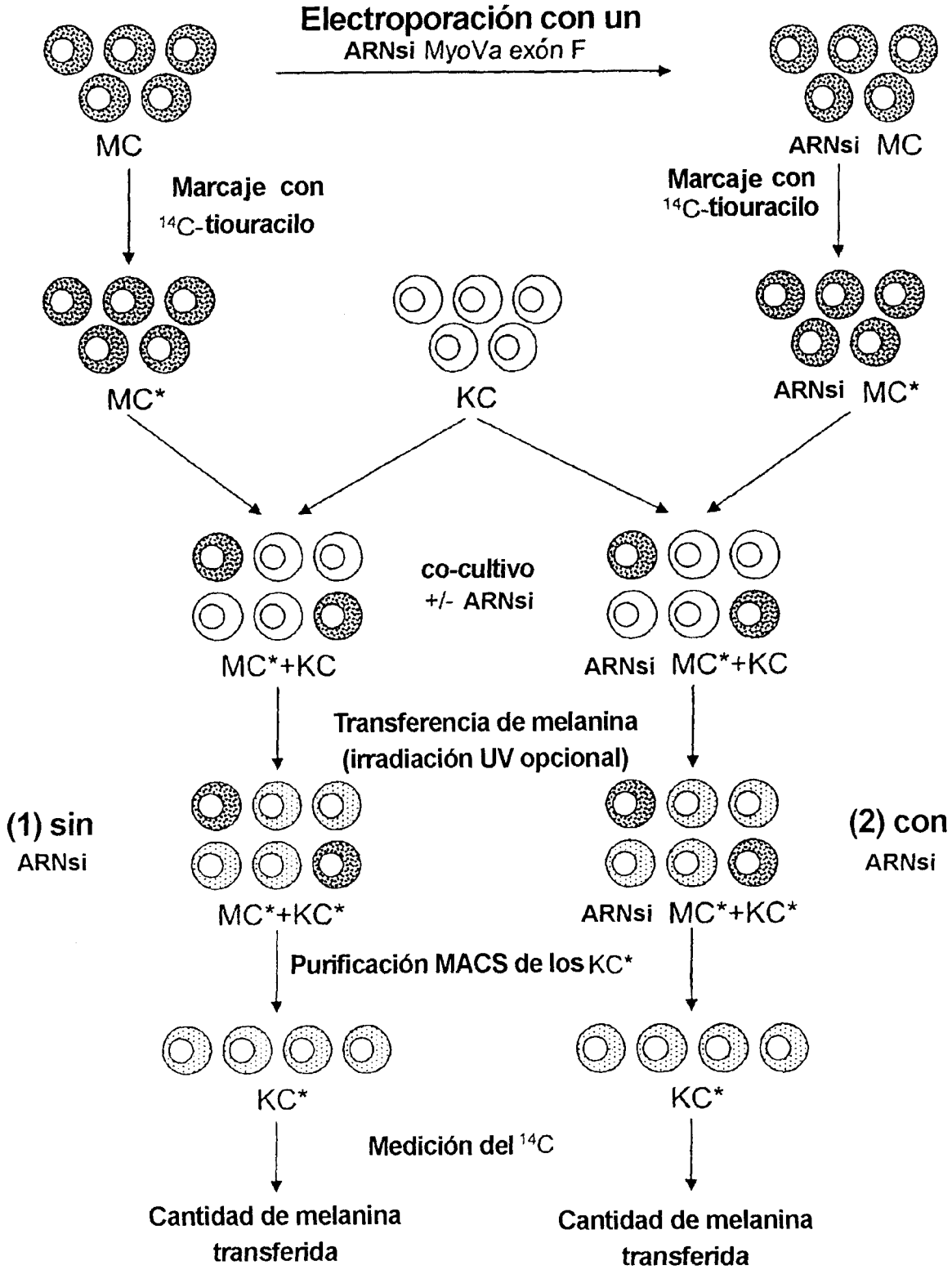

Electroporación con un
ARNsi MyoVa exón F
MC
ARNsi MC
Marcaje con
14C-tiouracilo
Marcaje con
14C-tiouracilo
MC*
KC
ARNsi MC*
co-cultivo
+/- ARNsi
MC*+KC
ARNsi MC*+KC
Transferencia de melanina
(irradiación UV opcional)
(1) sin
ARNsi
(2) con
ARNsi
MC*+KC*
ARNsi MC*+KC*
Purificación MACS de los KC*
KC*
KC*
Medición del 14C
Cantidad de melanina
transferida
Cantidad de melanina
transferida

Figura 7

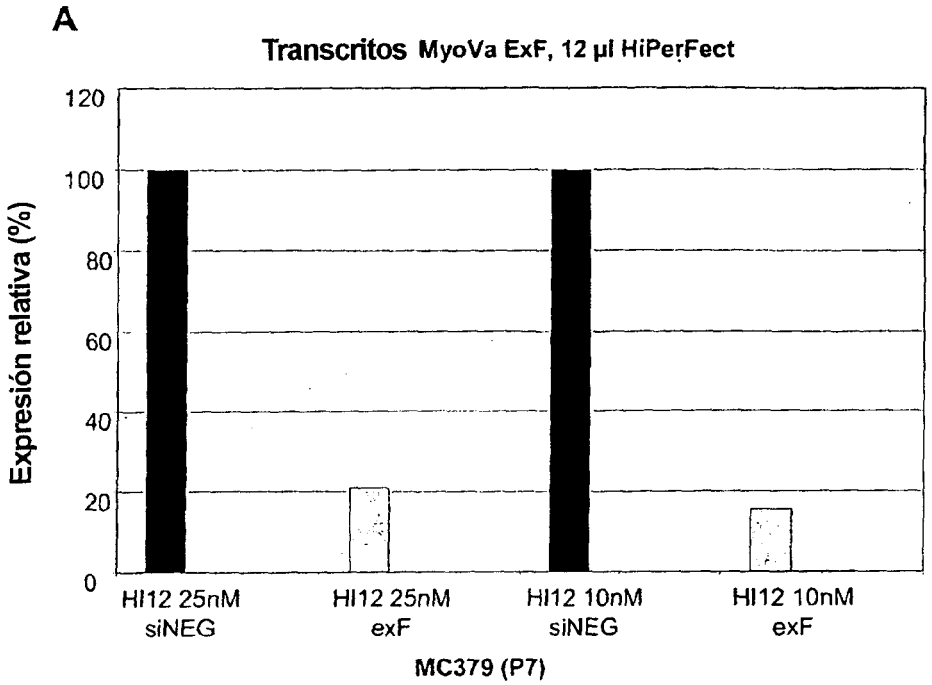


Figura 8A

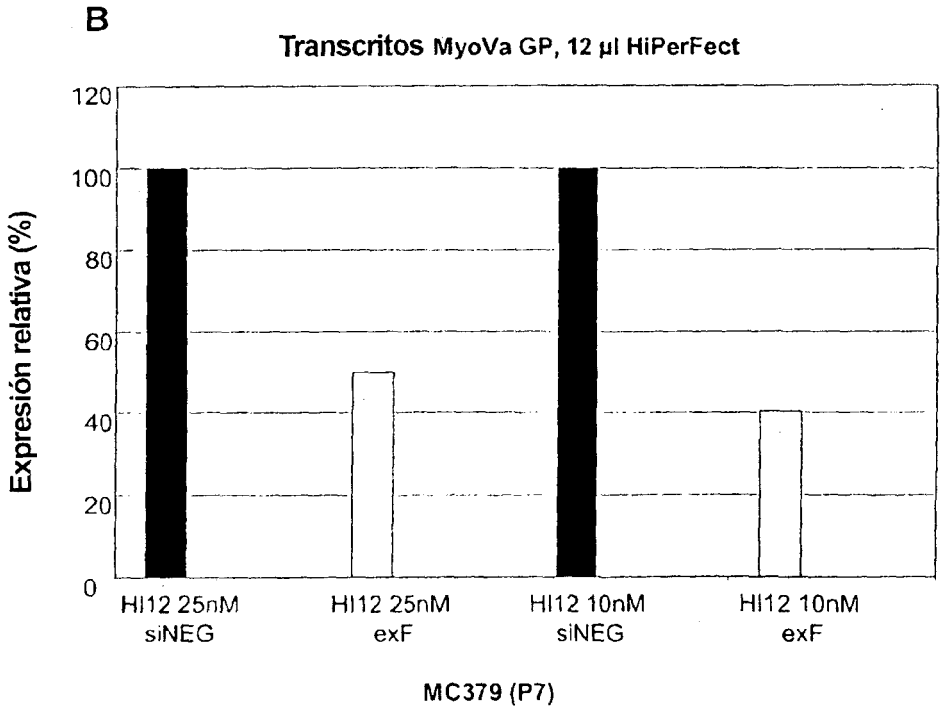


Figura 8B

C

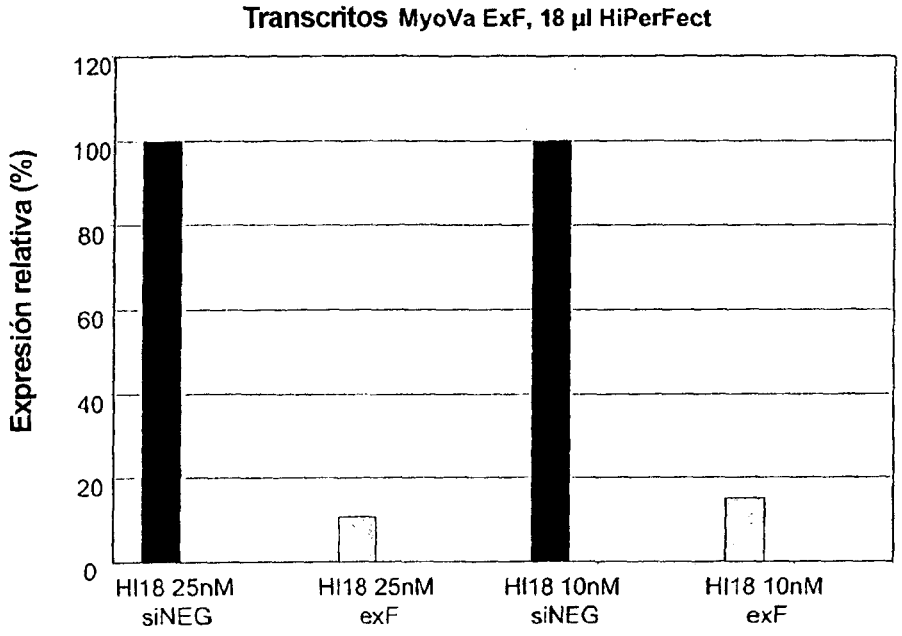


Figura 8C

D

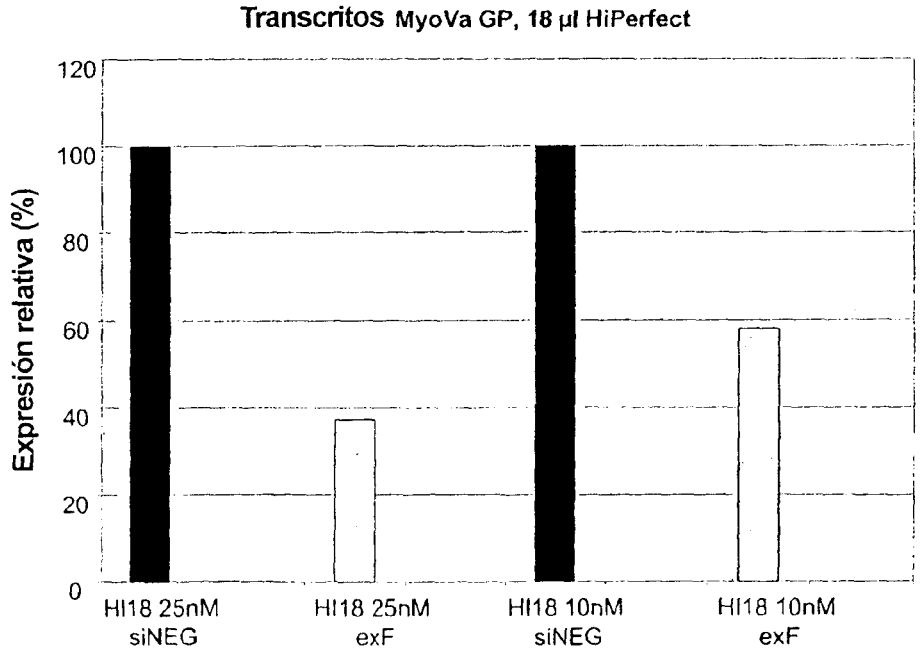


Figura 8D

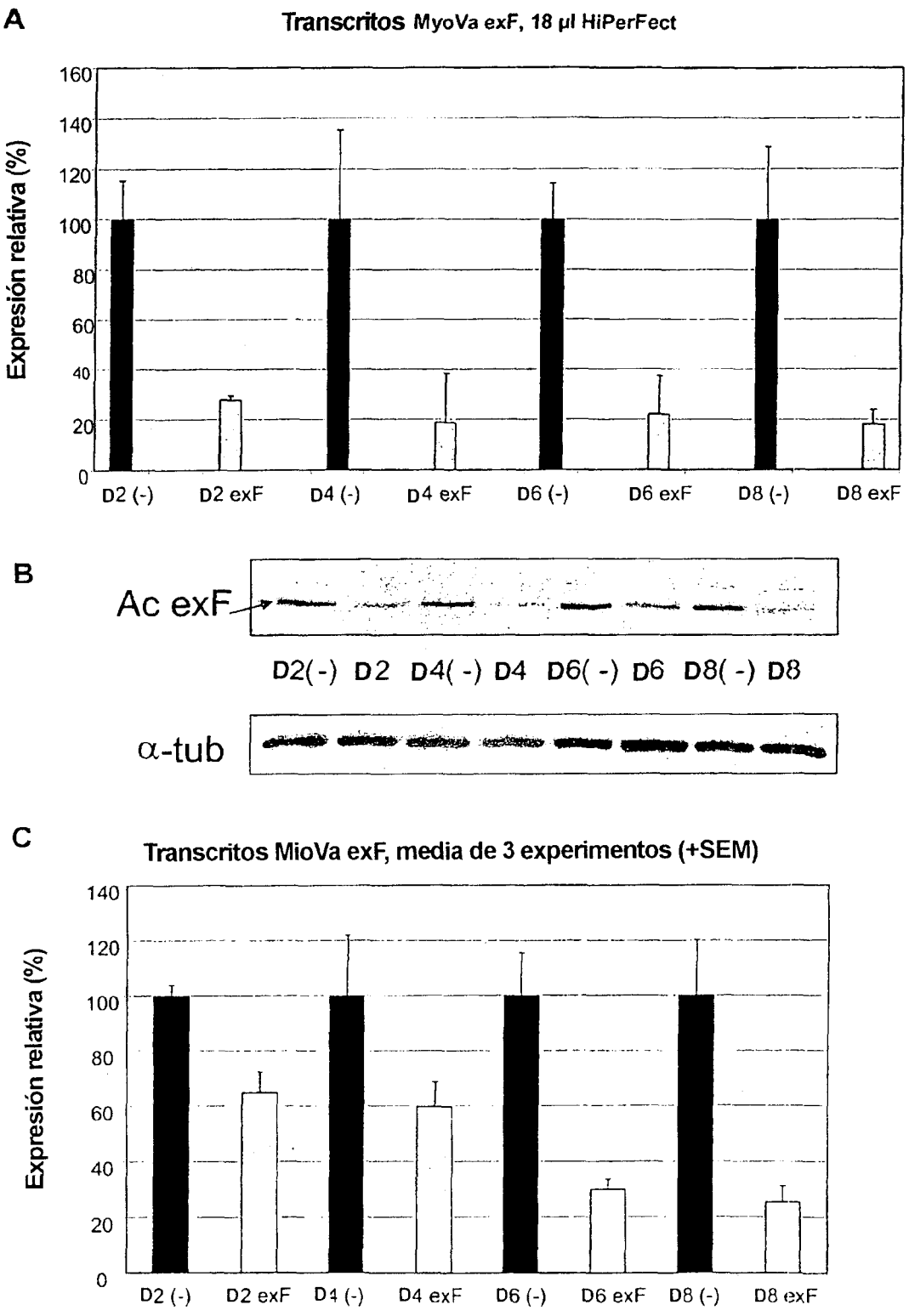

A
Transcritos MyoVa exF, 18 µl HiPerFect
Expresión relativa (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
D2 (-)
D2 exF
D4 (-)
D4 exF
D6 (-)
D6 exF
D8 (-)
D8 exF
B
Ac exF
D2(-) D2 D4(-) D4 D6(-) D6 D8(-) D8
α-tub
C
Transcritos MioVa exF, media de 3 experimentos (+SEM)
Expresión relativa (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
D2 (-)
D2 exF
D4 (-)
D4 exF
D6 (-)
D6 exF
D8 (-)
D8 exF

Figura 9

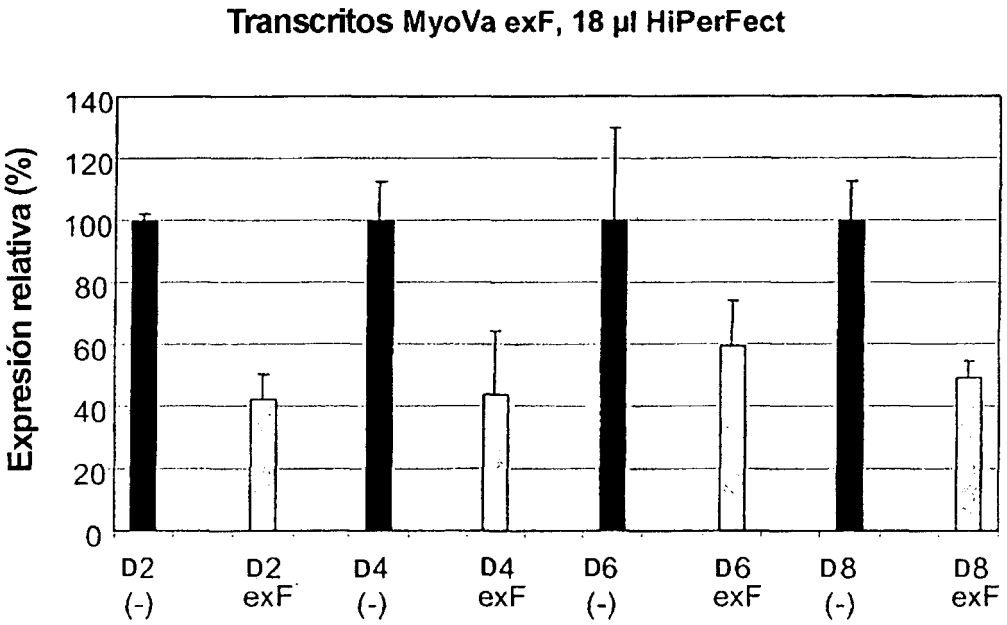

Transcritos MyoVa exF, 18 µl HiPerFect
Expresión relativa (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
D2 (-)
D2 exF
D4 (-)
D4 exF
D6 (-)
D6 exF
D8 (-)
D8 exF

Figura 10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE SCHMITT-MILAS, Anne-Marie LAMBERT, Jo WESTBROEK, Wendy VAN CELE, Mireille

<120> ARNsi anti miosina Va y despigmentación de la piel

<130> D23968

<150> FR 0512553
<151> 12/12/2005

<160> 20

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 75
<212> ADN
<213> *homo sapiens*

<220>
<223> Secuencia del exón F de la proteína miosina Va humana

<400> 1

tattttgagg aattatatgc agatgaccct aagaagtatc aatcatatcg gatttccctt 60
tacaaacgga tgatt 75

<210> 2
<211> 19
<212> ADN
<213> *homo sapiens*

<220>
<223> fragmento del exón de la proteína miosina Va humana

<400> 2

tgaccctaag aagtatcaa 19

<210> 3
<211> 19
<212> ADN
<213> *homo sapiens*

<220>
<223> fragmento del exón F de la proteína miosina Va humana

<400> 3

gtatcaatca tatcggatt 19

<210> 4
<211> 19

<212> ADN
<213> *homo sapiens*

<220>
<223> fragmento del exón F de la proteína miosina Va humana

<400> 4

tcatatcgga tttcccttt 19

<210> 5
<211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador sentido de amplificación del exón F de la proteína miosina Va humana

<400> 5

cagcctgcag cacgagatc 19

<210> 6
<211> 27
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador antisentido de amplificación del exón F de la proteína miosina Va humana

<400> 6

tcttagggtc atctgcatat aattcct 27

<210> 7
<211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador sentido de amplificación de la parte GP de la proteína miosina Va humana

<400> 7

ycaytcaatt tyattccagy att 23

<210> 8
<211> 25
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador antisentido de amplificación de la parte GP de la proteína miosina Va humana

<400> 8

tgatcatcat tcaggtagtc agcat 25

<210> 9
<211> 21
<212> ARN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> hebra sentido ARNsi anti-miosina Va nº1

<400> 9

ugacccuaag aaguaucaat t 21

<210> 10
<211> 21
<212> ARN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> hebra antisentido ARNsi anti-miosina Va nº1

<400> 10

uugauacuuc uuagggucat t 21

<210> 11
<211> 21
<212> ARN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> hebra sentido ARNsi anti-miosina Va nº2

<400> 11

guaucaauca uaucggauut t 21

<210> 12
<211> 21
<212> ARN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> hebra antisentido ARNsi anti-miosina Va nº2

<400> 12

aaucccauau gauugauact t 21

<210> 13
<211> 21

<212> ARN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> hebra sentido ARNsi anti-miosina Va nº3

<400> 13

ucauaucgga uuucccuuut t 21

<210> 14
<211> 21
<212> ARN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> hebra antisentido ARNsi anti-miosina Va nº3

<400> 14

aaagggaaau ccgauaugat t 21

<210> 15
<211> 56
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> hebra sentido oligonucleótido para la clonación en un vector lentivírico de un ARNsh anti-miosina Va

<400> 15

gatcgtatca atcatatcgg attctcaaga gaaatccgat atgattgata cttttt 56

<210> 16
<211> 56
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> hebra antisentido oligonucleótido para la clonación en un vector lentivírico de un ARNsh anti-miosina Va

<400> 16

agctaaaaag tatcaatcat atcggatttc tcttgagaat ccgatatgat tgatac 56

<210> 17
<211> 47
<212> ARN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> ARNsh anti-miosina Va

<400> 17

guaucaauca uaucggauuc ucaagagaaa uccgauauga uugauac 47

<210> 18
<211> 55
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> hebra sentido oligonucleótido para la clonación en un vector lentivírico de un ARNsh de control aleatorio

<400> 18

gatcattatc taggagatat cacctcaaga gagtgatatc tcctagataa ttttt 55

<210> 19
<211> 56
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> hebra antisentido oligonucleótido para la clonación en un vector lentivírico de un ARNsh de control aleatorio

<400> 19

agctaaaaaa ttatctagga gatatcactc tcttgaggtg atatctccta gataat 56

<210> 20
<211> 46
<212> ARN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> ARNsh de control aleatorio

<400> 20

auuaucuagg agauaucacc ucaagagagu gauaucuccu agauaa 46