



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 304 633**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04802618 .1**
(86) Fecha de presentación : **01.10.2004**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1670919**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **21.06.2006**

(54) Título: **Procedimiento para la preparación de un fármaco específico para células y/o tejidos y/o fases de enfermedad.**

(30) Prioridad: **02.10.2003 DE 103 46 487**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2008

(73) Titular/es:
STERNA BIOLOGICALS GmbH & Co. KG.
Bmfz Hans-Meerwein-Strasse 2
35043 Marburg, DE

(72) Inventor/es: **Sel, Serdar y**
Renz, Harald

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Procedimiento para la preparación de un fármaco específico para células y/o tejidos y/o fases de enfermedad.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un fármaco específico para células y/o tejidos y/o fases de enfermedad que es adecuado para el tratamiento de inflamaciones crónicas.

Antecedentes de la invención

10 Las inflamaciones crónicas representan una gran problemática médica en aumento con gran impacto socioeconómico. Entre éstas figuran especialmente los siguientes grupos de enfermedades:

- Enfermedades autoinmunitarias y enfermedades de tipo reumático (manifestaciones en, entre otros, piel, pulmón, riñón, sistema vascular, sistema nervioso, tejido conjuntivo, aparato locomotor, sistema endocrino)
- 15 - Reacciones alérgicas de tipo inmediato y asma
- Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC)
- 20 - Arteriosclerosis
- Psoriasis y eccema de contacto
- Reacciones de rechazo crónico después de trasplante de órganos, de médula ósea

25 Muchas de estas enfermedades muestran en las últimas décadas una prevalencia creciente no sólo en los países industrializados, sino en parte mundialmente. Así, entretanto, en Europa, América del Norte, Japón y Australia más del 20% de la población padecen enfermedades alérgicas y asma. En la actualidad, las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas son la quinta causa de muerte más frecuente mundialmente y representarán en el año 2020 según cálculos de la OMS la tercera causa de muerte más frecuente. La arteriosclerosis con las comorbilidades infarto de miocardio, ataque de apoplejía y enfermedad arterial oclusiva periférica ocupan mundialmente una primera posición en la estadística de morbilidad y mortalidad. La psoriasis y el eccema de contacto son generalmente, junto con la neurodermitis, las enfermedades inflamatorias crónicas más frecuentes de la piel.

35 Las regulaciones anómalas persistentes del sistema inmunitario se producen debido a interacciones no suficientemente entendidas hasta la fecha entre factores medioambientales y una disposición genética. En este caso, para estas diferentes enfermedades pueden fijarse los siguientes principios comunes:

40 (A) Se produce el desarrollo de una respuesta inmunitaria excesiva contra antígenos normalmente inofensivos para los seres humanos. Estos antígenos pueden ser constituyentes del medio ambiente (por ejemplo, alergenicos, como polen, pelo de animales, alimentos, ácaros, sustancias químicas como conservantes, colorantes, productos de limpieza). En estos casos se desarrolla en los pacientes una reacción alérgica. En el caso de, por ejemplo, fumadores activos y pasivos se producen enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC). Sin embargo, por otro lado, el sistema inmunitario también puede reaccionar contra componentes del propio organismo que reconocen a éstos como extraños y ponen en marcha una reacción inflamatoria en contra. En estos casos se desarrolla una enfermedad autoinmunitaria. En todo caso se reconocen por error antígenos no tóxicos inofensivos como extraños o peligrosos y se pone en marcha una reacción inflamatoria inadecuada.

50 (B) Las enfermedades pasan a fases entre las que figuran la iniciación, progresión, por consiguiente el avance de la reacción inflamatoria, y la destrucción y conversión asociadas a ellas con pérdida de la funcionalidad de los órganos (denominada remodelación).

(C) Las enfermedades muestran rasgos característicos subfenotípicos específicos para los pacientes.

55 (D) En la iniciación, mantenimiento y los procesos de destrucción y conversión participan persistentemente componentes de la inmunidad congénita y adquirida. Bajo la influencia de la inmunidad congénita (componentes importantes: células presentadoras de antígeno con sus diversas poblaciones y el sistema del complemento) se produce la activación y diferenciación de las células del sistema inmunitario adaptativo (componentes importantes: linfocitos T y B). A continuación, las células T asumen funciones centrales mediante diferenciación en efectores sumamente especializados. 60 Con esto activan y adquieren determinados mecanismos efectores, entre los que figuran especialmente las siguientes funciones: producción de anticuerpos, control de la funcionalidad de las células efectoras del sistema inmunitario (como por ejemplo, granulocitos neutrófilos, basófilos, eosinófilos), retroalimentación a las funciones del sistema inmunitario congénito, influencia de la funcionalidad de las células no hematopoyéticas, como por ejemplo epitelio, endotelio, tejido conjuntivo, hueso y cartílago y sobre todo células neuronales. En este caso se produce una interacción especial entre el sistema inmunitario y nervioso a partir de la que se ha desarrollado el concepto de interacción neuroinmunológica en inflamaciones crónicas. 65

Debido a la complejidad y las múltiples facetas de los cuadros clínicos que van acompañados de las inflamaciones crónicas, a un fármaco óptimo para el tratamiento de las enfermedades debe exigírsele los siguientes requisitos:

- (1) Las enfermedades se manifiestan en (sub)-fenotipos específicos para los pacientes. Por tanto, los fármacos deben presentar una alta especificidad clínica o por pacientes.
- (2) Las enfermedades pasan a estadios y fases. Por tanto, los fármacos deben poseer una especificidad por estadios y fases.
- (3) Las enfermedades son reguladas por células especializadas de manera diferente. Por tanto, los fármacos deben provocar una intervención específica para la célula.
- (4) Las enfermedades se manifiestan en diferentes órganos y compartimentos. Por tanto, los fármacos deben poseer una especificidad por un compartimento u órgano.
- (5) Los fármacos deben ser adecuados durante una terapia a largo plazo. Entonces, deben evitarse reacciones del sistema inmunitario contra los fármacos.
- (6) El perfil de efectos secundarios de los fármacos debe estar en una relación aceptable en la relación médica y ética con el grado de gravedad, pronóstico y transcurso de las enfermedades.

Ninguna de las terapias establecidas actualmente disponibles contra inflamaciones crónicas satisface de manera óptima estos criterios. Del documento DE 695 11 245 T2 se conoce el tratamiento con inmunoglobulina A y del documento DE 695 18 667 T2 la inhibición de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y/o la transacilasa independiente de la coenzima A (CoA-IT). En el centro de interés de los conceptos de terapia actualmente establecidos para esta enfermedad se encuentra la terapia antiinflamatoria inespecífica, así como la inmunosupresión. Así, muchas de las sustancias inespecíficas utilizadas que actúan de forma antiinflamatoria, como ibuprofeno, ácido acetilsalicílico y paracetamol, o no son suficientemente eficaces o adolecen de una alta tasa de efectos secundarios no deseados. Por el contrario, los esteroides tienen concretamente una mayor potencia, pero por su parte adolecen de graves efectos secundarios como hipertensión, diabetes y osteoporosis. Los medicamentos inmunosupresores de ultimísima generación, como por ejemplo, ciclosporina y tacrolimus, muestran hepatotoxicidad y nefrotoxicidad.

Esta situación ha llevado a la búsqueda y al ensayo clínico de una pluralidad de ultimísimas moléculas que deben intervenir más específicamente en la regulación anómala inmunológica y de biología celular. Entre éstas figuran citocinas, receptores de citocinas y anticitocinas. Los problemas que están asociados a estas ultimísimas utilizaciones terapéuticas incluyen falta de especificidad por células y órganos, el desarrollo de reacciones inmunitarias no deseadas contra estas moléculas, así como una falta de eficacia en distintos fenotipos.

En los últimos tiempos se ha probado utilizar una nueva clase de moléculas catalíticas, las denominadas "ADNzimas" (Santoro, 1997), como agentes terapéuticos para la inactivación de genes cuya expresión causa enfermedades. Las ADNzimas son moléculas monocatenarias que fundamentalmente pueden unirse a zonas complementarias de ARN e inactivar éstas mediante escisión. No obstante, la utilización específica de las ADNzimas como agentes terapéuticos presupone que los genes causantes de la enfermedad y sus ARNm se conocen perfectamente. Hasta la fecha, esto es sólo el caso de pocas enfermedades.

La ADNzima descrita en el documento WO 01/11023A1 se une a RelA (p65) mONA y con esto se dirige contra el factor de transcripción NF- κ B, en el documento WO 00/42173 se da a conocer una ADNzima que se une a ARNm de EGR-1. El documento W099/50452 da a conocer una ADNzima 10-23 que puede usarse en un procedimiento diagnóstico para localizar mutaciones de ácidos nucleicos.

Ninguna de las moléculas antisentido y ADNzimas actualmente conocidas puede usarse para la preparación de un fármaco para el tratamiento de inflamaciones crónicas en pacientes.

Objetivo de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar fármacos específicos para células y/o tejidos y/o fases de enfermedad, que llevan a la inactivación funcional de moléculas de ácido ribonucleico de factores de transcripción y factores de las rutas de transducción de señales, cuya expresión participa en la aparición de reacciones inflamatorias crónicas y enfermedades autoinmunitarias y son adecuados para el tratamiento de reacciones inflamatorias crónicas y enfermedades autoinmunitarias, eliminándose las desventajas expuestas en el estado de la técnica.

Además, es objetivo de la invención proporcionar un procedimiento para la preparación de fármacos específicos para células y/o tejidos y/o fases de enfermedad, que identifique las moléculas de ácido ribonucleico de factores de transcripción y de factores de las rutas de transducción de señales, cuya expresión participe en la aparición de reacciones inflamatorias crónicas y enfermedades autoinmunitarias y las inactive funcionalmente en células diana.

ES 2 304 633 T3

El objetivo se alcanza según la invención mediante ADNzimas específicas según las reivindicaciones 1 a 5, un procedimiento según la reivindicación 6 y un fármaco, así como su uso según las reivindicaciones 7 a 9.

La ventaja de la invención consiste en una inactivación funcional de las moléculas de ácido ribonucleico de factores de transcripción y factores de las rutas de transducción de señales para la diferenciación y/o expresión de citocinas que participan en la aparición de reacciones inflamatorias crónicas y enfermedades autoinmunitarias mediante ADNzimas y/o ARNip específicos. Esta estrategia destaca, en comparación con los enfoques convencionales, pero también de terapia génica, por la mayor especificidad y selectividad para células y/o tejidos y/o fases de enfermedad, alta estabilidad de las moléculas y una antigenicidad insignificante. Se consiguen requisitos óptimos para una terapia a largo plazo hecha a medida en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas.

Otros detalles y preferencias de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente figura y la descripción. En este sentido muestra

La fig. 1: representación esquemática de la transducción de señales en la diferenciación de células CD4⁺ a células TH1 o TH2 (modificada según Ho I. C. y Glimcher L. H., Cell 2002; 109: pág. 109-pág. 120).

La fig. 2: secuencia de nucleótidos del dominio catalítico de la ADNzima 10-23 y unión a un ARN diana mediante el par de Watson-Crick. (R = A o G; Y = U o C, N = A, G, U o G). La flecha muestra el sitio de escisión en el ARNm diana.

La fig. 3: conjunto de moléculas de ácido ribonucleico específico según la etapa b), en particular las ADNzimas hgd1 a hgd70 contra GATA-3 y sus secuencias de nucleótidos (A=adenina, G=guanina, C=citosina, T=timina). Los nucleótidos escritos en mayúscula marcan un dominio derecho e izquierdo de unión a sustrato, los nucleótidos escritos en minúscula marcan el dominio catalítico central de la ADNzima 10-23.

La fig. 4: secuencias de nucleótidos del gen GATA-3 humano en el alineamiento

secuencia 1: GATA-3 humano del banco de datos nº: XM_043124,

secuencia 2: GATA-3 humano del banco de datos nº: X58072,

secuencia 3: GATA-3 humano (secuenciado a partir del plásmido pCR2.1).

Las bases divergentes están en cuadros grises, las localizaciones de los cebadores para el clonado de GATA-3 están subrayadas. La localización de la ADNzima hgd40 está ilustrada en negrita, que al mismo tiempo está en cuadros grises y subrayada.

(A=adenina, G=guanina, C=citosina, T=timina)

La fig. 4 A: secuencia de nucleótidos 3 del gen GATA-3 humano de la figura 4 en la que están marcados (en un cuadro en gris) respectivamente los pares de nucleótidos GT y AT entre los que están más sitios de corte de ADNzimas.

La fig 5: la electroforesis en gel muestra la escisión de un ARNm diana (en este caso ARNm de GATA-3) con moléculas de ácido ribonucleico específico según la etapa b), en este caso ADNzimas no modificadas [hgd11 (carril 2), hgd13 (carril 4), hgd17 (carril 6), hgd40 (carril 8)] y ADNzimas modificadas [hgd11-M (carril 3), hgd13-M (carril 5), hgd17-M (carril 7), hgd40-M (carril 9)]. M designa las ADNzimas modificadas. Las ADNzimas no modificadas (0,25 μ M) o modificadas (0,25 μ M) se incuban una hora a 37°C con ARNm de GATA-3 transcrito *in vitro* (0,025 μ M) en un volumen de 10 μ l con la siguiente mezcla de reacción: Tris 50 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM. A continuación, los productos se separan mediante electroforesis en gel. El carril 1 contiene como control ARNm sin adición de ADNzimas. El patrón de longitud introducido conjuntamente (no representado) muestra tamaños de banda de 1000 pb, 2000 pb y 3000 pb. Las flechas señalan hacia S, la banda con el sustrato (en este caso ARNm de GATA-3) y los productos de escisión P1 y P2.

La fig. 6: inmunotransferencia con la reacción de moléculas de ácido ribonucleico específico en células. Se transfectan células Jurkat E6.1 mediante lipofección con moléculas de ácido ribonucleico específico, en este caso ADNzimas [hgd11-M (carril 4), hgd13-M (carril 5), hgd17-M (carril 6), hgd40-M (carril 7)], como controles se utilizan células no tratadas (carril 1), células sólo tratadas con medio de transfección (carril 2) o células tratadas con ADNzimas (hgd11-M) sin medio de transfección (carril 3). Después de 48 h de incubación, las proteínas solubilizadas se separan mediante SDS-PAGE y GATA-3 (A) se detecta mediante inmunotransferencia con anticuerpos específicos (el carril 4 contiene células con hgd11-M, el carril 5 contiene células con hgd13-M, el carril 6 contiene células con hgd17-M, el carril 7 contiene células con hgd40-M). Para el control a las mismas cantidades de proteína por carril, en la misma membrana de transferencia se realiza una inmunotinción con β -actina (B). El patrón de longitud introducido conjuntamente (no representado) muestra tamaños de banda de 63,8 kDa, 49,5 kDa y 37,4 kDa.

La figura 1 muestra en una representación esquemática modificada según Ho I.C. y Glimcher L.H. (Cell 2002; 109: pág. 109-pág. 120) las relaciones de la transducción de señales en la diferenciación de células CD4⁺ a células TH1 o TH2. La estimulación mediante el receptor de células T por el complejo péptido-MHC correspondiente induce la expansión clonal y la diferenciación programada de linfocitos T CD4⁺ a células T cooperadoras (TH) 1 o TH2.

La distinción de estos dos subtipos tiene lugar debido a su perfil de citocinas. Las células TH1 producen interferón- γ (INF γ), interleucina 2 (IL-2) y factor β de necrosis tumoral, mientras que las células TH2 secretan IL-4, IL-5, IL-9 y IL-13. Las infecciones bacterianas y virales inducen una respuesta inmunitaria que es dominada por células TH1. Por otra parte, las células TH2 regulan la producción de IgE contra parásitos. En este sentido, entre las células TH1 y TH2 existe un equilibrio. La destrucción de este equilibrio causa enfermedades; así, una respuesta excesiva de células TH1 está asociada con enfermedades autoinmunitarias, mientras que las enfermedades alérgicas se basan en una respuesta reforzada de células TH2.

Se sabe que las citocinas TH1 participan en la patogénesis de enfermedades autoinmunitarias, como por ejemplo uveítis autoinmune, encefalomiелitis alérgica experimental, diabetes mellitus tipo 1 o enfermedad de Crohn, mientras que las citocinas TH2 (IL A, IL-5, IL-13 o IL-9) participan en la aparición de enfermedades respiratorias inflamatorias crónicas, como por ejemplo eosinofilia de las vías respiratorias, hipersecreción mucosa e hiperreactividad de las vías respiratorias. La base de estas enfermedades son modificaciones patofisiológicas durante la producción de citocinas características mediante células TH específicas para antígeno. Así, los ratones transgénicos, que en los epitelios de las vías respiratorias sobreexpresan de manera constitutiva las citocinas TH2 IL-4, IL-5, IL-13 o IL-9, muestran reacciones inflamatorias alérgicas típicas. Las subpoblaciones de células TH2 en el pulmón y las vías respiratorias provocan en las células TH2 en el modelo animal los síntomas característicos del asma bronquial.

Se encontró de manera sorprendente que para el tratamiento específico para células y/o tejidos de inflamaciones crónicas y/o enfermedades autoinmunitarias son idealmente adecuados factores de transcripción y factores de las rutas de transducción de señales para la diferenciación y/o expresión de citocinas que participan en la aparición de reacciones inflamatorias crónicas y enfermedades autoinmunitarias, como por ejemplo: el factor de transcripción específico para células TH1 T-bet y el factor de transcripción específico para células TH2 GATA-3.

El factor de transcripción específico para células TH2 GATA-3 es sobre todo responsable de la diferenciación de células T CD4⁺ indiferenciadas a células TH2.

En este sentido, la diferenciación de células TH2 se controla principalmente mediante dos rutas de transducción de señales, la ruta del receptor de células T (RCT) y la ruta del receptor de IL-4. Las señales transmitidas por RCT activan tanto los factores de transcripción específicos para células TH2 c-Maf y GATA-3 como los factores de transcripción NFAT y AP-1. La activación del receptor de IL-4 lleva a la unión de STAT6 al dominio citoplasmático del receptor de IL-4, donde es fosforilado por las cinasas Jak1 y Jak3. Por su parte, la fosforilación lleva a la dimerización y translocación de STAT6 en el núcleo, en el que STAT6 activa la transcripción de GATA-3 y otros genes.

GATA-3 es un factor de transcripción de tipo dedo de cinc que según el “análisis de diferencia representacional” (ADR) y estudios de la regulación transcripcional de IL-5 se expresa exclusivamente en células TH2 maduras, no en TH1.

Otros factores de transcripción que desempeñan una función en la diferenciación a células TH1 o TH2 y participan en la aparición de reacciones inflamatorias crónicas y enfermedades autoinmunitarias presentan una expresión que se diferencia en una célula diana en comparación con la expresión de una célula de control y según la invención también se utilizan para el diseño de ADNzimas y/o ARNip específicos para la utilización terapéutica en enfermedades inflamatorias crónicas:

- STAT4, STAT5a y STAT1 (signal transducer and activator of transcription, transductor de señales y activador de la transcripción)

- c-Rel

- CREB2 (cAMP response element-binding protein 2, proteína de unión 2 del elemento de respuesta del AMPc)

- ATF-2, ATF-2

- Hlx

- IRF-1 (interferon regulatory factor-1, factor 1 regulador del interferón)

- c-Maf

- NFAT (Nuclear factor of activated T cells, factor nuclear de células T activadas)

- NIP45 (NF-AT interacting protein 45, proteína 45 que interacciona con NF-AT)

ES 2 304 633 T3

- AP1 (Activator Protein 1, proteína 1 activadora)

- Mel-18

5 • SKAT-2 (SCAN box, KRAB domain associated with a Th2 phenotype, dominio KRAB de la caja SCAN asociado con un fenotipo Th2)

- CTLA-4 (Cytolytic T lymphocyte-associated antigen 4, antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico)

10 Otros factores de las rutas de transducción de señales que son responsables de la diferenciación y/o expresión de citocinas y participan en la aparición de reacciones inflamatorias crónicas y enfermedades autoinmunitarias presentan una expresión que se diferencia en una célula diana en comparación con la expresión de una célula de control y según la invención también se utilizan para el diseño de ADNzimas y/o ARNip específicos para la utilización terapéutica en enfermedades inflamatorias crónicas:

- Cinasa Src

- Cinasa Tec

20 Rlk (Txk en seres humanos)

 Itk

 Tec

25 • RIBP (proteína de unión a Rlk/Itk)

- PLC γ (fosfolipasa C γ 1)

30 • Cinasa MAP (proteína cinasa activada por mitógeno)

 ERK

 JNK

35 P38

- MKK (cinasa cinasa MAP)

40 MKK1

 MKK2

 MKK3

45 MKK4

 MKK6

50 MKK7

- Rac2

55 • GADD45 (gen 45 de detención del crecimiento y daño del ADN)

 GADD45 β

 GADD45 γ

60 • SOCS (supresores de la señalización de citocinas)

 CIS (proteína SH2 inducida por citocinas)

 SOCS1

65 SOCS2

 SOCS3

- JAK (cinasa Janus)

JAK1

JAK3

- NIP45 (proteína que interacciona con NF-AT)

Según la invención se proporciona un fármaco específico para células y/o tejidos y/o fases de enfermedad que es adecuado para el tratamiento de inflamaciones crónicas.

El fármaco ataca preferiblemente en los puntos de intervención de la compleja cascada de las regulaciones anómalas inmunológicas y de biología celular en la que se basan las reacciones inflamatorias crónicas y las enfermedades autoinmunitarias. Se prefieren especialmente estos puntos de intervención de la regulación de la diferenciación de los factores de transcripción partícipes, como por ejemplo el factor de transcripción específico para células TH2 GATA-3. El efecto terapéutico conseguido consiste en una inactivación funcional de moléculas de ARNm mediante ADNzimas y/o ARNip específicos. Esta estrategia ofrece una serie de ventajas en comparación con los enfoques convencionales, pero también de terapia génica: mayor especificidad y selectividad, alta estabilidad de las moléculas y una antigenicidad insignificante. Se consiguen requisitos óptimos para una terapia a largo plazo hecha a medida en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas.

Según la invención se proporciona un procedimiento para la preparación de un fármaco específico para células y/o tejidos y/o fases de enfermedad que comprende las siguientes etapas:

a) Identificación de moléculas de ácido ribonucleico cuya expresión se diferencia en una célula diana en comparación con la expresión de una célula de control

b) Diseño de moléculas de ácido ribonucleico específico que se unen a las moléculas de ácido ribonucleico de la etapa a) y las inactivan funcionalmente

c) Introducción de las moléculas de ácido ribonucleico específico de la etapa b) en células diana

d) Formulación de las moléculas de ácido ribonucleico específico de la etapa b) y/o de una célula diana de la etapa c) en un fármaco

El término “específico para células y/o tejidos y/o fases de enfermedad” significa en el sentido de la presente invención que el fármaco preparado mediante el procedimiento según la invención sólo es esencialmente eficaz en un tipo determinado de células (célula diana) y/o en determinados tejidos u órganos y/o en determinadas fases de la enfermedad y posee una influencia insignificante en otras células (células de control), tejido u órganos. Preferiblemente, el fármaco es eficaz en al menos 2/3 de las células diana. Más preferido en al menos el 80% y lo más preferido en al menos el 98% de las células diana. Se prefiere además que el fármaco sea eficaz en como máximo el 10% de las células de control, más preferido en como máximo el 5% y lo más preferido en < 1% de las células de control.

El término “identificación de moléculas de ácido ribonucleico cuya expresión se diferencia en una célula diana en comparación con la expresión de una célula de control” comprende en la presente invención los siguientes puntos:

i) Células diana son células en tejidos y órganos que, de manera conocida, llevan a la aparición de una enfermedad, contribuyen a ella o la refuerzan, que fomentan los procesos que mantienen la enfermedad, contribuyen a ellos o los refuerzan, o que llevan a las consecuencias a largo plazo de una enfermedad, contribuyen o las refuerzan. Entre éstas figuran, por ejemplo, células que presentan determinados factores de transcripción, que segregan hormonas específicas, citocinas y factores de crecimiento, o células con receptores de superficie típicos.

ii) Las células diana pueden aislarse, por ejemplo, mediante tecnologías que se basan en la unión a anticuerpos específicos. En este caso se usan perlas magnéticas que pueden obtenerse de las empresas Miltenyi (Macs-System), Dynal (DynaBeads) o BD-Bioscience (iMAG). Alternativamente, esto tiene lugar mediante una purificación de células mediante anticuerpos marcados con fluorescencia en citómetros, por ejemplo, de la empresa Cytomation (MOFLO) o BD-Bioscience (FACS-Vantage). La pureza de las células diana es preferiblemente de al menos el 80%, más preferido de al menos el 95% y lo más preferido de al menos el 99%.

iii) Los procedimientos para el aislamiento de ARN se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory (2001), Nueva York y Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998), Nueva York. Además, para el experto medio en la materia es posible usar kits comercialmente disponibles (Silika-Technologie), por ejemplo, el kit RNeasy de la empresa Qiagen, para el aislamiento de ARN. Además, se prefiere purificar directamente ARNm de las células diana mediante el uso de kits comerciales, por ejemplo, de las empresas Qiagen (kit Oligotex mRNA), Promega (polyAtract mRNA Isolation System) o Miltenyi (mRNA direct).

iv) La identificación de ARNm que son diferencialmente distintos, es decir, ARNm cuya expresión en la célula diana es alta en comparación con la célula de control, tiene lugar, por ejemplo, con matrices génicas que pueden adquirirse comercialmente (por ejemplo, MWG, CLONTECH)] o con un procedimiento de hibridación en filtro (por ejemplo Unigene) según indicaciones del fabricante. Alternativamente, los ARNm diferenciales se preparan mediante hibridación sustractiva de ADNc que se forman previamente a partir de ARNm mediante reacción de TI. Entre los procedimientos conocidos para el experto figuran, por ejemplo, el procedimiento de SSH (empresa Clontech) o el procedimiento de ADR. A una forma de aplicación también preferida pertenece la combinación de tecnología de matrices e hibridación sustractiva. La identificación de los genes diferencialmente expresados tiene lugar con la utilización de la tecnología de matrices con ayuda de programas que pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, con el programa Vector Xpression de la empresa InforMax. En la utilización de hibridación sustractiva, después del aislamiento de los genes diferencialmente expresados mediante procedimientos habituales usuales para el experto como clonación y posterior secuenciación (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory (2001), Nueva York y Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998), Nueva York) tiene lugar un alineamiento de secuencias en un banco de datos, como por ejemplo Gene-Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

La expresión en la célula diana se diferencia en comparación con la expresión en una célula de control. En una forma de realización del procedimiento según la invención, la expresión en la célula diana es alta en comparación con la expresión en una célula de control, preferiblemente al menos un factor de 1,5. En una forma de realización especialmente preferida, la expresión en la célula diana es alta en comparación con la expresión en una célula de control al menos un factor de 5, y en una forma de realización muy preferida, la expresión sólo en la célula diana, pero no en la célula de control, es detectable.

El término “diseño de moléculas de ácido ribonucleico que se unen a moléculas de ácido ribonucleico de la etapa a) y las inactivan funcionalmente” comprende en el sentido de la presente invención el uso de enzimas de ADN inactivadoras de ARN (ADNzimas) y/o ARN interferente pequeño (ARNip) que inactivan funcionalmente las moléculas de ácido ribonucleico.

El término ADNzimas comprende en este sentido según la invención moléculas de ADN que reconocen específicamente y escinden la secuencia diana del ácido nucleico, tanto ADN como ARN.

El modelo “10-23” representa un modelo de ADNzimas general. Las ADNzimas del modelo 10-23 - también denominadas “ADNzimas 10-23” - poseen un dominio catalítico de 15 ácidos desoxirribonucleicos que está flanqueado por dos dominios de unión a sustrato. La longitud de los dominios de unión a sustrato es variable, son o de longitud igual o diferente. En una realización preferida, la longitud de los dominios de unión a sustrato asciende a entre 6 y 14 nucleótidos.

En una realización especialmente preferida, los dominios de unión a sustrato son completamente complementarios a la región que flanquea el sitio de escisión. Sin embargo, para unirse al ARN diana y escindirlo, las ADNzimas no deben ser necesariamente completamente complementarias. Las investigaciones *in vitro* muestran que las ADNzimas del tipo 10-23 escinden el ARNm diana de secuencias sucesivas de purina-pirimidina.

Para usar las ADNzimas en el tratamiento de enfermedades se prefiere que las ADNzimas estén tan bien estabilizadas en el cuerpo (en la sangre, en el medio intracelular, etc.) como sea posible contra la degradación. Una realización preferida es la introducción de una inversión 3'-3' en uno o varios extremos de la ADNzima. El término inversión 3'-3' designa un enlace fosfato covalente entre los carbonos de 3' del nucleótido del extremo y del nucleótido contiguo. Este tipo de enlace está en oposición al enlace fosfato normal entre los carbonos de 3' y 5' de nucleótidos sucesivos. En consecuencia, se prefiere que el nucleótido en el extremo 3' del dominio de unión a sustrato contiguo al extremo 3' del dominio catalítico esté al revés. Adicionalmente a las inversiones, las ADNzimas pueden contener nucleótidos o compuestos de nucleótidos modificados. Los nucleótidos modificados contienen, por ejemplo, compuestos de N3'-P5'-fosforamido, sustituciones de 2'-O-metilo y compuestos de ácido nucleico de péptido. Su preparación es usual para el experto.

Aunque los potenciales sitios de corte de ADNzimas aparecen de forma ubicua, éstos están frecuentemente bloqueados por la estructura secundaria del ARN y con ello son inaccesibles para las ADNzimas. Por tanto, de un conjunto de ADNzimas se seleccionan aquellas cuyos sitios de corte estén libremente accesibles. Estas ADNzimas seleccionadas son activas, escinden el ARNm diana y con ello lo inactivan funcionalmente. La eficacia de la escisión del ARNm por las ADNzimas individuales se muestra o mediante pruebas individuales de cada ADNzima o mediante pruebas acopladas de varias ADNzimas en “múltiples ensayos” (descritos, por ejemplo, en Cairns y col., 1999).

El término ARNip comprende según la invención moléculas de ARN bicatenario de 21-23 bases de longitud que llevan a una degradación específica del ARNm diana complementario tanto *in vitro* como *in vivo*. El experto sabe mediante la bibliografía (por ejemplo, <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/index.html>) preparar moléculas de ARNip partiendo de la secuencia de ARNm diana.

La probabilidad de que entre tres moléculas de ARNip seleccionadas se encuentre al menos una sumamente activa (inhibición del ARN diana de al menos el 80%) se indica en la bibliografía con al menos el 70%. De un conjunto de

moléculas de ARNip se seleccionan aquellas que llevan a una degeneración específica del ARNm diana complementario tanto *in vitro* como *in vivo*.

El término “introducción de las moléculas de ácido ribonucleico específico de la etapa b) en células diana” comprende en el sentido de la presente invención la transfección de vectores, especialmente plásmidos, cósmidos, virus o bacteriófagos, que contienen las moléculas de ácido ribonucleico específico anteriormente descritas según la invención, en las células diana. Preferiblemente son adecuados los vectores para la transformación de células animales y humanas y permiten la integración de las moléculas de ácido ribonucleico según la invención. Los procedimientos para la transfección, como por ejemplo lipofección mediante DMRIE-C de la empresa Invitrogen, son conocidos para el experto de la bibliografía. En principio, para esto también son adecuados vectores liposomales. Las moléculas diana son factores de transcripción, células que segregan hormonas, citocinas y factores de crecimiento, pero también células que en la superficie llevan los receptores expresados.

Como células de control en el sentido de la invención se recurre a células sanas de tejido diana, células del mismo tipo de otros compartimentos del mismo paciente o también de individuos sanos.

El cultivo de la célula diana tiene lugar en medios nutrientes que están adaptados correspondientemente a las necesidades de la célula diana según valor de pH, temperatura, concentración de sales, antibióticos, vitaminas, oligoelementos y aireación.

El término paciente se refiere igualmente a seres humanos y vertebrados. Con esto, el fármaco puede usarse en la medicina humana y veterinaria.

El término “formulación de las moléculas de ácido ribonucleico específico de la etapa b) o de una célula diana de la etapa c) en un fármaco” comprende composiciones farmacéuticamente aceptables que contienen modificaciones y “profármacos”, siempre y cuando según juicio médico fidedigno no desencadenen toxicidad excesiva, irritaciones o reacciones alérgicas en el paciente. El término “profármaco” se refiere a compuestos que se transforman para mejorar la absorción, como por ejemplo mediante hidrólisis en la sangre.

Preferiblemente, la formulación hace posible que las moléculas de ácido ribonucleico específico se administren al paciente en forma de una composición farmacéuticamente aceptable o bien por vía oral, rectal, parenteral, intravenosa, intramuscular o subcutánea, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intratecal, intravascular, local (polvo, pomada o gotas) o bien en forma de aerosol.

Las formas farmacéuticas para la administración local del fármaco de esta invención incluyen pomadas, polvos, aerosoles o agentes para inhalación. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo fisiológicamente aceptable y posibles conservantes, tampones o propelentes, dependiendo de la necesidad.

El médico práctico determina el tipo de dosificación correspondientemente a los factores clínicos. El experto sabe que el tipo de dosificación depende de distintos factores como, por ejemplo, tamaño corporal, peso, superficie corporal, edad, sexo o la salud general del paciente, pero también del agente que especialmente va a administrarse, la duración y el tipo de administración y de otros medicamentos que posiblemente se administran en paralelo.

El fármaco preparado con el procedimiento según la invención presenta una alta especificidad por pacientes, enfermedades, estadios o fases. Produce una intervención específica para células y es específico para compartimentos y órganos. No aparece ninguna reacción o sólo muy pocas reacciones del sistema inmunitario contra el fármaco y el perfil de efectos secundarios está en una relación aceptable con el grado de gravedad, pronóstico y transcurso de la enfermedad.

El fármaco puede usarse para la terapia contra grupos completos de enfermedades que van acompañados de inflamaciones crónicas como, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades de tipo reumático (manifestaciones en, entre otros, piel, pulmón, riñón, sistema vascular, sistema nervioso, tejido conjuntivo, aparato locomotor, sistema endocrino), reacciones alérgicas de tipo inmediato y asma, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), arteriosclerosis, psoriasis y eccema de contacto, así como contra reacciones de rechazo crónico después de trasplante de órganos y de médula ósea.

Ejemplo

a) *Identificación de moléculas de ácido ribonucleico cuya expresión en una célula diana se diferencia en comparación con la expresión de una célula de control*

i) Como células diana se usan las células CD4⁺ indiferenciadas responsables de la aparición de reacciones inflamatorias crónicas.

ii) Las células diana CD4⁺ se aíslan mediante perlas magnéticas (empresa Miltenyi (Macs-System), Dynal (Dyna-Beads) o BD-Bioscience (iMAG), alternativamente mediante anticuerpos marcados con fluorescencia en citómetros, por ejemplo de las empresas Cytomation (MOFLO) o BD-Bioscience (FACS-Vantage).

ES 2 304 633 T3

iii) El aislamiento de ARN tiene lugar según procedimientos habituales, véase Sambrook y Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory (2001), Nueva York y Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998), Nueva York.

5 Alternativamente se usa un kit RNeasy de la empresa Qiagen, o tiene lugar el aislamiento directo de ARNm de células diana CD4⁺ con el kit Oligotex mRNA de la empresa Qiagen según indicaciones del fabricante.

iv) La identificación de ARNm que son diferencialmente distintos, es decir, ARNm cuya expresión en la célula diana es alta en comparación con la célula de control, tiene lugar mediante matrices génicas (por ejemplo, MWG, CLONTECH)] y la identificación de los genes diferencialmente expresados mediante el programa Vector Xpression de la empresa Infor-Max.

Procedimientos de hibridación en filtro (por ejemplo Unigene) según indicaciones del fabricante. El aislamiento de los genes diferencialmente expresados incluye la clonación, secuenciación (según instrucciones habituales, véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory (2001) y el alineamiento de secuencias en el banco de datos de genes (www.ncbi.nlm.nih.gov).

La expresión de GATA-3 se diferencia en la célula diana (célula TH2) en comparación con la expresión en una célula de control (por ejemplo, célula Th0).

20

b) *Diseño de moléculas de ácido ribonucleico específico que se unen a moléculas de ácido ribonucleico de la etapa y las inactivan funcionalmente*

25 La figura 3 muestra el conjunto según la invención hgd1 a hgd70 de ADNzimas específicas contra ARNm de GATA-3. Las ADNzimas presentan una longitud total de 33 nucleótidos, en las que el dominio catalítico central se corresponde con 15 nucleótidos (en letras minúsculas) del dominio catalítico de la ADNzima 10-23 conocida (figura 2). Este dominio catalítico se flanquea por dos dominios de unión a sustrato derecho e izquierdo compuestos respectivamente por 9 nucleótidos (en letras mayúsculas). La secuencia de nucleótidos del dominio de unión a sustrato derecho e izquierdo es diferente y varía en las ADNzimas hgd1 a hgd70, de manera que tiene lugar una unión diferentemente específica mediante el par de Watson-Crick del ARNm de GATA-3.

30

La figura 2 muestra el modelo general para la unión de la ADNzima 10-23 a un ARN diana cualquiera marcado con N en el que la flecha señala hacia el sitio de escisión en el ARNm diana.

35

Las ADNzimas pueden escindir el ARNm diana concretamente en cualquier secuencia de purina-pirimidina, pero de la bibliografía se conoce que los enlaces purina-uracilo se escinden más eficazmente que los enlaces purina-citosina. Por esto se construyen preferiblemente ADNzimas que se escinden en los enlaces purina-uracilo.

40 El modelo mostrado en la figura 2 puede transferirse en su modo de funcionamiento al enlace de las ADNzimas hgd1 a hgd70 de ARNm de GATA-3.

Las ADNzimas hgd1 a hgd70 se utilizan sin modificar para ensayos *in vitro*, para ensayos en cultivo celular provistas de modificaciones (pueden adquirirse comercialmente de la empresa Eurogentec).

45

Como modificaciones para la estabilización y protección se utilizan:

1) Una timidina inversa estabilizadora en el extremo 3'

50 2) Una marca de FAM en el extremo 5' para evaluar la eficacia de transfección de las células mediante análisis de FACS.

Para probar las ADNzimas *in vitro* se necesita ARNm de GATA-3 que se prepare mediante transcripción *in vitro*. Las etapas individuales son del siguiente modo:

55

- Aislamiento de ARN a partir de sangre completa humana con EDTA mediante QIAamp-RNA-Blood-Mini-Kit (Qiagen, Alemania) según indicaciones del fabricante

- Transcripción inversa con los cebadores:

60

Cebador directo GCGCGCGTCTTGATACTTT

Cebador inverso CCGAAAATTGAGAGAGAAGGAA, en la que se amplifica un producto de PCR con una longitud de 2731 nucleótidos (JumpStart Accu Taq DNA Polymerase, Sigma).

65

Condiciones de PCR: desnaturalización inicial (96°C, 30 s), amplificación con 40 ciclos (94°C, 15 s; 48°C, 30 s; 68°C, 3 min.), extensión final (68°C, 30 min.).

El producto de PCR se clona mediante procedimientos habituales en el plásmido pCR2.1 (Invitrogen) y se secuenciar para comprobación. La preparación de ARNm de GATA-3 tiene lugar después de la linealización del plásmido pCR2.1 que contiene GATA-3 mediante escisión con la enzima de restricción Spe 1 mediante transcripción *in vitro* según indicaciones del fabricante (Ambion). El ARNm de GATA-3 está presente con una longitud total de 2876 nucleótidos.

La figura 4 muestra las secuencias de nucleótidos conocidas de los genes de GATA-3 humanos de las entradas del banco de datos [PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>)], en las que las bases divergentes están en un cuadro gris. Secuencia 1: GATA-3 humano del banco de datos n°: XM_043124, secuencia 2: GATA-3 humano del banco de datos n°: X58072, secuencia 3: GATA-3 humano (aislado a partir del plásmido pCR2.1).

Las secuencias de ARNm de GATA-3 se diferencian entre sí en lo referente a la longitud de los extremos sin traducir 3' o sin traducir 5'. Para obtener la secuencia completa exacta del ARNm, para la selección de cebadores se usan las secuencias de ARNm de n° de entrada: XM_043124 y X58072. Las localizaciones de los cebadores para la clonación de GATA-3 están subrayadas en la figura 4. La figura 4 muestra además un alineamiento de la secuencia de ácidos nucleicos de GATA-3 de la base de datos (secuencia 1 y 2) con la secuencia de nucleótidos (secuencia 3) secuenciada a partir del plásmido pCR2.1. En este sentido se muestra que las secuencias no son completamente idénticas, sino que bases aisladas son diferentes. La secuencia de ácidos nucleicos 3 de GATA-3 de la figura 4 forma según la invención la base para la construcción de ADNzimas contra ARNm de GATA-3.

La figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos de la secuencia 3 del gen de GATA-3 humano de la figura 4 y en ella marcada como relleno gris respectivamente dos nucleótidos GT o AT, entre los cuales se encuentran otros sitios de corte potenciales para las ADNzimas.

Los experimentos de escisión *in vitro* de ARNm de GATA-3 con las ADNzimas (hgd1-hgd70) se realizan en un volumen de 10 μ l de la siguiente mezcla de reacción: Tris 50 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, ADNzima 0,25 μ M y ARNm de GATA-3 transcrito *in vitro* 0,025 μ M (en una relación sustrato a ADNzima de 1:10). Las reacciones se incuban a 37°C durante los tiempos respectivamente indicados. La reacción se detiene mediante la adición de tampón de carga de muestra de ARN que contiene formamida y EDTA (Sigma). Las muestras desnaturizadas se separan en geles de TAE al 1,3%-agarosa y se analizan en el transiluminador de UV. La figura 5 muestra como resultado de la electroforesis en gel la escisión del ARNm diana de GATA-3 con ADNzima no modificada [hgd11 (carril 2), hgd13 (carril 4), hgd17 (carril 6), hgd40 (carril 8)] y ADNzimas modificadas [hgd11-M (carril 3), hgd13-M (carril 5), hgd17-M (carril 7), hgd40-M (carril 9)]. El carril 1 contiene como control ARNm sin adición de ADNzima. Las ADNzimas modificadas están marcadas con una M adicional. Un patrón de longitud introducido conjuntamente (no representado) muestra tamaños de banda de 1000 pb, 2000 pb y 3000 pb. Las flechas señalan hacia S, la banda con el sustrato (en este caso ARNm de GATA-3) y los productos de escisión P1 y P2.

La comparación entre las 70 ADNzimas muestra que hgd11, hgd13, hgd17 y hgd40 son especialmente activas, las modificaciones reducen la eficacia de las ADNzimas hgd11, hgd13 y hgd17, pero no la eficacia de la ADNzima hgd40.

La siguiente tabla muestra la clasificación de las ADNzimas hgd1 a hgd70 contra ARNm de GATA-3 en 4 grupos. Esta clasificación en grupos tiene lugar debido a las pruebas de actividad *in vitro* de las ADNzimas realizadas contra ARNm de GATA-3. Grupo 1: actividad de escisión alta, grupo 2: actividad de escisión media, grupo 3: actividad de escisión débil, grupo 4: ninguna actividad de escisión.

Grupo	hgd	Actividad frente a ARNm de GATA-3
1	11, 13, 17, 40	Actividad de escisión alta
2	10, 12, 16, 18, 23, 31, 36, 37, 39, 52, 57, 58, 63, 70	Actividad de escisión media
3	22, 24, 25, 34, 35, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 54, 55, 56, 57	Actividad de escisión débil

4	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 14, 15, 19, 20, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 38, 44, 51, 53, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 68, 69	Ninguna actividad de escisión
---	--	----------------------------------

c) *Introducción de las moléculas de ácido ribonucleico específico de la etapa b) en células diana*

Las ADNzimas todavía activas hgd11, hgd13, hgd17 y hgd40 se usan con y sin las modificaciones descritas en células diana.

Para esto se cultivan células Jurkat E6.1 células (células de leucemia aguda humana de células T) en medio RPMI con 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin y SBF al 10% a 37°C en atmósfera humedecida con 5% de CO₂. Las transfecciones se realizan en placas de 6 pocillos. Para esto, 2x10⁶ células Jurkat E6.1 se transfieren a medio de cultivo celular Opti-MEM-I (Invitrogen) y se transfectan mediante DMR1E-C (Invitrogen) con las ADNzimas modificadas (0,3 μM) (según indicaciones del fabricante de la empresa invitrogen). Después de 10 horas de incubación en una estufa de incubación bajo las condiciones anteriores se añade medio RPMI (con los aditivos anteriormente indicados) y la incubación continua durante otras 14 horas. Las células se lavan con medio Opti-MEM y a continuación se transfectan de nuevo según el protocolo anteriormente descrito. Después de cada transfección se valora la eficacia de la transfección mediante análisis de FACS.

A continuación se comprueba la actividad de las ADNzimas mediante detección de la cantidad de proteína de GATA-3 en transferencia de Western (véase la figura 6).

Para los análisis de transferencia de Western, las proteínas citoplasmáticas y las proteínas del núcleo se separan procesan mediante un kit de extracción de proteínas según indicaciones del fabricante (Pierce). La concentración de proteína se determina con el kit BCA (Pierce). La separación de respectivamente 30 μg de proteína tiene lugar mediante electroforesis en gel desnaturante en geles de SDS al 10%-poliacrilamidas. Las proteínas se transfieren a continuación según procedimientos habituales a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquean con leche desnatada en polvo al 5% en PBS (con Tween 20 al 0,01%) y a continuación con anticuerpos de ratón anti-GATA-3 (Santa Cruz) (1:500) y posteriormente se incuban con anticuerpos de ratón anti-conejo acoplados a HRP (BD Biosciences) (1:2000) durante respectivamente una hora a temperatura ambiente. Las proteínas se visualizan mediante quimioluminiscencia. Mediante la detección en paralelo de beta-actina en las transferencias se controlan las variaciones en la cantidad aplicada de proteína. Para esto se detecta primero GATA-3 en la membrana de nitrocelulosa. A continuación se deja la misma membrana durante la noche en una cámara húmeda. Después de 2 lavados con PBS tiene lugar la detección de β-actina mediante inmunotinción con anticuerpos específicos (anticuerpos de ratón anti-beta-actina humana (Sigma)).

La figura 6 muestra el resultado de la inmunotransferencia con el resultado de la actividad de las ADNzimas en células. Las células Jurkat E6.1 se transfectan mediante lipofección con ADNzimas (carril 4=hgd11-M, carril 5=hgd13-M, carril 6=hgd17-M, carril 7=hgd40-M). Como controles se utilizan células no tratadas (carril 1), solamente tratadas con medio de transfección (carril 2) o con ADNzimas sin medio de transfección (carril 3). Después de 48 h de incubación, las proteínas solubilizadas se separan mediante SDS-PAGE y GATA-3 (A) se detecta mediante inmunotransferencia con anticuerpos específicos. Para confirmar que en cada carril se utiliza la misma cantidad de proteína, en la misma membrana de transferencia tiene lugar una inmunotinción con β-actina (B). Un patrón de longitud introducido conjuntamente (no representado) muestra bandas de proteína del tamaño 63,8 kDa, 49,5 kDa y 37,4 kDa.

Se muestra que las ADNzimas hgd11, hgd13 y hgd17 no son activas *in vivo*, mientras que la ADNzima hgd40 también inhibe la expresión de GATA-3 *in vivo*. Por tanto, la inhibición específica de la expresión de GATA-3 *in vivo* por la ADNzima hgd40 representa una herramienta terapéutica eficaz para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas.

d) *Formulación del ácido ribonucleico específico de la etapa b) y/o de una célula diana de la etapa c) en un fármaco*

El análisis de distintas ADNzimas con dominio de unión a sustrato específico para GATA-3 muestra que la ADNzima hgd40 inhibe específicamente la expresión de GATA-3 *in vivo* y es adecuada como ácido ribonucleico específico para la preparación de un fármaco específico para células y/o tejidos y/o fases de enfermedad. Además, hgd40 (5'-GTGGATGGAggtagctacaacgaGTCTTGAG) o las células transfectadas con hgd40 se proveen en una composición farmacéutica de un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo liposomas o polímeros biodegradables. Alternativamente a las ADNzimas, para la inhibición específica de la expresión de GATA-3 y para la preparación de un fármaco específico para células y/o tejidos y/o fases de enfermedad se propone la utilización de ARNip. Preferiblemente se utiliza ARNip para la inhibición de GATA-3 de ratón y humano. La preparación de ARNip es conocida para el experto y se describe en la bibliografía.

A continuación se presentan ejemplos de secuencias de ARNip:

Fuente	Secuencias de ácido nucleico
GATA-3 de ratón	Cadena de transcripción: CAUCGAUGGUCAAGGCAACdTdT Cadena complementaria: GUUGCCUUGACCAUCGAUGdTdT
Secuencia 1 de GATA-3 humano	Cadena de transcripción: CAUCGACGGUCAAGGCAACdTdT Cadena complementaria: GUUGCCUUGACCGUCGAUGdTdT
Secuencia 2 de GATA-3 humano	Cadena de transcripción: AAGAGUGCCUCAAGUACCAdTdT Cadena complementaria: UGGUACUUGAGGCACUCUdTdT
Secuencia 3 de GATA-3 humano	Cadena de transcripción: AGCUUCACAAUAUUAACAGdTdT Cadena complementaria: CUGUAAUAUUGUGAAGCUdTdT
Secuencia 4 de GATA-3 humano 4	Cadena de transcripción: UGACUCACUGGAGGACUUCdTdT Cadena complementaria: GAAGUCCUCCAGUGAGUCAdTdT

Para el experto es evidente que con el conocimiento de la presente invención también pueden prepararse fácilmente ADNzimas o ARNip específicos como fármacos para enfermedades inflamatorias crónicas y enfermedades autoinmunitarias que están dirigidos contra otros factores de transcripción que desempeñan una función en la diferenciación a células TH1 o TH2, por ejemplo STAT4, STAT5a, STAT1, c-Rel, CREB2, ATF-2, Hlx, IRF-1, c-Maf, NFAT, NIP45, AP1, Mcl-1, SKAT-2, CTLA-4 o que están dirigidos contra otros factores de las rutas de transducción de señales para la diferenciación y/o expresión de citocinas, por ejemplo cinasa Src, cinasa Tec, Rlk (Txk en seres humanos), Itk, Tec, RIBP, PLC γ , cinasa MAP, ERK, JNK, P38, MKK, MKK1, MKK2, MKK3, MKK4, MKK6, MKK7, Rac2, GADD45, GADD45 β , GADD45 γ , SOCS, CIS, SOCS1, SOCS2, SOCS3, JAK, JAK1, JAK3, NIP45.

Estas proteínas presentan una expresión que es alta en una célula diana en comparación con la expresión de una célula de control.

REIVINDICACIONES

1. ADNzimas **caracterizadas** porque están compuestas por

- un dominio catalítico con la secuencia de nucleótidos GGCTAGCTACAACGA o una secuencia modificada con efecto biológico comparable que corta al ARNm de GATA-3 en cada sitio de unión de purina-pirimidina, al que está unido,

- un dominio de unión a sustrato derecho a continuación del extremo 3' del dominio catalítico y

- un dominio de unión a sustrato izquierdo a continuación del extremo 5' del dominio catalítico, en las que los dos dominios de unión a sustrato son respectivamente complementarios a dos regiones del ARNm de GATA-3, de manera que se hibridan con el ARNm,

- son activas *in vivo* y

- contienen la secuencia hgd40 GTGGATGGA GGCTAGCTACAACGA GTCTTGGAG.

2. ADNzimas según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque cortan con el dominio catalítico el ARNm de GATA-3 en un sitio de unión de purina-uracilo.

3. ADNzimas según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizadas** porque están estabilizadas contra la degradación en el organismo mediante la introducción de una inversión 3'-3'.

4. ADNzimas según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizadas** porque están estabilizadas contra la degradación en el organismo mediante la introducción de nucleótidos o compuestos de nucleótidos modificados.

5. ADNzimas según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizadas** porque como modificación presentan una timidina inversa en el extremo 3' y/o una marca de FAM en el extremo 5'.

6. Procedimiento para la preparación de un fármaco para el tratamiento de inflamaciones crónicas, **caracterizado** porque

- se determinan células diana en las que la expresión de ARNm de GATA-3 es mayor que en células corporales sanas,

- se desarrolla una ADNzima eficaz *in vivo* según la reivindicación 1 que se une al ARNm de GATA-3 y lo inactiva funcionalmente,

- la ADNzima eficaz *in vivo* se introduce en las células diana y

- se formulan fármacos que contienen la ADNzima eficaz *in vivo*.

7. Fármaco que contiene una ADNzima según las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Uso de una ADNzima según una o varias de las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de un fármaco para el tratamiento de inflamaciones crónicas.

9. Uso de una ADNzima según una o varias de las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de un fármaco para la inhibición específica de la expresión de GATA-3 en células diana de pacientes que padecen inflamaciones crónicas.

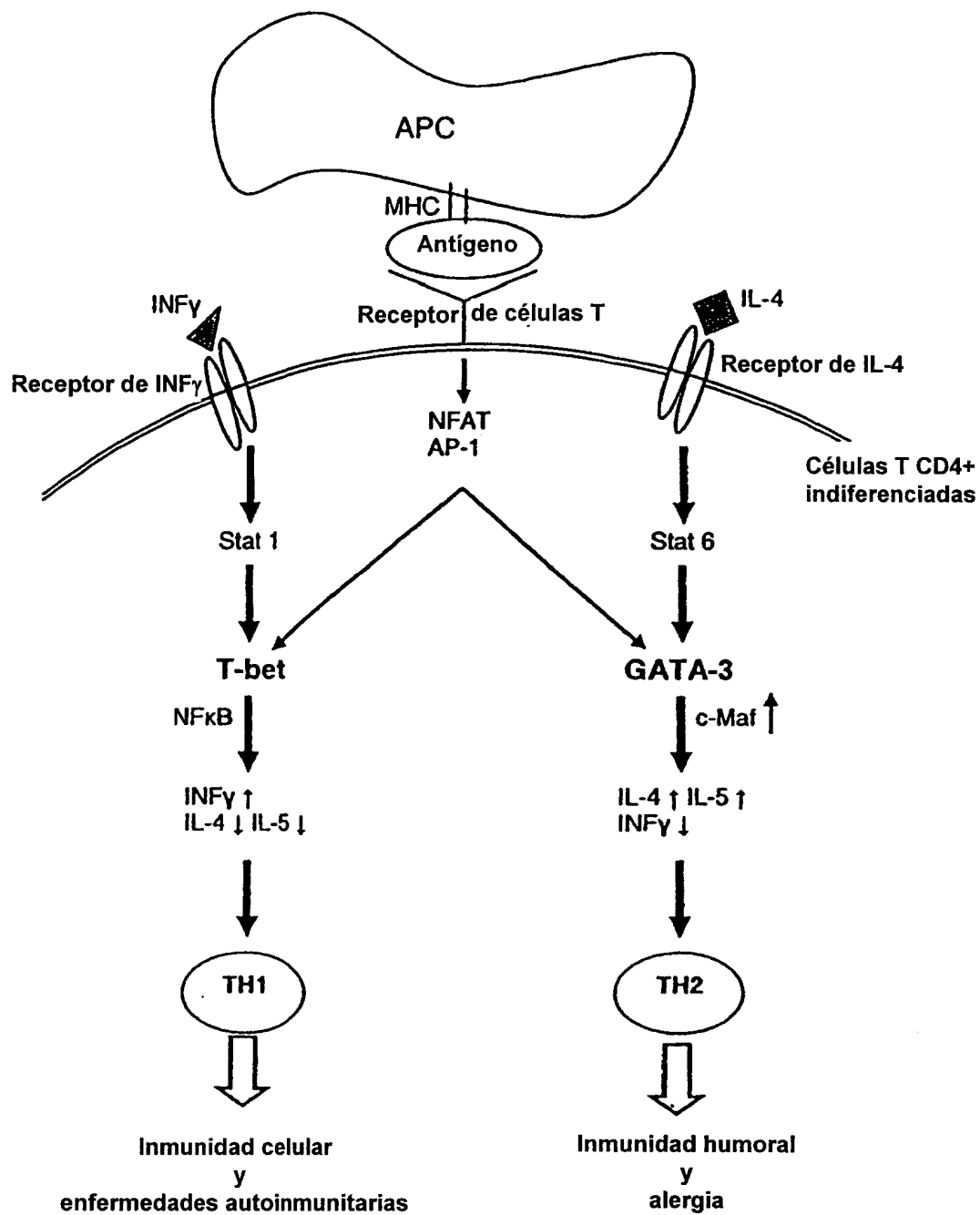


Fig. 1

Fig. 3

Nombre	Secuencia de ADNzima
hgd1	5'-TCGGTCAGAggctagctacaacgaTGCGTTGCT-3'
hgd2	5'-GGCGTACGAggctagctacaacgaCTGCTCGGT-3'
hgd3	5'-GGCGGCGTAggctagctacaacgaGACCTGCTC-3'
hgd4	5'-CTCGGGTCAGgctagctacaacgaCTGGGTAGC-3'
hgd5	5'-TCCTCTGCAGgctagctacaacgaCGGGGTCCT-3'
hgd6	5'-ACTCTGCAAggctagctacaacgaTCTGCGAGC-3'
hgd7	5'-GGGCGACGAggctagctacaacgaTCTGCAATT-3'
hgd8	5'-AAGGGGCGAggctagctacaacgaGACTCTGCA-3'
hgd9	5'-AAAACGGGAggctagctacaacgaCAGGTTGTA-3'
hgd10	5'-AGAATAAAAggctagctacaacgaGGGACCAGG-3'
hgd11	5'-ATGGCAGAAggctagctacaacgaAAAACGGGA-3'
hgd12	5'-AACTGGGTAggctagctacaacgaGGCAGAATA-3'
hgd13	5'-ATCCAAAAAggctagctacaacgaTGGGTATGG-3'
hgd14	5'-AGGGGAAGAggctagctacaacgaAAAAATCCA-3'
hgd15	5'-TTTTAAAAAggctagctacaacgaTATCTTGGA-3'
hgd16	5'-GTGGGGGGAggctagctacaacgaGGGAAGGCT-3'
hgd17	5'-GTTGAATGAggctagctacaacgaTTGCTTTCG-3'
hgd18	5'-GTCGTTGAAGgctagctacaacgaGATTTGCTT-3'
hgd19	5'-GGCCCGGAAGgctagctacaacgaCCGCGCGCG-3'
hgd20	5'-TCACCTCCAggctagctacaacgaGGCCTCGGC-3'
hgd21	5'-CCGCCGTCAGgctagctacaacgaCTCCATGGC-3'
hgd22	5'-GGTGGCTCAGgctagctacaacgaCCAGCGCGG-3'
hgd23	5'-CGTTGAGCAGgctagctacaacgaGGCGGGGTG-3'
hgd24	5'-CCGCGTCCAggctagctacaacgaGTAGGAGTG-3'
hgd25	5'-CAGCGGGTAggctagctacaacgaTGCGCCCGC-3'
hgd26	5'-GCACATCCAggctagctacaacgaCTCCTCCGG-3'
hgd27	5'-AAAAGCACAggctagctacaacgaCCACCTCCT-3'
hgd28	5'-TAAAAAGCAGgctagctacaacgaATCCACCTC-3'
hgd29	5'-GACCGTCGAggctagctacaacgaGTTAAAAAG-3'
hgd30	5'-TTGCCTTGAggctagctacaacgaCGTCGATGT-3'
hgd31	5'-AGGGCGGGAggctagctacaacgaGTGGTTGCC-3'
hgd32	5'-TGGCCCTGAggctagctacaacgaCGAGTTTCC-3'
hgd33	5'-ACCTCTGCAGgctagctacaacgaCGTGGCCCT-3'
hgd34	5'-CGGAGGGTAggctagctacaacgaCTCTGCACC-3'
hgd35	5'-GGCGGCACAggctagctacaacgaCTGGCTCCC-3'
hgd36	5'-CGGGCGGCAGgctagctacaacgaACCTGGCTC-3'
hgd37	5'-AGGGATCCAggctagctacaacgaGAAGCAGAG-3'
hgd38	5'-GGGTAGGGAggctagctacaacgaCCATGAAGC-3'
hgd39	5'-GGGCTGAGAggctagctacaacgaTCCAGGGGG-3'
hgd40	5'-GTGGATGGAggctagctacaacgaGTCTTGAG-3'
hgd41	5'-CGTGGTGGAggctagctacaacgaGGACGTCTT-3'
hgd42	5'-GGGGGTAGAggctagctacaacgaGGAGAGGGG-3'
hgd43	5'-GGAGGAGGAggctagctacaacgaGAGGCCGGG-3'
hgd44	5'-GCCCCCGAggctagctacaacgaAAGGAGGAG-3'
hgd45	5'-CCGGGGAGAggctagctacaacgaGTCCTTCGG-3'
hgd46	5'-GGACAGCGAggctagctacaacgaGGGTCCGGG-3'
hgd47	5'-TGGGGTGGAggctagctacaacgaAGCGATGGG-3'
hgd48	5'-CTTGAGGCAGgctagctacaacgaTCTTTCTCG-3'
hgd49	5'-CACCTGGTAggctagctacaacgaTTGAGGCAC-3'

Nombre	Secuencia de ADNzima
hgd50	5' -GCAGGGGCaggctagctacaacgaCTGGTACTT-3'
hgd51	5' -CCAGCTTCaggctagctacaacgaGCTGTCGGG-3'
hgd52	5' -GTGGGACGaggctagctacaacgaTCCAGCTTC-3'
hgd53	5' -GGAGTGGGaggctagctacaacgaGACTCCAGC-3'
hgd54	5' -ATGCTGCCaggctagctacaacgaGGGAGTGGG-3'
hgd55	5' -GGGCGGTCaggctagctacaacgaGCTGCCACG-3'
hgd56	5' -GAGGCTCCaggctagctacaacgaCCAGGGCGG-3'
hgd57	5' -GTGGGTCGaggctagctacaacgaGAGGAGGCT-3'
hgd58	5' -AGGTGGTGaggctagctacaacgaGGGGTGGTG-3'
hgd59	5' -ACTCGGGCaggctagctacaacgaGTAGGGCGG-3'
hgd60	5' -GGAGCTGTaggctagctacaacgaTCGGGCACG-3'
hgd61	5' -GGACTTGCaggctagctacaacgaCCGAAGCCG-3'
hgd62	5' -GGGCCTGGaggctagctacaacgaTTGCATCCG-3'
hgd63	5' -TGTGCTGGaggctagctacaacgaCGGGCCTTG-3'
hgd64	5' -GTTACACAggctagctacaacgaTCCCTGCCT-3'
hgd65	5' -CAGTTCACaggctagctacaacgaACTCCCTGC-3'
hgd66	5' -CACAGTTCaggctagctacaacgaACACTCCCT-3'
hgd67	5' -GTTGCCCCaggctagctacaacgaAGTTCACAC-3'
hgd68	5' -TCGCCGCCaggctagctacaacgaAGTGGGGTC-3'
hgd69	5' -CCCGTGCCaggctagctacaacgaCTCGCCGCC-3'
hgd70	5' -GGCGTTGCaggctagctacaacgaAGGTAGTGT-3'

ES 2 304 633 T3

Secuencia 1	1080	TCGGCCCGGAGGACGAGAAAGAGTGCTCAAGTACCAGGTGCCCCGCCCCGACAGCATG	1139
Secuencia 2	674	TCGGCCCGGAGGACGAGAAAGAGTGCTCAAGTACCAGGTGCCCCGCCCCGACAGCATG	733
Secuencia 3	1081	TCGGCCCGGAGGACGAGAAAGAGTGCTCAAGTACCAGGTGCCCCGCCCCGACAGCATG	1140
Secuencia 1	1140	AAGCTGGAGTCGTCCC ACTCCCGTGGCAGCATGACCGCCCTGGGTGGAGCCTCCTCGTCG	1199
Secuencia 2	734	AAGCTGGAGTCGTCCC ACTCCCGTGGCAGCATGACCGCCCTGGGTGGAGCCTCCTCGTCG	793
Secuencia 3	1141	AAGCTGGAGTCGTCCC ACTCCCGTGGCAGCATGACCGCCCTGGGTGGAGCCTCCTCGTCG	1200
Secuencia 1	1200	ACCCACCACCCCATCA CCACCTACCCGCCCTACGTGCCGAGTACAGCTCCGGACTCTTC	1259
Secuencia 2	794	ACCCACCACCCCATCA CCACCTACCCGCCCTACGTGCCGAGTACAGCTCCGGACTCTTC	853
Secuencia 3	1201	ACCCACCACCCCATCA CCACCTACCCGCCCTACGTGCCGAGTACAGCTCCGGACTCTTC	1260
Secuencia 1	1260	CCCCCAGCAGCCTGCTGGGGCGGCTCCCCACCGGCTTCGGATGCAAGTCCAGGCCCAAG	1319
Secuencia 2	854	CCCCCAGCAGCCTGCTGGGGCGGCTCCCCACCGGCTTCGGATGCAAGTCCAGGCCCAAG	913
Secuencia 3	1261	CCCCCAGCAGCCTGCTGGGGCGGCTCCCCACCGGCTTCGGATGCAAGTCCAGGCCCAAG	1320
Secuencia 1	1320	GCCCGGTCCAGCACAGAAGGCAGGGAGTGTGTGAAGTGTGGGGCAACCTCGACCCCACTG	1379
Secuencia 2	914	GCCCGGTCCAGCACAG ---GCAGGGAGTGTGTGAAGTGTGGGGCAACCTCGACCCCACTG	970
Secuencia 3	1321	GCCCGGTCCAGCACAGAAGGCAGGGAGTGTGTGAAGTGTGGGGCAACCTCGACCCCACTG	1380
Secuencia 1	1380	TGGCGGCGAGATGGCA CGGGACACTAAGTGTGCAACGCCTGCGGGCTCTATCAGAAAATG	1439
Secuencia 2	971	TGGCGGCGAGATGGCA CGGGACACTAAGTGTGCAACGCCTGCGGGCTCTATCAGAAAATG	1030
Secuencia 3	1381	TGGCGGCGAGATGGCA CGGGACACTAAGTGTGCAACGCCTGCGGGCTCTATCAGAAAATG	1440
Secuencia 1	1440	AACGGACAGAACCGGC CCCTCATTAAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCTGCAGCCAGGAGAGCA	1499
Secuencia 2	1031	AACGGACAGAACCGGC CCCTCATTAAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCTGCAGCCAGGAGAGCA	1090
Secuencia 3	1441	AACGGACAGAACCGGC CCCTCATTAAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCTGCAGCCAGGAGAGCA	1500
Secuencia 1	1500	GGGACGTCTGTGCGA ACTGTGACACCAACCAACCACTCTGGAGGAGGAATGCCAAT	1559
Secuencia 2	1091	GGGACGTCTGTGCGA ACTGTGACACCAACCAACCACTCTGGAGGAGGAATGCCAAT	1150
Secuencia 3	1501	GGGACGTCTGTGCGA ACTGTGACACCAACCAACCACTCTGGAGGAGGAATGCCAAT	1560
Secuencia 1	1560	GGGGACCTGTCTGCA ATGCCTGTGGGCTCTACTACAAGCTTCACAATATTAACAGACCC	1619
Secuencia 2	1151	GGGGACCTGTCTGCA ATGCCTGTGGGCTCTACTACAAGCTTCACAATATTAACAGACCC	1210
Secuencia 3	1561	GGGGACCTGTCTGCA ATGCCTGTGGGCTCTACTACAAGCTTCACAATATTAACAGACCC	1620
Secuencia 1	1620	CTGACTATGAAGAAGG AAGGCATCCAGACCAAGAAACCGAAAAATGTCTAGCAAAATCCAAA	1679
Secuencia 2	1211	CTGACTATGAAGAAGG AAGGCATCCAGACCAAGAAACCGAAAAATGTCTAGCAAAATCCAAA	1270
Secuencia 3	1621	CTGACTATGAAGAAGG AAGGCATCCAGACCAAGAAACCGAAAAATGTCTAGCAAAATCCAAA	1680
Secuencia 1	1680	AAGTGCAAAAAAGTGC ATGACTCACTGGAGGACTTCCCCAAGAACAGCTCGTTTAAACCG	1739
Secuencia 2	1271	AAGTGCAAAAAAGTGC ATGACTCACTGGAGGACTTCCCCAAGAACAGCTCGTTTAAACCG	1330
Secuencia 3	1681	AAGTGCAAAAAAGTGC ATGACTCACTGGAGGACTTCCCCAAGAACAGCTCGTTTAAACCG	1740
Secuencia 1	1740	GCCGCCCTCTCCAGACACATGTCTCCTGAGCCACATCTCGCCCTTCAGCCACCCAGC	1799
Secuencia 2	1331	GCCGCCCTCTCCAGACACATGTCTCCTGAGCCACATCTCGCCCTTCAGCCACCCAGC	1390
Secuencia 3	1741	GCCGCCCTCTCCAGACACATGTCTCCTGAGCCACATCTCGCCCTTCAGCCACCCAGC	1800
Secuencia 1	1800	CACATGCTGACCACGC CCACGCCGATGCACCCGCCATCCAGCCTGTCTTTGGACCACAC	1859
Secuencia 2	1391	CACATGCTGACCACGC CCACGCCGATGCACCCGCCATCCAGCCTGTCTTTGGACCACAC	1450
Secuencia 3	1801	CACATGCTGACCACGC CCACGCCGATGCACCCGCCATCCAGCCTGTCTTTGGACCACAC	1860
Secuencia 1	1860	CACCCCTCCAGCATGG TCACCGCCATGGGTTAGAGCCCTGCTCGATGCTCACAGGGCCCC	1919
Secuencia 2	1451	CACCCCTCCAGCATGG TCACCGCCATGGGTTAGAGCCCTGCTCGATGCTCACAGGGCCCC	1510
Secuencia 3	1861	CACCCCTCCAGCATGG TCACCGCCATGGGTTAGAGCCCTGCTCGATGCTCACAGGGCCCC	1920
Secuencia 1	1920	CAGCGAGAGTCCTTGC AGTCCCTTTTCGACTTGCATTTTTGCAGGAGCAGTATCATGAAGC	1979
Secuencia 2	1511	CAGCGAGAGTCCTTGC AGTCCCTTTTCGACTTGCATTTTTGCAGGAGCAGTATCATGAAGC	1570
Secuencia 3	1921	CAGCGAGAGTCCTTGC AGTCCCTTTTCGACTTGCATTTTTGCAGGAGCAGTATCATGAAGC	1980
Secuencia 1	1980	CTAAACGCGATGGATA TATGTTTTTGAAGGCAGAAAGCAAAATTATGTTGCCACTTTGC	2039
Secuencia 2	1571	CTAAACGCGATGGATA TATGTTTTTGAAGGCAGAAAGCAAAATTATGTTGCCACTTTGC	1630
Secuencia 3	1981	CTAAACGCGATGGATA TATGTTTTTGAAGGCAGAAAGCAAAATTATGTTGCCACTTTGC	2040
Secuencia 1	2040	AAAGGAGCTCACTGTG GTGTCTGTGTTCCAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAATA	2099
Secuencia 2	1631	AAAGGAGCTCACTGTG GTGTCTGTGTTCCAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAATA	1690
Secuencia 3	2041	AAAGGAGCTCACTGTG GTGTCTGTGTTCCAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAATA	2100

ES 2 304 633 T3

Secuencia 1	2100	AGCCATTCTGACTCAT ATCCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGCTGTGAAAAAAAAA - T	2158
Secuencia 2	1691	AGCCATTCTGACTCAT ATCCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGCTGTGAAAAAAAAAAT	1750
Secuencia 3	2101	AGCCATTCTGACTCAT ATCCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGCTGTGAAAAAAAAAAT	2160
Secuencia 1	2159	CTGAACATTGCATAT AACTTATATTGTAAGAAATACTGTACAATGACTTTATTGCATCT	2218
Secuencia 2	1751	CTGAACATTGCATAT AACTTATATTGTAAGAAATACTGTACAATGACTTTATTGCATCT	1810
Secuencia 3	2161	CTGAACATTGCATAT AACTTATATTGTAAGAAATACTGTACAATGACTTTATTGCATCT	2220
Secuencia 1	2219	GGGTAGCTGTAAGGCA TGAAGGATGCCAAGAAGTTTAAGGAATATGGGAGAAATAGTGTG	2278
Secuencia 2	1811	GGGTAGCTGTAAGGCA TGAAGGATGCCAAGAAGTTTAAGGAATATGGGAGAAATAGTGTG	1870
Secuencia 3	2221	GGGTAGCTGTAAGGCA TGAAGGATGCCAAGAAGTTTAAGGAATATGGGAGAAATAGTGTG	2280
Secuencia 1	2279	GAAATTAAGAAGAAAC TAGGTCTGATATTCAAATGGACAACTGCCAGTTTGTTCCTT	2338
Secuencia 2	1871	GAAATTAAGAAGAAAC TAGGTCTGATATTCAAATGGACAACTGCCAGTTTGTTCCTT	1930
Secuencia 3	2281	GAAATTAAGAAGAAAC TAGGTCTGATATTCAAATGGACAACTGCCAGTTTGTTCCTT	2340
Secuencia 1	2339	TCACTGGCCACAGTTG TTTGATGCATTAAAAGAAAAAAGAAAAAGAGAAAAAG	2398
Secuencia 2	1931	TCACTGGCCACAGTTG TTTGATGCATTAAAAGAAAAAAGAAAAAGAGAAAAAG	1990
Secuencia 3	2341	TCACTGGCCACAGTTG TTTGATGCATTAAAAGAAAAAAGAAAAAGAGAAAAAG	2399
Secuencia 1	2399	A-----	2399
Secuencia 2	1991	AAAAAAAAAGAAAAAA GTTGTAGGCGAATCATTTGTTCAAAGCTGTTGGCCCTCTGCAAA	2050
Secuencia 3	2400	AAAAAAAAAGAAAAAA GTTGTAGGCGAATCATTTGTTCAAAGCTGTTGGCC -TCTGCAAA	2458
Secuencia 1	****	-----	****
Secuencia 2	2051	GGAAATACCAGTTCTG GGCAATCAGTGTTACCGTTCACCAGTTGCCATTGAGGGTTTCAG	2110
Secuencia 3	2459	GGAAATACCAGTTCTG GGCAATCAGTGTTACCGTTCACCAGTTGCCATTGAGGGTTTCAG	2518
Secuencia 1	****	-----	****
Secuencia 2	2111	AGAGCCTTTTCTAGG CCTACATGCTTTGTGAACAAGTCCCTGTAATTGTTGTTGTATG	2170
Secuencia 3	2519	AGAGCCTTTTCTAGG CCTACATGCTTTGTGAACAAGTCCCTGTAATTGTTGTTGTATG	2578
Secuencia 1	****	-----	****
Secuencia 2	2171	TATAATTCAAAGCACC AAAATAAGAAAAGATGTAGATTTATTTTCATCATATTATACAGAC	2230
Secuencia 3	2579	TATAATTCAAAGCACC AAAATAAGAAAAGATGTAGATTTATTTTCATCATATTATACAGAC	2638
Secuencia 1	****	-----	****
Secuencia 2	2231	CGAACTGTTGTATAAA TTTATTTACTGCTAGTCTTAAGAACTGCTTCTTTTCGTTTGT	2290
Secuencia 3	2639	CGAACTGTTGTATAAA TTTATTTACTGCTAGTCTTAAGAACTGCTTCTTTTCGTTTGT	2698
Secuencia 1	****	-----	****
Secuencia 2	2291	GTTTCAATATTTTCCT TCTCTCTCAATTTTCGGTTGAATAAACTAGATTACATTGAGTTG	2350
Secuencia 3	2699	GTTTCAATATTTTCCT TCTCTCTCAATTTTCGG-----	2731
Secuencia 1	****	-----	****
Secuencia 2	2351	GCAAAAAAAAAAAAA	2365
Secuencia 3	****	-----	****

GCGCCGTCTTGATACTTTCAGAAAGAATGCATTCCCTGTAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAATACTGAGAGAGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGACGG
 AGGGAGAGCGAGACAGAGCGAGCAACGCAATCTGACCGAGCAGGTCTGAC
 GCCGCCGCTCCTCCTCCTCTCTGCTCTTCGCTACCCAGGTGACCCGAGG
 AGGGACTCCGCCTCCGAGCGGTGAGGACCCCGGTGCAGAGGAGCCTGGC
 TCGCAGAATTGCAGAGTCGTGCCCCCTTTTACAACTGGTCCCGTTTTA
 TTCTGCCATACCCAGTTTGTGATTTTGTCTTCCCCTTCTTCTTTTGC
 TAAACGACCCCTCCAAGATAATTTTAAAAAACCTTCTCCTTTGCTCACC
 TTTGCTTCCCAGCCTTCCCATCCCCCACCAGAAAGCAAATCATTCAACGA
 CCCCCGACCCCTCCGACGGCAGGAGCCCCCGACCTCCCAGGCGGACCGCC
 CTCCCTCCCCCGCGCGGGTTCCGGGCCCCGGGAGAGGGCGCGAGCAGAG
 CCGAGGCCATGGAGGTGACGGCGGACCGCCGCGCTGGGTGAGCCACCAC
 CACCCCGCCGTGCTCAACGGGCAGCACCCGGACACGCACCAACCCGGGCT
 CAGCCACTCCTACATGGACGCGGCGCAGTACCCGCTGCCGGAGGAGGTGG
 ATGTGCTTTTTAACATCGACGGTCAAGGCAACCACGTCCCGCCCTACTAC
 GGAAACTCGGTGAGGGCCACGGTGCAGAGGTACCTCCGACCCACCACGG
 GAGCCAGGTGTGCCGCCGCTCTGCTTCATGGATCCCTACCTGGCTGG
 ACGGCGGCAAGCCCTGGGCAGCCACCACACCGCTCCCCCTGGAATCTC
 AGCCCCCTTCTCCAAGACGTCCATCCACCACGGCTCCCCGGGGCCCCCTC
 CGTCTACCCCCCGCTCGTCTCCTCTTGTGCGGGGGCCACGCCAGCC
 CGACCTCTTCACTTCCCGCCACCCCGCCGAAGGACGTCTCCCGGAC
 CCATCGCTGTCCACCCAGGCTCGGCCGCTCGGCCCGGACGAGCAGAGAA
 AGAGTGCCCTCAAGTACCAGGTGCCCTGCCCGACAGCATGAAGCTGGAGT
 CGTCCCACTCCCGTGGCAGCATGACCGCCCTGGGTGGAGCCTCCTCGTCG
 ACCCACCACCCCATCACCACTACCCGCCCTACGTGCCCGAGTACAGCTC
 CGGACTCTTCCCCCCCAGCAGCCTGCTGGGCGGCTCCCCACCGGCTTCG
 GATGCAAGTCCAGGCCCAAGGCCCGGTCCAGCACAGAAGGCAGGGAGTGT
 GTGAACTGTGGGCAACCTCGACCCCACTGTGGCGGCGAGATGGCACGGG
 ACACTACCTGTGCAACGCCTGCGGGCTCTTACAAAAAGAACGGACAGA
 ACCGGCCCCCTCAATAAGCCCAAGCGAAGGCTCTGTCAGCCAGGAGAGCA
 GGGACGCTCGCGAACTCTCAGACCACCACAACCACACTCTGGAGGAG
 GAGTCCCAATGGGACCCCTCTGCAATGCTCTGGGCTCTACTACAAGC
 TTCACAAATAACAGACCCCTGACTAAGAAGGAAGGCGCCAGACC
 AGAAACCGAAAAATCTAGCAATCCAAAAAGTGCAAAAAAGTCAAGA
 CTCACTGGAGGACTTCCCAAGAACAGCTCTTAACCCGCGCGCCCTCT
 CCAGACACCTCCTCCTGAGCCACCTCTCGCCCTTACGCCACCCAGC
 CACAGCTGACCACGCCCCACGCCGATGCACCCGCCACAGCCTCCTT
 TGGACCACACCACCCCTCCAGCATGCTCACCGCCATGGCTAGAGCCCTG
 CTCGATGCTCACAGGGCCCCCAGCGAGATCCCTGCATCCCTTTGACT
 TGCATTTTTCAGGAGCACTATCATGAAGCCTAAACGCGATGGATATAG
 TTTTGAAGGCAGAAAGCAAAATTAAGCTTGCCACTTTGCAAAGGAGCTC
 ACTGCTGCTCTGCTCCAACCACTGATCTGGACCCCTCTGATTA
 AGCCATCTGACTCATCCCTATTTAACAGGCTCTATGCTTGAA
 AAAAAAAAGCTGAACAATGCATATAACTTATATGAAGAACTACT
 ACAATGACTTTATGCACTCTGGTAGCTTAAGGCATGAAGGATGCCAAG
 AAGTTAAGGAATATGGAGAAATAGTGGAAATTAAGAAGAACTAGG
 TCTGATATCAAAATGGACAACTGCCACTTTCTTCTTTCACTGGCCA
 CACTTCTTCTGATGCATTAAGAAAGAAAGAAAAAGAGAAAGAA
 AAAAAAGAAAAAACTTCTAGGCGAATCATTTCTCAAAGCTCTGGCC
 TCTGCAAGGAAATACCAGTCTGGGCAATCATCTATACCCTACCACT
 TGCCATGAGGCTTTCAGAGAGCCTTTTTCTAGGCCTACATGCTTTGA
 ACAAGCCCTCTAATTTCTTTCTTCTATGATATTAAGCACCAAAATA
 AGAAAGATGAGATTTATTTCTCAATTAACAGACCGAATCTCTTA
 TAAATTTTACTGCTAGCTTAAGAAGCTTTCTTTCTTTCTTTCT
 TTCAATTTTCTTCTCTCTCAATTTTC

Fig. 4 A

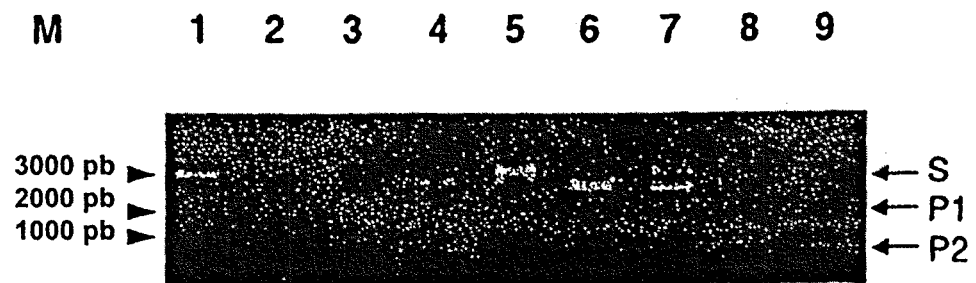


Fig. 5

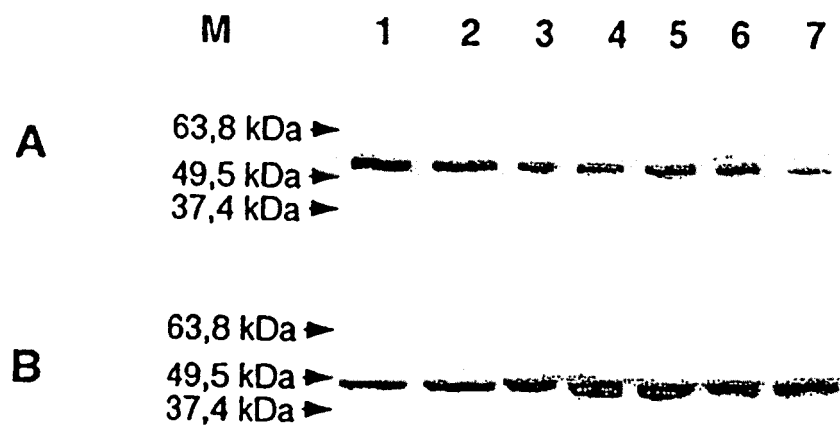


Fig. 6

ES 2 304 633 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Universidad Philipps de Marburgo	
5	<120> Procedimiento para la preparación de un fármaco específico para células y/o tejidos y/o fases de enfermedad	
	<130> 04802618.1 - 2403	
	<140> PCT/DE2004002197	
	<141> 01-10-2004	
10	<150> DE 10346487.5	
	<151> 02-10-2003	
	<160> 73	
	<170> PatentIn versión 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 33	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd1 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
25	<400> 1	
	tcggtcagag gctagctaca acgatgcgtt gct	33
30	<210> 2	
	<211> 33	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hdg2 contra ARNm de GATA-3	
40	<222> (1)..(33)	
	<400> 2	
45	ggcgtagcag gctagctaca acgactgctc ggt	33
	<210> 3	
	<211> 33	
	<212> ADN	
50	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd3 contra ARNm de GATA-3	
55	<222> (1)..(33)	
	<400> 3	
60	ggcggcgtag gctagctaca acgagacctg ctc	33
	<210> 4	
	<211> 33	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	

ES 2 304 633 T3

	<221> ADNzima hgd4 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
5	<400> 4	
	ctcgggtcag gctagctaca acgactgggt agc	33
10	<210> 5	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<220>	
	<221> ADNzima hgd5 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
20	<400> 5	
	tcctctgcag gctagctaca acgacggggt cct	33
25	<210> 6	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<220>	
	<221> ADNzima hgd6 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
35	<400> 6	
	actctgcaag gctagctaca acgatctgcg agc	33
40	<210> 7	
	<211> 33	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd7 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
50	<400> 7	
	gggcgacgag gctagctaca acgatctgca att	33
55	<210> 8	
	<211> 33	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd8 contra ARNm de GATA-3	
65	<222> (1)..(33)	

ES 2 304 633 T3

	<400> 8	
	aaggggag gctagctaca acgagactct gca	33
5	<210> 9	
	<211> 33	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd9 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
15	<400> 9	
	aaaacgggag gctagctaca acgacaggtt gta	33
20	<210> 10	
	<211> 33	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd10 contra ARNm de GATA-3	
30	<222> (1)..(33)	
	<400> 10	
35	agaataaaag gctagctaca acgaggacc agg	33
	<210> 11	
	<211> 33	
40	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd11 contra ARNm de GATA-3	
45	<222> (1)..(33)	
	<400> 11	
50	atggcagaag gctagctaca acgaaaaacg gga	33
	<210> 12	
	<211> 33	
55	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd12 contra ARNm de GATA-3	
60	<222> (1)..(33)	
	<400> 12	
65	aactgggtag gctagctaca acgaggcaga ata	33

ES 2 304 633 T3

	<210> 13	
	<211> 33	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd13 contra ARNm de GATA-3	
10	<222> (1)..(33)	
	<400> 13	
15	atccaaaaag gctagctaca acgatgggta tgg	33
	<210> 14	
	<211> 33	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd14 contra ARNm de GATA-3	
25	<222> (1)..(33)	
	<400> 14	
30	aggggaagag gctagctaca acgaaaaaat cca	33
	<210> 15	
	<211> 33	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd15 contra ARNm de GATA-3	
40	<222> (1)..(33)	
	<400> 15	
45	ttttaaaaag gctagctaca acgatatctt gga	33
	<210> 16	
	<211> 33	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
55	<221> ADNzima hgd16 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
	<400> 16	
60	gtggggggag gctagctaca acgagggaag gct	33
	<210> 17	
65	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 304 633 T3

	<220>	
	<221> ADNzima hgd17 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
5	<400> 17	
	gttgaatgag gctagctaca acgattgctt tcg	33
10	<210> 18	
	<211> 33	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd18 contra ARNm de GATA-3	
20	<222> (1)..(33)	
	<400> 18	
	gtcgttgaag gctagctaca acgagatttg ctt	33
25	<210> 19	
	<211> 33	
	<212> ADN	
30	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd19 contra ARNm de GATA-3	
35	<222> (1)..(33)	
	<400> 19	
40	ggcccggaag gctagctaca acgaccgcgc gcg	33
	<210> 20	
	<211> 33	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd20 contra ARNm de GATA-3	
50	<222> (1)..(33)	
	<400> 20	
55	tcacctccag gctagctaca acgaggcctc ggc	33
	<210> 21	
	<211> 33	
60	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
65	<221> ADNzima hgd21 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	

ES 2 304 633 T3

	<400> 21	
	ccgccgtcag gctagctaca acgactccat ggc	33
5	<210> 22	
	<211> 33	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd22 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
15	<400> 22	
	ggtggctcag gctagctaca acgaccagcg cgg	33
20	<210> 23	
	<211> 33	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd23 contra ARNm de GATA-3	
30	<222> (1)..(33)	
	<400> 23	
35	cgttgagcag gctagctaca acgaggcggg gtg	33
	<210> 24	
	<211> 33	
40	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd24 contra ARNm de GATA-3	
45	<222> (1)..(33)	
	<400> 24	
50	ccgcgtccag gctagctaca acgagtagga gtg	33
	<210> 25	
	<211> 33	
55	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd25 contra ARNm de GATA-3	
60	<222> (1)..(33)	
	<400> 25	
65	cagcgggtag gctagctaca acgatgcgcc gcg	33

ES 2 304 633 T3

	<210> 26	
	<211> 33	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd26 contra ARNm de GATA-3	
10	<222> (1)..(33)	
	<400> 26	
15	gcacatccag gctagctaca acgactcctc cgg	33
	<210> 27	
	<211> 33	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd27 contra ARNm de GATA-3	
25	<222> (1)..(33)	
	<400> 27	
30	aaaagcacag gctagctaca acgaccacct cct	33
	<210> 28	
	<211> 33	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd28 contra ARNm de GATA-3	
40	<222> (1)..(33)	
	<400> 28	
45	taaaaagcag gctagctaca acgaatccac ctc	33
	<210> 29	
	<211> 33	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
55	<221> ADNzima hgd29 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
	<400> 29	
60	gaccgtcgag gctagctaca acgagttaaa aag	33
	<210> 30	
65	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 304 633 T3

	<220>	
	<221> ADNzima hgd30 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
5	<400> 30	
	ttgccttgag gctagctaca acgacgtcga tgt	33
10	<210> 31	
	<211> 33	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd31 contra ARNm de GATA-3	
20	<222> (1)..(33)	
	<400> 31	
	agggcgggag gctagctaca acgagtgggt gcc	33
25	<210> 32	
	<211> 33	
	<212> ADN	
30	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd32 contra ARNm de GATA-3	
35	<222> (1)..(33)	
	<400> 32	
40	tggccctgag gctagctaca acgacgagtt tcc	33
	<210> 33	
	<211> 33	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd33 contra ARNm de GATA-3	
50	<222> (1)..(33)	
	<400> 33	
55	acctctgcag gctagctaca acgacgtggc cct	33
	<210> 34	
	<211> 33	
60	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
65	<221> ADNzima hgd34 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	

ES 2 304 633 T3

	<400> 34	
	cggagggtag gctagctaca acgactctgc acc	33
5	<210> 35	
	<211> 33	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd35 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
15	<400> 35	
	ggcggcacag gctagctaca acgactggct ccc	33
20	<210> 36	
	<211> 33	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd36 contra ARNm de GATA-3	
30	<222> (1)..(33)	
	<400> 36	
35	cgggcggcag gctagctaca acgaacctgg ctc	33
	<210> 37	
	<211> 33	
40	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd37 contra ARNm de GATA-3	
45	<222> (1)..(33)	
	<400> 37	
50	agggatccag gctagctaca acgagaagca gag	33
	<210> 38	
	<211> 33	
55	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd38 contra ARNm de GATA-3	
60	<222> (1)..(33)	
	<400> 38	
65	gggtaggagg gctagctaca acgaccatga agc	33

ES 2 304 633 T3

	<210> 39	
	<211> 33	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd39 contra ARNm de GATA-3	
10	<222> (1)..(33)	
	<400> 39	
15	gggctgagag gctagctaca acgatccagg ggg	33
	<210> 40	
	<211> 33	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd40 contra ARNm de GATA-3	
25	<222> (1)..(33)	
	<400> 40	
30	gtggatggag gctagctaca acgagtcttg gag	33
	<210> 41	
	<211> 33	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd41 contra ARNm de GATA-3	
40	<222> (1)..(33)	
	<400> 41	
45	cgtggtagag gctagctaca acgaggacgt ctt	33
	<210> 42	
	<211> 33	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
55	<221> ADNzima hgd42 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
	<400> 42	
60	gggggtagag gctagctaca acgaggagag ggg	33
	<210> 43	
65	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 304 633 T3

	<220>	
	<221> ADNzima hgd43 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
5	<400> 43	
	ggaggaggag gctagctaca acgagaggcc ggg	33
10	<210> 44	
	<211> 33	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd44 contra ARNm de GATA-3	
20	<222> (1)..(33)	
	<400> 44	
	gccccccgag gctagctaca acgaaaggag gag	33
25	<210> 45	
	<211> 33	
	<212> ADN	
30	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd45 contra ARNm de GATA-3	
35	<222> (1)..(33)	
	<400> 45	
40	ccggggagag gctagctaca acgagtcctt cgg	33
	<210> 46	
	<211> 33	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd46 contra ARNm de GATA-3	
50	<222> (1)..(33)	
	<400> 46	
55	ggacagcgag gctagctaca acgaggtcc ggg	33
	<210> 47	
	<211> 33	
60	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
65	<221> ADNzima hgd47 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	

ES 2 304 633 T3

	<400> 47	
	tggggtggag gctagctaca acgaagcgat ggg	33
5	<210> 48	
	<211> 33	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd48 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
15	<400> 48	
	cttgaggcag gctagctaca acgatctttc tcg	33
20	<210> 49	
	<211> 33	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd49 contra ARNm de GATA-3	
30	<222> (1)..(33)	
	<400> 49	
35	cacctggtag gctagctaca acgattgagg cac	33
	<210> 50	
	<211> 33	
40	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd50 contra ARNm de GATA-3	
45	<222> (1)..(33)	
	<400> 50	
50	gcaggggcag gctagctaca acgactggta ctt	33
	<210> 51	
	<211> 33	
55	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd51 contra ARNm de GATA-3	
60	<222> (1)..(33)	
	<400> 51	
65	ccagcttcag gctagctaca acgagctgtc ggg	33

ES 2 304 633 T3

	<210> 52	
	<211> 33	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd52 contra ARNm de GATA-3	
10	<222> (1)..(33)	
	<400> 52	
15	gtgggacgag gctagctaca acgatccagc ttc	33
	<210> 53	
	<211> 33	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd53 contra ARNm de GATA-3	
25	<222> (1)..(33)	
	<400> 53	
30	ggagtgggag gctagctaca acgagactcc agc	33
	<210> 54	
	<211> 33	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd54 contra ARNm de GATA-3	
40	<222> (1)..(33)	
	<400> 54	
45	atgctgccag gctagctaca acgagggagt ggg	33
	<210> 55	
	<211> 33	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
55	<221> ADNzima hgd55 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
	<400> 55	
60	gggcggtcag gctagctaca acgagctgcc acg	33
	<210> 56	
65	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 304 633 T3

	<220>	
	<221> ADNzima hgd56 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
5	<400> 56	
	gaggctccag gctagctaca acgaccaggg cgg	33
10	<210> 57	
	<211> 33	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd57 contra ARNm de GATA-3	
20	<222> (1)..(33)	
	<400> 57	
	gtgggtcgag gctagctaca acgagaggag gct	33
25	<210> 58	
	<211> 33	
	<212> ADN	
30	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd58 contra ARNm de GATA-3	
35	<222> (1)..(33)	
	<400> 58	
40	aggtggtgag gctagctaca acgaggggtg gtg	33
	<210> 59	
	<211> 33	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd59 contra ARNm de GATA-3	
50	<222> (1)..(33)	
	<400> 59	
55	actcgggcag gctagctaca acgagtaggg cgg	33
	<210> 60	
	<211> 33	
60	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
65	<221> ADNzima hgd60 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	

ES 2 304 633 T3

	<400> 60	
	ggagctgtag gctagctaca acgatcgggc acg	33
5	<210> 61	
	<211> 33	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd61 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
15	<400> 61	
	ggactgcag gctagctaca acgaccgaag ccg	33
20	<210> 62	
	<211> 33	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd62 contra ARNm de GATA-3	
30	<222> (1)..(33)	
	<400> 62	
35	gggcctggag gctagctaca acgattgcat ccg	33
	<210> 63	
	<211> 33	
40	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd63 contra ARNm de GATA-3	
45	<222> (1)..(33)	
	<400> 63	
50	tgtgctggag gctagctaca acgacgggcc ttg	33
	<210> 64	
	<211> 33	
55	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd64 contra ARNm de GATA-3	
60	<222> (1)..(33)	
	<400> 64	
65	gttcacacag gctagctaca acgatccctg cct	33

ES 2 304 633 T3

	<210> 65	
	<211> 33	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd65 contra ARNm de GATA-3	
10	<222> (1)..(33)	
	<400> 65	
15	cagttcacag gctagctaca acgaactccc tgc	33
	<210> 66	
	<211> 33	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd66 contra ARNm de GATA-3	
25	<222> (1)..(33)	
	<400> 66	
30	cacagttcag gctagctaca acgaacactc cct	33
	<210> 67	
	<211> 33	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> ADNzima hgd67 contra ARNm de GATA-3	
40	<222> (1)..(33)	
	<400> 67	
45	gttgccccag gctagctaca acgaagtcca cac	33
	<210> 68	
	<211> 33	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
55	<221> ADNzima hgd68 contra ARNm de GATA-3	
	<222> (1)..(33)	
	<400> 68	
60	tcgccgccag gctagctaca acgaagtggg gtc	33
	<211> 33	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	

ES 2 304 633 T3

<221> ADNzima hgd69 contra ARNm de GATA-3

<222> (1)..(33)

5 <400> 69

cccggtgccag gctagctaca acgactegcc gcc

33

10 <210> 70

<211> 33

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15 <220>

<221> ADNzima hgd70 contra ARNm de GATA-3

<222> (1)..(33)

20 <400> 70

ggcgttgcag gctagctaca acgaaggtag tgt

33

25 <210> 71

<211> 2399

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 71

35

ggcgccgtct tgatactttc agaaagaatg cattccctgt aaaaaaaaaa aaaaaaatact 60

gagagagggga gagagagaga gaagaagaga gagagacgga gggagagcga gacagagcga 120

40

gcaacgcaat ctgaccgagc aggtcgtacg ccgcccgcctc ctccctcctct ctgctcttcg 180

ctacccaggt gacccgagga gggactccgc ctccgagcgg ctgaggaccc cggtgcagag 240

gagcctggct cgcagaattg cagagtcgtc gccccttttt acaacctggt cccgttttat 300

45

tctgccgtac ccagtttttg gatTTTTgtc ttcccccttct tctctttgct aaacgacccc 360

tccaagataa tttttaaaaa accttctcct ttgctcacct ttgcttccca gccttcccat 420

50

ccccccaccg aaagcaaatac attcaacgac ccccgaccct ccgacggcag gagccccccg 480

55

60

65

ES 2 304 633 T3

	acctcccagg	cggaccgccc	tcctccccg	cgcgcgggtt	ccgggcccgg	cgagagggcg	540
	cgagcacagc	cgaggccatg	gaggtgacgg	cggaccagcc	gcgctgggtg	agccaccacc	600
5	accccgccgt	gctcaacggg	cagcaccg	acacgcacca	cccgggcctc	agccactcct	660
	acatggacgc	ggcgcagtac	ccgctgccc	aggaggtgga	tgtgcttttt	aacatcgacg	720
10	gtcaaggcaa	ccacgtccc	ccctactacg	gaaactcgg	cagggccacg	gtgcagaggt	780
	accctccgac	ccaccacggg	agccaggtgt	gccgcccggc	tctgcttcat	ggatccctac	840
	cctggctgga	cggcggcaaa	gccctgggca	gccaccacac	cgcctcccc	tggaatctca	900
15	gcccccttctc	caagacgtcc	atccaccacg	gctccccggg	gccccctctc	gtctaccccc	960
	cggcctcgtc	ctcctccttg	tcggggggcc	acgccagccc	gcacctcttc	accttccccg	1020
20	ccaccccgcc	gaaggacgtc	tcctccggacc	catcgctgtc	cacccagggc	tcggccgggt	1080
	cggcccggca	ggacgagaaa	gagtgcctca	agtaccaggt	gcccctgccc	gacagcatga	1140
	agctggagtc	gtccactcc	cgtggcagca	tgaccgccct	gggtggagcc	tcctcgtcga	1200
25	cccaccaccc	catcaccacc	taccgcctt	acgtgcccga	gtacagctcc	ggactcttcc	1260
	ccccagcag	cctgctgggc	ggctcccca	ccggcttcgg	atgcaagtcc	aggcccaagg	1320
	cccggtccag	cacagaaggc	agggagtgtg	tgaactgtgg	ggcaacctcg	acccactgt	1380
30	ggcggcgaga	tggcacggga	cactacctgt	gcaacgcctg	cgggctctat	cacaaaatga	1440
	acggacagaa	ccggcccctc	attaagccca	agcgaaggct	gtctgcagcc	aggagagcag	1500
35	ggacgtcctg	tgcgaactgt	cagaccacca	caaccacact	ctggaggagg	aatgccaatg	1560
	gggaccctgt	ctgcaatgcc	tgtgggtctt	actacaagct	tcacaatatt	aacagacccc	1620
	tgactatgaa	gaaggaaggc	atccagacca	gaaaccgaaa	aatgtctagc	aaatccaaaa	1680
40	agtgcaaaaa	agtgcatgac	tcactggagg	acttcccca	gaacagctcg	tttaaccgg	1740
	ccgccccctc	cagacacatg	tcctccctga	gccacatctc	gcccttcagc	cactccagcc	1800
	acatgctgac	cacgcccacg	ccgatgcacc	cgccatccag	cctgtccttt	ggaccacacc	1860
45	acccctccag	catggtcacc	gccatgggtt	agagccctgc	tcgatgtcga	cagggcccc	1920
	agcgagagtc	cctgcagtcc	ctttcgactt	gcatttttgc	aggagcagta	tcatgaagcc	1980
50	taaacgcgat	ggatatatgt	ttttgaaggc	agaaagcaaa	attatgtttg	ccactttgca	2040
	aaggagctca	ctgtggtgtc	tgtgttccaa	ccactgaatc	tggaacccat	ctgtgaataa	2100
	gccattctga	ctcatatccc	ctatttaaca	gggtctctag	tgctgtgaaa	aaaaaaatgc	2160
55	tgaacattgc	atataactta	tattgtaaga	aatactgtac	aatgacttta	ttgcatctgg	2220
	gtagctgtaa	ggcatgaagg	atgccaagaa	gtttaaggaa	tatgggagaa	atagtgtgga	2280
60	aattaagaag	aaactaggtc	tgatattcaa	atggacaaac	tgccagtttt	gtttcctttc	2340
	actggccaca	gttggtttgat	gcattaaaag	aaaataaaaa	aaagaaaaaa	gagaaaaga	2399

65 <210> 72
 <211> 2365
 <212> ADN

ES 2 304 633 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 72

5	tcccagcctt cccatcccc caccgaaagc aaatcattca acgacccccg accctccgac	60
	ggcaggagcc ccccgacctc ccaggcggac cgcccttccc tccccgcgcg gggtccgggc	120
10	ccggcgagag ggcgcgacga cagccgaggc catggagggtg acggcggacc agccgcgctg	180
	ggtgagccac caccaccccg ccgtgctcaa cgggcagcac ccggacacgc accacccggg	240
	cctcagccac tcctacatgg acgcggcgca gtacccgctg ccggaggagg tggatgtgct	300
15	ttttaacatc gacgggtcaag gcaaccacgt cccgccctac tacggaaact cggtcagggc	360
	cacggtgcag aggtaccctc cgacccacca cgggagccag gtgtgccgcc cgcctctgct	420
	tcattggtatc ctaccctggc tggacggcgg caaagccctg ggcagccacc acaccgcctc	480
20	cccctggaat ctacgcccct tctccaagac gtccatccac cacggctccc cggggcccct	540
	ctccgtctac cccccggcct cgtctctctc cttgtcgggg ggccacgcca gcccgcacct	600
25	cttcaccttc ccgcccaccc cgccgaagga cgtctccccg gacccatcgc tgtccacccc	660
	aggctcggcc ggctcggccc ggcaggacga gaaagagtgc ctcaagtacc aggtgcccct	720
	gcccgcacgc atgaagctgg agtcgtccca ctcccgtggc agcatgaccg ccctgggtgg	780
30	agcctcctcg tcgaccacc accccatcac cacctacccg ccctacgtgc ccgagtacag	840
	ctccggactc ttcccccca gcagcctgct gggcggtccc cccaccggct tcggatgcaa	900
35	gtccaggccc aaggcccggc ccagcacagg cagggaagtgt gtgaactgtg gggcaacctc	960
	gaccccaactg tggcggcgag atggcacggg aactacactg tgcaacgcct gcgggctcta	1020
	tcacaaaatg aacggacaga accggcccct cattaagccc aagcgaaggc tgtctgcagc	1080
40	caggagagca gggacgtcct gtgcgaactg tcagaccacc acaaccacac tctggaggag	1140
	gaatgccaat ggggacctg tctgcaatgc ctgtgggctc tactacaagc ttcacaatat	1200
45	taacagaccc ctgactatga agaaggaagg catccagacc agaaaccgaa aaatgtctag	1260
	caaatccaaa aagtgcacaa aagtgcattg ctactggag gacttcccca agaacagctc	1320
	gtttaacccg gccgcccctc ccagacacat gtcctccctg agccacatct cgcccttcag	1380
50	ccactccagc cacatgctga ccacgcccac gccgatgcac ccgccatcca gcctgtcctt	1440
	tggaccacac caccctcca gcatggtcac cgccatgggt tagagccctg ctcatgctc	1500
	acagggcccc cagcgagagt ccctgcagtc cctttcgact tgcatttttg caggagcagt	1560
55	atcatgaagc ctaaacgcga tggatatatg tttttgaagg cagaaagcaa aattatgttt	1620
	gccactttgc aaaggagctc actgtggtgt ctgtgttcca accactgaat ctggacccca	1680
60	tctgtgaata agccattctg actcatatcc cctatttaac agggctctcta gtgctgtgaa	1740
	aaaaaaaaat cctgaacatt gcatataact tatattgtaa gaaatactgt acaatgactt	1800
	tattgcatct gggtagctgt aaggcatgaa ggatgccaa aagtttaagg aatatgggag	1860
65	aaatagtgtg gaaattaaga agaaactagg tctgatattc aaatggacaa actgccagtt	1920

ES 2 304 633 T3

	ttgtttcctt	tcactggcca	cagttgtttg	atgcattaaa	agaaaataaa	aaaaagaaaa	1980
	aagagaaaaag	aaaaaaaaag	aaaaaagttg	taggcgaatc	atttggtcaa	agctgttggc	2040
5	cctctgcaaa	ggaaatacca	gttctgggca	atcagtggtta	ccgttcacca	gttgccattg	2100
	agggtttcag	agagcctttt	tctaggccta	catgctttgt	gaacaagtcc	ctgtaattgt	2160
	tgtttgatg	tataattcaa	agcaccaaaa	taagaaaaga	tgtagattta	tttcatcata	2220
10	ttatacagac	cgaactgttg	tataaattta	tttactgcta	gtcttaagaa	ctgctttctt	2280
	tcgtttgttt	gtttcaatat	tttccttctc	tctcaatttt	cggttgaata	aactagatta	2340
	cattcagttg	gcaaaaaaaaa	aaaaa				2365
15	<210> 73						
	<211> 2728						
	<212> ADN						
20	<213> <i>Homo sapiens</i>						
	<220>						
	<221> mutación						
25	<222> (57)..(57)						
	<220>						
	<221> mutación						
	<222> (59)..(59)						
30	<220>						
	<221> mutación						
	<222> (69)..(69)						
35	<220>						
	<221> sitio de unión de hgd40						
	<222> (909)..(927)						
40	<400> 73						
	ggcgccgtct	tgatactttc	agaaagaatg	cattccctgt	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaat	60
45	actgagagag	ggagagagag	agaagaagag	agagagacgg	aggagagagcg	agacagagcg	120
	agcaacgcaa	tctgaccgag	caggtcgtac	gccgcccgcct	cctcctcctc	tctgctcttc	180
	gctacccagg	tgacccgagg	agggactccg	cctccgagcg	gctgaggacc	ccggtgcaga	240
50	ggagcctggc	tcgcagaatt	gcagagtcgt	cgccccctttt	tacaacctgg	tcccgtttta	300
	ttctgccata	cccagttttt	ggatttttgt	cttccccctc	ttctctttgc	taaacgaccc	360
	ctccaagata	atttttaaaa	aacctttctc	tttgctcacc	tttgcttccc	agccttccca	420
55	tccccccacc	gaaagcaa	cattcaacga	cccccgaccc	tccgacggca	ggagcccccc	480
	gacctcccag	gcggaccgcc	ctccctcccc	gcgcgcgggt	tccggggccg	gcgagagggc	540
	gcgagcacag	ccgaggccat	ggagggtgacg	gcggaccagc	cgcgctgggt	gagccaccac	600
60	caccccgccg	tgctcaacgg	gcagcaccgc	gacacgcacc	acccgggcct	cagccactcc	660
	tacatggacg	cggcgagta	cccgtgccc	gaggaggtgg	atgtgctttt	taacatcgac	720
	ggtcaaggca	accacgtccc	gccctactac	ggaaactcgg	tcaggggccac	ggtgcagagg	780
65	taccctccga	cccaccacgg	gagccaggtg	tgccgcccgc	ctctgcttca	tggatccctc	840

ES 2 304 633 T3

	cctggctgga	cggcggcaaa	gccctgggca	gccaccacac	cgcctcccc	tggaatctca	900
	gccccctctc	caagacgtcc	atccaccacg	gtccccggg	gccccctctc	gtctaccccc	960
5	cggcctcgtc	ctcctccttg	tcggggggcc	acgccagccc	gcacctcttc	accttcccgc	1020
	ccaccccgcc	gaaggacgtc	tccccggacc	catcgtctgc	caccccaggc	tcggccggct	1080
10	cggcccggca	ggacgagaaa	gagtgcctca	agtaccaggt	gccccctgcc	gacagcatga	1140
	agctggagtc	gtcccactcc	cgtggcagca	tgaccgccct	gggtggagcc	tcctcgtcga	1200
	cccaccaccc	catcaccacc	tacccgccct	acgtgcccga	gtacagctcc	ggactcttcc	1260
15	cccccagcag	cctgctgggc	ggctccccca	ccggcttcgg	atgcaagtcc	aggcccaagg	1320
	cccggtccag	cacagaaggc	agggagtgtg	tgaactgtgg	ggcaacctcg	acccactgt	1380
20	ggcggcgaga	tggcacggga	cactacctgt	gcaacgcctg	cgggctctat	cacaaaatga	1440
	acggacagaa	ccggccccctc	attaagccca	agcgaaggct	gtctgcagcc	aggagagcag	1500
	ggacgtcctg	tgcaactgt	cagaccacca	caaccacact	ctggaggagg	aatgccaatg	1560
25	gggaccctgt	ctgcaatgcc	tgtgggctct	actacaagct	tcacaatatt	aacagacccc	1620
	tgactatgaa	gaaggaaggc	atccagacca	gaaaccgaaa	aatgtctagc	aaatccaaaa	1680
	agtgcaaaaa	agtgcattgac	tcactggagg	acttccccaa	gaacagctcg	tttaacccgg	1740
30	ccgcccctctc	cagacacatg	tcctccctga	gccacatctc	gcccttcagc	caccccagcc	1800
	acatgctgac	cacgcccacg	ccgatgcacc	cgccatccag	cctgtccttt	ggaccacacc	1860
35	acccctccag	catggtcacc	gcatggggtt	agagccctgc	tgatgctcac	agggccccca	1920
	gcgagagtcc	ctgcagtccc	tttcgacttg	catttttgca	ggagcagtat	catgaagcct	1980
	aaacgcgatg	gatatatggt	tttgaaggca	gaaagcaaaa	ttatgcttgc	cactttgcaa	2040
40	aggagctcac	tgtgggtgtct	gtgttccaac	cactgaatct	ggaccccatc	tgtgaataag	2100
	ccattctgac	tcatatcccc	tatttaacag	ggtctctagt	gctgtgaaaa	aaaaaaatgc	2160
	tgaacattgc	atataactta	tattgtaaga	aatactgtac	aatgacttta	ttgcatctgg	2220
45	gtagctgtaa	ggcatgaagg	atgccaaaga	gtttaaggaa	tatgggagaa	atagtgtgga	2280
	aattaagaag	aaactagggtc	tgatattcaa	atggacaaac	tgccagtttt	gtttcctttc	2340
50	actggccaca	gttgtttgat	gcattaaaag	aaaataaaaa	aaagaaaaag	agaaaagaaa	2400
	aaaaaagaaa	aaagtgtgtag	gcgaatcatt	tgttcaaagc	tgttggcctc	tgcaaaggaa	2460
	ataccagttc	gggcaatcag	tgttaccgtt	caccagttgc	cattgagggg	ttcagagagc	2520
55	ctttttctag	gcctacatgc	tttgtgaaca	agtccttgta	attgttggtt	gtatgtataa	2580
	ttcaaagcac	caaaataaga	aaagatgtag	atttatttca	tcataattata	cagaccgaac	2640
60	tgttgtataa	atttattttac	tgctagtcct	aagaactgct	ttctttcgtt	tgtttggttc	2700
	aatatttttc	ttctctctca	attttcgg				2728