

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 749**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05016736 .0**
96 Fecha de presentación: **27.01.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1621212**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2006**

54 Título: **Formulaciones que comprenden nucleótidos antisentidos para conexinas**

30 Prioridad:
27.01.1999 NZ 33392899
07.10.1999 NZ 50019099

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.03.2012

73 Titular/es:
Coda Therapeutics, Inc.
10505 Sorrento Valley Road, Suite 395
San Diego, CA 92121 , US

72 Inventor/es:
Becker, David y
Green, Colin R.

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 377 749 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones que comprenden nucleótidos antisentidos para conexinas

Este invento se refiere a las formulaciones para usar en tratamientos terapéuticos y/o cosméticos, particularmente aquellos en los que una interrupción localizada en la comunicación directa célula-célula es deseable.

5 ANTECEDENTES

Las uniones intercelulares son estructuras de membrana celular que facilitan la comunicación directa célula-célula. Un canal de unión intercelular está formado por dos hemicanales (conexones), cada uno está compuesto por seis subunidades de conexinas. Estas conexinas son una familia de proteínas, comúnmente denominadas según sus pesos moleculares o clasificadas según una base filogenética, es decir, en una clase α y una clase β .

10 Una capacidad para controlar la expresión de las conexinas (y en particular para disminuir sus niveles) proporcionaría por lo tanto una oportunidad para modular la comunicación célula-célula en un paciente, para propósitos terapéuticos y/o de remedio. Sin embargo, ya que un número de proteínas conexinas se expresa ampliamente a través del cuerpo, no se desea un efecto de disminución general de los niveles para inducir un efecto terapéutico en un sitio específico.

15 Los oligonucleótidos antisentidos (ODNs) tienen un potencial considerable como agentes para la manipulación de la expresión génica específica (revisado: Stein y otros, 1992; Wagner 1994). Sin embargo, quedan dificultades que necesitan ser superadas. Estas incluyen la vida media corta de tales ODNs (oligómeros fosfodiéster sin modificar tienen típicamente una vida media intracelular de sólo 20 minutos debido a la degradación por nucleasas intracelulares (Wagner 1994)) y su liberación de modo consistente y fiable a los tejidos diana.

20 Fue con la intención de superar al menos parcialmente estas dificultades que los solicitantes concibieron el presente invento.

RESUMEN DEL INVENTO

25 La invención se define en las reivindicaciones. Consecuentemente, en un primer aspecto, el invento proporciona una formulación para uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante una terapia, cuya formulación comprende: un polinucleótido complementario de una conexina humana; junto con un soporte o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una forma preferida, la formulación contiene polinucleótidos sólo para una proteína conexina. Más preferiblemente, la proteína conexina es conexina 43.

30 Muchos aspectos del invento se describen con referencia a los oligodesoxinucleótidos. Sin embargo, se comprende que otros polinucleótidos adecuados (tales como polinucleótidos ARN) pueden ser usados en estos aspectos.

Alternativamente, la formulación contiene oligodesoxinucleótidos para más de una proteína conexina. Preferiblemente, una de las proteínas conexinas a la que se dirigen los oligodesoxinucleótidos es conexina 43. Otras proteínas conexinas a las que los oligodesoxinucleótidos están dirigidos incluyen conexina 26, conexina 31.1 y conexina 32.

35 Convenientemente se selecciona el oligodesoxinucleótido para conexina 43 de:

GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC,

GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC, y

GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT

Lo más convenientemente el oligodesoxinucleótido para la conexina 43 es:

40 GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC

Convenientemente el oligodesoxinucleótido para la conexina 26 y es:

TCC TGA GCA ATA CCT AAC GAA CAA ATA

Convenientemente el oligodesoxinucleótido para la conexina 31.1 es:

CGT CCG AGC CCA GAA AGA TGA GGT C

45 Convenientemente el oligodesoxinucleótido para la conexina 32 es:

TTT CTT TTC TAT GTG CTG TTG GTG A.

5 Los polinucleótidos antisentido se pueden formular para administración parenteral, intramuscular, intracerebral, intravenosa, subcutánea o transdérmica. Los polinucleótidos antisentido se administran preferentemente de forma tópica (en la parte a ser tratada). Adecuadamente, los polinucleótidos antisentido se combinan con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables para proporcionar una composición farmacéutica.

Excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen cualquiera de los comúnmente usados para administración tópica. La formulación tópica puede estar en forma de crema, ungüento, gel, emulsión, loción o pintura. La formulación del invento se puede presentar también en forma de un apósito impregnado.

10 Materiales excipiente adecuados incluyen cualquier excipiente o vehículo comúnmente usado como base para cremas, lociones, geles, emulsiones, lociones o pinturas para la administración tópica. Los ejemplos incluyen agentes de emulsificación, excipientes inertes que incluyen bases hidrocarbonadas, bases de emulsificación, disolventes no tóxicos o bases hidrosolubles. Ejemplos particularmente adecuados incluyen lanolina, parafina dura, parafina líquida, parafina amarilla blanda o parafina blanca blanda, cera de abeja blanca, cera de abeja amarilla, cetostearyl alcohol, cetilalcohol, dimeticonas, ceras emulsionantes, isopropil miristato, cera microcristalina, alcohol oleílico y alcohol estearílico.

15 Preferentemente, el excipiente farmacéuticamente aceptable o vehículo es un gel, un gel copolímero polioxietileno-polioxipropileno no iónico adecuado, por ejemplo, un gel Plurónico, preferentemente Plurónico F-127 (BASF Corp.). Este gel es particularmente preferido, ya que es líquido a baja temperatura pero rápidamente se fija a temperaturas fisiológicas, que limitan la liberación del componente ODN al sitio de aplicación o inmediatamente adyacente a ese sitio.

20 Un agente auxiliar tal como caseína, gelatina, albúmina, pegamento, alginato sódico, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa o polivinil alcohol se pueden incluir también en la formulación del invento.

La composición farmacéutica se puede formular para proporcionar una liberación sostenida del polinucleótido antisentido.

25 Convenientemente, la formulación incluye además un tensioactivo para ayudar con la penetración oligodesoxinucleotídica a la célula o la formulación puede contener cualquier agente de carga adecuado. Cualquier tensioactivo no tóxico adecuado puede ser incluido, tal como DMSO. Alternativamente, se puede incluir un agente de penetración transdérmica tal como la urea.

30 En la presente memoria también se describe un método de reducción, de sitio específico, de los niveles de expresión de la proteína conexina con fines terapéuticos y/o cosméticos, que comprende administrar una formulación como se define anteriormente a un sitio o en un paciente en el se requiere dicha reducción.

35 Todavía en otro aspecto, se describe un método para reducir la muerte celular neuronal que de otra manera resultaría de una lesión neuronal en un sitio específico del cerebro, médula espinal o nervio óptico de un paciente, que comprende la etapa de administrar una formulación como se define anteriormente a dicho sitio para reducir la expresión de proteína(s) conexina(s) en un sitio inmediatamente adyacente a dicho sitio.

Preferiblemente, la formulación se administra para reducir la pérdida neuronal debida a trauma físico del cerebro, médula espinal o nervio óptico.

Convenientemente, la formulación se administra en una cantidad suficiente para reducir los niveles de expresión de dicha(s) proteína(s) conexina(s) durante al menos 24 horas después de la administración.

40 Todavía en otro aspecto adicional, la invención proporciona un medio para estimular la cicatrización de heridas en un paciente, que comprende la etapa de administrar una formulación como se define anteriormente a dicha herida para reducir el nivel de expresión de una(s) proteína(s) conexina(s) en un sitio inmediatamente adyacente a dicha herida.

45 Generalmente, la herida será el resultado de un trauma, incluyendo quemaduras. Puede ser, sin embargo, el resultado de una operación.

También se describe un método para reducir la inflamación como parte del tratamiento de una herida y/o tejido sometido a trauma físico que comprende la etapa de administrar una formulación como se define anteriormente o próxima a dicha herida o tejido.

Preferentemente, dicha herida es una quemadura.

50 Alternativamente, dicha herida es el resultado de un trauma físico en el tejido, incluyendo tejidos neuronales como el cerebro, la médula espinal o el nervio óptico.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un medio para disminuir la formación de cicatrices en un paciente que ha padecido una herida, que comprende la etapa de administrar una formulación como se define anteriormente a dicha herida para reducir los niveles de expresión de una(s) proteína(s) conexina(s) en un sitio inmediatamente adyacente al sitio de dicha herida.

- 5 De nuevo, la herida puede ser el resultado de un trauma u operación, aplicándose la formulación en la herida inmediatamente antes de la operación quirúrgica y/o cierre de la misma.

En un aspecto adicional más, se describe un medio para el rejuvenecimiento o engrosamiento de la piel con fines cosméticos o terapéuticos que comprende la etapa de administrar, una vez o de forma repetida, una formulación como se define anteriormente a la superficie de la piel.

- 10 Convenientemente, dicha formulación incluye oligodesoxinucleótidos dirigidos a la conexina 26 o conexina 43 y es administrada para regular la división y crecimiento celular basal epitelial.

En otra realización, dicha formulación incluye oligodesoxinucleótidos dirigidos a la conexina 31,1 y es administrada para regular la queratinización de la capa externa.

Preferentemente, la formulación es una crema o gel.

15 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La Figuras 1 a 5 muestran secciones de lesiones cerebrales de rata tratadas con gel Plurónico que contiene oligodesoxinucleótidos antisentido específico para la conexina 43, o para lesiones testigo, gel Plurónico solo. En todos los casos, las lesiones fueron seccionadas seriamente en un plano coronal y las secciones de punto medio usadas para análisis. Cada imagen (excepto la Figura 5) muestra 4 mm por 5,33 mm de tejido. La Figura 5 es aproximadamente de 1,2 mm por 2 mm.

- Figura 1: las Figuras 1A y 1C muestran dos lados de una lesión testigo 24 horas después de la lesión. La lesión ha sido tratada con gel Plurónico solo. Las secciones han sido teñidas con Nissl (núcleos azules) y el anticuerpo etiquetado con el marcador neuronal N-Neuronal (células marrones). Las Figuras 1B y 1D muestran una escala gris de las imágenes 1A y 1C respectivamente con el borde de la lesión marcada. Nótese el gran tamaño de la lesión y la extensión irregular de los bordes. La lesión se ha extendido hacia abajo en dirección al cuerpo calloso (línea discontinua) dentro de las 24 horas después de la lesión.

- La Figura 2: Una lesión testigo 24 horas después de la herida. La figura 2A muestra tinción Nissl (núcleos azules) y marcado N-Neuronal de neuronas viables. La Figura 2B es una escala de grises equivalente con el borde de la lesión marcado y la parte superior del cuerpo calloso marcado (línea discontinua). La marca de la aguja original es clara pero la muerte neuronal ha tenido lugar más atrás del borde de la lesión como se indica mediante el marcado del N-Neuronal. Los bordes de la lesión son irregulares y la lesión, dentro de las 24 horas, se ha extendido hacia abajo en el cuerpo calloso.

- Figura 3: Las Figuras 3A y 3B son imágenes de escalas de color y de grises de una lesión tratada con antisentido para conexina 43, 48 horas después de lesionarse. El perfil de la lesión se ha marcado en la Figura 3B para mostrar la extensión de la lesión y la parte superior del cuerpo calloso se ha marcado (línea discontinua). La Figura 3A se ha teñido con Nissl (núcleos azules) y N-Neuronal (células rosadas). Nótese como es de compacta la lesión, incluso después de 48 horas, comparado con las lesiones testigo (Figuras 1 y 2). Mientras que hay una extensión hacia el lado derecho, el lado izquierdo de la lesión sigue esencialmente la marca de la aguja original con pequeños signos de extensión. El lado izquierdo de la lesión es bastante recto y no se ha propagado al cuerpo calloso.

- Figura 4: Las Figuras 4A y 4B muestran otra lesión que ha sido tratada con antisentido para conexina 43, 48 después de la herida. El marcaje es el mismo que en la Figura 3 con la lesión perfilada en la imagen de la escala de grises (Figura 4B). Incluso después de 48 horas esta lesión es extremadamente compacta con pequeñas extensiones sólo hacia la izquierda (lado medio). Nótese como de recto es el lado derecho de la lesión con neuronas viables hacia el borde de la marca de la aguja (y verdaderamente sobreviven dentro del área lesionada). La lesión está muy por encima del cuerpo calloso (línea discontinua) indicando que virtualmente no hay ninguna extensión hacia abajo.

Figura 5: Un aumento mayor de la vista muestra el borde de una lesión tratada con el antisentido de la conexina 43. El borde de la lesión se ha marcado mostrando las neuronas viables (marcadas con N-Neuronal) por encima hasta el borde de la marca de la aguja lesionante, incluso 48 horas después de la lesión.

- Figura 6: Marcaje inmunohistoquímico de GFAP (rojo) y conexina 43 (verde) de una lesión tratada con un antisentido específico para conexina 43, 24 horas después de la lesión. La imagen está tomada en el borde lateral de la lesión en un punto medio del camino hacia debajo de la profundidad de la lesión. Los niveles de astrocitos activados son elevados comparados con los de los testigos (Figura 7) y los niveles de conexina 43, están notablemente reducidos. El resto de marcaje de conexina está asociado generalmente con los vasos sanguíneos (flechas).

Figura 7: Marcaje inmunohistoquímico de GFAP (rojo) y conexina 43 (verde) de una lesión testigo, 24 horas después de la lesión. La imagen está tomada en el borde medio de la lesión y muestra niveles de GFAP ligeramente elevados por encima de córtex no lesionado. Nótese el extenso marcaje de la conexina 43, a menudo colocada con el marcador de astrocitos GFAP (flechas).

5 Figura 8 muestra una comparación las áreas de la mitad inferior de las secciones transversales de la lesión 24 horas (círculos) y 48 horas (rombos) después de la lesión. El análisis se llevó a cabo en una media sección de un corte de la lesión seccionada en serie, cortada en el plano coronario. Las lesiones fueron evaluadas usando anticuerpos marcados con N-Neuronal para delinear las neuronas viables. Las lesiones tratadas con DBI (marcadores verdes) han sido tratadas con oligodesoxinucleótidos antisentido específicos para conexina 43. El grupo de lesión tratada
10 sólo con gel (marcadores rojos) también incluye lesiones vacías mientras que el grupo HB3 (marcadores violetas) es tratado con el gel que contiene una secuencia aleatoria de oligodesoxinucleótidos testigo. Nótese que, mientras las lesiones tratadas con antisentido para conexina 43 pueden ser grandes (presumiblemente en las que el antisentido no ha sido bien liberado), las lesiones más pequeñas son todas tratadas con antisentido para conexina 43. Las lesiones fueron hechas hasta una profundidad de 2 mm y los análisis cubren 1 mm y por debajo, de manera a excluir
15 el borde exterior donde el antisentido no se asentó.

Figura 9: las lesiones en la médula espinal de la rata 24 horas después del tratamiento con ODNs homosentido y antisentido para conexina 43. Las lesiones homosentido no fueron diferentes de los testigos sin tratar mientras que las lesiones tratadas con antisentido eran más pequeñas y con una inflamación reducida.

20 Figura 10: lesiones en las patas delanteras de un ratón neonatal 24 horas después del tratamiento con ODNs homosentido para conexina 43 (pata izquierda) u ODNs antisentido (pata derecha). Nótese la reducción de la inflamación y el aumento en la velocidad de cicatrización en la pata tratada con antisentido.

Figura 11: secciones a través del centro de las heridas de 24 horas mostradas en la Figura 10. Las secciones han sido teñidas con azul de toluidina para mostrar los neutrófilos. Hay considerablemente menos neutrófilos en la herida tratada con antisentido que estaba además menos inflamada.

25 Figura 12: pares de lesiones en las patas de ratas cinco días después de la lesión, que han sido tratadas con ODNs antisentido específicos para conexina 43 u testigo ODNs homosentido. Las lesiones tratadas con antisentido se curan más rápido y muestran menos signos de formación de cicatrices.

30 Figura 13: pares de lesiones en las patas de las ratas hechas en el estadio neonato, y observadas aquí 8 días después de la lesión. Las lesiones fueron tratadas con ODN antisentido específico de conexina 43 u homosentido testigo. El pelo ha crecido y está claro que el tratamiento antisentido ha dado como resultado cicatrices más pequeñas y menor pérdida de pelo. El sitio de la lesión permanece destacado en el testigo tratado con homosentido pero es difícil de detectar en la extremidad tratada con antisentido.

DESCRIPCIÓN DEL INVENTO

35 Como se ha definido anteriormente de modo amplio, el enfoque del invento es la reducción de los niveles de modo específico de sitio de la expresión de la conexina. Esto tendrá el efecto de reducir la comunicación directa célula-célula en el sitio en el que la expresión de la conexina está disminuída, lo que genera numerosas aplicaciones terapéuticas/cosméticas, como se describe a continuación.

40 La disminución de los niveles de la expresión de la conexina está basada generalmente en la aproximación antisentido usando polinucleótidos antisentido (tales como polinucleótidos ADN o ARN), y de modo más particular en el uso de oligodesoxinucleótidos (ODN) antisentido. Estos polinucleótidos (por ejemplo ODN) tienen como objetivo reducir los niveles de las proteínas conexina. Típicamente los polinucleótidos son de hebra única, pero pueden ser de doble hebra.

45 Los polinucleótidos antisentido pueden inhibir la transcripción y/o la traducción de la conexina. Preferiblemente, el polinucleótido es un inhibidor específico de la transcripción y/o traducción a partir del gen de la conexina, y no inhibe la transcripción y/o la traducción a partir de otros genes. El producto se puede unir al gen o mRNA de la conexina bien (i) en 5' de la secuencia codificante, y/o (ii) a la secuencia codificante, y/o (iii) en 3' de la secuencia codificante.

Generalmente, el polinucleótido antisentido causará la expresión de mRNA y/o proteína de conexina en una célula que ha de ser reducida.

50 El polinucleótido antisentido es generalmente antisentido para el mRNA de la conexina. Tal polinucleótido puede ser capaz de hibridar con el mRNA de la conexina y puede así inhibir la expresión de la conexina interfiriendo con uno o más aspectos del metabolismo del mRNA de la conexina incluyendo la transcripción, procesamiento del mRNA, transporte del mRNA desde el núcleo, la traducción o la degradación de mRNA. El polinucleótido antisentido hibrida típicamente con el mRNA de la conexina para formar un dúplex que puede causar inhibición directa de la traducción y/o desestabilización del mRNA. Tal dúplex puede ser susceptible de degradación por nucleasas.

- El polinucleótido antisentido puede hibridar con todo o parte del mRNA de la conexina. Típicamente, el polinucleótido antisentido hibrida con la región de unión del ribosoma o con la región codificante del mRNA de la conexina. El polinucleótido puede ser complementario a todo o a una región del mRNA de la conexina. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser el complemento exacto de todo o de una parte del mRNA de la conexina. Sin embargo, no se requiere la complementariedad absoluta y los polinucleótidos que tienen suficiente complementariedad para formar un dúplex, que tienen una temperatura de fusión mayor de 20°C, 30°C o 40°C en condiciones fisiológicas, son particularmente adecuados para usar en el presente invento.
- De este modo el polinucleótido es típicamente un homólogo del mRNA. El polinucleótido puede ser un polinucleótido que hibrida con el mRNA de la conexina en condiciones de media a alta rigurosidad tal como cloruro sódico 0,03 M y citrato sódico 0,03 M a partir de alrededor de 50 a alrededor de 60 grados centígrados.
- El polinucleótido será típicamente desde 6 a 40 polinucleótidos de longitud. Preferiblemente será de 12 a 20 nucleótidos de longitud. Los polinucleótidos pueden ser al menos 40, por ejemplo al menos 60 o al menos 80, nucleótidos de longitud y hasta de 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000 o 3000 o más nucleótidos de longitud.
- La proteína conexina o proteínas diana para el ODN serán dependientes del sitio en el que se ha de efectuar la disminución de los niveles. Esto refleja la estructura no uniforme de las uniones intercelulares en diferentes sitios a través del cuerpo en términos de la composición de subunidades de conexina. La conexina puede ser cualquier conexina presente de manera natural en un humano o animal. El gen de la conexina (incluyendo la secuencia codificante) tiene generalmente homología con cualquiera de las conexinas específicas mencionadas aquí, tal como la homología con la secuencia codificante de la conexina 43 mostrada en la Tabla 1. La conexina es típicamente una conexina α o β . Preferiblemente, la conexina se expresa en la piel o tejido nervioso (incluyendo las células del cerebro).
- Algunas proteínas conexinas son sin embargo más ubicuas que otras, en términos de distribución en el tejido. Una de las más extendidas es la conexina 43. Los ODNs que están dirigidos hacia la conexina 43 son por lo tanto particularmente adecuados para el uso en el presente invento.
- También se contempla que los ODNs que están dirigidos hacia proteínas de conexina por separado pueden ser usados en combinación (por ejemplo pueden estar dirigidos a 1, 2, 3, 4, o más conexinas diferentes). Por ejemplo, ODNs dirigidos a la conexina 43, y uno o más miembros de la familia de la conexina (tal como la conexina 26, 31.1, 32, 36, 40 y 45) se pueden usar en combinación.
- Los polinucleótidos antisentido individuales pueden ser específicos para una conexina particular, o pueden estar dirigidos hacia 1, 2, 3 o más conexinas diferentes. Los polinucleótidos específicos estarán dirigidos generalmente a secuencias en el gen o mRNA de las conexinas que no están conservadas entre las conexinas, mientras que los polinucleótidos no específicos alcanzarán secuencias conservadas.
- Los ODNs para usar en el invento serán generalmente oligómeros fosfodiéster sin modificar. Variarán en longitud aunque un ODN de 30 mer es particularmente adecuado.
- Los polinucleótidos antisentido pueden ser químicamente modificados. Esto puede potenciar su resistencia a las nucleasas y puede potenciar su capacidad para entrar en las células. Por ejemplo, se pueden usar oligonucleótidos fosfotioato. Otros desoxinucleótidos análogos incluyen metilfosfonato, fosforamidatos, fosforoditioatos, N3'P5'-fosforamidatos y oligoribo-nucleótidos fosforotioatos y sus análogos 2'-O-alquil y 2'-O-metilfosfonatos metilribonucleótido.
- Alternativamente se pueden usar oligonucleótidos de cadenas mixtas (MBOs). Los MBOs contienen segmentos de oligodesoxinucleótidos fosfotioato y segmentos colocados apropiadamente de oligodesoxi u oligoribonucleótidos modificados. Los MBOs tienen segmentos de uniones fosfotioato y otros segmentos de otros oligonucleótidos modificados, tales como metilfosfonato, que es no iónico, y muy resistente a las nucleasas o 2'-O-alquiloligo-ribonucleótidos.
- La secuencia exacta del polinucleótido antisentido usado en el invento dependerá de la proteína conexina diana. Para la conexina 43, el solicitante ha encontrado que los ODNs, que tienen las siguientes secuencias son particularmente adecuados:
- GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC;
- GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC; y
- GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT

Los ODNs dirigidos a otras proteínas conexas pueden ser seleccionados en términos de su secuencia nucleotídica mediante cualquier aproximación cómoda y convencional. Por ejemplo, se pueden usar los programas informáticos MacVector y OligoTech (de Oligos etc. Eugene, Oregón, USA). Por ejemplo, los ODNs para las conexas 26, 31.1 y 32 tienen las siguientes secuencias:

5

5'TCC TGA GCA ATA CCT AAC GAA CAA ATA (conexina 26)

5'CGT CCG AGC CCA GAA AGA TGA GGT C (conexina 31,1)

5'TTT CTT TTC TAT GTG CTG TTG GTG A (conexina 32)

10 Una vez seleccionado, los ODNs pueden ser sintetizados usando un sintetizador de ADN.

Para el uso en el invento, el ODN(s) requiere una liberación específica de sitio. También requiere la liberación a lo largo de un período extenso de tiempo. Mientras que está claro que el período de suministro dependerá tanto del sitio en que se inducirá la reducción de los niveles como del efecto terapéutico que se desea, se requerirán con frecuencia liberaciones continuas de 24 horas o más.

15 De acuerdo con el presente invento, esto se logra mediante la inclusión del ODN(s) en una formulación junto con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, particularmente en la forma de una formulación para administración tópica.

20 Una vez preparadas, las formulaciones del invento tienen utilidad en cualquier aproximación terapéutica /cosmética donde se desea una interrupción transitoria y específica de sitio de la comunicación célula-célula. Esto incluye el tratamiento del daño neuronal en el cerebro, la médula espinal o el nervio óptico (en el que el daño ha de ser localizado tanto como sea posible), en la promoción de la cicatrización de la herida y en la reducción de la formación de cicatriz después de, por ejemplo, operaciones cosméticas o quemaduras.

25 En particular, las formulaciones tópicas tales como cremas pueden ser empleadas para regular la división de las células basales epiteliales y el crecimiento (usando ODNs dirigidos a la conexina 43) y la queratinización de la capa externa (usando ODNs dirigidos a la conexina 31,1).

30 Los polinucleótidos antisentido (incluyendo el ODN) pueden estar presentes en una forma aislada sustancialmente. Se entenderá que el producto se puede mezclar con excipientes o diluyentes que no interferirán con el propósito del producto que se pretende designar y aún considerarse como sustancialmente aislado. Un producto del invento puede estar también en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenderá generalmente el 90%, por ejemplo al menos 95%, 98% ó 99% del polinucleótido o masa seca de la preparación.

Administración

35 Los polinucleótidos antisentido (que incluyen ODNs) del invento (típicamente en la forma de la formulación tratada aquí) puede ser así administrada a una persona o a un animal en necesidad del tratamiento, tal como una persona o animal con cualquiera de las enfermedades o estados mencionados aquí. El estado de la persona o animal puede ser así mejorado. El polinucleótido y la formulación pueden ser así usados en el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. Se pueden usar en la fabricación de un medicamento para tratar cualquiera de los estados aquí mencionados.

40 Los polinucleótidos antisentido pueden ser administrados típicamente (en el lugar a ser tratado). Preferiblemente, los polinucleótidos antisentido se combinan con un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptables para producir una composición farmacéutica. Los excipientes y diluyentes adecuados incluyen disoluciones salinas isotónicas, por ejemplo tampón fosfato salino. La composición puede ser formulada para administración parenteral, intramuscular, intracerebral, intravenosa, subcutánea o transdérmica.

45 La dosis en la que el polinucleótido antisentido es administrado al paciente dependerá de una variedad de factores tales como la edad, peso y estado general del paciente, la condición que está siendo tratada, y el polinucleótido antisentido particular que está siendo administrado. Una dosis adecuada puede sin embargo ser desde 0,1 a 100 mg/kg del peso corporal tal como de 1 a 40 mg/kg del peso corporal.

50 La ingesta de ácidos nucleicos por las células de mamíferos es potenciada mediante varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo aquellas que incluyen el uso de agentes de transfección. La formulación que es administrada puede contener tales agentes. Ejemplo de estos agentes incluye agentes catiónicos (por ejemplo fosfato cálcico y DEAE-dextrano) y lipofectantes (por ejemplo lipofectam™ y transfectam™).

Las rutas de administración y dosificaciones descritas anteriormente pretenden ser sólo una guía, ya que un médico con experiencia será capaz de determinar fácilmente la ruta óptima de administración y dosificación para cualquier paciente y condición particular.

Homólogos

5 La homología y los homólogos se tratan aquí (por ejemplo, los polinucleótidos pueden ser homólogos de secuencia en el mRNA de conexina). Tales polinucleótidos tienen típicamente al menos 70% de homología, preferiblemente al menos 80, 90%, 95%, 97% ó 99% de homología con la secuencia relevante, por ejemplo a lo largo de una región de al menos 15, 20, 40, 100 nucleótidos contiguos más (de la secuencia homóloga).

10 La homología puede ser calculada basándose en cualquier método de la técnica. Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede ser usado para calcular la homología (por ejemplo, usado en sus ajustes por defecto) (Devereux y otros (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395). Los algoritmos PILEUP y BLAST pueden ser usados para calcular la homología, o alinear las secuencias (típicamente en sus ajustes por defecto), por ejemplo como se describe en Altschul S.F. (1993) *J Mol Evol* 36: 290-300; Altschul, S, F y otros (1990) *J Mol Biol* 215: 403-10.

15 El software para realizar los análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

20 Este algoritmo implica el primer par de identificación de secuencia de puntuación alta (HSPs) que identifica palabras cortas de longitud W en la secuencia buscada, que bien coincide o satisface algunos umbrales de puntuación T valorados de modo positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de la palabra vecina (Altschul y otros, supra). Estas palabras iniciales vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs que las contienen. Los fragmentos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta que la puntuación de alineación acumulada se pueda aumentar. Las extensiones para los fragmentos de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de la alineación acumulada cae por debajo de la cantidad X de su máximo valor conseguido; la puntuación acumulada va a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos con puntuación negativa; o cuando se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 89: 10915-10919) alineamiento (B) de 50, expectación (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas hebras.

30 El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 90: 5873-5787. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma (P(N)) más pequeña, que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual tendrá lugar por casualidad una unión entre dos nucleótidos o secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación con la primera secuencia a la segunda secuencia es menor de alrededor de 1, preferiblemente menor que alrededor de 0,1, más preferiblemente menor que alrededor de 0,01 y más preferiblemente menor que alrededor de 0,001.

40 La secuencia homóloga difiere típicamente de la secuencia relevante por al menos (o por no más de) 2, 5, 10, 15, 20 mas mutaciones (que pueden ser sustituciones, deleciones o inserciones). Estas mutaciones pueden ser medidas a través de cualquiera de las regiones anteriormente mencionadas en relación a calcular la homología.

45 La secuencia homóloga típicamente hibrida de modo selectivo con la secuencia original a un nivel significativamente por encima del fondo. La hibridación selectiva se logra típicamente usando condiciones de media a alta rigurosidad (por ejemplo cloruro sódico 0,03 M y citrato sódico 0,03 M desde alrededor de 50°C a alrededor de 60°C). Sin embargo, tal hibridación puede ser llevada a cabo bajo cualquier condición adecuada conocida en la técnica (véase Sambrook y otros (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*). Por ejemplo, si se requiere una alta rigurosidad, las condiciones adecuadas incluyen SSC 0,2x a 60°C.

Diversos aspectos del invento serán ahora descritos con referencia a la sección experimental siguiente que se comprenderá que se proporciona a medio de ilustración y no para constituir una limitación en el alcance del invento.

EXPERIMENTAL

50 EXPERIMENTO 1

MATERIALES Y MÉTODOS

Aplicación antisentido

Se usó gel F-127 Plurónico al 30% (BASF Corp) en tampón fosfato salino (agua de pureza molecular) para liberar ODNs antisentido específicos para conexina a1 sin modificar (conexina 43) al embrión de pollo en desarrollo (Simons, y otros, 1992). Los embriones de pollo fueron incubados a 38°C y los estadios determinados según los estadios de Hamilton y Hamburger. A los huevos se les hicieron ventanas y las membranas vitelina y amniótica sobre el área a ser tratada fueron abiertas usando finos forceps. Después de la aplicación del antisentido, los huevos fueron sellados con cinta y recolocados en el incubador durante 48 horas, tiempo al cual la mayoría de los experimentos fueron analizados, siendo la excepción el análisis a distintos tiempos de la "eliminación de la expresión" de la conexina y su recuperación.

El gel Plurónico es líquido a bajas temperaturas, 0-4°C, pero se asienta cuando se añade por goteo sobre el embrión a temperatura fisiológica, permaneciendo en el sitio durante al menos 12 horas. El gel tiene la ventaja adicional de ser un tensioactivo suave y éste, usado bien solo o junto con DMSO, parece acelerar notablemente la penetración de ODN en las células (Wagner, 1994). La adición de una etiqueta FITC al ODN DB1, vista usando microscopía confocal de escaneado con láser, demostró la penetración intracelular de las sondas. Las secuencias de desoxiligonucleótidos usados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: El efecto sobre el desarrollo de extremidades de la aplicación de ODN entre los estadios 8 y 14 del desarrollo del embrión de pollo.

Oligodesoxinucleótidos antisentido para la conexina 43

DB1 GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC

CG1 GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT

Oligodesoxinucleótidos testigo

DB1 (homosentido) GAC AGA AAC AAT TCC TCC TGC CGC AAT TAC

DB1 (pollo) GTA GTT ACG ACA GGA GGA ATT GTT CTC GTC

CV3 (al azar) TCG AAC TGT CAA GAC TGC TAT GGC GAT CAT

Sólo el gel

Todos los ODNs fueron aplicados a una concentración final de 0,5-1,0 mM seguido de un análisis dependiente de dosis durante experimentos preliminares que cubrían un intervalo de concentraciones desde 0,05 mM a 50 mM. Los efectos de toxicidad general sólo fueron evidentes con concentraciones de ODN superiores a 10 mM. Las mezclas de gel ODN fueron preparadas a partir de disoluciones patrón concentradas almacenadas a -80°C.

Secuencias antisentido

DB1 es una secuencia de ratón antisentido, complementaria a las bases 1094-1123 del gen de la conexina a1. Tiene cuatro errores de apareamiento con la secuencia de pollo de la conexina a1. CG es complementaria a las bases 720-749 de la conexina a1 de pollo. La eficacia de esta sonda fue mejorada con Dimetilsulfóxido (DMSO) al 1% añadido al gel. El DMSO no tuvo ningún efecto añadido sobre ningún otro resultado con ODN antisentido o testigo.

Secuencias testigo

DB1 (pollo) es el equivalente de la conexina a1 de pollo del DB1 que empareja con las bases 954-983 de la conexina a1 de pollo. El análisis indica, sin embargo, una alta probabilidad de formar estructuras de bucle de tallo ($G = -7.0$ kcal/mol, T_m del bucle = 92°) y homodimerización ($T_m = 1,5^\circ$) y por lo tanto actúa como una secuencia testigo. Se ha demostrado que algunos oligonucleótidos homosentido pueden formar tripletes de ADN estables (Neckers y otros, 1993) que inhiben la transcripción. Sin embargo, esto no fue evidente con el DB1 (homosentido). Una secuencia testigo al azar sin estructura secundaria estable ($G = 1,4$ kcal/mol) y homodimerización inestable fue también usada, llamada CV3. Un testigo adicional aplicando una mezcla de DB1 y DB1 (homosentido) de igual concentración dio niveles de fondo de los defectos.

Monitorizando la eliminación de los niveles de proteína.

La localización inmunohistoquímica de una proteína de unión intercelular conexina 1 en el punto de contacto célula-célula proporciona una medida directa del efecto antisentido. Se usaron sondas de anticuerpos específicos anti péptido de la conexina 1 para teñir embriones totales y se analizó la distribución de la conexina usando microscopía de barrido con láser confocal según los procedimientos establecidos (Green y otros, 1995). El marcaje de los testigos para otras dos conexinas expresadas en el embrión de pollo en desarrollo (conexinas b1 y b2) fue llevada a cabo de igual modo, usando también anticuerpos específicos de secuencia (Becker y otros., 1995).

RESULTADOS

Reducción de la expresión de conexina a1

5 Usando gel F-127 Plurónico para liberar ODNs antisentido específicos para conexina a1 no modificados al embrión de pollo en desarrollo, la expresión de la proteína puede ser interferida a puntos de tiempos elegidos y permitir que el tratamiento antisentido sea dirigido a regiones específicas de un embrión de pollo. Una gota de gel que contiene el antisentido a una concentración relativamente baja fue colocada de forma precisa en embriones individuales. El gel se asienta y permanece en su sitio durante al menos 12 horas y así se mantiene una dosis baja sostenida de antisentido en esta región. Las aplicaciones antisentido fueron dirigidas y puestas a un tiempo para bloquear la formación de la unión previamente a los períodos de expresión elevada en las extremidades, el tubo neural y la cara. 10 Estos tiempos fueron elegidos para optimizar los efectos del antisentido reduciendo la expresión de nuevas proteínas más que dependiendo de la renovación de la proteína ya en las membranas de las células del tejido diana. Ambos ODNs de DB1 y CG1 redujeron la expresión de la proteína conexina a1 dentro de dos horas en el tubo neural y la protuberancia de la extremidad, dramáticamente dentro de 4-8 horas y persistió a 18-24 horas y 48 horas en algunos tejidos (datos no mostrados). No fue evidente la disminución de los niveles de la proteína conexina a1 en ninguno de los testigos usados. Igualmente, dos otros miembros de la familia de conexina expresada en el embrión de pollo, conexina b1 y conexina b2, no fueron afectados por el ODN antisentido específico de la conexina a1. 15

Se corrieron varios testigos paralelos con todos los de los experimentos. Estos incluían; DB1 homosentido, DB1 antisentido y DB1 homosentido combinados, DB1 de pollo (que forma estructuras de bucle en tallo consigo mismo), ODNs al azar CV3, gel Plurónico solo, gel Plurónico con DMSO y PBS solo). Ninguno de los testigos tuvo un efecto notable sobre la expresión de proteína de conexina a1. 20

EXPERIMENTO 2

INTRODUCCIÓN

25 Los astrocitos constituyen el tipo celular más abundante en el cerebro de mamífero. Están ampliamente acoplados entre sí y a las neuronas a través de uniones intercelulares compuestas predominantemente de conexina 43 (Giaume y McCarthy (1996)). Tras la isquemia inducida o daño cerebral físico estos canales permanecen abiertos y una onda expansiva de depresión (iniciada por potasio intersticial y señales de glutamato y apoptóticas aumentadas) es propagada (Cotrina y otros, (1998); Lin y otros (1998)). Ondas de aumento de calcio citosólico y moléculas segundos mensajeros tales como IP3 se extienden lentamente vía los canales de unión intercelular a las neuronas más allá del núcleo de la región dañada, dando como resultado una extensión de la lesión en las 24-48 horas siguientes al daño. De esta manera, las células vecinas no dañadas son destruidas (Lin y otros, 1998), el así llamado efecto colateral. 30

Este experimento investiga la capacidad de las formulaciones del invento para impedir los efectos colaterales.

MATERIALES

35 Los oligodesoxinucleótidos fueron preparados con las siguientes secuencias:

GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC (conexina 43)

TTG TGA TTT ATT TAG TTC GTC TGA TTT C (testigo al azar)

MÉTODOS

Oligodesoxinucleótidos (ODNs)

40 Los ODNs no modificados fueron liberados en gel F-127 Plurónico (BASF) en tampón fosfato salino (PBS). El gel Plurónico es líquido a bajas temperaturas (0-4°C) y se asienta a temperaturas fisiológicas, y también es un tensioactivo suave. Los ODNs tienen normalmente una vida media de aproximadamente 20 min en las células (Wagner, 1994) pero el método de carga del gel Plurónico proporciona un fuente de difusión continua, actuando el gel como un reservorio Becker y otros, (1999)). Se aplicaron los ODNs específicos para la conexina 43, o los ODNs testigo al azar de composición de bases similar, a una concentración final de 2 mM. Se llevaron a cabo también testigos de sólo gel. Los ODNs fueron de 30 mer analizados para mostrar que no tuvieran lugar bucles en horquilla u homodimerización. 45

Formación de la lesión

50 Las lesiones cerebrales fueron llevadas a cabo en ratas Wistar macho de 250-300 g. Los animales fueron anestesiados con halotano 1-2% en oxígeno y la cabeza mantenida en una pinza estereotáxica. La región alrededor del sitio de la lesión fue afeitada y la piel sobre el cráneo cortada en un plano sagital con un escalpelo y tirada hacia

atrás para dejar las placas del cráneo limpias. Un agujero de diámetro 0,5 mm fue perforado a través de la placa del cráneo 3 mm hacia la derecha del bregma usando un grabador Arlet y se hizo una lesión en el córtex del cerebro usando una aguja de jeringa de calibre 19G 1 ½ unida a la plataforma micrométrica. La plataforma permitió un control direccional preciso y una penetración de 2 mm de profundidad precisa que mantuvo la lesión dentro del córtex y muy por encima del cuerpo calloso.

Con el animal preparado, se aspiraron 10 ml de gel F-127 Plurónico (BASF) enfriado en hielo que contenía ODN específico para conexina 43 (o un ODN testigo) en una aguja de jeringa de calibre 19G 1 ½ preenfriada recortada a modo que tuviera una punta plana. La aguja de la jeringa fue unida a una pipeta volumétrica vía una punta de pipeta amarilla cortada en la parte inferior. El gel se asentó entonces en la aguja según se calentó a temperatura ambiente. La aguja con el tapón de gel en su punta fue transferida a una jeringa de 1 ml que contenía PBS y se colocó una funda sobre el eje de la aguja de modo que la punta de la aguja pudiera bajar a la lesión con la funda (subiendo contra el cráneo) impidiendo la sobrepenetración. Una presión suave sobre el émbolo "hizo saltar" el tapón de gel fuera de la aguja dentro de la lesión. La herida fue después tratada con peróxido de hidrógeno para parar el sangrado y la piel fue suturada de vuelta en su sitio. Los animales fueron cuidadosamente monitorizados y dejados hasta que estuvieron listos para el sacrificio 24 horas, 48 horas ó 12 días más tarde.

Corte de secciones congelados

Los animales fueron sacrificados usando Nembutal (pentobarbitona sódica, Virbac) y decapitados. Los cerebros fueron retirados intactos y congelados inmediatamente en hielo seco y almacenados a -80°C hasta que estuvieron listos para hacer los cortes de secciones. Las criosecciones seriadas (secciones de 30 µm) fueron tomadas desde la frente a la parte posterior (plano coronario), las secciones secas montadas sobre placas tratadas con cromo y aluminio, y almacenadas para histoquímica o inmunohistoquímica a -80°C. La primera y la última sección de cada lesión fueron grabadas a modo que las secciones del punto medio de la lesión estuvieran claramente identificadas.

Histoquímica

Para las tinciones con hematoxilina y eoxina las secciones fueron hidratadas a través de series decrecientes de alcoholes (absoluto, 2 x 95%, 1 x 70% y agua) y teñidas en hematoxilina de Gill durante 4 minutos. Las secciones fueron después lavadas en agua, sumergidas en agua de Scott y vueltas a lavar en agua. Fueron después teñidas durante 30 segundos en eoxina en tampón de Moore. Las secciones fueron lavadas una vez más en agua antes de la deshidratación a través de una serie de alcoholes (2 x 95%, 1 x absoluto), 50:50 alcohol: xilol y sumergidas en xileno. Las secciones fueron después montadas usando medio de montaje Histomountä.

Para la tinción Nissl, las secciones fueron deshidratadas en una serie gradual creciente de alcoholes (75%, 95%, 3 x 100%), cinco minutos en cada, y las grasas eliminadas en xileno durante cinco minutos. Las secciones fueron después rehidratadas disminuyendo a través de la misma serie de alcoholes y lavadas en agua. Las secciones fueron después colocadas en una disolución de tinción Nissl (5 ml de una disolución patrón acuosa de violeta de Cresilo al 2%, 90 ml de ácido acético glacial en una disolución acuosa, 10 ml de una disolución de acetato sódico 1,35%) durante 10 minutos. Las secciones fueron después deshidratadas rápidamente en una serie de alcoholes creciente durante 5 minutos a 75%, después 2 minutos cada una a 95% y 3 x 100%, tres cambios de xileno durante 10 minutos cada uno. Fueron después cubiertas con medio de montaje Histomountä.

Inmunohistoquímica

Se dejó que las secciones congeladas volvieran primero a temperatura ambiente en PBS. Después fueron permeabilizadas en metanol durante dos minutos, lavadas en PBS y transferidas a una disolución de lisina 0,1 M y Tritón-X 100 al 0,1% en PBS para bloquear durante 30 min. Le siguieron dos lavados en PBS, de dos minutos cada uno. Se eliminó el PBS y se aplicaron 50 µl por sección de anticuerpo primario.

La inmunohistoquímica fue llevada a cabo con anticuerpos primarios contra conexina 43, núcleos neuronales (proteína nuclear NeuN específica de vertebrados) y GFAP (proteína ácida fibrilar glial). Los siguientes anticuerpos fueron usados:

Anticuerpo de conejo anti-Cx 43 (Gourdie y otros, (1991)) a una concentración de 1:300.

Anticuerpo de ratón anti-Cx 43 (Chemicon Internacional, Inc.) a una concentración de 1:100.

Anticuerpo de conejo anti-rata GFAP (DAKO, Z0334), a una concentración de 1:1000.

Anticuerpo de ratón anti-núcleos neuronales (Chemicon Internacional, Inc.) a una concentración de 1:1000.

Para el marcaje de conexina y GFAP las secciones fueron incubadas durante toda la noche a 4°C. Fueron después lavadas tres veces durante 15 minutos en PBS en un agitador orbital. A continuación, el exceso de PBS fue eliminado y se aplicaron 50 µl por sección de Alexaã 488 anti-conejo IgG (Molecular Probes, Oregón, USA) a una concentración de 1:200. Para monoclonales y dobles marcajes, se usó un anticuerpo CY3 anti-ratón (Chemicon,

132C). Las secciones fueron incubadas en la oscuridad durante dos horas a temperatura ambiente seguida por tres lavados de 15 minutos en PBS. Para el montaje el exceso de PBS fue eliminado de las placas portaobjetos y una o dos gotas de medio antidecoloración Citifluor (disolución de glicerol/PBS) fueron aplicadas. Un cubreobjetos fue colocado sobre las secciones y sellado con esmalte de uñas. Para el marcaje de N-Neuronales el anticuerpo secundario fue un anticuerpo de cabra anti-ratón biotinilado seguido por una HRP unida a avidina y una reacción DAB (Kit Sigma ExtrAvidin o DAKO Quickstain).

Captura de imágenes y Análisis

El marcaje inmunofluorescente fue llevado a cabo usando un microscopio de barrido confocal láser Leica TCS 4D. Las imágenes doblemente marcadas fueron combinadas subsiguientemente usando la función Leica combinada o en Adobe Photoshop. Las muestras teñidas con hematoxilina y eoxina, y Nissl fueron capturadas usando una cámara digital 3008 Kontron Progress (Zeis) y las áreas lesionadas analizadas usando MetaMorph (Universal Imaging Corp). Las áreas lesionadas fueron analizadas por la sección media de cada lesión.

RESULTADOS

La bien documentada extensión de las lesiones cerebrales en las primeras 24-48 horas después del trauma tuvo lugar en los experimentos testigos con gel y en todas las lesiones, tratadas por los autores con testigos y con antisentido, y tendieron a extenderse hacia el extremo exterior donde el gel es menos probable que se asiente tras la carga. Sin embargo, las lesiones testigo se extendieron hacia abajo en el cuerpo callosos y hacia los lados a partir de los extremos desiguales, en extensión (Figuras 1 y 2). El examen de los tejidos marcados con anticuerpo anti N-Neuronal reveló muerte neuronal que tuvo lugar desde muy atrás desde el extremo de la lesión, con áreas de tinción de Nissl y que no quedaron neuronas viables. Esta extensión tuvo lugar predominantemente dentro de 24 horas (Figuras 1 y 2), continuando hasta 48 horas después de la lesión. Esto es especialmente evidente en la Figura 2 en la que la muerte neuronal es evidente dentro de 24 horas desde muy atrás desde el extremo de la lesión hasta tejidos que de otro modo parecen normales, y la lesión se ha extendido hasta abajo en el cuerpo calloso. Por el contrario, las lesiones mejor tratadas con antisentido para conexina 43 permanecen confinadas hacia el sitio original de la lesión y tienen niveles basales claramente definidos (Figuras 3 y 4). El marcaje de N-Neuronal colocaliza con tejidos teñidos con Nissl y ninguna de las lesiones tratadas con antisentido de conexina 43 se extendió hasta el cuerpo calloso. El marcaje N-Neuronal muestra una supervivencia neuronal hasta arriba del extremo de la lesión del tracto de la aguja original. Las neuronas supervivientes alrededor de estas lesiones definen frecuentemente límites agudos marcando el extremo del tracto de la aguja (Figuras 3 y 5). Más tejidos permanecen viables dentro de la misma lesión después del tratamiento antisentido; en lesiones testigo, la muerte celular lleva a una pérdida de tejidos dentro del área lesionada (compárese la lesión testigo en la Figura 2 a 24 horas con las lesiones tratadas con antisentido en las Figuras 3 y 4 a 48 horas).

Mientras que el marcaje de anticuerpo de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) muestra alguna activación aumentada de astrocitos en los extremos de las lesiones, los niveles de proteína conexina 43 están claramente reducidos en muchos sitios a lo largo del extremo de las lesiones tratadas con antisentido, particularmente los extremos basales y medios (Figura 6) comparado con testigos (Figura 7). En algunas áreas el único marcaje de conexina 43 que permanece 24 horas después del tratamiento con antisentido específico de conexina 43 es en las paredes de los vasos sanguíneos pese a los niveles aumentados de GFAP (Figura 6). En general, el marcaje de conexina 43 alrededor de la lesión tratada con antisentido colocaliza en mucha menor medida con el marcaje de GFAP que en los testigos en los que más de la mitad del marcaje de conexina 43 está relacionada con los astrocitos. Los niveles de otras conexinas (conexinas 26 y 32) no parecen estar alterados por los tratamientos específicos de conexina 43.

36 animales fueron lesionados. El área transversal (corte central del volumen de la lesión en un plano coronario) fue analizada para 21 animales. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Áreas transversales de lesiones tratadas con oligodesoxinucleótidos testigo y con oligonucleótidos específicos para conexina 43, dejadas vacías, o tratadas sólo con gel. Las medidas son para animales medidos después de 24 horas, 48 horas y 12 días. Dos grupos de figuras están incluidos- medidas de la lesión entera, y medidas desde 1 mm por debajo de la superficie. En base al análisis del segundo grupo la lesión tratada DB1 más grande (paréntesis) está excluida ya que cae fuera de las desviaciones estándar 3 a partir de la media para este grupo. Nótese que el cerebro de rata se cura (a diferencia de otras especies) y medidas de 12 días de lesión no representan la extensión original de la extensión de la lesión.

DB1 está tratada con anti conexina 43

HB3 está con oligos al azar y parecen ser tóxicos			
Lesión entera: (medidas en mm cuadrados)			
	<i>24 horas</i>	<i>48 horas</i>	<i>12 días</i>
DB1	2,42; 3,16; 3,78; 5,57	3,7; 6,05; 2,91; 3,41; 4,53	2,79; 2,86
HB3	7,14	13,19	
Gel/vacio	5,04; 4,48	3,96; 3,41; 3,56; 5,91	2,58; 3,3
Lesiones desde 1 mm hacia abajo: (ésta es considerada una medida más precisa ya que todas las lesiones tienden a extenderse hacia el borde externo indicando que el gel de tratamiento se ha asentado en el fondo de la lesión y/o el córtex externo ha sido dañado cuando se ha perforado el cráneo o al insertar la aguja de carga del gel).			
	<i>24 horas</i>	<i>48 horas</i>	<i>12 días</i>
DB1	0,91; 1,13; 2,12; 2,41	(3,38); 0,99; 1,54; 1,44; 1,08	0,47; 1,2
HB3	5,9	5,6	
Gel/vacio	3,2; 2,19	1,86; 1,5; 1,68; 2,17	1,07; 1,43

En el análisis final el área de la lesión desde una línea de 1 mm por debajo del extremo del córtex externo fue medida a modo de excluir la extensión de la lesión en el extremo exterior en el que los tratamientos antisentido tienen poco o ningún efecto (debido a que el gel se inyecta en y se asienta en el fondo de las lesiones). Un animal tratado con con antisentido cae más de tres desviaciones estándar fuera de la media para este grupo y ha sido excluido. El tamaño de la lesión media para lesiones tratadas con antisentido a 24 y 48 horas fue de 1,45 mm² (+/- 0,55), para testigos 2,1 mm² (+/- 0,6). Las cuatro más pequeñas (de 8 lesiones tratadas con antisentido y 8 lesiones testigo a 24 y 48 horas) fueron todas tratadas con antisentido para conexinas, siendo la lesión testigo más pequeña 50% más grande que éstas cuatro. Estos datos se muestran también en forma gráfica en la Figura 8. A 12 días tiene lugar la regeneración en la rata (pero no en tejido cerebral humano) y los límites de la extensión de la lesión no están claramente definidos.

DISCUSIÓN

El método del tapón de gel Plurónico-ODN antisentido ha sido usado para estudiar el efecto de la eliminación de la expresión de conexina 43 durante la astrocitosis que tiene lugar tras la lesión del córtex cerebral del cerebro de mamíferos. En el cerebro, la liberación de toxinas a partir de neuronas muriendo causa lo que se conoce por efecto colateral, con las toxinas extendiéndose a células vecinas a través de canales de uniones intercelulares (Lin y otros, (1998)). En condiciones neurodegenerativas, la lenta liberación de toxinas aparentemente lleva a un aumento de los niveles de canales de conexina 43 en astrocitos para permitir el transporte y la eliminación de las toxinas a la corriente sanguínea. Sin embargo, en casos de trauma grave, este aumento de los niveles ayuda a la extensión de elevados niveles de toxina a neuronas vecinas, matándolas. El bloqueo del aumento de los niveles de conexina 43 y la eliminación de la expresión de los canales de conexina 43 impide esta extensión que lleva a lesiones hasta un 50% más pequeñas en áreas transversales. Esto tiene implicaciones significativas en el manejo de fallos isquémicos, tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, y modulación de efectos secundarios a partir de intervención quirúrgica.

EXPERIMENTO 3

INTRODUCCIÓN

El efecto colateral en tejidos neurales mediante el cual las neuronas dañadas liberan toxinas que se extienden y matan células vecinas está bien documentado. El experimento 2 muestra que este efecto puede ser reducido en el cerebro usando una aproximación de liberación sostenida de oligodesoxinucleótidos antisentido para eliminar los niveles de la proteína de uniones intercelulares conexina 43.

Otro tejido de composición similar al cerebro es la médula espinal en la que la población neuronal está apoyada por poblaciones de células gliales, incluyendo astrocitos que son responsables para el efecto neuroprotector eliminando el glutamato y el exceso de calcio a partir del entorno neural. Este experimento investiga la capacidad de las formulaciones del invento para reducir la extensión de las lesiones de médula espinal.

5 MATERIALES

Los oligodesoxinucleótidos fueron preparados con las siguientes secuencias:

GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC (conexina 43)

GAC AGA AAC AAT TCC TCC TGC CGC AAT TAC (testigo homosentido)

MÉTODOS

- 10 Las ratas Wistar fueron anestesiadas y su médula espinal expuesta. Una lesión de una hemisección estándar fue después hecha en la médula y 5 ml de gel Plurónico frío, que contenía bien ODNs antisentido o bien homosentido para la conexina 43 (5 mM) fueron colocados en la lesión. Las aplicaciones fueron hechas en ciego. La médula expuesta fue después recuperada y la rata devuelta a su jaula. Algunos animales fueron sacrificados a 24 horas mientras que otros fueron mantenidos durante 12 días y dos meses para determinar la extensión de la regeneración neuronal y el tamaño final de la lesión. Para estudios de regeneración axonal las ratas fueron anestesiadas y sus axones cortados previamente a sus sitios de entrada en la médula espinal. Un precipitado de peroxidasa de rábano (HRP) fue colocada en el corte para marcar de modo retrógrado los axones a lo largo del período de 24 horas. Al día siguiente las ratas fueron sacrificadas y sus médulas espinales retiradas y fijadas en paraformaldehído 2%. Las médulas fueron después procesadas para cortes transversales y las secciones de series longitudinales de 8 mm fueron tomadas a través de las médulas. Las secciones fueron después inmunoteñidas tanto para las conexinas como para el GFAP solo con yoduro de propidio como marcador nuclear, o procesadas para revelar el HRP.

RESULTADOS

- 25 A 24 horas posterior a la lesión hubo una notable diferencia entre las lesiones de médulas espinales tratadas con conexina 43 homosentido y ODNs antisentido. Las lesiones homosentido no parecieron diferentes de los testigos sin tratar mientras que las lesiones tratadas con antisentido parecieron más pequeñas y menos inflamadas (Figura 9).

A día 12 los axones marcados con HRP podían ser visto tanto en las médulas tratadas con homosentido como en las tratadas con antisentido pero en ningún caso atravesó la lesión ningún número significativo de axones regenerantes. Sin embargo, hubo una notable diferencia en el tamaño de la lesión pareciendo la lesión antisentido significativamente más pequeña que las lesiones homosentido o sin tratar.

- 30 Dos meses tras la lesión de las médulas espinales el marcaje con HRP de axones en regeneración reveló que no consiguieron atravesar el sitio de la lesión en los tratamientos tanto homosentido como antisentido. El tamaño de la lesión fue significativamente más pequeño en las médulas tratadas con antisentido indicando una reducción significativa en muerte celular neuronal secundaria.

DISCUSIÓN

- 35 Usando las formulaciones del invento, la eliminación de los niveles de conexina 43 por los oligodesoxinucleótidos antisentido redujo significativa-mente le extensión de la lesión que tiene lugar en las primeras 24-48 horas tras el daño de la médula espinal. La eliminación de los niveles de conexina 43 también reduce la inflamación, ayudando además en el efecto neuroprotector, pero no hubo cambio en la capacidad para las neuronas de crecer de nuevo a través del sitio de la lesión. Así, el tratamiento antisentido con oligodesoxinucleótidos específicos para conexina 43 no puede ayudar al crecimiento de neuronas dañadas, pero tiene un efecto neuroprotector significativo reduciendo la extensión del insulto.

EXPERIMENTO 4

INTRODUCCIÓN

- 45 Para reparar heridas cutáneas se activan un número de tipos celulares, tales como fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos, para proliferar, migrar y colocar matriz extracelular para rellenar la herida.

- La comunicación y la señalización intercelular es una característica clave del proceso de cicatrización de heridas. Los mecanismos de señalización extracelular se cree que son las piezas clave aunque es también probable que la señalización intercelular a través de las redes extensivas de los canales de uniones intercelulares en las capas dérmicas pueda tener también un papel. Las ondas de calcio que se propagan desde las células heridas a través de la epidermis pueden señalar su daño. En una cicatrización de heridas normal los niveles de conexinas comienzan a caer dentro de 6 horas y les lleva 6 días para recuperarse. Los papeles que estos cambios juegan no se

comprenden pero una teoría es que las células se liberan de sus vecinas para dividirse rápidamente, y después las uniones reforman la migración coordinada en y sobre el sitio de la herida.

Este experimento investiga la capacidad de las formulaciones del invento para afectar la cicatrización de heridas.

MATERIALES

5 Los oligodesoxinucleótidos fueron preparados con las siguientes secuencias:

GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC (conexina 43)

GAC AGA AAC AAT TCC TCC TGC CGC AAT TAC (testigo homosentido)

MÉTODOS

10 Los ratones neonatales, de la cepa CD1, fueron anestesiados con un anestésico local mediante pulverización. Una herida con una incisión limpia, de 2 mm de largo, fue luego hecha a lo largo de la longitud de ambas patas delanteras con un cuchillo de iridectomía. Haciendo las heridas bajo un microscopio de disección se pueden hacer muy reproducibles en tamaño. Éstas cicatrizan generalmente en 3-6 días. El polvo de carbón fue rociado en las heridas para marcarlas para una identificación subsiguiente del sitio de la herida a tiempo más tardíos- esto no afecta la cicatrización de ninguna manera. 5 ml de gel Plurónico enfriado, que contenía ODNs bien homosentido o bien antisentido fueron después aplicados a las heridas. El gel Plurónico es líquido entre 0-4 °C pero se asienta a temperaturas más altas. Una vez que se aplica a las heridas el gel se asienta en su sitio y actúa como un reservorio de liberación lenta para los ODNs así como un tensioactivo suave, ayudando a la penetración de los ODNs en el tejido. La aplicación de los ODNs homosentido fue hecha sobre una pata y el antisentido en la otra, alternando izquierda y derecha entre las distintas camadas. Los ratones neonatales fueron calentados bajo una lámpara y después devueltos a sus madres. Las heridas fueron examinadas a diario y registradas en lo que respecta a la calidad de la cicatrización. Los ratones representativos fueron seleccionados a día 1, día 5 día 8 posterior a la operación y sus patas delanteras fotografiadas antes de que los ratones fueran anestesiados y perfundidos con paraformaldehído 2%. Las patas delanteras fueron retiradas y sumergidas-fijadas en paraformaldehído 2% durante toda la noche y después procesadas para histología de resina (1 día) o cera (2 días en adelante).

15 20 25 La inflamación de la herida fue evaluada 24 horas tras la herida. Las secciones de resina a través de la herida están teñidas con azul de Toluidina para revelar células positivas para nissl, neutrófilos que son las primeras células en responder al daño. Estos pueden también ser revelados usando marcadores específicos de neutrófilos.

30 La muerte celular y la eliminación es evaluada mediante marcaje tunel para determinar la velocidad de eliminación de células apoptóticas. La tinción de macrófagos fue usada para mostrar el período de limpieza tras la muerte celular. Estas son llevadas a cabo 3-5 días posteriores a la herida.

Angiogénesis

35 La granulación es una característica del tejido conectivo cicatrizante y es causada por la invasión de numerosos capilares. Se conoce que los macrófagos expresan potentes factores angiogénicos tales como VEGF. El grado de vascularización está monitorizado con anticuerpos para los receptores VEGF, anti-PCAM y anti-FLT-1 que son ambos buenos marcadores de vasos sanguíneos. La contracción de este tejido es provocada por la diferenciación de los fibroblastos de la herida en un miofibroblasto contráctil. Después de que han cicatrizado la herida mueren apoptóticamente y son eliminados por los macrófagos. Estas células pueden ser reveladas mediante anticuerpos específicos anti actina de músculo liso y su formación y eliminación puede ser seguida.

Hiperenergación

40 45 Los nervios sensoriales son muy sensibles a las señales liberadas sobre la herida y muestran liberación de señales transitorias en los sitios de las heridas en adultos. Sin embargo, en heridas neonatales esta liberación de señales es más abundante y da como resultado una hiperenergación permanente. Mientras que no está claro lo que son estas señales es probable que se liberen a partir de macrófagos inflamatorios. La hiperenergación es máxima a 7 d posteriores a la herida y la distribución nerviosa puede revelarse usando anticuerpos PGP 9,5 contra neurofilamentos.

La formación de la cicatriz es evaluada normalmente semanas o meses después del cierre de la herida. Sin embargo, una evaluación razonable puede ser hecha 12 días después de la herida. Las secciones a través de las heridas son teñidas con la tinción de colágeno Rojo de Picosirus y examinadas por un microscopio de confocal para determinar la densidad del colágeno y la orientación en el sitio de la herida.

50 RESULTADOS

Día 1

24 horas después de la herida notables diferencias fueron evidentes entre las extremidades tratadas con el homosentido y el antisentido. Las heridas tratadas con el homosentido no parecieron diferentes de las heridas sin tratar con un espectro normal de grados y velocidades de cicatrización (Figura 10). Las extremidades tratadas con antisentido fueron notablemente diferentes de los testigos, pareciendo estar menos inflamadas y la velocidad de cicatrización fue generalmente más rápida.

Las secciones de resina de las extremidades representativas teñidas con una tinción de nissl revelaron significativamente menos células neutrófilas indicando un tejido menos inflamado (Figura 11).

Día 5

Tras estos días se habían comenzado a caer las costras de las heridas. En esta etapa la mayoría de las heridas tratadas con los antisentido parecieron ser mas pequeñas que las tratadas con homosentido con costras mas pequeñas o cicatrización menos prominente (Figura 12).

Día 8

8 días después de la herida, en las extremidades había crecido pelo. Las heridas tratadas con homosentido fueron aún visibles siendo demarcadas por una falta de pelo alrededor del sitio de la herida. Las heridas tratadas con los antisentidos fueron la mayoría invisibles, estando recubiertas por crecimiento de pelo normal. Esta diferencia en el crecimiento del pelo indica que una cicatrización reducida había tenido lugar en las heridas tratadas con los antisentido (Figura 13).

CONCLUSIONES

La aplicación de los ODNs antisentido de la conexina 43 a una herida tiene un notable efecto sobre el proceso de cicatrización. El primer efecto notable es una reducción en la inflamación de las heridas que es notable en secciones que muestran un respuesta inflamatoria mucho menor en términos de niveles de neutrófilos. Según progresa la cicatrización, las heridas tratadas con antisentido cicatrizan mucho más rápido y con menos formación de costra que las lesiones testigo.

Esta reducción en la respuesta inflamatoria y la subsiguiente cicatrización mejorada es posible debido a la reducida comunicación con los neutrófilos y a una aceleración de los procesos de cicatrización natural. Los ODNs antisentido pueden reducir la expresión de conexina en 4-8 horas de modo que no tendrán un efecto sobre la señalización inicial de la herida pero jugarán un papel en los eventos de señalización secundarios. Es interesante observar que los neutrófilos que invaden en respuesta a la herida expresan normalmente una gran cantidad de conexina 43. Es también posible que formen uniones intercelulares con otras células en la herida y que comuniquen con ellas. La reducción en esta forma de comunicación puede dar como resultado una reducción de los factores secretados a partir de neutrófilos y puede reducir la muerte celular en la herida así como la granulación e hiperreneración. También se conoce que en condiciones normales los niveles de proteína conexina (conexinas 26, 31.1 y 43) están reducidos tanto en las capas epiteliales como en las subdérmicas de las heridas empezando en 6 horas, y permaneciendo disminuidas durante hasta 6 días. La aproximación antisentido puede acelerar esta reducción proteica inicial bloqueando los procesos traduccionales como ocurre con la eliminación proteica de la membrana. Ciertamente, los efectos de la eliminación de los niveles de conexina 43 inmediatamente tras la herida tiene un notable efecto en reducir los niveles inflamatorios y aumentar la velocidad de cicatrización.

EXPERIMENTO 5

INTRODUCCIÓN

La inflamación y muerte celular secundaria que sigue a una quemadura es una preocupación principal. Las víctimas de quemaduras graves por encima de un alto porcentaje de su cuerpo por lo general mueren uno o dos días después del trauma. Este experimento investiga la capacidad de las formulaciones del invento para afectar beneficiosamente el proceso de recuperación de la quemadura.

MATERIALES

Los oligodesoxinucleótidos fueron preparados con las siguientes secuencias:

GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC (conexina 43)

GAC AGA AAC AAT TCC TCC TGC CGC AAT TAC (testigo homosentido)

MÉTODOS

5 Las quemaduras reproducibles son liberadas a la piel humedecida, y el gel Plurónico que contiene ODNs antisentido inyectados subdérmicamente a la quemadura. Una serie de quemaduras fueron hechas usando hierro de soldar hacia los lados izquierdo y derecho del cráneo de seis ratones neonatos. Las quemaduras sobre un lado de la cabeza fueron tratadas con ODN específico de conexina 43 en gel Plurónico y aquellas en el otro lado con ODN testigo homosentido en gel Plurónico.

RESULTADOS

Tras 24 horas, las seis quemaduras tratadas con ODN de conexina 43 mostraron niveles más bajos de inflamación comparados con las quemaduras testigo. Estas diferencias fueron notables (datos no mostrados).

UTILIDAD

10 Así, de acuerdo con el invento, hay formulaciones proporcionadas mediante las cuales la comunicación célula-célula puede ser disminuida en una manera transitoria y específica de sitio. Las formulaciones tienen por lo tanto, aplicación en métodos de terapia y en tratamientos cosméticos.

15 La liberación del componente ODN de la formulación durante un período extendido (24 horas o más) es una ventaja particular a la hora de tratar daño neuronal. Esto es debido, en la mayoría de los casos de daño neuronal físico directo, a que la pérdida de células neuronales se extiende mas allá del sitio de la lesión concreta a las células circundantes. Ésta pérdida de células neuronales secundaria tiene lugar durante 24 horas de la lesión original y está mediada por la comunicación de uniones intercelulares célula-célula. La disminución de la expresión de proteína conexina bloquea por lo tanto o al menos disminuye los niveles de comunicación entre las células y minimiza el daño de células neuronales secundario.

20 Igualmente, en ejemplos de otros daños en tejidos (particularmente heridas) las formulaciones del invento se ha encontrado que son eficaces tanto en promover el proceso de cicatrización de heridas, reduciendo la inflamación y minimizando la formación de costra. Las formulaciones tienen por lo tanto un claro beneficio en el tratamiento de las heridas, sea el resultado de un trauma externo (incluyendo quemaduras) o de intervención quirúrgica.

25 Se apreciará además que la descripción anterior se proporciona sólo como un ejemplo y que se pueden hacer modificaciones, tanto en términos de los ODNs específicos y los excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables empleados sin salirse del alcance del presente invento.

Tabla 1

```

1 atgggtgact ggagcgcctt aggcaaacctc ctgacaagg ttcaagccta ctcaactgct
61 ggaggggaagg tgtggctgtc agtacttttc atttccgaa tctgtctgct ggggacagcg
121 gttgagtcag cctggggaga tgagcagctc gcccttcgtt gtaacactca gcaacctggt
181 tgtgaaaatg tctgctatga caagctttc ccaatctctc atgtgcgctt ctgggtcctg
241 cagatcatat ttgtgtctgt acccacactc ttgtacctgg ctcatgtgtt ctatgtgatg
301 cgaagggaag agaaacgaa caagaaagag gaagaactca aggttgccca aactgatggt
361 gtcaatgtgg acatgcactt gaagcagatt gagataaaga agttcaagta cggtattgaa
421 gagcatggta aggtgaaaat gcgagggggg ttgctgcgaa cctacatcat cagtatcctc
481 ttcaagtcta tctttgaggt ggccttcttg ctgatccagt ggtacatcta tggatcage
541 ttgagtgtctg ttacacttg caaaagagat cctgcccac atcaggtgga ctgttctctc
601 tctgccccca cggagaaaac catcttcac atcttcatgc tgggtgtgtc ctgggtgtcc
661 ctggcctiga atatcaltga actcttctat gttttctca agggcgtaa ggatcgggtt
721 aagggaaga gcgacccta ccatgcgacc agtgggtgcgc tgagccctgc caaagactgt
781 ggggtcaaa aatatgcta ttcaatggc tgetctcac caaccgtcc cctctgcct
841 atgtctctc ctgggtacaa gctggttact ggcgacagaa acaattctc ttgccgcaat
901 tacaacaagc aagcaagtga gcaaaactgg gctaattaca gtgcagaaca aaatogaatg
961 gggcagcgg gaagcaccat ctctaactcc catgcacagc cttttgattt ccccgatgat
1021 aaccagaatt ctaaaaaact agctgctgga catgaattac agccactagc cattgtggac
1081 cagcgacctt caagcagagc cagcagctgt gccagcagca gacctggcc tgatgacctg
1141 gagatctag
    
```

REFERENCES

- Becker, D. L., Evans, W. H., Green, C. R., Warner, A. (1995): Functional analysis of amino acid sequences in connexin 43 involved in intercellular communication through gap junctions. *J. Cell Sci.* 108, 1455-1467.
- 5 Becker, D. L., McGonnell, I., Makarenkova, H. P., Patel, K., Tickle, C., Lorimer, J. And Green, C. R. (1999). Roles for a1 connexin in morphogenesis of chick embryos revealed using a novel antisense approach. *Devel. Genetics*, 24, 33-42.
- Cotrina, M.L., Kang, J., Lin, J. H-C., Bueno, E., Hansen, T. W., He, L., Lie, Y. and Nedergaard, M. (1998). Astrocytic gap junctions remain open during ischemic conditions. *J. Neurosci.*, 18, 2520-2537.
- 10 Giaume, C. And McCarthy, K. D. (1996). Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *TINS*, 19, 319-325.
- Gourdie, R. G., Green, C. R., Severs, N.J. (1991). Gap junction distribution in adult mammalian myocardium revealed by an anti-peptide antibody and laser scanning confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 99: 41-55.
- 15 Green, C. R., Bowles, L., Crawley, A., Tickle C. (1994): Expression of the connexin 43 gap junctional protein in tissues at the tip of the chick limb bud is related to epithelial- mesenchymal interactions that mediate morphogenesis. *Devel. Biol.* 161, 12-21.
- Lin, J. H., Weigel, H., Cotrina, M. L., Liu S., Bueno, E., Hansen, a. J., Hansen, T. W., Goldman, S. and Nedergaard, M. (1998). Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nature Neurosci.* 1,431-432.
- 20 Neckers, L., Whitesell, L. (1993): Anti-sense technology: biological utility and practical considerations. *Am. J. Physiol.* 265 (lung cell mol physiol), L1-L12.
- Simons, M., Edelman, E. R., DeKeyser, J. L., Langer, R., Rosenberg, R. D. (1992): Anti-sense c-myb oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation *in vivo*. *Nature*, 359. 67-70.
- Stein, C. A. (1992): Anti-sense oligodeoxynucleotides- promises and pitfalls, *Leukemia* 6, 967-974.
- Wagner, R. W. (1994): Gene inhibition using anti-sense oligodeoxynucleotides, *Nature*, 372, 333-335.

25

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Becker, David L
Green, Colin R
- 5
- <120> Formulaciones que comprenden nucleótidos antisentidos para conexinas
- <130> N78821B TJD PT
- 10 <140>
<141> 2000-01-27
- <150> EP 00901236.0
<151> 2000-01-27
- 15
- <150> PCT/GB00/00238
<151> 2000-01-27
- <150> NZ 333928
- 20 <151> 1999-01-27
- <150> NZ 500136
<151> 1999-10-07
- 25 <160> 12
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- 30 <211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- <220>
- 35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

ES 2 377 749 T3

	<400> 1	
	gtaattgCGG caagaagaat tgtttctgTC	30
	<210> 2	
5	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido	
	<400> 2	
	gtaattgCGG caggaggaat tgtttctgTC	30
	<210> 3	
15	<211> 30	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido	
	<400> 3	
	ggcaagagac accaaagaca ctaccagcat	30
	<210> 4	
25	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido	
	<400> 4	
	tcctgagcaa tacctaacga acaaata	27
35	<210> 5	
	<211> 25	

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

<400> 5

cgtccgagcc cagaaagatg aggtc 25

10 <210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

<400> 6

tttctttct atgtgctgtt ggtga 25

20

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

<400> 7

30 gacagaaaca attcctcctg ccgcaattac 30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

<400> 8

gtagttacga caggaggaat tgttctcgtc 30

5

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

<400> 9

15 tcgaactgtc aagactgcta tggcgatcat 30

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

25 <400> 10

ttgtgattta ttagttcgt ctgatttc 28

<210> 11

<211> 30

30 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

35

<400> 11

gacagaaaca attcctcctg ccgcaattac

30

<210> 12

<211> 1149

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

```

atgggtgact ggagcgcctt aggcaaactc cttgacaagg ttcaagccta ctcaactgct 60
ggaggggaag tgtggctgtc agtacttttc attttccgaa tcctgctgct ggggacagcg 120
gttgagtcag cctggggaga tgagcagtct gcctttcgtt gtaacactca gcaacctggt 180
tgtgaaaatg tctgctatga caagtctttc ccaatctctc atgtgcgctt ctgggtcctg 240
cagatcataat ttgtgtctgt acccacactc ttgtacctgg ctcattgtgt ctatgtgatg 300
cgaaaggaag agaaactgaa caagaaagag gaagaactca aggttgccca aactgatggt 360
gtcaatgtgg acatgcactt gaagcagatt gagataaaga agttcaagta cggatttgaa 420
gagcatggta aggtgaaaat gcgagggggg ttgctgcgaa cctacatcat cagtatcctc 480
ttcaagtcta tctttgaggt ggcccttctg ctgatccagt ggtacatcta tggattcagc 540
ttgagtgctg tttacacttg caaaagagat ccctgcccac atcaggtgga ctgtttcctc 600
tctcgcccca cggagaaaaac catcttcatc atcttcatgc tgggtggtgc cttggtgtcc 660
ctggccttga atatcattga actcttctat gttttcttca agggcgtaa ggatcgggtt 720
aagggaaaga gcgaccctta ccatgcgacc agtgggtgcg tgagccctgc caaagactgt 780
gggtctcaaa aatatgctta tttcaatggc tgctcctcac caaccgctcc cctctcgct 840
atgtctcctc ctgggtacaa gctggttact ggcgacagaa acaattcttc ttgccgcaat 900
tacaacaagc aagcaagtga gcaaaactgg gctaattaca gtgcagaaca aaatcgaatg 960
gggcaggcgg gaagcaccat ctctaactcc catgcacagc ctttgattt ccccgatgat 1020
aaccagaatt ctaaaaaact agctgctgga catgaattac agccactagc cattgtggac 1080
cagcgacctt caagcagagc cagcagtcgt gccagcagca gacctcggcc tgatgacctg 1140
gagatctag                                     1149
    
```

10

REIVINDICACIONES

- 1.Una formulación para uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante una terapia, cuya formulación comprende:
- 5 un polinucleótido complementario de una conexina humana; junto con un soporte o un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 2.Una formulación para uso en el tratamiento de una lesión tisular, cuya formulación comprende:
- un polinucleótido complementario de una conexina; junto con un soporte o un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 3.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que se formula para administración tópica.
- 10 4.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 3, que está en forma de una crema, una pomada, un gel, una emulsión, una loción o una pintura.
- 5.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 4, que está en forma de un gel.
- 6.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 5, que está en forma de un gel de copolímero no iónico polioxietileno-polioxipropileno.
- 15 7.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 5, que está en forma de un gel de Pluronic.
- 8.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende Pluronic F-127.
- 9.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende 30% de Pluronic F-127.
- 10.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el polinucleótido se formula para la administración por vía parenteral, intramuscular, intracerebral, subcutánea o transdérmica.
- 20 11.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una formulación de liberación retardada.
- 12.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un agente auxiliar seleccionado entre caseína, gelatina, albúmina, pegamento, alginato sódico, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa o alcohol polivinílico.
- 25 13.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente uno o varios entre un agente tensioactivo, un emulsionante, un agente de carga, un vehículo inerte y un agente de penetración transdérmica.
- 14.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está en forma de vendaje impregnado por lo menos con un polinucleótido complementario de una conexina.
- 30 15.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polinucleótido es ADN.
- 16.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el polinucleótido es ARN.
- 35 17.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el polinucleótido es un oligodesoxinucleótido.
- 18.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el oligodesoxinucleótido es un oligonucleótido de fosfodiéster no modificado.
- 19.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el polinucleótido es un oligonucleótido modificado químicamente seleccionado entre fosforotioatos, metilfosfonatos, fosforamidatos, fosforoditioatos, N3'P5'-fosforamidatos, fosforotioatos de oligorribonucleótido y sus análogos 2'-O-alcúlicos, metilfosfonatos de 2'-O-metilribonucleótido y oligonucleótidos con la cadena principal híbrida.
- 40 20.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polinucleótido tiene una longitud comprendida entre 6 y 40 nucleótidos.
- 45 21.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polinucleótido tiene una longitud comprendida entre 12 y 20 nucleótidos.

- 22.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde el polinucleótido tiene una longitud de al menos 40 nucleótidos.
- 23.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene polinucleótidos complementarios de una conexina α .
- 5 24.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que contiene polinucleótidos complementarios de una conexina β .
- 25.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la conexina es conexina 26, conexina 31.1, conexina 32, conexina 36 o conexina 43.
- 10 26.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 y 25, en donde la conexina es conexina 43.
- 27.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, 24 y 25, en donde la conexina es conexina 31.1.
- 28.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, 24 y 25, en donde la conexina es conexina 26.
- 15 29.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene polinucleótidos complementarios de más de una conexina.
- 30.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 29, que incluye polinucleótidos complementarios de conexina 26, conexina 31.1, conexina 32, conexina 36, conexina 40, conexina 43 y/o conexina 45.
- 20 31.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, que contiene polinucleótidos complementarios de una sola conexina.
- 32.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 31, en la que el polinucleótido complementario de la conexina 43 se selecciona entre:
- GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC;**
GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC; y
GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT;
- el polinucleótido complementario de la conexina 26 es:
- 25 **TCC TGA GCA ATA CCT AAC GAA CAA ATA;**
- el polinucleótido complementario de la conexina 31.1 es:
- CGT CCG AGC CCA GAA AGA TGA GGT C;**
- o el polinucleótido complementario de la conexina 32 es:
- TTT CTT TTC TAT GTG CTG TTG GTG A.**
- 30 33.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 32, en donde el polinucleótido complementario de la conexina 43 es **GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC.**
- 34.Una formulación para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25, 26 y 29 a 31, en la que el polinucleótido complementario presenta una homología de al menos 70% con un polinucleótido que tiene la siguiente secuencia:
- 35 **GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC.**
- 35.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 34, en la que el polinucleótido complementario tiene una homología de al menos 90% con un polinucleótido que tiene la siguiente secuencia:
- GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC.**
- 40 36.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el polinucleótido complementario tiene una homología de al menos 95% con la siguiente secuencia:
- GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC.**

- 37.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en donde el polinucleótido complementario es bicatenario.
- 38.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, en donde el polinucleótido complementario es monocatenario.
- 5 39.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polinucleótido complementario es capaz de unirse a un ARNm de conexina.
- 40.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 39, en donde el polinucleótido complementario es capaz de unirse a un ARNm de la conexina 43.
- 10 41.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 39 o 40, en donde el polinucleótido complementario tiene una complementariedad absoluta con el ARNm.
- 42.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 39 o 40, en donde el polinucleótido complementario no tiene una complementariedad absoluta con el ARNm.
- 15 43.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 39 a 42, en donde el polinucleótido complementario se puede unir a un ARNm de conexina (i) en 5' de la secuencia codificante, y/o (ii) en la secuencia codificante y/o (iii) en 3' de la secuencia codificante.
- 44.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 39 a 42, en donde el ARN comprende la SEQ ID NO: 12.
- 20 45.Una formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se formula en una cantidad suficiente para disminuir la muerte celular en una herida en un tejido de mamífero, o inmediatamente adyacente a la misma.
- 46.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 45, en donde el tejido de mamífero se selecciona entre la piel, el tejido neural, el cerebro, la médula espinal, el tejido conjuntivo y los vasos sanguíneos.
- 47.Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso en un método para favorecer la cicatrización de heridas.
- 25 48.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 47, en donde la conexina es conexina 43, conexina 31.1 o conexina 26.
- 49.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 47 o 48, en donde la formulación es una formulación de liberación retardada.
- 30 50.Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46, para uso en el tratamiento de una herida, en donde la formulación se aplica antes de restañar o cerrar una herida.
- 51.Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46, para uso en un método de tratamiento de una herida producida por cirugía.
- 52.Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 51, en donde la formulación se aplica antes de cerrar una herida quirúrgica.
- 35 53.Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46, para uso en un método para favorecer el rejuvenecimiento o el engrosamiento de la piel con un fin terapéutico mediante la regulación de la división y del crecimiento de las células basales epiteliales, en donde la conexina es la conexina 26 o la conexina 43.
- 40 54.Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46, para uso en un método para favorecer el rejuvenecimiento o el engrosamiento de la piel con un fin terapéutico mediante la regulación de la queratinización de la capa externa, en donde la formulación contiene un polinucleótido complementario de la conexina 31.1.
- 55.Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46, para uso en un método para:
- (a) reducir la muerte de células neuronales que de otro modo sería el resultado de una lesión neuronal;
- (b) tratar un daño neuronal en el cerebro, la médula espinal o el nervio óptico, o lesiones cerebrales;
- 45 (c) tratar lesiones de la médula espinal o un traumatismo de la médula espinal;
- (d) tratar trastornos neurodegenerativos;

- (e) favorecer la cicatrización de una herida que se ha originado por traumatismo, quemaduras o cirugía;
- (f) reducir la inflamación;
- (g) tratar una apoplejía isquémica;
- (h) disminuir la formación de cicatrices; o
- 5 (i) rejuvenecer la piel con un fin terapéutico.
- 56.Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46, para uso en un método para el tratamiento de una apoplejía isquémica, en donde la formulación comprende un polinucleótido complementario de una proteína conexina 43.
- 10 57.Un producto para almacenar o suministrar una formulación, que comprende un polinucleótido complementario de una proteína conexina, comprendiendo dicho producto una jeringa y una aguja, en donde el producto contiene un polinucleótido complementario de una proteína conexina y un gel de Pluronic F-127.
- 58.Un producto de acuerdo con la reivindicación 57, en donde la proteína conexina es conexina 43.
- 59.El uso de una formulación tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46, en la fabricación de un medicamento para:
- 15 (a) favorecer la cicatrización de una herida;
- (b) reducir la muerte de células neuronales que de otro modo sería el resultado de una lesión neuronal;
- (c) tratar un daño neuronal en el cerebro, la médula espinal o el nervio óptico, o lesiones cerebrales;
- (d) tratar lesiones de la médula espinal o un traumatismo de la médula espinal;
- (e) tratar trastornos neurodegenerativos;
- 20 (f) reducir la inflamación;
- (g) tratar una apoplejía isquémica;
- (h) disminuir la formación de cicatrices; o
- (i) rejuvenecer la piel con un fin terapéutico.
- 60.Un uso de acuerdo con la reivindicación 59, en donde la herida es el resultado de un traumatismo, quemaduras o
- 25 cirugía.
- 61.Un polinucleótido complementario de una conexina, en donde:
- (a) la conexina es la conexina 43 y el polinucleótido se selecciona entre:
- GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC;**
GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC; y
GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT;
- (b) la conexina es la conexina 26 y el polinucleótido es
- 30 **TCC TGA GCA ATA CCT AAC GAA CAA ATA;**
- (c) la conexina es la conexina 31.1 y el polinucleótido es
- CGT CCG AGC CCA GAA AGA TGA GGT C;** o
- (d) la conexina es la conexina 32 y el polinucleótido es
- TTT CTT TTC TAT GTG CTG TTG GTG A.**
- 35 62.Un polinucleótido complementario de acuerdo con la reivindicación 61, que es ADN.
- 63.Un polinucleótido complementario de acuerdo con la reivindicación 61, que es ARN.

- 64.Un polinucleótido complementario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 61 a 63, que es un oligodesoxinucleótido.
- 65.Un polinucleótido complementario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 61 a 64, que es bicatenario.
- 5 66.Un polinucleótido complementario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 61 a 64, que es monocatenario.
- 67.Un polinucleótido complementario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 61 a 66, que es un oligonucleótido modificado químicamente, seleccionado entre fosforotioatos, metilfosfonatos, fosforamidatos, fosforoditioatos, N3'P5'-fosforamidatos, fosforotioatos de oligorribonucleótido y sus análogos 2'-O-alkílicos, metilfosfonatos de 2'-O-metilribonucleótido y oligonucleótidos con la cadena principal híbrida.
- 10

FIGURA 1A



FIGURA 1B



FIGURA 1C



FIGURA 1D

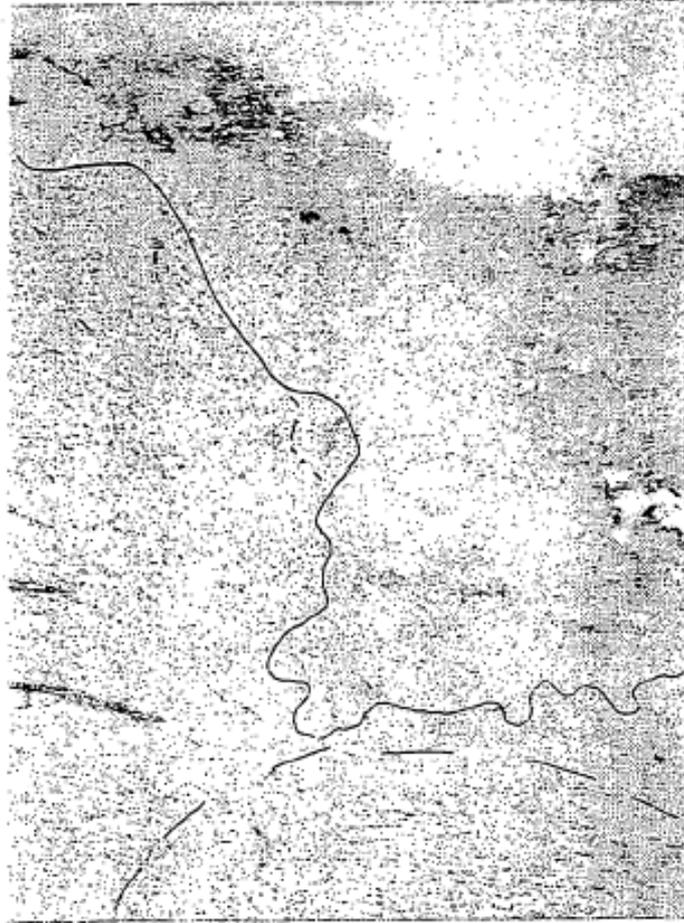


FIGURA 2A



FIGURA 2B

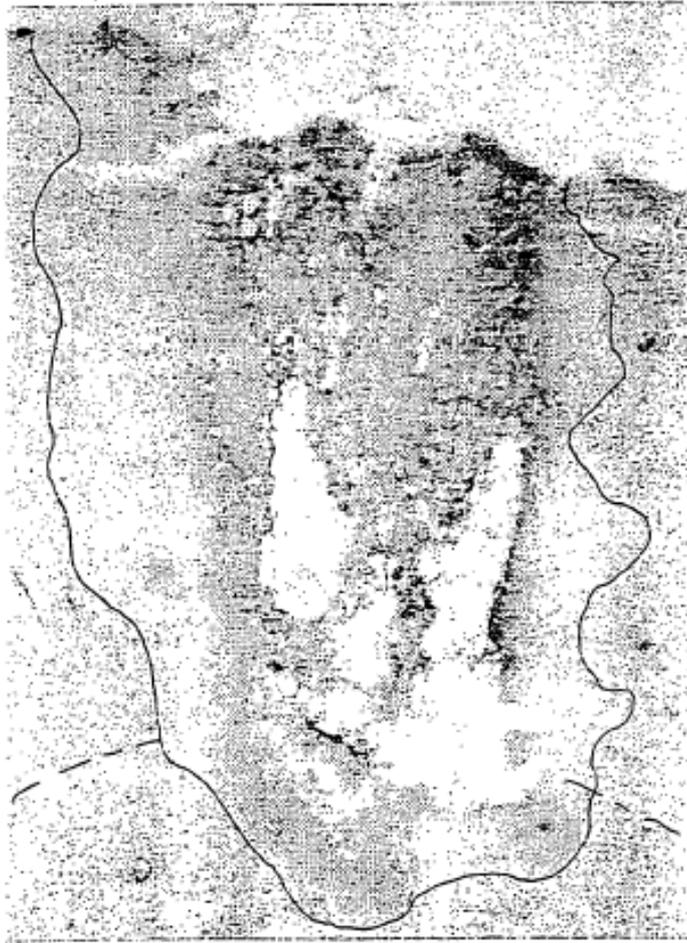


FIGURA 3A



FIGURA 3B



FIGURA 4A



FIGURA 4B



FIGURA 5

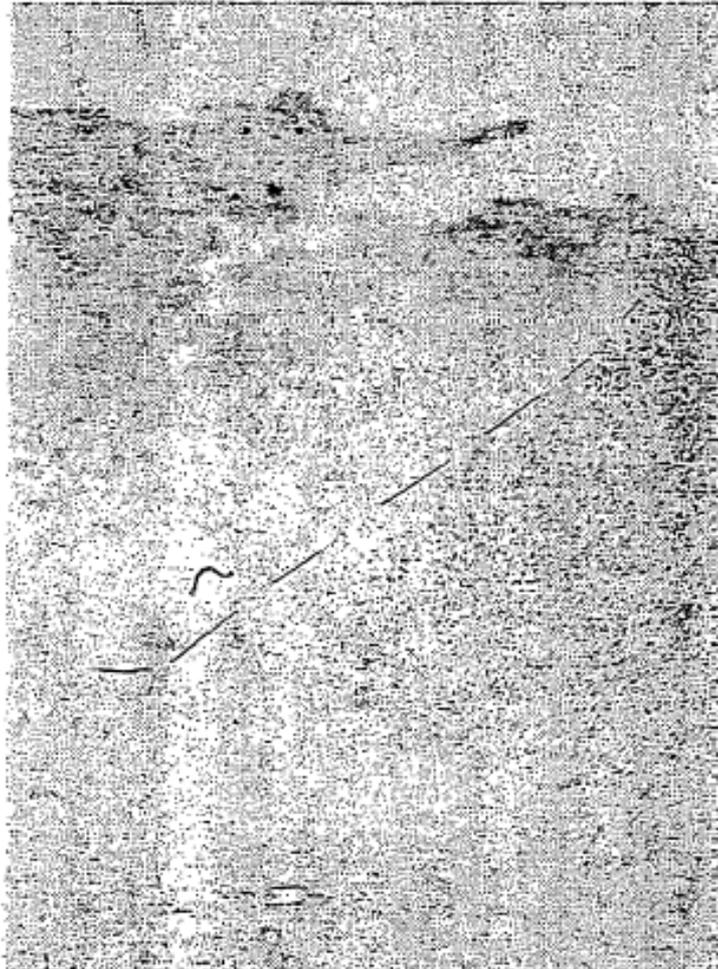


FIGURA 6

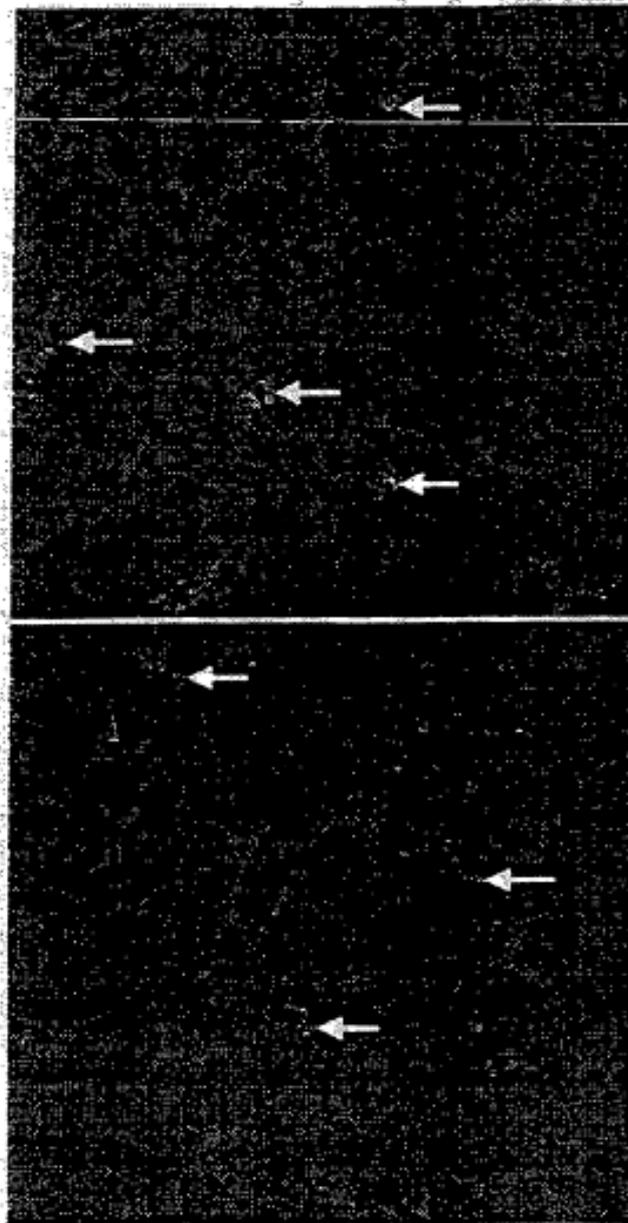


FIGURA 7

Comparación de las zonas lesionadas con diferentes tratamientos

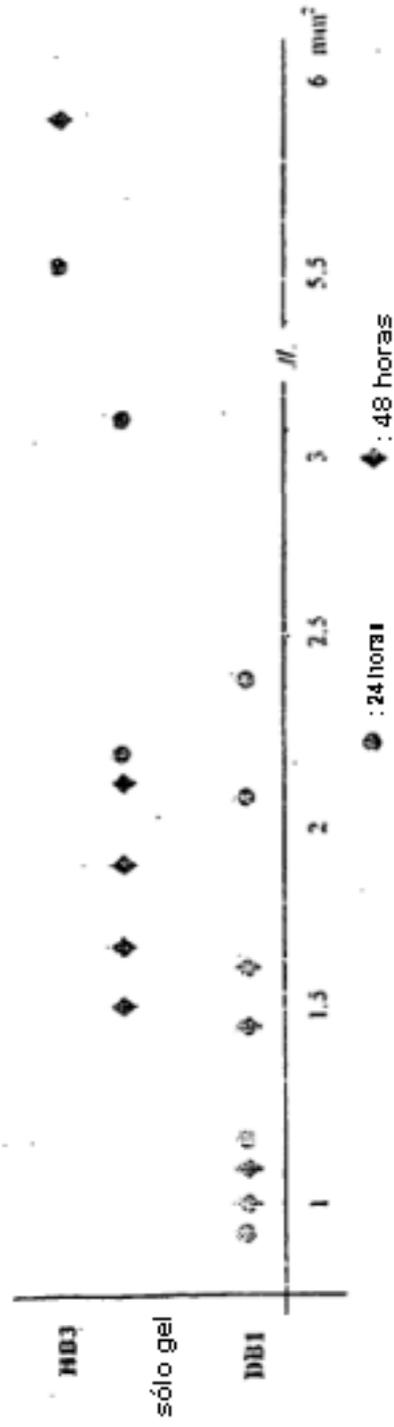


FIGURA 8

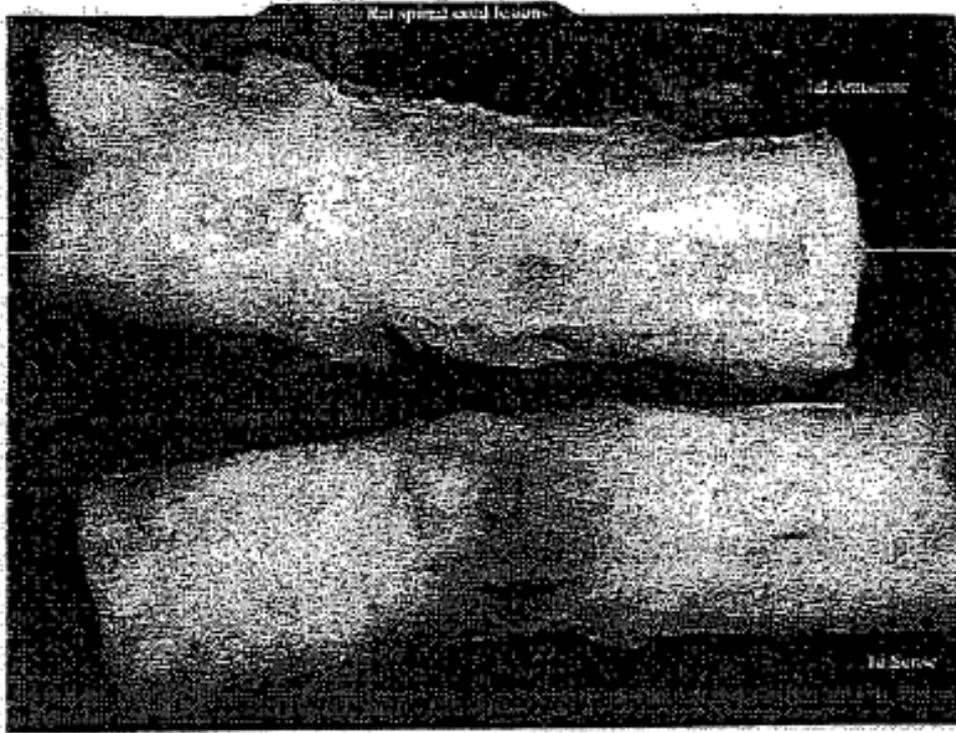


FIGURA 9

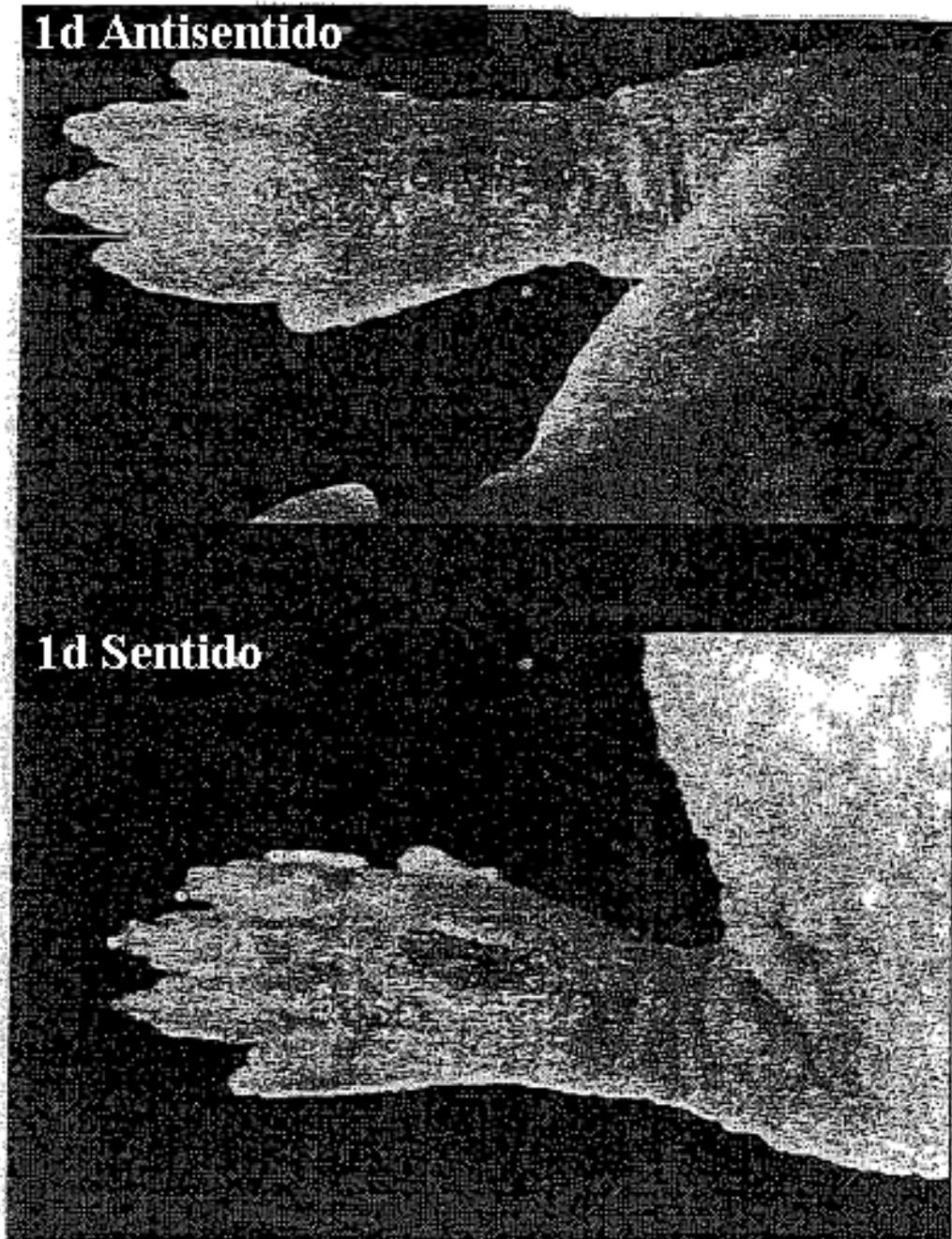


FIGURA 10



FIGURA 11

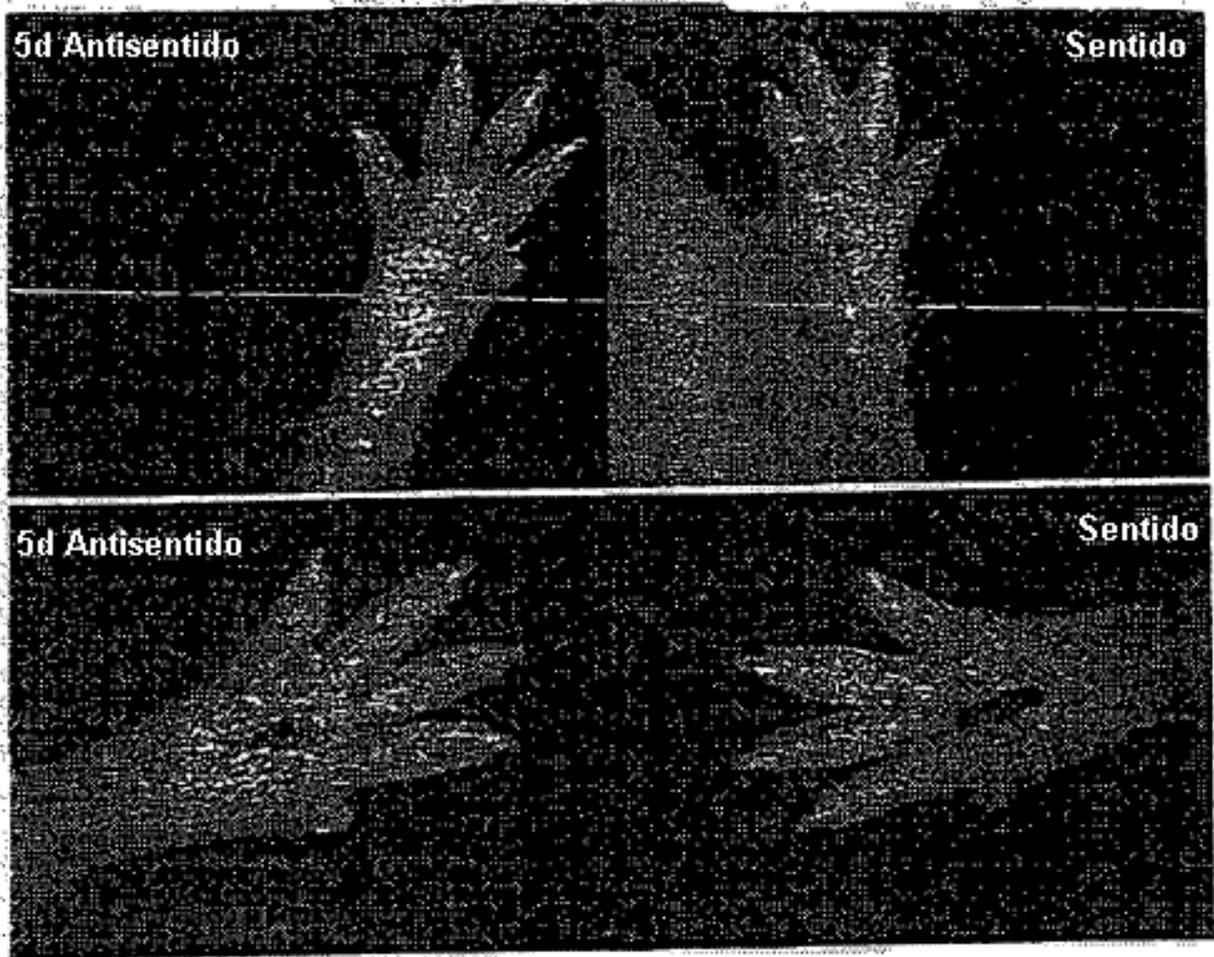


FIGURA 12

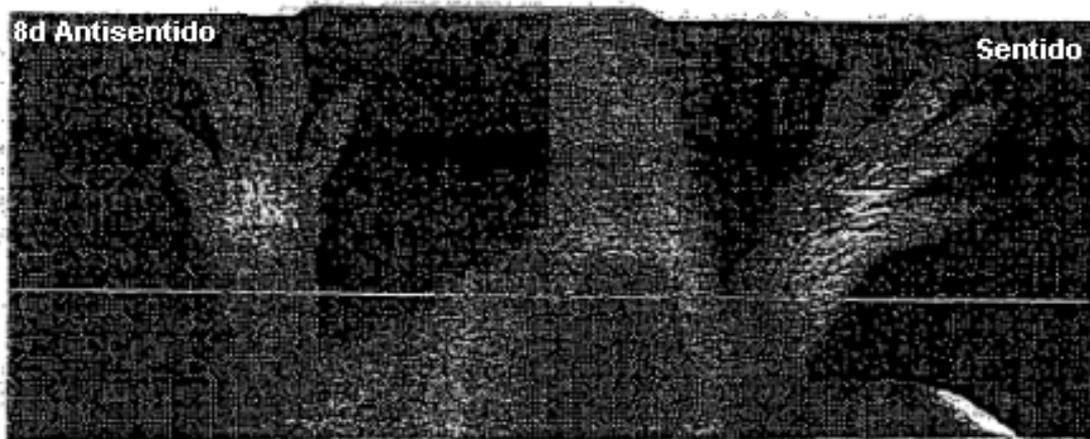


FIGURA 13