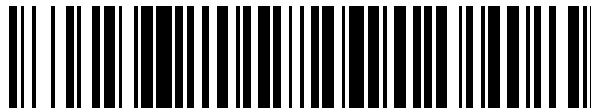


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 131**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7105 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2007 E 07853353 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014 EP 2101791**

54 Título: **Polinucleótidos anticonexina como composiciones para la curación alterada de heridas**

30 Prioridad:

11.12.2006 US 874404 P

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

20.01.2015

73 Titular/es:

**CODA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
12520 High Bluff Drive, Suite 350
San Diego, CA 92130, US**

72 Inventor/es:

**BECKER, DAVID L.;
GREEN, COLIN R. y
DUFT, BRADFORD J.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 527 131 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

Polinucleótidos anticonexina como composiciones para la curación alterada de heridas

5 **Campo**

Las invenciones se refieren a uniones comunicantes y a heridas y curación de heridas, en particular a heridas que no se curan a las velocidades esperadas, tales como heridas de curación retardada, heridas de curación incompleta, heridas crónicas y heridas con dehiscencia.

10

Antecedentes breves

A continuación se incluye información que puede ser útil en el entendimiento de la presente invención. No es una admisión de que ninguna de la información proporcionada en el presente documento sea técnica anterior, o relevante, para las invenciones descritas o reivindicadas en el presente documento, o que cualquier publicación o documento al que se haga referencia de forma específica o implícita sea técnica anterior.

15

En seres humanos y otros mamíferos la lesión con herida desencadena una cascada compleja organizada de acontecimientos celulares y bioquímicos que en la mayoría de los casos darán como resultado una herida curada. Una herida curada de forma óptima es una que restaura la estructura anatómica, función y apariencia normales a los niveles celular, tisular, orgánico y de organismo. La curación de heridas, bien iniciada por traumatismo, microbios o materiales ajenos, sucede mediante un proceso complejo que abarca varias fases solapantes, incluyendo inflamación, epitelización, angiogénesis y deposición de matriz. Normalmente, estos procesos conducen a una herida madura y un cierto grado de cicatrización. Aunque la inflamación y la reparación se producen principalmente siguiendo un ciclo previsto, la sensibilidad del proceso depende del equilibrio de una diversidad de factores moduladores de la curación de heridas, incluyendo por ejemplo una red compleja de citocinas reguladoras y factores de crecimiento.

20

25

Las uniones comunicantes son estructuras de membrana celular que facilitan la comunicación directa entre células. Un canal de unión comunicante está formado por dos conexones (hemicanales), cada uno compuesto de seis subunidades de conexina. Cada conexón hexamérico se acopla a un conexón en la membrana opuesta para formar una única unión comunicante. Se ha indicado que los canales de unión comunicante se encuentran por todo el cuerpo. El tejido tal como el epitelio corneal, por ejemplo, tiene de seis a ocho capas celulares, pero expresa diferentes canales de unión comunicante en diferentes capas con conexina 43 en la capa basal y conexina 26 de las capas celulares aladas basal a media. En general, las conexinas son una familia de proteínas, habitualmente nombradas según su peso molecular o clasificadas filogenéticamente en subclases alfa, beta y gamma. Se han identificado al menos 20 isoformas humanas y 19 murinas. Se ha indicado que diferentes tejidos y tipos celulares tienen patrones característicos de expresión de proteína conexina y se ha mostrado que tejidos tales como la córnea alteran el patrón de expresión de proteína conexina después de lesión o trasplante (Qui *et al.* (2003) *Current Biology*, 13: 1967-1703; Brander *et al.* (2004), *J. Invest Dermatol.* 122: 1310-20).

30

35

40

Se ha indicado que la función de conexina anómala puede estar ligada a ciertas patologías (por ejemplo enfermedades cardíacas) (A. C. de Carvalho, *et al.* (1994) *J Cardiovasc Electrophysiol* 5: 686). En ciertas proteínas conexinas, las alteraciones en las propiedades de renovación y tráfico pueden inducirse por la adición de agentes exógenos que pueden afectar al nivel de comunicación intercelular de uniones comunicantes (Darrow *et al.* (1995) *Circ Res* 76: 381; Lin *et al.* (2001) *J Cell Biol* 154(4): 815). También se ha presentado tecnología antisentido para la modulación de la expresión para genes implicados en enfermedades virales, fúngicas y metabólicas. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.166.195 (inhibidores oligonucleotídicos del VIH), Patente de Estados Unidos Nº 5.004.810 (oligómeros para hibridar con ARNm de virus del herpes simple Vmw65 e inhibir la replicación). Véase también Patente de Estados Unidos Nº 7.098.190 de Becker y Green (formulaciones que comprenden nucleótidos antisentido para conexinas). También se han presentado inhibidores peptídicos de uniones comunicantes y hemicanales. Véase por ejemplo, Berthoud *et al.* (2000) *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279: L619-L622; Evans, W. H. y Boitano, S. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 606-612, y De Vriese A. S., *et al.* (2001) *Kidney Int.* 61: 177-185. Véase también Green y Becker, documento WO2006/134494 ("Anti-connexin compounds and methods of use").

45

50

55

A pesar de los avances en el entendimiento de los principios que subyacen al proceso de curación de heridas, sigue habiendo una necesidad no satisfecha significativa de opciones terapéuticas adecuadas para el cuidado de heridas, incluyendo heridas que no se curan a las velocidades esperadas, tales como heridas de curación retardada, heridas de curación incompleta y heridas crónicas. Dichas composiciones y tratamientos terapéuticos se describen y reivindican en el presente documento.

60

Breve resumen

Las invenciones se refieren en general al uso de un polinucleótido anticonexina incluyendo, por ejemplo, un polinucleótido antisentido de conexina, y composiciones y métodos para el tratamiento de heridas que no se curan a

65

las velocidades esperadas, tales como heridas de curación retardada, heridas de curación incompleta y heridas crónicas.

5 La presente invención posibilita aumentos y mejoras en la curación de heridas que no se curan a las velocidades esperadas, tales como heridas de curación retardada, heridas de curación incompleta, y heridas crónicas, mediante el uso de uno o más polinucleótidos antisentido de conexina.

10 También se refieren al uso de un polinucleótido anticonexina en combinación con apósitos, vendas, matrices y envolturas. En un aspecto, la invención comprende una matriz de curación de heridas de origen natural o sintético que comprende un polinucleótido anticonexina. En ciertas realizaciones, el polinucleótido anticonexina es un polinucleótido anticonexina 43, por ejemplo, un polinucleótido anticonexina 43. Los polinucleótidos anticonexina preferidos incluyen oligodesoxinucleótidos anticonexina, tales como oligodesoxinucleótidos anticonexina 43.

15 También se refieren al uso de polinucleótidos anticonexina, solos o en combinación con apósitos, vendas, matrices y envolturas, en aplicaciones repetidas, por ejemplo, una vez por semana hasta que se complete la curación o según se desee.

20 Se describen y se reivindican composiciones y métodos de la invención que emplean polinucleótidos anticonexina, incluyendo polinucleótidos antisentido de conexina.

25 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende uno o más polinucleótidos antisentido de conexina. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende además un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las invenciones incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido antisentido de conexina farmacéuticamente aceptable y (b) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

30 En un aspecto, la invención incluye composiciones farmacéuticas, incluyendo formas de administración tópica y formulaciones que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y cantidades terapéuticamente eficaces de un polinucleótido anticonexina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, y más preferentemente un polinucleótido antisentido de conexina 43.

35 Los ejemplos de un polinucleótido antisentido de conexina incluyen un oligodesoxinucleótido (ODN) anticonexina, incluyendo polinucleótidos antisentido (incluyendo antisentido de cadena principal modificada y no modificada; por ejemplo, un polinucleótido antisentido de ADN que se une con ARNm de conexina), de ARNi y de ARNip.

40 En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona una formulación que comprende al menos un polinucleótido antisentido de conexina para una proteína conexina junto con un vehículo o transportador farmacéuticamente aceptable para su uso de acuerdo con la reivindicación 1.

45 La invención incluye una formulación que comprende un polinucleótido anticonexina farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un polinucleótido antisentido de conexina, en una cantidad eficaz para promover la curación de heridas en un sujeto que tiene una herida crónica o una herida caracterizada por curación retardada, u otras heridas que no se curan a las velocidades esperadas. Dichas formulaciones incluyen, por ejemplo, formas y formulaciones de administración tópica. Los polinucleótidos anticonexina y polinucleótidos antisentido de conexina son polinucleótidos anticonexina 43 y polinucleótidos antisentido de conexina 43.

50 Convenientemente, el oligodesoxinucleótido para conexina 43 se selecciona de: GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC (SEQ ID NO: 1); GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC (SEQ ID NO: 2); GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT (SEQ ID NO: 3), un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente 70 % de homología con SEQ ID NO: 1, 2 o 3 o un polinucleótido que hibrida con ARNm de conexina 43 en condiciones de media a alta astringencia.

55 Los polinucleótidos antisentido se administran preferentemente por vía tópica (en y/o cerca del sitio a tratar). Convenientemente los polinucleótidos antisentido se combinan con un vehículo, transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable para proporcionar una composición farmacéutica.

60 Los vehículos o transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen cualquiera de los habitualmente usados para administración tópica. La formulación tópica puede estar en forma, por ejemplo, de una crema, pomada, gel, emulsión, loción, pulverización, espuma o pintura. La formulación de la invención también puede presentarse en forma de un apósito impregnado.

65 Preferentemente, el vehículo o transportador farmacéuticamente aceptable es un gel, convenientemente un gel de copolímero de polioxietileno-polioxipropileno no iónico, por ejemplo, un gel Pluronic, preferentemente Pluronic F-127 (BASF Corp.). Este gel puede usarse como un líquido a temperaturas bajas pero se endurece rápidamente a temperaturas fisiológicas, lo que puede ayudar a confinar la liberación del componente oligonucleotídico

5 anticonexina al sitio de aplicación o inmediatamente adyacente a ese sitio. Se prefieren para aplicación tópica geles de liberación lenta en los que el oligonucleótido de anticonexina se libera a lo largo del tiempo. Por lo tanto, la composición farmacéutica puede formularse para proporcionar liberación sostenida del polinucleótido anticonexina, por ejemplo, un polinucleótido antisentido. Los polinucleótidos anticonexina y polinucleótidos antisentido de conexina son polinucleótidos anticonexina 43 y polinucleótidos antisentido de conexina 43.

10 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más polinucleótidos antisentido de conexina farmacéuticamente aceptables formulados en una preparación de liberación retardada, una preparación de liberación lenta, una preparación de liberación extendida, una preparación de liberación controlada y/o en una preparación de acción repetida a un sujeto con una herida caracterizada completamente o en parte por curación de herida retardada o incompleta, u otra herida que no se cura a una velocidad esperada. Dichas formulaciones son particularmente ventajosas para heridas que no se curan a las velocidades esperadas, tales como heridas crónicas.

15 En ciertos otros aspectos, las invenciones también proporcionan métodos para usar dichas composiciones para tratar sujetos que padecen diversas enfermedades, trastornos y afecciones asociados con una herida que no se cura a la velocidad esperada, tal como una herida de curación retardada, una herida de curación incompleta o una herida crónica. En otro aspecto más, la invención proporciona métodos para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene cualquier enfermedad, trastorno y/o afección caracterizado completamente o en parte por una herida crónica o curación de herida retardada o incompleta, u otra herida que no se cura a una velocidad esperada. Dichas composiciones incluyen, por ejemplo, formas y formulaciones de administración tópica. Los polinucleótidos anticonexina y polinucleótidos antisentido de conexina son polinucleótidos anticonexina 43 y polinucleótidos antisentido de conexina 43.

25 En un aspecto adicional, la invención incluye parches transdérmicos, apósitos, almohadillas, vendajes, matrices y vendas capaces de adherirse o asociarse de otro modo con la piel de un sujeto, siendo dichos artículos capaces de suministrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más polinucleótidos anticonexina farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, polinucleótidos antisentido de conexina.

30 La invención incluye dispositivos que contienen cantidades terapéuticamente eficaces de uno o más polinucleótidos anticonexina farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, polinucleótidos antisentido de conexina, por ejemplo, una membrana de control de la velocidad que incluye un depósito farmacológico y un dispositivo de matriz monolítico. Estos dispositivos pueden emplearse para el tratamiento de sujetos que lo necesiten como se describe en el presente documento. Convenientemente se proporciona el apósito o matriz de heridas incluyendo la forma de un sustrato sólido con un polinucleótido anticonexina, por ejemplo, un polinucleótido antisentido de conexina, dispersado sobre o en el sustrato sólido. En una realización el producto farmacéutico de la invención se proporciona en combinación con un apósito de heridas o matriz promotora de la curación de heridas. Los polinucleótidos anticonexina y polinucleótidos antisentido de conexina son polinucleótidos anticonexina 43 y polinucleótidos antisentido de conexina 43.

40 En un aspecto adicional más, la invención proporciona un método para promover la curación de heridas en un paciente que tiene una curación de heridas retardada o una herida crónica, que comprende la etapa de administrar una formulación como se define en el presente documento a dicha herida en una cantidad eficaz para regular negativamente la expresión de proteínas conexas en e inmediatamente adyacentes al sitio de dicha herida. Se incluyen aplicaciones repetidas dentro de la invención. Se prefiere la regulación negativa de la conexina 43.

50 Un aspecto de la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene una curación retardada o herida crónica, u otra herida que no se cura a una velocidad esperada, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un polinucleótido anticonexina, por ejemplo, un polinucleótido anticonexina. Un polinucleótido anticonexina adecuado puede seleccionarse del grupo que consiste en un polinucleótido antisentido de conexina (por ejemplo, un polinucleótido antisentido de ADN que se une con un ARNm de conexina), un polinucleótido de ARNi y un polinucleótido de ARNip. Los polinucleótidos anticonexina bloquean o inhiben la expresión de conexina 43. Se proporcionan por la invención aplicaciones repetidas.

55 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene una herida de curación retardada o incompleta o una herida crónica, u otra herida que no se cura a una velocidad esperada, que comprende la administración sostenida de una cantidad eficaz de un polinucleótido antisentido de conexina 43 a la herida. Convenientemente, el polinucleótido antisentido se administra o se suministra durante al menos aproximadamente 0,5 horas, aproximadamente 1-2 horas, aproximadamente 2-4 horas, aproximadamente 4-6 horas o aproximadamente 6-8 horas, pero puede administrarse durante más tiempo, por ejemplo, hasta 24 horas, o más. Se prefiere en la actualidad la aplicación o suministro de 1-2 horas, 2-3 horas y 4-8 horas. De acuerdo con una realización el sujeto es diabético. En otras realizaciones, el paciente tiene una úlcera diabética, una úlcera de pie diabético, una úlcera vasculítica, una úlcera venosa, una úlcera de estasis venosa, una úlcera arterial, una úlcera de presión, una úlcera de decúbito, una úlcera infecciosa, una úlcera inducida por traumatismo, una úlcera de quemadura, ulceraciones asociadas con pioderma gangrenosa, o una úlcera o úlceras mixtas. Se incluyen aplicaciones repetidas dentro de la invención. Se prefieren aplicaciones repetidas hasta que se vea que sucede el

cierre de la herida, seguido de una aplicación (o aplicaciones) repetida en el caso de que la curación de heridas se vuelva a detener o retardar.

5 De acuerdo con un aspecto alternativo, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que
 10 tiene una herida de curación retardada o incompleta o una herida crónica, u otra herida que no se cura a una
 15 velocidad esperada, que comprende administración sostenida a la herida (o al área en o alrededor de un área de
 herida) de un polinucleótido antisentido de conexina 43 de modo que la expresión de conexina 43 se regula
 negativamente durante un periodo de tiempo sostenido. Convenientemente, la expresión de conexina 43 se regula
 negativamente durante al menos aproximadamente 0,5 horas, aproximadamente 1-2 horas, aproximadamente 2-4
 20 horas, aproximadamente 4-6 horas, o aproximadamente 6-8 horas, pero puede administrarse durante más tiempo,
 por ejemplo, hasta 24 horas, o más. Se prefieren en la actualidad administraciones sostenidas de 0,5, 1-2 horas y 4-
 8 horas. Los sujetos adecuados incluyen un sujeto diabético. En otras realizaciones, el paciente tiene una úlcera
 diabética, una úlcera de pie diabético, una úlcera vasculítica, una úlcera venosa, una úlcera de estasis venosa, una
 25 úlcera arterial, una úlcera de presión, una úlcera de decúbito, una úlcera infecciosa, una úlcera inducida por
 traumatismo, una úlcera de quemadura, ulceraciones asociadas con pioderma gangrenosa, o una úlcera o úlceras
 mixtas. Se incluyen dentro de la invención aplicaciones repetidas. Se prefieren aplicaciones repetidas hasta que se
 vea que sucede el cierre de la herida, seguido de una aplicación (o aplicaciones) repetida en el caso de que la
 curación de herida se vuelva a detener o retardar.

20 De acuerdo con un aspecto adicional, se proporciona la administración sostenida a la herida de una cantidad de un
 polinucleótido antisentido de conexina 43 eficaz para regular negativamente la expresión de conexina 43 durante un
 periodo de tiempo sostenido. Además de acuerdo con este aspecto, se promueve la curación de heridas de una
 25 herida que no se cura a las velocidades esperadas, incluyendo heridas de curación retardada, heridas de curación
 alterada, y heridas crónicas. En una realización la herida es una úlcera diabética, una úlcera de pie diabético, una
 30 úlcera vasculítica, una úlcera venosa, una úlcera de estasis venosa, una úlcera arterial, una úlcera de presión, una
 úlcera de decúbito, una úlcera infecciosa, una úlcera inducida por traumatismo, una úlcera de quemadura, una
 ulceración asociada con pioderma gangrenosa, o una úlcera o úlceras mixtas. Se incluyen dentro de la invención
 aplicaciones repetidas. Se prefieren aplicaciones repetidas hasta que se vea que sucede el cierre de la herida,
 seguido de una aplicación (o aplicaciones) repetida en el caso de que la curación de herida se vuelva a detener o
 retardar.

De acuerdo con otros aspectos de la presente invención se promueve la reepitelización de heridas y/o formación de
 tejido de granulación.

35 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para promover la curación de heridas en un
 sujeto que tiene una herida que no se cura a una velocidad esperada, incluyendo una herida de curación retardada o
 una herida de curación incompleta o una herida crónica, que comprende la administración sostenida de un
 polinucleótido antisentido de conexina 43 y un polinucleótido antisentido de conexina 31.1. Se incluyen dentro de la
 invención aplicaciones repetidas.

40 Un aspecto alternativo de la presente invención proporciona un método para promover la reepitelización de heridas
 cutáneas que comprende administrar a un sujeto que tiene una herida que no se cura a la velocidad esperada,
 incluyendo, por ejemplo, una herida de curación retardada o de curación incompleta, o una herida crónica, un
 polinucleótido anticonexina, por ejemplo, un polinucleótido anticonexina en una cantidad eficaz para promover la
 45 reepitelización. El polinucleótido anticonexina se dirige contra conexina 43. Los polinucleótidos adecuados pueden
 seleccionarse de un polinucleótido antisentido de conexina de cadena principal modificada o no modificada (por
 ejemplo, un polinucleótido antisentido de ADN que se une con un ARNm de conexina), un polinucleótido de ARNi y
 un polinucleótido de ARNip. Se incluyen dentro de la invención aplicaciones repetidas.

50 En un aspecto adicional más, la presente invención proporciona un método para promover la curación de heridas en
 un sujeto que tiene una herida que no se cura a la velocidad esperada, incluyendo, por ejemplo, una herida de
 curación retardada o una herida de curación incompleta o una herida crónica, que comprende la administración
 sostenida de un polinucleótido anticonexina, por ejemplo, un polinucleótido antisentido de conexina, que es eficaz
 para regular la división y el crecimiento de células basales epiteliales y un polinucleótido anticonexina, por ejemplo,
 55 un polinucleótido antisentido de conexina, que es eficaz para regular la secreción de queratina de la capa externa. El
 polinucleótido anticonexina, por ejemplo, polinucleótido antisentido de conexina, eficaz para regular la división o
 crecimiento de células basales epiteliales es un polinucleótido antisentido de conexina 43.

Se incluyen dentro de la invención aplicaciones repetidas.

60 En otra realización, la herida crónica es una herida cutánea crónica y un polinucleótido anticonexina se administra a
 la piel o un tejido asociado con la piel de dicho sujeto durante un periodo de tiempo eficaz. Una herida cutánea
 crónica adecuada para el tratamiento puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en úlceras de
 presión, úlceras de decúbito, úlceras diabéticas, úlceras de pie diabético, úlceras venosas, úlceras de estasis
 65 venosa, úlceras arteriales, úlceras vasculíticas, úlceras infecciosas, úlceras inducidas por traumatismo, úlceras de
 quemadura, ulceraciones asociadas con la pioderma gangrenosa y úlceras mixtas. La herida crónica puede ser una

úlceras arteriales que comprenden ulceraciones resultantes del bloqueo arterial completo o parcial. La herida crónica puede ser una úlcera venosa o úlcera de estasis venosa que comprende ulceraciones resultantes de un fallo de la válvula venosa y la enfermedad vascular asociada. La herida crónica puede ser una úlcera inducida por traumatismo. Se incluyen dentro de la invención aplicaciones repetidas.

5 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un método para aumentar la velocidad de curación o cierre de heridas en un sujeto que tiene una herida que no se cura a la velocidad esperada (incluyendo una herida de curación retardada, una herida de curación incompleta y una herida crónica) que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polinucleótido anticonexina. Un polinucleótido adecuado se selecciona de un polinucleótido antisentido de conexina (por ejemplo, un polinucleótido antisentido de ADN que se une con un ARNm de conexina), un polinucleótido de ARN y un polinucleótido de ARNip. Un polinucleótido antisentido de conexina adecuado es un polinucleótido de conexina 43. Los polinucleótidos particularmente adecuados tienen de aproximadamente 18 a aproximadamente 32 nucleótidos. Se incluyen dentro de la invención aplicaciones repetidas. Un oligonucleótido preferido en la actualidad es SEQ ID NO: 1.

15 La invención proporciona métodos para el uso de cantidades terapéuticamente eficaces de uno o más polinucleótidos anticonexina farmacéuticamente aceptables, incluyendo polinucleótidos antisentido de conexina, en la fabricación de un medicamento o forma de dosificación. Dichos medicamentos, formulaciones y formas de dosificación incluyen, por ejemplo, formas y formulaciones de administración tópica. Dichos medicamentos incluyen los del tratamiento de un sujeto como se describe en el presente documento. Los polinucleótidos anticonexina y polinucleótidos antisentido de conexina son polinucleótidos anticonexina 43 y polinucleótidos antisentido de conexina 43. Preferentemente, el medicamento, formulación o forma de dosificación es una espuma, crema, pulverización o gel.

25 También se describe en el presente documento un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más polinucleótidos anticonexina farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, polinucleótidos antisentido de conexina e instrucciones para su uso. Dichas instrucciones pueden incluir instrucciones con respecto a su uso para el tratamiento de un sujeto que tiene una herida crónica o una herida caracterizada por curación retardada. Las instrucciones pueden incluir instrucciones para su uso con respecto a heridas que no se curan a las velocidades esperadas, tales como heridas de curación retardada, heridas de curación incompleta y heridas crónicas. Los polinucleótidos anticonexina y polinucleótidos antisentido de conexina son polinucleótidos anticonexina 43 y polinucleótidos antisentido de conexina 43.

35 También se describe en el presente documento un artículo de fabricación que comprende material de envasado que contiene una o más formas de dosificación que contienen uno o más polinucleótidos anticonexina farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, polinucleótidos antisentido de conexina, en el que el material de envasado tiene una etiqueta que indica que la forma de dosificación puede usarse para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene o está predispuesto a cualquiera de las enfermedades, trastornos y/o afecciones descritos o referidos en el presente documento, incluyendo enfermedades, trastornos y/o afecciones caracterizados completamente o en parte por curación de heridas alterada o retardada o una herida crónica, u otras heridas que no se curan a las velocidades esperadas. Dichas formas de dosificación incluyen, por ejemplo, formas y formulaciones de administración tópica. Los polinucleótidos anticonexina y polinucleótidos antisentido de conexina son polinucleótidos anticonexina 43 y polinucleótidos antisentido de conexina 43.

45 También se describe en el presente documento un envase que comprende un polinucleótido anticonexina, por ejemplo, un polinucleótido antisentido de conexina, junto con instrucciones para su uso para la promoción (por ejemplo, reducción del tiempo de curación, mejor resultado de heridas) de la curación de heridas para una herida de curación retardada o incompleta o una herida crónica.

50 En todos los aspectos de la invención, el polinucleótido anticonexina es un polinucleótido anticonexina 43, el polinucleótido antisentido de conexina es un polinucleótido antisentido de conexina 43 y el oligodesoxinucleótido antisentido de conexina es un oligodesoxinucleótido de conexina 43.

55 Estos y otros aspectos de la presente invención, que no se limitan a o por la información en este Breve Resumen, se proporcionan posteriormente.

Breve descripción de los dibujos

60 Las Figuras 1A a 1D representan la inmunotinción de conexina en los fibroblastos dérmicos, folículos pilosos, vasos sanguíneos y apéndices. La Figura 1A representa la tinción para conexina 43 en la epidermis y dermis y tinción para conexina 26 en la epidermis en piel normal (barras abiertas) y diabética (barras sólidas), dos semanas después de la inducción de la diabetes. La Figura 1B representa los efectos en la expresión de conexina ocho semanas después de la inducción por STZ de diabetes. La Figura 1C representa inmunotinción de conexina en control (C) y diabéticos (D) a las 8 semanas en la que las cabezas de flecha marcan el límite entre la epidermis y la dermis. La Figura 1D representa la cuantificación de la distancia de transferencia de colorante del colorante permanente de unión comunicante al tejido en cinco minutos en epidermis y dermis no diabética (barras abiertas) y diabética (barras

sólidas).

Las Figuras 2A a 2D representan tasas de reepitelización y respuestas de niveles de proteína conexina 43 y conexina 26 midiendo la tinción de conexina después de la herida. La Figura 2A representa zonas en las que se cuantificó la tinción de conexina en queratinocitos: borde de la herida (BH), una zona adyacente a 500 μm de distancia (AD) y borde anterior (BA). La tinción de conexina en BH y AD se cuantificó uno y dos días después de la herida. Se capturaron imágenes de queratinocitos de BA después de 5 días. La Figura 2B representa la velocidad de reepitelización a los 1, 2 y 5 días después de la herida en piel de control (C) y diabética (D). La Figura 2C representa tinción de conexina 43 1, 2 y 5 días después de la herida en el BH, AD y BA en animales de control (barras abiertas) y diabéticos (barras sólidas). La Figura 2D representa la tinción de conexina 26 1, 2 y 5 días después de la herida en zonas BH, AD y BA en animales de control (barras abiertas) y diabéticos (barras sólidas).

Las Figuras 3 a a 3 f y 3 a' a 3 f representan la tinción de conexina 1, 2 y 5 días después de la herida en animales de control y diabéticos. Las Figuras 3a, 3c y 3e (control) y 3a', 3c' y 3e' (diabético) representan tinción de conexina 43 1 (Figuras 3a y 3a'), 2 (Figuras 3c y 3c') y 5 (Figuras 3e y 3e') días después de la herida. Las Figuras 3b, 3d y 3f (control) y 3b', 3d' y 3f' (diabético) representan tinción de conexina 26 1 (Figuras 3b y 3b'), 2 (Figuras 3d y 3d') y 5 (Figuras 3f y 3f') después de la herida.

Las Figuras 4A a 4C representan los efectos de la aplicación de una composición de oligodesoxinucleótidos antisentido de conexina 43 en la expresión de conexina 43 y la curación de heridas. Las Figuras 4A (control sentido) y Figura 4B (antisentido de conexina 43) representan la expresión de conexina 43 en queratinocitos de BH diabéticos. La Figura 4C representa el porcentaje de reepitelización, 1, 2 y 5 días después de la herida en heridas de control (C) y diabéticas (D) con el tratamiento de polinucleótidos sentido ("s") y antisentido de conexina 43 ("as").

25 Descripción detallada

Las heridas que no se curan a las velocidades esperadas, incluyendo heridas de curación lenta, heridas de curación retardada, heridas de curación incompleta, heridas con dehiscencia y heridas crónicas dan como resultado con frecuencia infección y pueden conducir a la amputación o la muerte. La comunicación entre células a través de uniones comunicantes desempeña papeles clave en la curación de heridas. Se ha descubierto que el uso de ciertos compuestos, incluyendo los descritos o referidos en el presente documento, puede bloquear, inhibir o alterar las comunicaciones celulares, lo que promueve el cierre y la curación de heridas que no se curan a las velocidades esperadas, incluyendo heridas de curación lenta, heridas de curación retardada, heridas de curación incompleta, heridas con dehiscencia y heridas crónicas. Para todas las aplicaciones, se prefieren agentes moduladores de unión comunicante de conexina 43.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, un "trastorno" es cualquier trastorno, enfermedad o afección que se beneficiaría de un agente que promueva la curación de heridas y/o reduzca la cicatrización. Por ejemplo, se incluyen anomalías asociadas con heridas en relación con patología neuropática, isquémica y microvascular; presión sobre el área ósea [coxis (sacro), cadera (trocanterico), nalgas (isquial) o talón]; lesión por reperfusión; y afecciones asociadas con la etiología del reflujo de válvula y afecciones relacionadas.

Como se usa en el presente documento, un "sujeto" se refiere a cualquier mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, ovejas, cerdos, vacas, etc. El mamífero preferido en el presente documento es un ser humano, incluyendo adultos, niños y ancianos.

Como se usa en el presente documento, "prevenir" significa prevenir completamente o en parte, o aliviar o controlar.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" en referencia a los compuestos o composiciones de la presente invención se refiere a la cantidad suficiente para inducir un resultado biológico, farmacéutico o terapéutico deseado. Ese resultado puede ser el alivio de las señales, los síntomas o las causas de una enfermedad, trastorno o afección, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En la presente invención, el resultado implicará la promoción y/o mejora de la curación de heridas, incluyendo velocidades de curación de heridas y cierre de heridas, completamente o en parte. Otros beneficios incluyen las reducciones en la hinchazón, inflamación y/o cicatrización, completamente o en parte.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas.

Como se usa en el presente documento, "simultáneamente" se usa para indicar que el o los polinucleótidos anticonexina, por ejemplo, polinucleótidos antisentido, se administran simultáneamente, mientras que la expresión "en combinación" se usa para indicar que se administran, si no simultáneamente o en combinación física, entonces "secuencialmente" dentro de un marco temporal en el que ambos están disponibles para actuar terapéuticamente.

Por lo tanto, la administración “secuencialmente” puede permitir que un agente se administre en un intervalo de minutos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30) minutos o en horas, días, semanas o meses después del otro siempre que uno o más polinucleótidos anticonexina estén presentes simultáneamente en cantidades eficaces. El retardo temporal entre la administración de los componentes variará dependiendo de la naturaleza exacta de los componentes, la interacción entre ellos, y sus respectivas vidas medias.

Como se usa en el presente documento, un “polinucleótido anticonexina” reduce o inhibe la expresión de ARNm de conexina y/o proteína. Los polinucleótidos anticonexina incluyen, sin limitación, compuestos antisentido tales como polinucleótidos antisentido, otros polinucleótidos (tales como polinucleótidos que tienen funciones de ribozimas o ARNip). Los ejemplos adecuados de un polinucleótido anticonexina incluyen un polinucleótido antisentido para una conexina. En consecuencia, los polinucleótidos anticonexina adecuados incluyen, por ejemplo, polinucleótidos antisentido (por ejemplo, polinucleótidos antisentido de conexina 43) que modulan la expresión o actividad de conexinas y uniones comunicantes en tejidos, células y sujetos seleccionados.

La expresión “apósito de heridas” se refiere a un apósito para aplicación tópica a una herida y excluye composiciones adecuadas para administración sistémica. Por ejemplo, el o los polinucleótidos anticonexina (tales como polinucleótidos antisentido de conexina) pueden dispersarse en o sobre una lámina sólida de material en contacto con la herida tal como un material textil tejido o no tejido, o puede dispersarse en una capa de espuma tal como espuma de poliuretano, o en un hidrogel tal como un hidrogel de poliuretano, un hidrogel de poliacrilato, gelatina, carboximetil celulosa, pectina, alginato y/o hidrogel de ácido hialurónico, por ejemplo en un gel o pomada. En ciertas realizaciones el o los polinucleótidos anticonexinas se dispersan en o sobre un material de lámina biodegradable que proporciona liberación sostenida de los principios activos a la herida, por ejemplo una lámina de colágeno liofilizado, mezclas de alginato/colágeno liofilizado (disponibles con la Marca Comercial Registrada FIBRACOL de Johnson & Johnson Medical Limited) o celulosa regenerada oxidada/colágeno liofilizado (disponible con la Marca Comercial Registrada PROMOGRAN de Johnson & Johnson Medical Limited).

Como se usa en el presente documento, “matriz promotora de heridas” incluye por ejemplo, matrices de origen natural o sintético tales como colágeno, matriz acelular, moléculas de armazón biológico reticulado, almacén estructural de bioingeniería basado en tejido, bioprótesis biomanufacturadas y otras estructuras implantadas tales como por ejemplo injertos vasculares adecuados para la infiltración y proliferación celular útiles en la promoción de la curación de heridas. El material de biomatriz adecuado adicional puede incluir tejido de colágeno modificado químicamente para reducir la antigenicidad e inmunogenicidad. Otros ejemplos adecuados incluyen láminas de colágeno para apósitos de heridas, matriz acelular reducida en antígenos o sin antígenos (Wilson G J *et al.* (1990) *Trans Am Soc Artif Intern* 36: 340-343) u otra biomatriz que se haya construido para reducir la respuesta antigénica al material de xenoinjerto. Otras matrices útiles en la promoción de la curación de heridas pueden incluir por ejemplo, proteínas del pericardio bovino procesadas que comprenden colágeno insoluble y elastina (Courtman DW *et al.* (1994) *J Biomed Mater Res* 28: 655-666) y otro tejido acelular que puede ser útil para proporcionar un microambiente natural para la migración de células hospedadoras para acelerar la regeneración tisular (Malone J M *et al.* (1984) *J Vasc Surg* 1: 181-91). La invención contempla una matriz sintética o natural que comprende uno o más polipéptidos anticonexina descritos en el presente documento, incluyendo polipéptidos anticonexina 43. Se prefieren oligodesoxinucleótidos antisentido de conexina 43.

Como se usa en el presente documento, el término “herida” incluye una lesión a cualquier tejido, incluyendo por ejemplo, heridas de curación retardada o difíciles de curar, y heridas crónicas. Los ejemplos de heridas pueden incluir heridas tanto abiertas como cerradas. El término “herida” también puede incluir por ejemplo, lesiones de la piel y tejido subcutáneo iniciadas de diferentes maneras (por ejemplo, úlceras por presión de descanso en cama prolongado y heridas inducidas por traumatismo) y con diversas características. Las heridas pueden clasificarse en uno de cuatro grados dependiendo de la profundidad de la herida: i) heridas de Grado I limitadas al epitelio; ii) heridas de Grado II que se extienden a la dermis; iii) heridas de Grado III que se extienden al tejido subcutáneo; y iv) heridas de Grado IV (o heridas de grosor completo) en las que se exponen los huesos (por ejemplo, un punto de presión ósea tal como el trocánter mayor o el sacro).

La expresión “herida de grosor parcial” se refiere a heridas que abarcan los Grados I-III. Los ejemplos de heridas de grosor parcial incluyen úlceras de presión, úlceras de estasis venosa y úlceras diabéticas. La presente invención contempla el tratamiento de todas las heridas de un tipo que no se curan a las velocidades esperadas, incluyendo heridas de curación retardada, heridas de curación incompleta y heridas crónicas.

Una “herida que no se cura a la/una velocidad esperada” significa una lesión de cualquier tejido, incluyendo heridas de curación retardada o difíciles de curar (incluyendo heridas de curación retardada o incompleta) y heridas crónicas. Los ejemplos de heridas que no se curan a la velocidad esperada incluyen úlceras, tales como úlceras diabéticas, úlceras de pie diabético, úlceras vasculíticas, úlceras arteriales, úlceras venosas, úlceras de estasis venosa, úlceras de presión, úlceras de decúbito, úlceras infecciosas, úlceras inducidas por traumatismo, úlceras de quemadura, ulceraciones asociadas con pioderma gangrenosa y úlceras mixtas. Otras heridas que no se curan a la velocidad esperada incluyen heridas con dehiscencia.

Como se usa en el presente documento, una herida con curación retardada o difícil de curar puede incluir, por ejemplo, una herida que se caracteriza al menos en parte por 1) una fase inflamatoria prolongada, 2) una matriz extracelular de formación lenta y/o 3) una velocidad reducida de epitelización o cierre.

5 La expresión “herida crónica” se refiere en general a una herida que no se ha curado. Las heridas que no se curan en un periodo de tres meses, por ejemplo, se consideran crónicas. Las heridas crónicas incluyen úlceras venosas, úlceras de estasis venosa, úlceras arteriales, úlceras de presión, úlceras diabéticas, úlceras de pie diabético, úlceras vasculífticas, úlceras de decúbito, úlceras de quemadura, úlceras inducidas por traumatismo, úlceras infecciosas, úlceras mixtas y pioderma gangrenosa. La herida crónica puede ser una úlcera arterial que comprende ulceraciones resultantes de bloqueo arterial completo o parcial. La herida crónica puede ser una úlcera venosa o de estasis venosa que comprende ulceraciones resultantes de un fallo de la válvula venosa y la enfermedad vascular asociada. En ciertas realizaciones se proporciona un método para tratar una herida crónica en el que la herida crónica se caracteriza por uno o más de los siguientes estadios de AH CPR de ulceración por presión: estadio 1, estadio 2, estadio 3, y/o estadio 4.

15 Como se usa en el presente documento, la herida crónica puede referirse a, por ejemplo, una herida que se caracteriza al menos en parte por uno o más de (1) un estado crónico de inflamación de herida que se auto perpetúa, (2) una matriz extracelular de herida deficiente y defectuosa, (3) células de herida con poca respuesta (senescentes) especialmente fibroblastos, que limitan la producción de matriz extracelular, y/o (4) insuficiencia de la reepitelización debido en parte a falta de la orquestación de matriz extracelular necesaria y falta de almacén para la migración. Las heridas crónicas también pueden caracterizarse por 1) inflamación y actividad proteolítica prolongadas que conducen a lesiones ulcerantes, incluyendo por ejemplo, úlceras diabéticas, de presión (decúbito), venosas y arteriales; 2) deposición progresiva de la matriz en el área afectada, 3) tiempos de reparación más largos, 4) menor contracción de la herida, 5) reepitelización más lenta, y 6) aumento del grosor del tejido de granulación.

25 Las heridas crónicas ejemplares pueden incluir “úlceras de presión”. Las úlceras de presión ejemplares pueden clasificarse en 4 estadios basándose en las directrices de la AH CPR (Agencia para la Política e Investigación de Cuidados Sanitarios, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos). Una úlcera de presión de estadio I es una alteración relacionada con la presión observable de piel intacta cuyos indicadores en comparación con el área adyacente u opuesta en el cuerpo pueden incluir cambios en uno o más de los siguientes: temperatura cutánea (calor o frío), consistencia tisular (sensación firme o blanda) y/o sensación (dolor, prurito). La úlcera aparece como un área definida de rojez persistente en piel ligeramente pigmentada, mientras que en tonos de piel más oscuros, la úlcera puede aparecer con tonos rojos, azules o púrpuras persistentes. La ulceración de estadio 1 puede incluir eritema no blanqueable de piel intacta y la lesión de partida de ulceración cutánea. En individuos con piel más oscura, la decoloración de la piel, el calor, el edema, el endurecimiento o la dureza pueden ser también indicadores de ulceración de estadio 1. La ulceración de Estadio 2 puede caracterizarse por pérdida parcial de grosor de la piel que implica la epidermis, la dermis o ambas. La úlcera es superficial y se presenta clínicamente como una abrasión, ampolla u hoyo poco profundo. La ulceración de Estadio 3 puede caracterizarse por pérdida de piel de grosor completo que implica daño a o necrosis del tejido subcutáneo que puede extenderse hasta, pero no a través de, la fascia subyacente. La úlcera se presenta clínicamente como un hoyo profundo con o sin socavación del tejido adyacente. La ulceración de Estadio 4 puede caracterizarse por pérdida de piel de grosor completo con destrucción extensiva, necrosis tisular o daño al músculo, hueso o estructuras de apoyo (por ejemplo, tendón, cápsula de la articulación). En ciertas realizaciones se proporciona un método para tratar una herida crónica en el que la herida crónica se caracteriza por uno o más de los siguientes estadios de AH CPR de ulceración de presión: estadio 1, estadio 2, estadio 3, y/o estadio 4.

50 Las heridas crónicas ejemplares también pueden incluir “úlceras por decúbito”. Las úlceras por decúbito ejemplares pueden surgir como resultado de presión prolongada y persistente sobre una prominencia ósea que conduce a isquemia. La herida tiende a aparecer en pacientes que son incapaces de cambiarse de posición por sí solos para descargar peso, tales como personas paralizadas, inconscientes o gravemente debilitadas. Como se define por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, las medidas preventivas principales incluyen identificación de pacientes de alto riesgo; evaluación frecuente; y medidas profilácticas tales como cambio de posición programado, camas de alivio de presión apropiado, barreras de humedad y estado nutricional adecuado. Las opciones de tratamiento pueden incluir, por ejemplo, alivio de presión, cirugía y desbridamiento enzimático, cuidado de herida húmeda y control de la carga bacteriana. En ciertas realizaciones se proporciona un método para tratar una herida crónica en el que la herida crónica se caracteriza por úlcera o ulceración por decúbito, que resulta de presión prolongada, persistente sobre una prominencia ósea que conduce a isquemia.

60 Las heridas crónicas también pueden incluir “úlceras arteriales”. Se entiende en general que las úlceras arteriales crónicas son ulceraciones que acompañan la enfermedad cardiovascular arteriosclerótica e hipertensiva. Son dolorosas, de márgenes marcados, y con frecuencia se encuentran en las extremidades inferiores laterales y los dedos de los pies. Las úlceras arteriales pueden caracterizarse por bloqueo arterial completo o parcial, que puede conducir a necrosis tisular y/o ulceración. Las señales de úlcera arterial pueden incluir, por ejemplo, ausencia de pulso en la extremidad; ulceración dolorosa; úlceras puntuadas, pequeñas, que se circunscriben habitualmente bien; piel fría o helada; tiempo de retorno capilar retardado (presionar brevemente sobre el extremo del dedo de pie y liberar, el color normal debería volver al dedo del pie en aproximadamente 3 segundos o menos); piel de apariencia

atrófica (por ejemplo, brillante, fina, seca); y pérdida de pelo dactilar y del pie. En ciertas realizaciones se proporciona un método para tratar una herida crónica en el que la herida crónica se caracteriza por úlceras o ulceraciones arteriales debido al bloqueo arterial completo o parcial.

5 Las heridas crónicas ejemplares pueden incluir "úlceras venosas". Las úlceras venosas ejemplares son el tipo más común de úlcera que afecta a las extremidades inferiores y puede caracterizarse por el fallo de la válvula venosa. La vena normal tiene válvulas que evitan el reflujo de la sangre. Cuando estas válvulas se hacen incompetentes, el reflujo de la sangre venosa provoca congestión venosa. La hemoglobina de los glóbulos rojos se escapa y se filtra al espacio extravascular, provocando la decoloración marrón habitualmente observada. Se ha mostrado que la presión de oxígeno transcutáneo de la piel que rodea a una úlcera venosa está reducida, lo que sugiere que hay fuerzas que obstruyen la vascularidad normal del área. El drenaje y flujo linfático también desempeñan un papel en estas úlceras. La úlcera venosa puede aparecer cerca del maléolo medio y habitualmente aparece en combinación con una extremidad inferior edematosa y endurecida; puede ser superficial, no demasiado dolorosa y puede estar presente con una descarga de goteo desde el sitio afectado. En ciertas realizaciones se proporciona un método para tratar una herida crónica en el que la herida crónica se caracteriza por úlceras o ulceraciones venosas debido al fallo de la válvula venosa y la enfermedad vascular asociada. En ciertas realizaciones se proporciona un método para tratar una herida crónica en el que la herida crónica se caracteriza por úlceras o ulceraciones arteriales debido al bloqueo arterial completo o parcial.

20 Las heridas crónicas ejemplares pueden incluir "úlceras de estasis venosa". Las úlceras de estasis son lesiones asociadas con insuficiencia venosa que están presentes más habitualmente sobre el maléolo medio, habitualmente con edema con fovea, varices, pigmentación moteada, eritema y petequias no palpables y púrpura. La dermatitis de estasis y úlceras son generalmente pruríticas más que dolorosas. Las úlceras de estasis venosa ejemplares pueden caracterizarse por congestión venosa pasiva crónica de las extremidades inferiores que da como resultado hipoxia local. Un posible mecanismo de patogénesis de estas heridas incluye el impedimento de la difusión de oxígeno al tejido a través de aros de fibrina perivascular gruesos. Otro mecanismo es que las macromoléculas que se filtran al tejido perivascular atrapan factores de crecimiento necesarios para el mantenimiento de la integridad cutánea. Adicionalmente, el flujo de glóbulos blancos grandes se ralentiza debido a la congestión venosa, obcluyendo capilares, activándose y dañando el endotelio vascular para predisponer a la formación de úlceras. En ciertas realizaciones se proporciona un método para tratar una herida crónica en el que la herida crónica se caracteriza por úlceras o ulceraciones venosas debido al fallo de la válvula venosa y la enfermedad vascular asociada. En ciertas realizaciones se proporciona un método para tratar una herida crónica en el que la herida crónica se caracteriza por úlceras o ulceraciones de estasis venosa debido a congestión venosa pasiva crónica de las extremidades inferiores y/o la hipoxia local resultante.

35 Las heridas crónicas ejemplares pueden incluir "úlceras diabéticas". Los pacientes diabéticos son propensos a ulceraciones, incluyendo ulceraciones del pie, debido a complicaciones tanto neurológicas como vasculares. La neuropatía periférica puede provocar alteración o pérdida completa de sensación en el pie y/o la pierna. Los pacientes diabéticos con neuropatía avanzada pierden toda la capacidad de diferenciación de agudo-romo. Cualquier corte o traumatismo en el pie puede no notarse en absoluto durante días o semanas en un paciente con neuropatía. Es habitual que un paciente con neuropatía observe que la úlcera "acababa de aparecer" cuando, de hecho, la úlcera había estado presente durante bastante tiempo. Para pacientes de neuropatía, se ha mostrado que el control de glucosa estricto ralentiza la progresión de la enfermedad. También puede producirse deformidad de pie de Charcot como resultado de una reducción de la sensación. Las personas con sensación "normal" en sus pies tienen la capacidad de notar automáticamente cuando se aplica demasiada presión en un área del pie. Una vez identificado, nuestros cuerpos cambian de posición instintivamente para aliviar esta tensión. Un paciente con neuropatía avanzada pierde esta capacidad para sentir la lesión de presión sostenida, como resultado, puede producirse isquemia tisular y necrosis que conducen a, por ejemplo, ulceraciones plantares. Adicionalmente, las microfracturas en los huesos del pie, si no se observan y no se tratan, pueden dar como resultado desfiguración, hinchamiento crónico y prominencias óseas adicionales. La enfermedad microvascular es una de las complicaciones significativas para los diabéticos, que también puede conducir a ulceraciones. En ciertas realizaciones se proporciona un método para tratar una herida crónica en el que la herida crónica se caracteriza por úlceras y/o ulceraciones de pie diabético debido a complicaciones tanto neurológicas como vasculares de la diabetes.

55 Las heridas crónicas ejemplares pueden incluir "úlceras traumáticas". La formación de úlceras traumáticas puede suceder como el resultado de lesiones traumáticas del cuerpo. Estas lesiones incluyen, por ejemplo, deterioro de los sistemas arterial, venoso o linfático; cambios de la arquitectura ósea del esqueleto; pérdida de capas tisulares de la epidermis, dermis, tejido blando subcutáneo, músculo o hueso; daño a partes del cuerpo u órganos y pérdida de partes del cuerpo u órganos. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el que la herida crónica se caracteriza por ulceraciones asociadas con lesiones traumáticas del cuerpo.

65 Las heridas crónicas ejemplares pueden incluir "úlceras de quemadura", incluyendo quemadura de primer grado (es decir área enrojecida, superficial, de la piel); quemadura de segundo grado (un sitio de lesión con ampollas que puede curarse espontáneamente después de haberse retirado el líquido de la ampolla); quemadura de tercer grado (quemadura de toda la piel y que requiere habitualmente intervención quirúrgica para la curación de heridas); escaldamiento (puede producirse por escaldamiento por agua caliente, grasa o líquido de radiadores); quemaduras

térmicas (pueden producirse por llamas, habitualmente quemaduras profundas); químicas (pueden producirse por ácidos y álcalis, habitualmente quemaduras profundas); eléctricas (bien de baja tensión en torno a una casa o alta tensión en el trabajo); fogonazo de explosión (habitualmente lesiones superficiales); y de contacto (habitualmente profundas y pueden producirse por tuberías de la cola de silenciador, hierros calientes y estufas). En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el que la herida crónica se caracteriza por ulceraciones asociadas con lesiones por quemaduras del cuerpo.

Las heridas crónicas ejemplares pueden incluir "úlceras vasculíticas". Las úlceras vasculíticas también pueden producirse en las extremidades inferiores y son lesiones dolorosas, de márgenes marcados, que pueden tener púrpuras palpables y ampollas hemorrágicas asociadas. Las enfermedades del colágeno, septicemias y una diversidad de trastornos hematológicos (por ejemplo, trombocitopenia, disproteinemia) pueden ser la causa de esta afección grave, aguda.

Las heridas crónicas ejemplares pueden incluir pioderma gangrenosa. La pioderma gangrenosa aparece como úlceras individuales o múltiples, muy blandas de las piernas inferiores. Un borde socavado, de rojo oscuro a púrpura, rodea el defecto central purulento. La biopsia típicamente no consigue revelar una vasculitis. En la mitad de los pacientes se asocia con una enfermedad sistémica tal como colitis ulcerosa, ileítis regional o leucemia. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el que la herida crónica se caracteriza por ulceraciones asociadas con pioderma gangrenosa.

Las heridas crónicas ejemplares pueden incluir úlceras infecciosas. Las úlceras infecciosas siguen la inoculación directa con una diversidad de organismos y pueden asociarse con adenopatía regional significativa. Son ejemplos la infección por micobacterias, antrax, difteria, blastomiosis, esporotricosis, tularemia y fiebre por arañazos de gato. Las úlceras genitales de sífilis primaria son típicamente no blandas con una base firme, limpia. Las de cancroide y granuloma inguinal tienden a ser lesiones irregulares, sucias y más extravagantes. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida crónica en el que la herida crónica se caracteriza por ulceraciones asociadas con la infección.

Como se usa en el presente documento, la expresión "herida con dehiscencia" se refiere a una herida, habitualmente una herida quirúrgica, que se ha abierto por rotura o incisión. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para tratar una herida que no se cura a la velocidad esperada en el que la herida se caracteriza por dehiscencia.

Polinucleótidos anticonexina

Los polinucleótidos anticonexina incluyen polinucleótidos antisentido de conexina así como polinucleótidos que tienen funcionalidades que les permiten regular negativamente la expresión de conexina (por ejemplo, por regulación negativa de la transcripción o traducción de ARNm). En el caso de la regulación negativa, esta tendrá el efecto de reducir la comunicación directa entre células mediante uniones comunicantes en el sitio en el que se regula negativamente la expresión de conexina.

Los polinucleótidos anticonexina adecuados incluyen polinucleótidos de ARNi y polinucleótidos de ARNip.

La síntesis de polinucleótidos antisentido y otros polinucleótidos anticonexina tales como ARNi, ARNip y polinucleótidos de ribozimas así como polinucleótidos que tienen cadenas principales modificadas y mixtas se conoce por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Stein C. A. y Krieg A. M. (eds), Applied Antisense Oligonucleotide Technology, 1998 (Wiley-Liss).

De acuerdo con un aspecto, la regulación negativa de la expresión de conexina puede basarse en general en el enfoque antisentido usando polinucleótidos antisentido (tales como polinucleótidos de ADN o ARN), y más particularmente en el uso de oligodesoxinucleótidos (ODN) antisentido. Estos polinucleótidos (por ejemplo, ODN) se dirigen a la proteína o proteínas conexas para regular negativamente. Típicamente los polinucleótidos son monocatenarios, pero pueden ser bicatenarios.

El polinucleótido antisentido puede inhibir la transcripción y/o traducción de una conexina. Preferentemente el polinucleótido es un inhibidor específico de la transcripción y/o traducción del gen o ARNm de conexina, y no inhibe la transcripción y/o traducción de otros genes o ARNm. El producto puede unirse con el gen de conexina o ARNm bien (i) por el 5' de la secuencia codificante y/o (ii) con la secuencia codificante y/o (iii) por el 3' de la secuencia codificante.

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

- El polinucleótido antisentido puede hibridar con todo o una parte del ARNm de conexina. Típicamente el polinucleótido antisentido hibrida con la región de unión de ribosoma o la región codificante del ARNm de conexina. El polinucleótido puede ser complementario de todo o una región del ARNm de conexina. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser el complemento exacto de todo o una parte del ARNm de conexina. Sin embargo, no se requiere complementariedad absoluta y los polinucleótidos que tengan suficiente complementariedad para formar un dúplex que tengan una temperatura de fusión de más de aproximadamente 20 °C, 30 °C o 40 °C en condiciones fisiológicas son particularmente adecuados para su uso en la presente invención.
- Por lo tanto el polinucleótido es típicamente un homólogo de una secuencia complementaria del ARNm. El polinucleótido puede ser un polinucleótido que hibrida con el ARNm de conexina en condiciones de media a alta astringencia tales como cloruro sódico 0,03 M y citrato sódico 0,03 M a aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C.
- Para ciertos aspectos, los polinucleótidos adecuados son típicamente de aproximadamente 6 a 40 nucleótidos de longitud. Preferentemente un polinucleótido puede ser de aproximadamente 12 a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud, o como alternativa de aproximadamente 12 a aproximadamente 20 nucleótidos de longitud o más preferentemente de aproximadamente 18 a aproximadamente 32 nucleótidos de longitud. De acuerdo con un aspecto alternativo, el polinucleótido puede ser de al menos aproximadamente 40, por ejemplo al menos aproximadamente 60 o al menos aproximadamente 80, nucleótidos de longitud y hasta aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 1000, aproximadamente 2000 o aproximadamente 3000 o más nucleótidos de longitud.
- La proteína o proteínas conexinas a las que se dirige el polinucleótido dependerán del sitio en el que vaya a efectuarse la regulación negativa. Esto refleja la composición no uniforme de la unión o las uniones comunicantes en sitios diferentes por todo el cuerpo con respecto a la composición de subunidades de conexina. La conexina es una conexina que aparece de forma natural en un ser humano o animal en un aspecto o aparece de forma natural en el tejido en el que va a reducirse la expresión o actividad de conexina. El gen de conexina (incluyendo la secuencia codificante) generalmente tiene homología con la secuencia codificante de una o más de las conexinas específicas mencionadas en el presente documento, tal como homología con la secuencia codificante de conexina 43 mostrada en la Tabla 2. La conexina es típicamente una conexina α o β . Preferentemente la conexina es una conexina α y se expresa en el tejido para tratar.
- Algunas proteínas conexinas son sin embargo más ubicuas que otras con respecto a la distribución en el tejido. Una de las más extendidas es la conexina 43. Se usan en la presente invención polinucleótidos dirigidos a conexina 43.
- En un aspecto preferido, los polinucleótidos antisentido se dirigen al ARNm de una proteína conexina solamente. Esta proteína conexina es la conexina 43.
- También se contempla que los polinucleótidos dirigidos a proteínas conexinas separadas se usen en combinación (por ejemplo pueden dirigirse a 1, 2, 3, 4 o más conexinas diferentes). Por ejemplo, los polinucleótidos dirigidos a conexina 43, y uno o más miembros adicionales de la familia de conexina (tales como conexina 26, 30, 30.3, 31.1, 32, 36, 37, 40, 40.1, 45 y 46.6) pueden usarse en combinación.
- Como alternativa, los polinucleótidos antisentido pueden ser parte de composiciones que pueden comprender polinucleótidos para más de una proteína conexina. Una de las proteínas conexinas a las que se dirigen los polinucleótidos es la conexina 43. Otras proteínas conexinas a las que se dirigen los oligodesoxinucleótidos pueden incluir, por ejemplo, conexinas 26, 30, 30.3, 31.1, 32, 36, 37, 40, 40.1, 45 y 46.6. Se exponen en la Tabla 1 polinucleótidos (y ODN) ejemplares adecuados dirigidos a diversas conexinas.
- Los polinucleótidos antisentido individuales pueden ser específicos para una conexina particular, o pueden dirigirse a 1, 2, 3 o más conexinas diferentes. Los polinucleótidos específicos se dirigirán generalmente a secuencias en el gen o ARNm de conexina que no están conservadas entre conexinas, mientras que los polinucleótidos no específicos se dirigirán a secuencias conservadas para diversas conexinas.
- Los polinucleótidos para su uso en la invención pueden ser convenientemente oligómeros de fosfodiéster no modificados. La longitud de dichos oligodesoxinucleótidos puede variar. Se ha descubierto que es particularmente adecuado un polinucleótido de 30 unidades.
- Muchos aspectos de la invención se describen con referencia a oligodesoxinucleótidos. Sin embargo se entiende que pueden usarse otros polinucleótidos adecuados (tales como polinucleótidos de ARN) en estos aspectos.
- Los polinucleótidos antisentido pueden modificarse químicamente. Esto puede potenciar su resistencia a nucleasas y puede potenciar su capacidad para entrar en las células. Por ejemplo, pueden usarse oligonucleótidos de fosforotiotato. Otros análogos de desoxinucleótidos incluyen metilfosfonatos, fosforamidatos, fosforoditioatos, N3'P5'-fosforamidatos y oligorribonucleótido fosforotioatos y sus análogos de 2'-O-alkilo y 2'-O-metilribonucleótido

5 metil fosfonatos. Como alternativa pueden usarse oligonucleótidos de cadena principal mixta ("MBO"). Los MBO contienen segmentos de oligodesoxinucleótidos de fosforotioato y segmentos colocados de forma apropiada de oligodesoxi u oligorribonucleótidos modificados. Los MBO tienen segmentos de enlaces de fosforotioato y otros segmentos de otros oligonucleótidos modificados, tales como metilfosfonato, que es no iónico, y muy resistente a nucleasas o 2'-O-alquiloligorribonucleótidos. Se conocen en la técnica métodos para preparar oligonucleótidos de cadena principal modificada y cadena principal mixta.

10 La secuencia precisa del polinucleótido antisentido usado en la invención dependerá de la proteína conexina diana, que es conexina 43. En una realización, los polinucleótidos antisentido de conexina 43 adecuados pueden incluir polinucleótidos tales como oligodesoxinucleótidos seleccionados de las siguientes secuencias expuestas en la Tabla 1:

Tabla 1

5' GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC 3'	(conexina 43)	(SEQ ID NO: 1)
5' GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC 3'	(conexina 43)	(SEQ ID NO: 2)
5' GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT 3'	(conexina 43)	(SEQ ID NO: 3)
5' TCC TGA GCA ATA CCT AAC GAA CAA ATA 3'	(conexina 26)	(SEQ ID NO: 4)
5' CAT CTC CTT GGT GCT CAA CC 3'	(conexina 37)	(SEQ ID NO: 5)
5' CTG AAG TCG ACT TGG CTT GG 3'	(conexina 37)	(SEQ ID NO: 6)
5' CTC AGA TAG TGG CCA GAA TGC 3'	(conexina 30)	(SEQ ID NO: 7)
5' TTG TCC AGG TGA CTC CAA GG 3'	(conexina 30)	(SEQ ID NO: 8)
5' CGT CCG AGC CCA GAA AGA TGA GGT C 3'	(conexina 31.1)	(SEQ ID NO: 9)
5' AGA GGC GCA CGT GAG ACA C 3'	(conexina 31.1)	(SEQ ID NO: 10)
5' TGA AGA CAA TGA AGA TGT T 3'	(conexina 31.1)	(SEQ ID NO: 11)
5' TTT CTT TTC TAT GTG CTG TTG GTG A 3'	(conexina 32)	(SEQ ID NO: 12)

15 Los polinucleótidos adecuados para la preparación de las composiciones de polinucleótidos combinadas descritas en el presente documento incluyen polinucleótidos para conexina 43 y polinucleótidos para conexinas 26, 30, 31.1, 32 y 37 como se ha descrito en la Tabla 1 anterior.

20 Aunque la secuencia precisa del polinucleótido antisentido usado en la invención dependerá de la proteína conexina diana, para conexina 43, se ha descubierto que los polinucleótidos antisentido que tienen las siguientes secuencias son particularmente adecuados: GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC (SEQ ID NO: 1); GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC (SEQ ID NO: 2); y GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT (SEQ ID NO: 3).

25 Por ejemplo, los polinucleótidos antisentido adecuados para conexinas 26, 31.1 y 32 tienen las siguientes secuencias:

30 5' TCC TGA GCA ATA CCT AAC GAA CAA ATA (conexina 26) (SEQ ID NO: 4);
 5' CGT CCG AGC CCA GAA AGA TGA GGT C (conexina 31.1) (SEQ ID NO: 9); y
 5' TTT CTT TTC TAT GTG CTG TTG GTG A (conexina 32) (SEQ ID NO: 12).

Otras secuencias de polinucleótidos antisentido de conexina útiles de acuerdo con los métodos de la presente invención incluyen:

35 5' CAT CTC CTT GGT GCT CAA CC 3' (conexina 37) (SEQ ID NO: 5);
 5' CTG AAG TCG ACT TGG CTT GG 3' (conexina 37) (SEQ ID NO: 6);
 40 5' CTC AGA TAG TGG CCA GAA TGC 3' (conexina 30) (SEQ ID NO: 7);
 5' TTG TCC AGG TGA CTC CAA GG 3' (conexina 30) (SEQ ID NO: 8);
 5' AGA GGC GCA CGT GAG ACA C 3' (conexina 31.1) (SEQ ID NO: 10); y
 45 5' TGA AGA CAA TGA AGA TGT T 3' (conexina 31.1) (SEQ ID NO: 11).

Los polinucleótidos, incluyendo ODN, dirigidos a proteínas conexas pueden seleccionarse con respecto a su secuencia de nucleótidos por cualquier enfoque conveniente, y convencional. Por ejemplo, pueden usarse los programas informáticos MacVector y OligoTech (de Oligos etc. Eugene, Oregón, Estados Unidos). Una vez seleccionados, los ODN pueden sintetizarse usando un sintetizador de ADN.

Homólogos de polinucleótidos

Se analizan en el presente documento la homología y los homólogos (por ejemplo, el polinucleótido puede ser un homólogo de un complemento para una secuencia en el ARNm de conexina). Dicho polinucleótido tiene típicamente al menos aproximadamente 70 % de homología, preferentemente al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 % o al menos aproximadamente 99 % de homología con la secuencia relevante, por ejemplo sobre una región de al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 100 nucleótidos contiguos más (de la secuencia homóloga).

La homología puede calcularse basándose en cualquier método de la técnica. Por ejemplo el Paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT, que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo usado en sus ajustes por defecto) (Devereux *et al.* (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p 387-395). Pueden usarse los algoritmos PILEUP y BLAST para calcular la homología o alinear 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 *et al* (1990) *J Mol Biol* 215: 403-10.

Está disponible públicamente el software para realizar análisis BLAST a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar el par de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al*, mencionado anteriormente). Estos aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP que los contienen. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como puede aumentarse la puntuación de alineamiento acumulada. Las extensiones para los aciertos de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulada cae en la cantidad X de su valor máximo obtenido; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza al final de una 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), la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 89: 10915-10919) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas.

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 la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma (P(N)), que proporciona un indicio de la probabilidad por la que se produciría al azar una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la menor probabilidad de suma en comparación de la primera secuencia con una segunda secuencia es menor de aproximadamente 1, preferentemente menor de aproximadamente 0,1, más preferentemente menor de aproximadamente 0,01 y más preferentemente menor de aproximadamente 0,001.

La secuencia homóloga difiere típicamente de la secuencia relevante en al menos aproximadamente (o en no más de aproximadamente) 2, 5, 10, 15, 20 mutaciones más (que pueden ser sustituciones, deleciones o inserciones). Estas mutaciones pueden medirse entre cualquiera de las regiones mencionadas anteriormente en relación con el cálculo de la homología.

La secuencia homóloga típicamente hibrida selectivamente con la secuencia original a un nivel significativamente mayor que el fondo. La hibridación selectiva se consigue típicamente usando condiciones de media a alta astringencia (por ejemplo cloruro sódico 0,03 M y citrato sódico 0,03 M a de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C). Sin embargo, dicha hibridación puede llevarse a cabo en cualquier condición adecuada conocida en la técnica (véase *Sambrook et al.* (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*). Por ejemplo, si se requiere alta astringencia, las condiciones adecuadas incluyen SSC 0,2 X a 60 °C. Si se requiere menor astringencia, las condiciones adecuadas incluyen SSC 2 X a 60 °C.

Formas y formulaciones de dosificación y administración

Los agentes de la invención pueden administrarse a un sujeto que necesite tratamiento, tal como un sujeto con cualquiera de las heridas mencionadas en el presente documento. La condición del sujeto puede de este modo mejorarse. El polinucleótido anticonexina puede usarse en el tratamiento del cuerpo del sujeto por terapia. Pueden usarse en la fabricación de un medicamento para tratar cualquiera de las heridas mencionadas en el presente

documento.

El polinucleótido anticonexina puede estar presente en una forma sustancialmente aislada. Se entenderá que el producto puede mezclarse con vehículos o diluyentes que no interferirán con el fin pretendido del producto y considerarse aún sustancialmente aislado. Un producto de la invención también puede estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso generalmente comprenderá aproximadamente 80 %, 85 % o 90 %, incluyendo, por ejemplo, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % del polinucleótido o masa seca de la preparación.

Dependiendo de la vía pretendida de administración, los productos farmacéuticos, composiciones farmacéuticas, preparaciones combinadas y medicamentos de la invención pueden, por ejemplo, tomar la forma de soluciones, suspensiones, instilaciones, pulverizaciones, pomadas, cremas, geles, espumas, ungüentos, emulsiones, lociones, pinturas, formulaciones de liberación sostenida o polvos, y típicamente contienen de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1 % del principio o los principios activos, aproximadamente 1 %-50 % del principio o los principios activos, aproximadamente 2 %-60 % del principio o los principios activos, aproximadamente 2 %-70 % del principio o los principios activos o hasta aproximadamente el 90 % del principio o los principios activos. Otras formulaciones adecuadas incluyen formulaciones basadas en gel de pluronic, formulaciones basadas en carboximetilcelulosa (CMC), y formulaciones basadas en hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Otras formulaciones útiles incluyen preparaciones de liberación lenta o retardada.

Pueden producirse geles o vaselinas usando un agente de gelificación adecuado incluyendo, pero sin limitación, gelatina, tragacanto o un derivado de celulosa y puede incluir glicerol como un humectante, emoliente y conservante. Los ungüentos son preparaciones semisólidas que consisten en el principio activo incorporado en una base grasa, cerosa o sintética. Los ejemplos de cremas adecuadas incluyen, pero sin limitación, emulsiones de agua en aceite y aceite en agua. Las cremas de agua en aceite pueden formularse usando un agente emulsionante adecuado con propiedades similares, pero sin limitación, a las de los alcoholes grasos tales como alcohol cetílico o alcohol cetosteárico y a cera emulsionante. Las cremas de aceite en agua pueden formularse usando un agente emulsionante tal como cera emulsionante de cetomacrogol. Las propiedades adecuadas incluyen la capacidad para modificar la viscosidad de la emulsión y la estabilidad tanto física como química sobre un intervalo amplio de pH. La base de crema soluble o miscible en agua puede contener un sistema conservante y también pueden tamponarse para mantener un pH fisiológico aceptable.

Pueden formularse preparaciones de espuma para suministrar a partir de una lata de aerosol presurizado, mediante un aplicador adecuado, usando propulsores inertes. Los excipientes adecuados para la formulación de la base de espuma incluyen, pero sin limitación, propilenglicol, cera emulsionante, alcohol cetílico y gliceril estearato. Los conservantes potenciales incluyen metilparabeno y propilparabeno.

Preferentemente los agentes de la invención se combinan con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica. Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato. Los diluyentes y excipientes adecuados también incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea también pueden estar presentes sustancias tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes estabilizantes o tamponantes de pH.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier vehículo farmacéutico que no induzca por sí solo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, y que pueden administrarse sin toxicidad indebida. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos.

También pueden estar presentes sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares.

Los materiales vehículos adecuados incluyen cualquier vehículo o transportador usado habitualmente como una base de cremas, lociones, pulverizaciones, espumas, geles, emulsiones, lociones o pinturas para administración tópica. Los ejemplos incluyen agentes emulsionantes, vehículos inertes incluyendo bases de hidrocarburos, bases emulsionantes, disolventes no tóxicos o bases solubles en agua. Los ejemplos particularmente adecuados incluyen pluronic, HPMC, CMC y otros ingredientes basados en celulosa, lanolina, parafina dura, parafina líquida, parafina amarilla blanda o parafina blanca blanda, cera de abejas blanca, cera de abejas amarilla, alcohol cetosteárico, alcohol cetílico, dimeticonas, ceras emulsionantes, isopropil miristato, cera microcristalina, alcohol oleílico y alcohol estearílico.

Preferentemente, el vehículo o transportador farmacéuticamente aceptable es un gel, convenientemente un gel de copolímero de polioxietileno-polioxipropileno no iónico, por ejemplo, un gel Pluronic, preferiblemente Pluronic F-127 (BASF Corp.). Este gel se prefiere particularmente porque es un líquido a temperaturas bajas pero se endurece

rápidamente a temperaturas fisiológicas, lo que confina la liberación del agente al sitio de aplicación o inmediatamente adyacente a ese sitio.

Un agente adyuvante tal como caseína, gelatina, albúmina, pegamento, alginato sódico, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa o alcohol polivinílico también pueden incluirse en la formulación de la invención.

Otras formulaciones adecuadas incluyen formulaciones basadas en gel pluronic, formulaciones basadas en carboximetilcelulosa (CMC), y formulaciones basadas en hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). La composición puede formularse para cualquier forma deseada de administración, incluyendo administración tópica, instilación, parenteral, intramuscular, subcutánea o transdérmica. Otras formulaciones útiles incluyen preparaciones de liberación lenta o retardada.

La formulación que se administra puede contener agentes de transfección. Los ejemplos de dichos agentes incluyen agentes catiónicos (por ejemplo fosfato cálcico y DEAE-dextrano) y lipofectantes (por ejemplo lipofectam™ y transfectam™), y tensioactivos.

En una realización, la formulación incluye además un tensioactivo para ayudar en la penetración celular del polinucleótido o la formulación puede contener cualquier agente de carga adecuado. Puede incluirse cualquier tensioactivo no tóxico adecuado, tal como DMSO. Como alternativa puede incluirse un agente de penetración transdérmico tal como urea.

La dosis eficaz para un sujeto dado está preferentemente dentro de la dosis que es terapéuticamente eficaz para al menos el 50 % de la población, y que muestra poca o ninguna toxicidad a este nivel.

La dosificación eficaz de cada uno de los polinucleótidos anticonexina empleados en los métodos y composiciones de la invención puede variar dependiendo de varios factores incluyendo el polinucleótido anticonexina particular empleado, el modo de administración, la frecuencia de administración, la herida que se trate, la gravedad de la herida que se trate, la vía de administración, las necesidades de una subpoblación de pacientes para tratar o las necesidades del paciente individual, pudiendo dichas necesidades diferentes ser debidas a la edad, el sexo, el peso corporal, la herida médica relevante específica del paciente.

Una dosis adecuada puede ser de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal tal como de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,4 mg/kg de peso corporal. Una dosis adecuada puede ser sin embargo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal tal como de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,050 mg/kg de peso corporal. Son apropiadas dosis de aproximadamente 1 a 100, 200, 300, 400 y 500 microgramos. Como se observa en el presente documento, se contemplan aplicaciones repetidas. Las aplicaciones repetidas se aplican típicamente aproximadamente una vez a la semana, o cuando puede parecer que la curación de heridas se detiene o se ralentiza.

Otros niveles de dosificación más entre aproximadamente 1 nanogramo (ng)/kg y aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por día de cada uno de los agentes se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones, la dosificación de cada uno de los compuestos objeto generalmente estará en el intervalo de aproximadamente 1 ng a aproximadamente 1 microgramo por kg de peso corporal, aproximadamente 1 ng a aproximadamente 0.1 microgramo por kg de peso corporal, aproximadamente 1 ng a aproximadamente 10 ng por kg de peso corporal, aproximadamente 10 ng a aproximadamente 0,1 microgramos por kg de peso corporal, aproximadamente 0,1 microgramos a aproximadamente 1 microgramo por kg de peso corporal, aproximadamente 20 ng a aproximadamente 100 ng por kg de peso corporal, aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal, o aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 mg por kg de peso corporal. En ciertas realizaciones, la dosificación de cada uno de los compuestos objeto estará generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 0,01 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 0,1 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 mg por kg de peso corporal, o aproximadamente 1 mg por kg de peso corporal. Si se usa más de un polinucleótido anticonexina, no es necesario que la dosificación de cada polinucleótido anticonexina esté en el mismo intervalo que los otros. Por ejemplo, la dosificación de un polinucleótido anticonexina puede estar entre aproximadamente 0,01 mg y aproximadamente 1 mg por kg de peso corporal, y la dosificación de otro polinucleótido anticonexina puede estar entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 1 mg por kg de peso corporal. Como se observa en el presente documento, se contemplan aplicaciones repetidas. Se aplican típicamente aplicaciones repetidas aproximadamente una vez por semana, o cuando puede parecer que la curación de heridas se detiene o ralentiza.

Otras dosis útiles varían de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida. Ciertas dosis serán de aproximadamente 1-2, aproximadamente 1-5, aproximadamente 2-4, aproximadamente 5-7 y aproximadamente 8-10 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida. Otras dosis útiles son mayores de aproximadamente 10 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida, incluyendo aproximadamente 15 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida, aproximadamente 20 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida, aproximadamente 25 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida, aproximadamente 30 microgramos por centímetro

cuadrado del tamaño de la herida, aproximadamente 35 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida, aproximadamente 40 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida, aproximadamente 50 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida, y aproximadamente 100 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida. Otras dosis útiles son de aproximadamente 150 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida, aproximadamente 200 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida, aproximadamente 250 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida o aproximadamente 500 microgramos por centímetro cuadrado del tamaño de la herida. Como se indica en el presente documento, se contemplan aplicaciones repetidas. Las aplicaciones repetidas se aplican típicamente aproximadamente una vez por semana, o cuando puede parecer que la curación de la herida se detiene o se ralentiza.

La composición del polinucleótido anticonexina puede aplicarse a una concentración final de 30 micromolar (μM) a 200 μM en el sitio de tratamiento y/o adyacente al sitio de tratamiento. Preferentemente, la composición del polinucleótido antisentido se aplica a una concentración final de 100 μM , más preferentemente, la composición del polinucleótido anticonexina se aplica a una concentración final de 50 μM , y más preferentemente, la composición del polinucleótido anticonexina se aplica a una concentración final de 30-50 μM . Las cantidades de dosis de polinucleótido anticonexina incluyen, por ejemplo, aproximadamente 0,1-1, 1-2, 2-3, 3-4 o 4-5 microgramos (μg), de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 μg , de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 μg , de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 μg , de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 μg , de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 μg , de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 μg , de aproximadamente 50 a aproximadamente 75 μg , de aproximadamente 75 a aproximadamente 100 μg , de aproximadamente 100 μg a aproximadamente 250 μg , y de 250 μg a aproximadamente 500 μg . También se proporcionan cantidades de dosis de 0,5 a aproximadamente 1,0 miligramos o más, como se ha indicado anteriormente. Los volúmenes de dosis dependerán del tamaño del sitio para tratar, y pueden variar, por ejemplo, de aproximadamente 25-100 μl a aproximadamente 100-200 μl , también son apropiadas dosis de aproximadamente 200-500 μl a aproximadamente 500-1000 μl (microlitro) para sitios de tratamiento mayores. Como se indica en el presente documento, se contemplan aplicaciones repetidas. Las aplicaciones repetidas se aplican típicamente a aproximadamente una vez por semana, o cuando puede parecer que la curación de heridas se detiene o se ralentiza.

Convenientemente, el polinucleótido anticonexina se administra en una cantidad suficiente para regular negativamente la expresión de una proteína conexina, o modular la formación de uniones comunicantes durante al menos aproximadamente 0,5 a 1 hora, al menos aproximadamente 1-2 horas, al menos aproximadamente 2-4 horas, al menos aproximadamente 4-6 horas, al menos aproximadamente 6-8 horas, al menos aproximadamente 8-10 horas, al menos aproximadamente 12 horas, o al menos aproximadamente 24 horas después de la administración.

La dosificación de cada uno de los polinucleótidos anticonexina en las composiciones y métodos de la invención objeto también puede determinarse por referencia a la concentración de la composición en relación con el tamaño, longitud, profundidad, área o volumen del área al que se aplicará. Por ejemplo, en ciertas aplicaciones tópicas y otras, por ejemplo, instilación, la dosificación de las composiciones farmacéuticas puede calcularse basándose en la masa (por ejemplo microgramos) de o la concentración en una composición farmacéutica (por ejemplo $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) por longitud, profundidad, área o volumen del área de aplicación.

Las dosificaciones iniciales y cualquiera posterior administradas dependerán de factores indicados en el presente documento. Dependiendo del oligonucleótido, la dosificación y el protocolo para administración variarán, y la dosificación también dependerá del método de administración seleccionado, por ejemplo, administración local o tópica.

Las dosis pueden administrarse en aplicaciones individuales o divididas. Las dosis pueden administrarse una vez, o puede repetirse la aplicación.

Pueden administrarse uno o más polinucleótidos anticonexina por la misma o diferentes vías. Los diversos agentes de la invención pueden administrarse por separado en momentos diferentes durante el transcurso de la terapia, o simultáneamente en formas de combinación divididas o individuales.

Preferentemente se suministran uno o más polinucleótidos anticonexina útiles para la curación de heridas por administración tópica (periféricamente o directamente en un sitio), incluyendo pero sin limitación administración tópica usando soportes sólidos (tales como apósitos y otras matrices) y formulaciones médicas (tales como geles, mezclas, suspensiones y pomadas). En una realización, el soporte sólido comprende una membrana biocompatible o inserción en un sitio de tratamiento. En otra realización, el soporte sólido comprende un apósito o matriz. En una realización de la invención, la composición de soporte sólido puede ser una composición de soporte sólido de liberación lenta, en la que el o los polinucleótidos anticonexina útiles para la curación de heridas se dispersan en una matriz sólida de liberación lenta tal como una matriz de alginato, colágeno o un polímero bioabsorbible sintético. Preferentemente, la composición de soporte sólido es estéril o tiene carga biológica baja. En una realización, puede usarse una solución de lavado que comprende uno o más polinucleótidos anticonexina.

La administración de uno o más polinucleótidos anticonexina puede producirse durante un periodo de tiempo, en algunos casos durante aproximadamente 0,5 horas, 1-2 horas, aproximadamente 2-4 horas, aproximadamente 4-6 horas, aproximadamente 6-8 o aproximadamente 24 horas o más, puede ser una ventaja particular en heridas más graves. En algunos casos, la pérdida de células puede extenderse bastante más allá del sitio de un procedimiento a células circundantes. Dicha pérdida puede producirse en un periodo de 24 horas del procedimiento original y está mediada por la comunicación entre células de unión comunicante. La administración de un polinucleótido o polinucleótidos anticonexina modulará la comunicación entre las células y minimizará la pérdida de células adicional o lesión o consecuencias de la lesión.

Aunque el periodo de administración dependerá tanto del sitio en el que se induzca la regulación negativa como del efecto terapéutico que se desee, se proporciona administración continua o de liberación lenta durante aproximadamente 0,5 horas, aproximadamente 1-2 horas, aproximadamente 2-4 horas, aproximadamente 4-6 horas, aproximadamente 6-8, o aproximadamente 24 horas o más. De acuerdo con la presente invención, esto puede conseguirse mediante la inclusión de los polinucleótidos anticonexina en una formulación junto con un vehículo o transportador farmacéuticamente aceptable, particularmente en forma de una formulación para administración continua o de liberación lenta.

Como se indica, el o los agentes de la invención pueden administrarse antes, durante, inmediatamente después de la herida, por ejemplo, o en un periodo de aproximadamente 180 o más, aproximadamente 120, aproximadamente 90, aproximadamente 60 o aproximadamente 30 días de la herida, por ejemplo.

Las vías de administración y dosificaciones descritas en el presente documento se entienden solamente como una guía ya que un médico experto determinará la vía de administración y dosificación óptimas para cualquier paciente y herida particular.

Cualquiera de los métodos para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad, trastorno y/o herida, a la que se hace referencia o que se describe en el presente documento puede utilizar la administración de cualquiera de las dosis, formas de dosificación, formulaciones y/o composiciones descritas en el presente documento.

Apósitos y matrices

En un aspecto, el o los polinucleótidos anticonexina se proporcionan en forma de un apósito o matriz. En ciertas realizaciones, el o los agentes de la invención se proporcionan en forma de una composición líquida, semisólida o sólida para aplicación directamente, o la composición se aplica a la superficie de, o se incorpora en, una capa de contacto sólida tal como una gasa de apósito o matriz. La composición del apósito puede proporcionarse, por ejemplo, en forma de un fluido o un gel. El o los polinucleótidos anticonexina pueden proporcionarse en combinación con excipientes farmacéuticos convencionales para aplicación tópica. Los vehículos adecuados incluyen: geles Pluronic, geles de Poloxámero, Hidrogeles que contienen derivados de celulosa, incluyendo hidroxietil celulosa, hidroximetil celulosa, carboximetil celulosa, hidropropilmetil celulosa y mezclas de las mismas; e hidrogeles que contienen ácido poliacrílico (Carbopoles). Los vehículos adecuados también incluyen cremas/pomadas usadas para preparaciones farmacéuticas tópicas, por ejemplo, cremas basadas en pomada emulsionante de cetomacrogol. Los vehículos anteriores pueden incluir alginato (como un espesante o estimulante), conservantes tales como alcohol bencílico, tampones para controlar el pH tales como hidrógeno fosfato disódico/dihidrógeno fosfato sódico, agentes para ajustar la osmolaridad tales como cloruro sódico y estabilizadores tales como EDTA.

En una realización se administran uno o más polinucleótidos anticonexina, por ejemplo un polinucleótido antisentido de conexina 43, preferentemente un oligodesoxinucleótido antisentido de conexina 43, en una matriz natural o sintética.

Los apósitos o matrices adecuados pueden incluir, por ejemplo, los siguientes con uno o más polinucleótidos anticonexina. Se prefiere un oligonucleótido anticonexina 43, por ejemplo un oligonucleótido antisentido anticonexina 43:

1) **Absorbentes:** los absorbentes adecuados pueden incluir, por ejemplo, apósitos absorbentes, que pueden proporcionar, por ejemplo, una cualidad semiadherente o una capa no adherente, combinadas con capas altamente absorbentes de fibra, tales como por ejemplo celulosa, algodón o rayón. Como alternativa, pueden usarse absorbentes como un apósito primario o secundario.

2) **Alginatos:** los alginatos adecuados incluyen, por ejemplo, apósitos que no están tejidos, almohadillas no adhesivas y lazos compuestos de fibras de polisacáridos naturales o xerogel derivado de alga. Los apósitos de alginatos adecuados pueden, por ejemplo, formar un gel húmedo mediante un proceso de intercambio iónico tras el contacto con el exudado. En ciertas realizaciones, los apósitos de alginato se diseñan para ser blandos y adaptables, fáciles de envasar, plegar o aplicar sobre áreas de forma irregular, En ciertas realizaciones, pueden usarse apósitos de alginato con un segundo apósito.

3) **Apósitos antimicrobianos:** los apósitos antimicrobianos adecuados pueden incluir, por ejemplo, apósitos que pueden facilitar la administración de agentes bioactivos, tales como, por ejemplo, plata y biguanida de

polihexametileno (PHMB), para mantener la eficacia contra la infección, cuando ésta sea necesaria o deseable. En ciertas realizaciones, pueden estar disponibles apósitos antimicrobianos adecuados como por ejemplo, como esponjas, gasas tejidas impregnadas, apósitos en película, productos absorbentes, apósitos tipo isla, tela de nylon, barreras no adherentes o una combinación de materiales.

4) Productos biológicos y biosintéticos: los apósitos biológicos o apósitos biosintéticos adecuados pueden incluir, por ejemplo, geles, soluciones o láminas semipermeables derivados de una fuente natural. En ciertas realizaciones, se aplica un gel o solución al sitio de tratamiento y se cubre con un apósito para barrera de protección. En otra realización, se sitúa una lámina *in situ* que puede actuar como una membrana, permaneciendo en su lugar después de una única aplicación.

5) Colágenos: los apósitos de colágeno adecuados pueden incluir, por ejemplo, geles, almohadillas, partículas, pastas, polvos, láminas o soluciones derivadas, por ejemplo, de fuentes bovinas, porcinas o aviares u otras fuentes o donantes naturales. En ciertas realizaciones, el apósito de colágeno puede interactuar con el exudado del sitio de tratamiento para formar un gel. En ciertas realizaciones, el apósito de colágeno puede usarse en combinación con un apósito secundario.

6) Compuestos: los apósitos compuestos adecuados pueden incluir, por ejemplo, apósitos que combinan componentes físicamente distintos en un único producto para proporcionar múltiples funciones, tales como, por ejemplo, una barrera bacteriana, absorción y adhesión. En ciertas realizaciones, los apósitos compuestos están comprendidos, por ejemplo, por múltiples capas e incorporan una almohadilla semiadherente o no adherente. En ciertas realizaciones, el compuesto también puede incluir por ejemplo un borde adhesivo de cinta de tela no tejida o película transparente.

7) Capas de contacto: los apósitos de capas de contacto adecuadas pueden incluir, por ejemplo, láminas finas, no adherentes situadas en un área para proteger el tejido de por ejemplo, contacto directo con otros agentes o apósitos aplicados al sitio de tratamiento. En ciertas realizaciones, pueden desplegarse capas de contacto para adaptarse a la forma del área del sitio de tratamiento y son porosas para permitir que el exudado pase a través de ellas para absorción por un apósito secundario que lo recubre.

8) Vendas elásticas: las vendas elásticas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, apósitos que se estiran y se adaptan a los contornos del cuerpo. En ciertas realizaciones, la composición de la tela puede incluir por ejemplo algodón, poliéster, rayón o nylon. En ciertas otras realizaciones, la venda elástica puede proporcionar, por ejemplo, absorción como una segunda capa o apósito, para mantener una cubierta en su lugar, para aplicar presión o para acolchar un sitio de tratamiento.

9) Espumas: los apósitos de espuma adecuados pueden incluir, por ejemplo, láminas y otras formas de soluciones de polímeros en espuma (incluyendo poliuretano) con células pequeñas, abiertas, capaces de retener fluidos. Las espumas ejemplares pueden estar, por ejemplo, impregnadas o en capas en combinación con otros materiales. En ciertas realizaciones, la capacidad de absorción puede ajustarse basándose en el grosor y composición de la espuma. En ciertas otras realizaciones, el área en contacto con el sitio de tratamiento puede no ser adhesiva para fácil retirada. En otra realización más, la espuma puede usarse en combinación con un borde adhesivo y/o un recubrimiento de película transparente que puede actuar como una barrera antiinfecciosa.

10) Gasas y apósitos no tejidos: los apósitos de gasa y apósitos tejidos adecuados pueden incluir, por ejemplo, esponjas y vendajes tejidos o no tejidos secos con diversos grados de absorbancia. La composición de tela ejemplar puede incluir, por ejemplo, algodón, poliéster o rayón. En ciertas realizaciones, pueden estar disponibles gasas y apósitos no tejidos estériles o no estériles en masa y con o sin un borde adhesivo. Pueden usarse apósitos de gasa y apósitos tejidos ejemplares para limpiar, envasar y cubrir una diversidad de sitios de tratamiento de heridas.

11) Hidrocoloides: los apósitos de hidrocoloides adecuados pueden incluir, por ejemplo, obleas, polvos o pastas compuestas de gelatina, pectina o carboximetilcelulosa. En ciertas realizaciones, las obleas son autoadherentes y están disponibles con o sin un borde adhesivo y en una amplia diversidad de formas y tamaños. Los hidrocoloides ejemplares son útiles en áreas que requieren ajustarse al contorno. En ciertas realizaciones, los hidrocoloides de polvos y pastas pueden usarse en combinación con un apósito secundario.

12) Hidrogeles (Amorfos): los apósitos de hidrogeles amorfos adecuados pueden incluir, por ejemplo, formulaciones de agua, polímeros y otros ingredientes sin forma, diseñados para donar humedad y para mantener un ambiente de curación húmedo y/o para rehidratar el sitio de tratamiento. En ciertas realizaciones, pueden usarse hidrogeles en combinación con una cobertura de apósito secundaria.

13) Hidrogeles: Apósitos Impregnados: los apósitos de hidrogeles impregnados adecuados pueden incluir, por ejemplo, gasas y esponjas no tejidas, cuerdas y tiras saturadas con un hidrogel amorfo. Los hidrogeles amorfos pueden incluir por ejemplo, formulaciones de agua, polímeros y otros ingredientes sin forma, diseñados para donar humedad al sitio de tratamiento seco y para mantener un ambiente de curación húmedo.

14) Láminas de hidrogel: las láminas de hidrogel adecuadas pueden incluir, por ejemplo, redes tridimensionales de polímeros hidrófilos reticulados que son insolubles en agua e interactúan con soluciones acuosas hinchándose. Los hidrogeles ejemplares son altamente adaptables y permeables y pueden absorber diversas cantidades de drenaje, dependiendo de su composición. En ciertas realizaciones, al hidrogel no es adhesivo frente al sitio de tratamiento o se trata para su fácil retirada.

15) Apósitos impregnados: los apósitos impregnados adecuados pueden incluir, por ejemplo, gasas y esponjas no tejidas, cuerdas y tiras saturadas con una solución, una emulsión, aceite, gel o algún otro compuesto o agente vehicular farmacéuticamente aceptable, incluyendo por ejemplo, solución salina, aceite, sales de cinc, vaselina, xeroform y rojo escarlata así como los compuestos descritos en el presente documento.

16) Láminas de gel de silicona: los apósitos de láminas de gel de silicona adecuados pueden incluir, por ejemplo,

cubiertas suaves compuestas de polímeros reticulados reforzados con o unidos a la malla o tela.

17) Soluciones: los apósitos líquidos adecuados pueden incluir, por ejemplo, mezclas de material multiproteico y otros elementos hallados en la matriz extracelular. En ciertas realizaciones, pueden aplicarse soluciones ejemplares al sitio de tratamiento después de desbridamiento y limpieza y después cubrirse con un apósito absorbente o una almohadilla no adherente.

18) Películas transparentes: los apósitos de películas transparentes adecuados pueden incluir membranas poliméricas de diverso grosor recubiertas en un lateral con un adhesivo. En ciertas realizaciones, las películas transparentes son impermeables a líquidos, agua y bacterias pero son permeables al vapor de humedad y gases atmosféricos. En ciertas realizaciones, la transparencia permite la visualización del sitio de tratamiento.

19) Rellenos: los apósitos de relleno adecuados pueden incluir, por ejemplo, cuentas, cremas, espumas, geles, pomadas, almohadillas, pastas, almohadas, polvos, hilos y otras formulaciones. En ciertas realizaciones, los rellenos no son adherentes y pueden incluir un producto antimicrobiano de liberación temporalizada. Los rellenos ejemplares pueden ser útiles para mantener un ambiente húmedo, controlar el exudado y para tratamiento de, por ejemplo, heridas de grosor parcial y completo, heridas infectadas, heridas con drenaje y heridas profundas que requieran empacotamiento.

Por lo tanto, de acuerdo con la invención, se proporcionan formulaciones por las que puede regularse negativamente la comunicación entre células de una manera transitoria y específica de sitio para el tratamiento de heridas que no se curan a las velocidades esperadas. Las formulaciones tienen por lo tanto aplicación en métodos de terapia.

Tratamiento de heridas

En casos de daño tisular (particularmente con heridas caracterizadas por curación retardada y heridas crónicas) se ha descubierto que las formulaciones de la invención son eficaces en la promoción del proceso de curación de heridas, la reducción de la inflamación y en la minimización de la formación de tejido cicatricial. Las formulaciones tienen por lo tanto claros beneficios en el tratamiento de heridas que no se curan a las velocidades esperadas, bien sean el resultado de traumatismo externo, patología (tales como úlceras diabéticas), afección (tales como úlceras venosas, úlceras arteriales y úlceras vasculíticas) o procesos físicos (tales como úlceras por presión).

En un aspecto la invención proporciona un método para promover o mejorar la curación de heridas en un sujeto que padece una herida crónica, herida de curación retardada o herida de curación incompleta, u otras heridas que no se curan a las velocidades esperadas, que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más polinucleótidos anticonexina. En ciertas realizaciones, la administración del o los polinucleótidos anticonexina es eficaz para reducir la deposición de tejido de granulación, promover la migración celular para acelerar el cierre y la curación de heridas, para facilitar el crecimiento epitelial, o cualquier combinación de los mismos.

En un aspecto la invención proporciona un método para promover o mejorar la curación de heridas en un sujeto, que comprende la administración de uno o más polinucleótidos anticonexina en una cantidad eficaz para regular la división y el crecimiento de células basales epiteliales en una herida crónica, herida de curación retardada o herida de curación incompleta, u otra herida que no se cure a una velocidad esperada. En una realización, el polinucleótido anticonexina es un polinucleótido antisentido de conexina eficaz para regular la división y crecimiento de células basales epiteliales. En una realización, el polinucleótido antisentido de conexina es un polinucleótido antisentido de conexina 26, un polinucleótido antisentido de conexina 43 o una mezcla de los mismos.

En un aspecto la invención proporciona un método para promover o mejorar la curación de heridas, que comprende la administración de uno o más polinucleótidos anticonexina en una cantidad eficaz para regular la secreción de queratina de la capa externa en una herida crónica, herida de curación retardada o herida de curación incompleta, u otra herida que no se cura a una velocidad esperada. En una realización, el polinucleótido anticonexina es un polinucleótido antisentido de conexina eficaz para regular la secreción de queratina de la capa externa. En una realización, el polinucleótido antisentido de conexina es un polinucleótido antisentido de conexina 43, un polinucleótido antisentido 31.1 o una mezcla de los mismos.

En un aspecto la invención proporciona un método para reducir, prevenir o aliviar el daño tisular en un sujeto que padece una herida crónica, herida de curación retardada o herida de curación incompleta, u otra herida que no se cure a una velocidad esperada, que comprende la administración de uno o más polinucleótidos anticonexina.

En un aspecto la invención se refiere a la administración sostenida de uno o más polinucleótidos anticonexina. En una realización, los polinucleótidos anticonexina se administran durante al menos aproximadamente 1-24 horas, al menos aproximadamente 0,5 horas, al menos aproximadamente 1 hora, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 3 horas, al menos aproximadamente 4 horas, al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 7 horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 9 horas, al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 11 horas, al menos aproximadamente 12 horas o al menos aproximadamente 24 horas. En una realización, la expresión de conexina está regulada negativamente durante un periodo prolongado de tiempo. Preferentemente la expresión de conexina 43 está regulada negativamente durante un periodo prolongado de tiempo. Convenientemente, la

expresión de conexina 43 está regulada negativamente durante al menos aproximadamente 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 24 horas. La recuperación de conexina completa sucede generalmente en un periodo de al menos aproximadamente 48-72 horas después de la regulación negativa de la expresión. Los sujetos adecuados incluyen un sujeto diabético u otro sujeto que tenga una herida que no se cure a una velocidad esperada.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene una herida crónica, herida de curación retardada o herida de curación incompleta, u otra herida que no se cura a una velocidad esperada, que comprende la administración sostenida de una cantidad eficaz de uno o más polinucleótidos anticonexina. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para promover o mejorar la curación de heridas en un sujeto que comprende la administración sostenida de uno o más polinucleótidos anticonexina a una herida crónica, herida de curación retardada o herida de curación incompleta u otra herida que no se cura a una velocidad esperada.

De acuerdo con otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para promover o mejorar la curación de heridas en un sujeto que tenga una herida crónica, herida de curación retardada o herida de curación incompleta, u otra herida que no se cure a una velocidad esperada, que comprende la administración sostenida de uno o más polinucleótidos anticonexina a un área de herida en una cantidad eficaz para aumentar las velocidades de reepitelización en el área de la herida. En una realización el método comprende la administración sostenida de un polinucleótido antisentido de conexina 43, y un polinucleótido antisentido de conexina 31.1. En una realización, la composición o las composiciones se administran en una formulación de liberación sostenida. En otra realización, la composición o las composiciones se administran durante un periodo de tiempo prolongado. Convenientemente, la composición es eficaz para reducir los niveles o la expresión de conexina 43 y 31.1 durante al menos aproximadamente 24 horas. Los sujetos que pueden tratarse incluyen sujetos diabéticos u otros sujetos que tienen una herida que no se cura a una velocidad esperada.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para promover o mejorar la curación de heridas en un sujeto que tiene una herida crónica, herida de curación retardada o herida de curación incompleta, u otra herida que no se cura a una velocidad esperada, que comprende la administración sostenida de uno o más polinucleótidos anticonexina a un área de herida en una cantidad eficaz para regular la división y crecimiento de células basales epiteliales y/o eficaz para regular la secreción de queratina de la capa externa. En una realización, la composición comprende un polinucleótido antisentido de conexina eficaz para regular la división o el crecimiento de células basales epiteliales, que es un polinucleótido antisentido de conexina 43, o una mezcla con un polinucleótido antisentido de conexina 26.

En una realización, la composición o las composiciones se administran en una formulación de liberación sostenida. En otra realización, la composición o las composiciones se administran durante un periodo de tiempo prolongado. Convenientemente, la composición es eficaz para reducir los niveles o la expresión de conexina 43, 26 y/o 31.1 durante al menos aproximadamente 24 horas. Los sujetos que pueden tratarse incluyen sujetos diabéticos.

En un aspecto la invención proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de una herida crónica, herida de curación retardada o herida de curación incompleta, u otra herida que no se cure a una velocidad esperada, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un polinucleótido anticonexina administrado a dicha herida o un tejido asociado con dicha herida. En otra realización, la herida crónica es una herida cutánea crónica y una composición de la presente invención se administra a la piel o un tejido asociado con la piel de dicho sujeto durante un periodo de tiempo eficaz. Convenientemente, la composición es eficaz para reducir los niveles de conexina 43, o bloquear o reducir la apertura del hemicanal de conexina 43, durante al menos aproximadamente 0,5 horas, aproximadamente 1-2 horas, aproximadamente 2-4 horas, aproximadamente 4-6 horas, aproximadamente 4-8 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas o aproximadamente 24 horas. Una herida cutánea crónica adecuada para el tratamiento puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en úlceras de presión, úlceras diabéticas, úlceras venosas, úlceras arteriales, úlceras vasculíticas y úlceras mixtas. La herida crónica puede ser una úlcera arterial, que comprende ulceraciones resultantes del bloqueo arterial completo o parcial. La herida crónica puede ser una úlcera de estasis venosas, que comprende ulceraciones resultantes de un fallo de la válvula venosa y la enfermedad vascular asociada. La herida crónica puede ser una úlcera inducida por traumatismo. Se describen en el presente documento y se conocen en la técnica sujetos con otras úlceras, incluyendo úlceras venosas y otras.

Composiciones

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, formulaciones y su uso en el que la composición comprende cantidades terapéuticamente eficaces de un polinucleótido anticonexina, incluyendo, por ejemplo, un polinucleótido antisentido de conexina. Las composiciones son útiles para potenciar o promover la curación de heridas que no se curan a las velocidades esperadas, incluyendo heridas que pueden ser lentas en su curación o refractarias al tratamiento de heridas convencional o terapias promotoras de la curación de heridas.

En una forma preferida, la composición contiene uno o más polinucleótidos anticonexina, por ejemplo un polinucleótido antisentido de conexina, para el ARNm de una proteína conexina solamente. La proteína conexina es

conexina 43.

Como alternativa, las composiciones pueden comprender polinucleótidos para más de una proteína conexina. Una de las proteínas conexas a las que se dirigen los polinucleótidos es la conexina 43. Otras proteínas conexas a las que se dirigen oligodesoxinucleótidos pueden incluir, por ejemplo, conexas 26, 30, 31.1, 32 y 37. Se exponen en la Tabla 1 polinucleótidos (y ODN) ejemplares adecuados dirigidos a diversas conexas.

Muchos aspectos de la invención se describen con referencia a oligodesoxinucleótidos. Sin embargo se entiende que pueden usarse otros polinucleótidos adecuados (tales como polinucleótidos de ARN) en estos aspectos. Otros oligonucleótidos anticonexina son oligonucleótidos de ARNi y ARNip.

En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona composiciones para su uso en el tratamiento terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un polinucleótido anticonexina 43. En una realización preferida, la composición comprende además un vehículo o transportador farmacéuticamente aceptable.

Kits, medicamentos y artículos de fabricación

Opcionalmente, también pueden usarse uno o más polinucleótidos anticonexina en la fabricación del medicamento. En una realización, el medicamento comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido anticonexina 43, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describe en el presente documento un kit que comprende una o más composiciones o formulaciones descritas. Por ejemplo, el kit puede incluir una composición que comprende una cantidad eficaz de uno o más polinucleótidos antisentido de conexina 43.

También se describen artículos de fabricación, que comprenden un recipiente que contiene una composición o formulación de la invención como se describe en el presente documento e instrucciones para su uso para el tratamiento de un sujeto. Por ejemplo, un artículo de fabricación, que comprende un recipiente que contiene un polinucleótido antisentido de conexina e instrucciones para su uso para el tratamiento de un sujeto que padece una herida crónica, de curación retardada o de curación incompleta, u otra herida que no se cura a una velocidad esperada.

También se describe en el presente documento un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más polinucleótidos anticonexina e instrucciones para su uso, incluyendo uso para el tratamiento de un sujeto que tiene una herida crónica o una herida de curación retardada o incompleta, u otra herida que no se cura a una velocidad esperada. También se describe en el presente documento un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más polinucleótidos anticonexina e instrucciones para su uso, incluyendo uso para el tratamiento de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene cualquier enfermedad, trastorno y/o afección caracterizado completamente o en parte por una herida crónica o herida de curación retardada o incompleta, u otra herida que no se cura a una velocidad esperada.

Como se ha observado, se ha indicado que la curación de heridas es lenta en diabetes, dando como resultado con frecuencia infección o heridas crónicas que pueden conducir a amputación. Se ha indicado que la comunicación entre células a través de la proteína de unión comunicante conexina 43 y la regulación dinámica de la expresión de conexina 43 desempeña papeles clave en la curación de heridas. En tejido normal, tal como la piel, en las primeras 24 horas después de la herida, la conexina 43 normalmente está regulada negativamente y la conexina 26 regulada positivamente en queratinocitos en el borde de la herida a medida que adoptan un fenotipo migratorio. Sin embargo, en tejido diabético, en general, y en la piel, en particular, hemos descubierto que la conexina 43 se regula positivamente inmediatamente después de la herida.

La curación de heridas en las ratas diabéticas se ha usado como un modelo de herida crónica. El ejemplo 1 demuestra el uso de un oligonucleótido anticonexina para mejorar la curación de heridas alterada en la rata diabética. En el Ejemplo 1, la diabetes inducida por estreptozotocina, aguda, en ratas altera la expresión de conexina en la piel, reduciendo la proteína conexina 43 y conexina 26 y la comunicación en la epidermis y aumentando la proteína conexina 43 y la comunicación en la dermis. El Ejemplo 1 demuestra que la diabetes altera los cambios dinámicos de conexas asociados con la curación de heridas. En un periodo de 24 horas, la conexina 43 se reguló positivamente en una ampolla engrosada de queratinocitos en el borde de la herida (en lugar de regularse negativamente, como en los controles que formaron un proceso delgado de células migratorias). La reducción de conexina 43 se retardó hasta 48 horas cuando comenzó la reepitelización. Aunque la conexina 26 estaba regulada positivamente como sucede habitualmente en la diabetes, su distribución en el borde de la herida fue anómala, siendo más generalizada. El Ejemplo 1 muestra además la asociación entre la dinámica anómala de la expresión de conexina 43 y la reepitelización retardada como se confirma por la aplicación de un gel antisentido específico de conexina 43 a heridas diabéticas en comparación con la aplicación de un gel con el oligodesoxinucleótido sentido correspondiente. Este tratamiento evitó la regulación positiva anómala de la conexina 43 y duplicó la velocidad de reepitelización a niveles de control (no diabéticos) y superiores.

Los resultados indicados en el Ejemplo 1 apoyan el concepto de que los cambios inducidos por diabetes en la dinámica de expresión de conexina contribuyen a la curación de heridas retardada y que la dirección de la expresión de conexina 43 como un medio para promover la curación de heridas diabéticas y otras crónicas tiene valor terapéutico potencial.

El Ejemplo 2 demuestra la aplicación exitosa de un oligonucleótido anticonexina 43 para promover la curación de una úlcera cutánea que no se cura en un sujeto humano.

El Ejemplo 3 demuestra la aplicación exitosa de un oligonucleótido anticonexina 43 para promover la curación de una úlcera venosa que no se cura en un sujeto humano.

Diversos aspectos de la invención se describirán ahora con referencia a los siguientes ejemplos, que se entenderá que se proporcionan como ilustración solamente y no constituyen una limitación del alcance de la invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Se prepararon oligodesoxinucleótidos con las siguientes secuencias:

GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT CTC (conexina 43) (SEQ ID NO: 2)
 GAC AGA AAC AAT TCC TCC TGC CGC ATT TAC (control sentido) (SEQ ID NO: 7)

Se indujo diabetes en ratas adultas Sprague-Dawley (350-400 g) por una única inyección intraperitoneal que contenía estreptozotocina, 65 mg/kg; en tampón citrato (Shotton HR, *et al.* (2003) Diabetes. 52: 157-64) (N= seis diabéticos, seis de control). La mayoría de los estudios de curación de heridas diabéticas se han llevado a cabo dos semanas después de la inducción de diabetes y se usó el mismo punto temporal para este estudio de curación de heridas. Sin embargo, también se examinó la expresión de conexina en piel de rata diabética a las ocho semanas (N= seis diabéticos, seis de control) para confirmar que los cambios detectados a las dos semanas permanecían iguales. La piel normal de la espalda se escindió, se crioseccionó, se inmunotizó con respecto a conexinas, se obtuvieron imágenes por microscopía confocal y se cuantificó la tinción como en Saitongdee *et al.* (2000). Cardiovascular Res. 47, 108-115.

Las ratas se anestesiaron con halotano y se afeitaron sus espaldas. Se realizaron dos pares de heridas de escisión de grosor completo de 5 x 5 mm, y se aplicó oligodesoxinucleótido antisentido específico de conexina 43 10 μ M en gel Pluronic F-127 a una herida y gel de control (sentido) a la otra (Qiu C, *et al.* (2003) Cell Biol. Int. 27: 525-541). El tejido se recogió los días 1, 2, 5, 10 y 15 después de la herida, y se seccionó en preparación para la inmunohistoquímica de conexina o tinción con H y E (misma referencia). Los cambios dinámicos en la expresión de conexina se correlacionan con acontecimientos clave en el proceso de curación de heridas. N= seis ratas diabéticas, seis de control por cada punto temporal.

Se evaluó la comunicación intercelular aplicando una solución al 4 % de Amarillo Lucifer CH (Sigma) en una compresa de gelfoam en una incisión de piel de grosor completo, nueva. Se permitió que el colorante se transfiriera durante 5 minutos antes de la retirada del gelfoam y fijación del tejido. Se usó un FITC-dextrano de 10 kD que entra en células lesionadas pero no pasa a través de las uniones comunicantes como control. Los tejidos se crioseccionaron y se capturaron sus imágenes por microscopía confocal en un Leica SP2UV (Leica, Milton Keynes, Reino Unido; N= cuatro diabéticos y cuatro de control).

Se examinaron los colorantes transferidos y la inmunotinción de conexina usando el microscopio confocal. Se ajustaron el aumento y la separación óptimos previamente y se mantuvieron constantes durante la adquisición de imágenes. Se tomó una serie de imágenes de sección óptica individuales para generar un montaje de la piel del corte. Las imágenes digitales eran de ocho bits y se analizaron usando software Image-J (NIH). Para evaluar la transferencia de colorante, se colocó una caja de región de interés de 1500 x 30 píxeles del borde del corte en la dermis media y se generó un gráfico de intensidad de imagen a través de la caja. Se tomó arbitrariamente una caída de la intensidad de nivel de gris por debajo de 50 como el punto en el que había viajado el Amarillo Lucifer. De forma similar, en la epidermis, se registró la distancia del corte a donde la señal de Amarillo Lucifer caía por debajo de 50. Se analizó un mínimo de tres imágenes de cada animal. Para comparar los niveles de proteína conexina, se tomaron seis imágenes de sección óptica individuales de la dermis o la epidermis de diferentes secciones para cada herida. Todos los parámetros de potencia de láser, orificio, aumento/separación y objetivo se mantuvieron constantes en los grupos tanto de control como diabéticos. Se cuantificó la expresión de conexina, como en Saitongdee *et al.* (2000) mencionado anteriormente, usando software Image J (NIH). Se estableció un umbral para detectar placas de unión comunicante con ruido de fondo mínimo y después se mantuvo constante para todas las imágenes. Se registró el tamaño y el número de las placas de conexina para cada imagen y se expresó por cada 100 μ m de epidermis o 10000 μ m² de dermis. Este enfoque ha demostrado ser mucho más preciso que el Western blot ya que genera información sobre la expresión de proteínas al nivel celular. Los Western blots serían incapaces de distinguir entre células de la epidermis y dermis o detectar efectos de proximidad al borde de la herida. Usando este enfoque, los

- niveles de conexina en queratinocitos en una zona en el borde de la herida (BH) y en una zona a 500 μm de distancia (AD), pudieron cuantificarse uno o dos días después de la herida. El día cinco después de la herida, también se capturaron imágenes de una zona adicional del borde anterior (BA) de la epidermis naciente. También se tomaron imágenes de tinción de H y E usando un microscopio Leica DMLFS con una cámara digital DC300F. Se han descrito mediciones para la velocidad de reepitelización en detalle previamente (Qiu C, *et al.* (2003) mencionado anteriormente). Todas las diferencias numéricas entre tratamientos se ensayaron con respecto a significación usando el ensayo de rangos con signos para muestras relacionadas de Wilcoxon como se implementó en Statview 5.0.1.
- Las Figuras 1A y 1B representan tinción de conexina 43 y 26 en piel de rata normal y diabética por STZ a las dos semanas (Figura 1A) y ocho semanas después de la inducción de diabetes (Figura 1B). Los gráficos muestran los números de placas en la epidermis y la dermis. La tinción de conexina 43 y conexina 26 se reduce significativamente en la epidermis diabética mientras que la tinción de conexina 43 aumenta en la dermis tan pronto como dos semanas después de la inducción de diabetes, sin ningún cambio adicional a las ocho semanas. La Figura 1C representa imágenes de inmunotinción de conexina 43 y conexina 26 típica en piel de control, C, y diabética, D, a las ocho semanas, en la que las cabezas de flecha marcan el límite entre la epidermis y la dermis. Barra de escala 25 μm . Figura 1D, cuantificación de la distancia que recorre el colorante permeable para la unión comunicante, Amarillo Lucifer, en cinco minutos en la epidermis y dermis de ratas de control y diabéticas. La transferencia de colorante se redujo significativamente en la epidermis diabética pero aumentó significativamente en la dermis diabética.
- Típicamente se descubrió inmunotinción de conexina 43 punteada en la capa basal de la epidermis, y en fibroblastos dérmicos, folículos pilosos, vasos sanguíneos y apéndices (Figuras 1A a 1D). Sin embargo, en piel diabética, la tinción de conexina 43 se redujo significativamente en la epidermis, con respecto tanto al tamaño como al número de placas de unión comunicante (Figura 1A). La tinción para conexina 26 en las capas superiores de la epidermis se redujo significativamente de forma similar en epidermis diabética (Figura 1A). Sin embargo, esta no fue una regulación negativa global de conexinas en respuesta a diabetes ya que se observó un efecto de contraste en fibroblastos dérmicos; en estos, se observó un aumento definido en el tamaño y número de placas positivas para conexina 43. Se vieron efectos similares en la expresión de conexina en la piel dos semanas y ocho semanas después de la inducción de diabetes por STZ (Figura 1 B).
- Para evaluar la comunicación entre células en epidermis y dermis diabética, se examinó el alcance de la transferencia del colorante permeable para unión comunicante Amarillo Lucifer a través del tejido en cinco minutos. Esto reveló una comunicación significativamente reducida en la epidermis diabética pero potenció significativamente la comunicación en la dermis (Figura 1D), lo que es coherente con los cambios en la expresión de proteína conexina. Se ha indicado expresión elevada de proteína conexina 43 y comunicación aumentada en fibroblastos diabéticos humanos (Abdullah KM, *et al.* (1999) *Endocrine* 10: 35-41) y se han observado respuestas mixtas de diferentes conexinas a la diabetes en el sistema renal (Zhang J, Hill CE. (2005) *Kidney Int.* 68: 1171-1185.) y la vejiga (Poladia DP, *et al.* (2005) *Acta Diabetol.* 42: 147-152.).
- Las Figuras 2A a 2D representan velocidades de reepitelización y respuestas de niveles de proteína conexina 43 y conexina 26 después de lesión en epidermis de control y diabética. Se cuantificó la tinción, contando placas a los uno y dos días después de la herida en la epidermis en el borde de la herida (BH) y epidermis adyacente (AD), a 500 μm de distancia (Figura 2A). El día cinco también se cuantificó una zona adicional en el borde anterior (BA) de la epidermis naciente y los datos también se incluyeron. La velocidad de reepitelización se redujo significativamente en ratas diabéticas (D) en comparación con controles (C) en todos los puntos temporales: uno, dos y cinco días después de la herida (Figura 2B). La tinción de conexina 43 en la zona BH normalmente se reduce en las primeras 24 horas después de la lesión pero en piel diabética aumenta significativamente, volviendo a niveles cercanos al control a los dos días después de la herida, y se encuentran niveles significativamente reducidos en las tres zonas 5 días después de la herida (Figura 2C). La respuesta normal de conexina 26 a la lesión es aumentar el nivel de tinción en BH y esto se produjo en animales tanto de control como diabéticos un día después de la herida (Figura 2D). A los 2 días después de la herida, sin embargo, en piel diabética, se vio que la tinción de conexina 26 estaba significativamente elevada en zonas tanto BH como AD, reduciéndose significativamente en estas zonas solamente a los 5 días después de la herida.
- Las Figuras 3a a 3f y 3a' a 3f' representan la tinción de conexina 43 (a, a', c, c', e, e') y conexina 26 (b, b', d, d', f, f') (verde) y tinción nuclear (azul) en el borde de la herida epidérmica de piel de control y diabética durante el proceso de curación de heridas. Después de un día, la expresión de proteína conexina 43 se regula negativamente en los queratinocitos del borde anterior de ratas de control (Figura 3a) pero se ha regulado positivamente en esta región, que aparece hinchada, en animales diabéticos (Figura 3a'). Puede verse que la conexina 26 se regula positivamente de forma similar en epidermis tanto de control (Figura 3b) como diabética (Figura 3b'). A los dos días, la tinción de conexina 43 se ha reducido en los queratinocitos del borde anterior diabético (Figura 3c') y es similar a la de los controles (Figura 3c) mientras que la conexina 26 ha continuado aumentando en todos los queratinocitos diabéticos (Figura 3d') hasta niveles significativamente mayores que los controles (Figura 3d). A los cinco días después de la herida la epidermis naciente de control (Figura 3e) y diabético (Figura 3e') muestra muy poca tinción de conexina 43 punteada entre queratinocitos mientras que la tinción de conexina 26 está algo reducida en heridas diabéticas (Figura 3f') en comparación con heridas de control (Figura 3f). La cabeza de flecha marca el borde de la herida.

Barra de escala a, c, e, 50 μm b, d, f 100 μm .

Para determinar las respuestas dinámicas de la expresión de conexina a lesión, se cuantificó la tinción de conexina en queratinocitos en el borde de la herida (BH) y en una zona adyacente a 500 μm de distancia (AD), uno y dos días después de la herida, mientras que después de cinco días se capturaron imágenes de los queratinocitos del borde anterior (BA) (Figura 2A). Un día después de la herida se descubrió una reducción significativa en la tinción de conexina 43 en queratinocitos de control en la zona BH en comparación con AD (Figuras 2C, 3a y 3a'). En notable contraste, en animales diabéticos se descubrió un aumento significativo de la tinción de conexina 43 en BH en comparación con AD. Esto fue lo opuesto de la respuesta de curación de heridas normal y fue sorprendente porque los niveles de conexina 43 se redujeron significativamente en piel diabética intacta. La respuesta dinámica de conexina 26 fue similar en piel diabética y de control, con un aumento significativo en la tinción en la zona BH (Figuras 2D, 3b y 3b') aunque, en la piel diabética, el aumento de la tinción de conexina 26 no se restringió a la zona BH como en los controles sino que se extendió cierta distancia hasta la zona AD, lo que implica una mayor propagación en la respuesta a lesión. Además se descubrió que los queratinocitos en el borde de la herida formaban una ampolla engrosada en el tejido diabético mientras que se reducían antes de extenderse hacia delante para cerrar la herida en los controles.

Las heridas de control de dos días comenzaron a reepitelizarse (12 % cerrado) pero las heridas diabéticas se retrasaron (5 % cerrado), habiendo adoptado solamente de forma muy reciente una morfología migratoria. Junto con este cambio de forma de queratinocitos diabéticos hubo una reducción significativa en la tinción de conexina 43 dentro de la zona BH, que en este estadio se asemejaba a la de los controles (Figuras 2C, 3c y 3c'). Sin embargo, en heridas de piel diabética, los niveles de tinción de conexina 26 continuaron aumentando en las zonas tanto BH como AD (Figuras 2D, 3d y 3d'), lo que indica una respuesta tisular mucho más amplia a la lesión.

El día cinco, la reepitelización estaba bastante avanzada en grupos tanto diabéticos como de control, aunque las heridas diabéticas se retrasaron significativamente (20 % cerrado en comparación con 33 % en los controles; $P < 0,008$; ensayo de rangos con signo de muestras relacionadas de Wilcoxon; Figura 2C). En los grupos tanto diabéticos como de control, pudo verse claramente que los queratinocitos BA contenían poca tinción de conexina 43. La tinción de conexina 43 aumentó significativamente en las zonas BH y AD, pero menos en la piel diabética, que, como la piel intacta, expresaban menos conexina 43 que los controles (Figuras 2C, 3e y 3e'). En este estadio, la tinción de conexina 26 en BA aumentó de forma similar en piel tanto diabética como de control (Figuras 2D, 3f y 3f'). La tinción de conexina 26 previamente elevada en zonas BH y AD diabéticas volvió a niveles más normales. La reepitelización se completó en animales tanto de control como diabéticos el día diez, cuando pudieron verse altos niveles de conexina 43 en la epidermis proliferativa, de grosor excesivo.

Las Figuras 4A a 4C representan el efecto del tratamiento con oligodesoxinucleótido antisentido de conexina 43 ("Cx43asODN") en la expresión de conexina 43 un día después de la herida y en las velocidades de reepitelización a los uno, dos y cinco días en comparación con un control de oligodesoxinucleótido sentido de conexina 43 ("sODN"). Pueden verse niveles elevados de la tinción de conexina 43 (puntos verdes) en la ampolla epidérmica hinchada en el borde de una herida diabética un día después de la herida (Figura 4A). Sin embargo, esta elevación en la expresión de proteína conexina 43 se evitó por el tratamiento con asODN de conexina 43 que también da como resultado una capa más fina de queratinocitos que tiene una apariencia más similar a los animales de control en lugar de una ampolla de células (Figura 4B). El tratamiento de pares de heridas en piel de control y diabética con asODN o sODN de control da como resultado el doble de la velocidad de reepitelización después de la aplicación de asODN en todos los puntos temporales examinados (Figura 4C). La velocidad de reepitelización de piel tratada con asODN diabética se aproxima a la de la piel de control tratada con sODN un 1 día después de la herida y 2 días después de la herida pero es significativamente más rápida a los 5 días después de la herida. Barra de escala 50 μm .

Habiendo observado estos patrones anómalos de inmunotinción de conexina, comunicación de uniones comunicantes y respuesta morfológica en heridas diabéticas, se evaluó el efecto del aumento anómalo de la proteína de conexina 43 en queratinocitos de BH diabéticos evitando el aumento con un gel antisentido específico de conexina 43, aplicado a la herida en el momento de la lesión. Esto evitó eficazmente el aumento de la conexina 43 (Figura 4A), y también mejoró las velocidades de curación de heridas que se duplicaron, alcanzando las de niveles de control no tratados o más (Figura 4B) aunque las velocidades de curación fueron aún mayores en heridas tratadas con antisentido en ratas de control.

El mecanismo por el que la diabetes altera la expresión de conexinas, con un efecto diferencial en diferentes proteínas de conexina, se desconoce. La hiperglucemia y/o estrés oxidativo inducido por hiperglucemia están implicados en el desarrollo de otras complicaciones de la diabetes tales como neuropatía y angiopatía (American Diabetes Association (1999) Consensus development conference on diabetic foot wound care: 7-8 abril 1999, Boston, Massachusetts). Se ha indicado que tanto la alta glucosa como el estrés oxidativo *in vitro* altera la expresión de conexina y/o comunicación de uniones comunicantes en una diversidad de tipos celulares diferentes (Fukuda T, *et al.* (2000) *J. Gastroenterol.* 35: 361-368; Cho JH, *et al.* (2002), *Carcinogenesis.* Jul; 23(7): 1163-9; Rouach N, *et al.* (2004) *Glia.* 1; 45(1): 28-38), y se sabe que la conexina 43 y conexina 26 tienen promotores diferentes (Hennemann H, *et al.* (1992) *Eur. J. Cell Biol.* 58(1): 81-9; Chen ZQ, *et al.* (1995) *J Biol Chem.* 270(8): 3863-8.

Sin embargo, se ha demostrado curación de heridas alterada en ratas tan pronto como una semana después de la inducción de la diabetes, antes de que se desarrolle la neuropatía o angiopatía (Witte MB, *et al.* (2002) *Br. J. Surg.* 89: 1594-1601; Shi HP, *et al.* (2003) *Wound Repair Regen.* 11: 198-203). Por lo tanto, los cambios observados en estos experimentos en un periodo de dos semanas probablemente sean consecuencias directas de la condición diabética en lugar de consecuencias secundarias de complicaciones diabéticas a largo plazo.

Un hallazgo significativo fue la regulación positiva anómala de la conexina 43 en el borde de la herida epidérmica en diabetes. Esto tiene el potencial de afectar al proceso del cierre de heridas de maneras diferentes. Se ha propuesto que la formación de compartimentos de comunicación dentro de la epidermis en regeneración desempeña un papel en la curación de heridas (Martin P (1997) *Science* 276: 75-81); Lampe PD, *et al.* (1998) *J Cell Biol.* 143(6): 1735-47; Hodgins M (2004) *J. Invest. Dermatol.* 122: comentario). La compartimentalización podría llevarse a cabo eficazmente en condiciones normales mediante la expresión de conexina 26 y retirada de conexina 43 en células del borde anterior, ya que estas conexinas no forman uniones entre sí. Por lo tanto, el retardo en la curación de heridas en diabetes podría reflejar el tiempo adicional requerido para que la expresión de conexina 43 se regule negativamente hasta un punto en el que pueda producirse dicha compartimentalización. Como alternativa, se sabe que la cola C de conexina 43 interacciona con componentes citoesqueléticos o con P120ctn/Rho GTPasa, de modo que la regulación negativa de la conexina 43 podría ser necesaria para cambiar la movilidad de los queratinocitos en el borde de la herida, permitiéndoles migrar y cerrar la herida (Wei CJ, *et al.* (2004) *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20: 811-38). A este respecto, fue notable que, un día después de la herida cuando su expresión de conexina 43 fue alta, los queratinocitos diabéticos formaron una ampolla engrosada en el borde de la herida en lugar de aplanarse y comenzar a extenderse hacia la herida.

Se ha mostrado en el presente documento que la anulación de la expresión de conexina 43 por una única aplicación del gel antisentido específico de conexina 43 en el momento de la curación permite que el proceso completo, de la migración inicial hasta el cierre completo de la herida, se produzca a una velocidad normal y superior a pesar de la presencia continuada de la condición diabética. Por lo tanto, el tratamiento con oligonucleótidos anticonexina, por ejemplo, tratamiento antisentido, tiene considerable potencial como un nuevo enfoque para el tratamiento de heridas que no se curan a las velocidades esperadas, incluyendo heridas crónicas en pacientes diabéticos y otros.

EJEMPLO 2

La invención se ha usado con éxito para tratar a un sujeto humano con una herida crónica grande, en este caso una úlcera vasculítica, basándose en un uso compasivo.

Un hombre de 49 años de edad con enfermedad vascular periférica subyacente se presentó en primer lugar por complicaciones que surgieron de una herida de la pierna que no se cerraba. Este paciente se había sometido a una amputación por debajo de la rodilla izquierda secundaria a un traumatismo, con dehiscencia posterior como resultado de una caída. Durante un periodo de más de 6 meses la herida no había respondido a ninguna forma de cuidado establecido. El paciente se sometió a múltiples tratamientos tópicos en un intento de curar la herida, incluyendo la aplicación de factor de crecimiento, apósitos antimicrobianos, VAC (cierre asistido por vacío), apósitos de xenoinjertos, sin cambios significativos. El paciente después se cayó y se lesionó adicionalmente el sitio de la herida. Esto se siguió de múltiples desbridamientos quirúrgicos y reemplazos del xenoinjerto. La herida continuó aumentando de tamaño y se consideró que tenía riesgo para la extremidad.

Por lo tanto, debido a la naturaleza de la herida y el nivel y tipo de amputación, se consideró que el paciente no tenía ninguna opción de tratamiento alternativa excepto someterse a una amputación por encima de la rodilla. La División Dermatológica de la FDA aprobó el uso del fármaco experimental de los solicitantes (SEQ ID NO: 1) para este paciente con un Uso de Urgencia IND. La herida se trató posteriormente con 2 ml de preparación 20 μ M de SEQ ID NO: 1 en gel pluronic (dosis total 400 μ g). La herida en el momento de la aplicación fue de aproximadamente 7 cm x 5 cm (aproximadamente 35 cm²) con una profundidad de aproximadamente 3-4 mm. Por lo tanto, se administraron aproximadamente 12 μ g/cm² de SEQ ID NO: 1. La herida se vendó y se dejó cubierta durante un periodo de 7 días. Cuando se descubrió el Día 7, el médico indicó que tanto el edema como el eritema ya no estaban presentes y la herida parecía haber comenzado a granular aunque las dimensiones (longitud y anchura) eran aproximadamente iguales en ese estadio.

Se aplicó un segundo tratamiento (dosis total de 400 μ g). Después de este tratamiento, la herida continuó curándose y se indicó posteriormente que la lesión era de 1 mm de profundidad (una reducción de tres a cuatro veces) con 1-1,5 cm de tejido nuevo en todos los lados. La herida estaba limpia y el tejido de granulación tenía apariencia "sana". El paciente se consideró "listo para el injerto" si otro tejido, por ejemplo, tejido del muslo podía usarse para el injerto. Sin embargo, esto no se consideró una opción para este paciente debido a su enfermedad vascular periférica subyacente.

No resultaron evidentes o se indicaron preocupaciones de seguridad después de este tratamiento experimental. El paciente se evaluó de nuevo a los dos meses y el tamaño de la herida había continuado reduciéndose. El tamaño aproximado de la herida se había reducido 7 veces, hasta 5 cm², y el personal médico que evaluaba la herida concluyó que continuaría hasta su cierre completo. Se determinó que ya no se requería una amputación por encima

de la rodilla.

EJEMPLO 3

5 La invención se ha usado con éxito para tratar a un sujeto humano con una herida crónica venosa. Un hombre de 86 años de edad con edema periférico subyacente se presentó con complicaciones de una úlcera venosa crónica sin curación, de cinco meses de antigüedad. Durante este periodo la herida no había respondido a ninguna forma de cuidado establecido en la comunidad. El paciente se sometió a múltiples tratamientos tópicos en un intento de curar la herida, incluyendo antimicrobianos y la aplicación de una venda de presión para reducir el edema. Durante este periodo de tiempo la herida continuó aumentando de tamaño. Se programó que el paciente se sometiera a cirugía de reemplazo de la rodilla, pero se le informó de que la operación no podría realizarse en presencia de una herida crónica abierta.

15 Por lo tanto, debido a la naturaleza de la herida, que también estaba inflamada e hinchada dentro del lecho de la herida y particularmente en los bordes, se consideró al paciente como un caso de uso compasivo y se obtuvo consentimiento informado para tratar al paciente. La herida se trató posteriormente con 200 µl de preparación 10 µM de SEQ ID NO: 1 en gel pluronic (dosis total de aproximadamente 20 µg). La herida en el momento de aplicación fue de aproximadamente 3 cm x 3 cm (aproximadamente 9 cm²) con una profundidad de aproximadamente 2-3 mm. Por lo tanto, la dosis total aplicada fue de aproximadamente 2,2 µg por cm². La herida se vendó después con un apósito no adhesivo durante 24 horas.

25 Cuando se descubrió a las 24 horas, ya no estaban presentes inflamación e hinchamiento y la herida estaba secándose. La herida después se dejó descubierta hasta 72 horas después del tratamiento momento en el cual la herida de úlcera cutánea previamente sin curación estaba completamente seca y se había formado una costra sobre la herida completa. La herida se vendó posteriormente y se volvió a examinar una semana después, momento en el cual las dimensiones de la herida (longitud y anchura) se habían reducido significativamente, la inflamación e hinchamiento permanecían ausentes, y la herida se estaba curando y progresando hacia el cierre.

30 Se aplicó un segundo tratamiento (dosis total de aproximadamente 20 µg de SEQ ID NO: 1) un mes después de una lesión adicional a la herida, que había conducido a un cese hacia el cierre. Después de este tratamiento, se aplicó una venda de presión para reducir el edema y la herida comenzó rápidamente a curarse de nuevo. La lesión se redujo en profundidad, anchura y longitud y la nueva piel en la que la herida se curaba era de apariencia sana.

35 No fueron evidentes ni se indicaron preocupaciones de seguridad después de este tratamiento experimental. El paciente se evaluó de nuevo a las seis semanas. El tamaño de la herida se había reducido hasta aproximadamente un cuarto del tamaño original, y estaba progresando hacia su cierre.

TABLA 2

40

Tabla 2A

Conexina 43 Humana de N° de Referencia en GenBank M65188 (SEQ ID NO: 13)

1	ggcttttagc gtgaggaag taccaaacag cagcggagtt taaacttta aatagacagg
61	tctgagtgcc tgaactgcc tttcatttt acttcatcct ccaaggagtt caatcactg
121	gcgtgacttc actactfta agcaaaagag tgggtcccag gcaacatggg tgactggagc
181	gccttaggca aactcctga caaggtcaa gcctactcaa ctgctggagg gaaggtgtgg
241	ctgtcagtac tttcatttt ccgaatcctg ctgctgggga cagcgggtga gtcagcctgg
301	ggagatgagc agtctgcctt tcgttgaac actcagcaac ctggttgtga aaatgtctgc
361	tatgacaagt ctttccaat ctctcatggt cgcttctggg tcctgcagat catatttgg
421	tctgtacca cactcttga cctggctcat gtgttctatg tgatgcgaaa ggaagagaaa
481	ctgaacaaga aagaggaaga actcaagggt gcccaaactg atggtgtcaa tgtggacatg
541	cactgaagc agattgatg aaagaagttc aagtacggtg tgaagagca tggtaagggtg
601	aaaatgcgag gggggttgc tccgaacctac atcatcagta tcctctcaa gtctatcttt
661	gagggtgctt tctgtctgat ccagtggtac atctatggat tcagcttgag tgctgtttac
721	actgcaaaa gagatccctg cccacatcag gtggactggt tcctctctcg ccccacggag
781	aaaacctct tcatcatctt catgctgggt gtgtccttgg tgcctctggc ctggaatac
841	attgaactct tctatgtttt ctcaagggtc gtttaaggat gggtaagggt aaagagcgac
901	cctaccatg cgaccagtgg tgcgctgagc cctgccaaag actgtgggtc tcaaaaatat
961	gcttattca atggctgctc ctaccaaac gctcccctct cgctatgtc tctctctggg
1021	tacaagctgg ttactggcga cagaacaat tcttcttggc gcaattaca caagcaagca
1081	agtgagcaaa actgggctaa ttacagtga gaacaaaatc gaatggggca ggcgggaagc
1141	accatctca actcccatgc acagcctttt gatttcccg atgataacca gaattctaaa
1201	aaactagctg ctggacatga attacagcca ctagccattg tggaccagcg acctcaagc
1261	agagccagca gtcgtgccag cagcagacct cggcctgatg acctggagat ctg

Tabla 2B**Conexina 43 Humana (SEQ ID NO: 14)**

1	atgggtgactggagcgctt aggcaaaactc ctgacaagg tcaagccta ctcaactgct
61	ggaggaagggtggctgtc agtactttc atttccgaatcctgctgct ggggacagcg
121	gtgagtcagcctggggaga tgagcagtct gcccttcgtt gtaactca gcaacctggt
181	tgtgaaaatg tctgctatga caagctttccaatctctc atgtgctt ctgggtcctg
241	cagatcatat ttgtgtctgt acccactctgtacctgg ctcatgttctatgtgatg
301	cgaaggaag agaaactgaa caagaaagag gaagaactca aggtgcca aactgatggt
361	gtcaatggtg acatgcactt gaagcagatt gagataaagaagtcaagta cggattgaa
421	gagcatggta aggtgaaaat gcgagggggg ttgctgcaa cctacatcat cagtacctc
481	ttcaagtcta tcttgagggt ggcttctg ctgatccagt ggtacatcta tggattcagc
541	ttgagtctg ttactctg caaaagat cctgcccac atcaggtgga ctgttctc
601	tctgccccca cggagaaaac catctcatc atctcatgc tgggtgtgc ctggtgtcc
661	ctggcctga atatcattga actctctat gtttctca agggcgtaa ggatcgggt
721	aagggaaga gcgacccta ccatgcgacc agtgggtgctg tgagccctgc caagactg
781	gggtctaaa aatatgcta ttcaatgctc tgctctcac caaccgctcc cctctgct
841	atgtctctc ctgggtacaa gctggtact ggcgacagaa acaattctc ttccgcaat
901	tacaacaagc aagcaagtga gcaaaactgg gctaattaca gtgcagaaca aaatcgaatg
961	ggcagggcg gaagcaccat cttaactcc catgcacagcctttgatit cccgatgat
1021	aaccagaatt ctaaaaactagctgctgga catgaattac agccactagc cattgtggac
1081	cagcgacct caagcagagc cagcagctgtccagcagca gacctggcctgatgacctg
1141	gagatctag

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

- 5 (a) un polinucleótido anticonexina 43 presente en una concentración de 30 μ M a 200 μ M, y
 (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable;
 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene una herida que no se cura a una velocidad esperada que comprende administrar la composición a la herida.

10 2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la que:

- a) el polinucleótido anticonexina 43 está presente en una concentración de 30 μ M a 50 μ M;
 b) el polinucleótido anticonexina 43 está presente en una concentración de 30 μ M;
 15 c) el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un gel de copolímero de polioxietileno-polioxipropileno no iónico;
 d) el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un alginato;
 e) el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un hidrogel;
 f) el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un hidrogel seleccionado del grupo que consiste en hidrogeles que contienen un derivado de celulosa e hidrogeles que contienen ácido poliacrílico;
 20 g) el vehículo farmacéuticamente aceptable es un vehículo basado en celulosa;
 h) el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un vehículo basado en celulosa seleccionado del grupo que consiste en hidroxietil celulosa, hidroximetil celulosa, carboximetil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa y mezclas de las mismas:
 i) la composición se formula para aplicación tópica;
 25 j) la composición se formula para liberación sostenida;
 k) la composición se formula para liberación lenta, liberación prolongada o liberación controlada;
 l) la composición es un gel; o
 m) la composición es una crema, ungüento, emulsión, loción, pulverización, pomada, espuma o pintura.

30 3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en la que la herida es:

- a) una herida de curación retardada o incompleta;
 b) una herida con dehiscencia;
 35 c) caracterizada al menos en parte por inflamación;
 d) una herida crónica;
 e) una herida crónica caracterizada al menos en parte por inflamación;
 f) una úlcera vasculítica;
 g) una úlcera venosa o una úlcera de estasis venosa,
 h) una úlcera arterial;
 40 i) una úlcera de presión o una úlcera de decúbito;
 j) una úlcera de presión de estadio 1, una úlcera de presión de estadio 2, una úlcera de presión de estadio 3 o una úlcera de presión de estadio 4;
 k) una úlcera diabética;
 l) una úlcera cutánea resultante de traumatismo o una quemadura; o
 45 m) una herida sin curación.

4. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que el sujeto:

- a) es diabético;
 50 b) tiene neuropatía periférica;
 c) tiene un fallo de la válvula venosa y/o insuficiencia venosa;
 d) tiene un bloqueo arterial;
 e) es un mamífero;
 f) es un ser humano;
 55 g) es un animal no humano;
 h) es un animal no humano seleccionado del grupo que consiste en animales de granja, animales de zoológico, animales deportivos y animales de compañía; o
 i) es un caballo, un perro o un gato.

60 5. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el polinucleótido anticonexina 43 se administra:

- a) en una cantidad que varía de 1 a 100 μ g por centímetro cuadrado de tamaño de la herida;
 b) en una cantidad que varía de 1 a 10 μ g por centímetro cuadrado de tamaño de la herida;
 65 c) en una cantidad que varía de 1 a 5 μ g por centímetro cuadrado de tamaño de la herida; o

d) en una cantidad que varía de 5 a 7 µg por centímetro cuadrado de tamaño de la herida.

6. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que:

- 5 a) la composición se aplica más de una vez; o
b) la administración de la composición se repite aproximadamente una vez por semana.

7. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que:

- 10 a) el polinucleótido anticonexina 43 tiene de 18 a 32 nucleótidos;
b) el polinucleótido anticonexina 43 es un oligodesoxinucleótido;
c) el polinucleótido anticonexina 43 es un oligodesoxinucleótido modificado;
d) el polinucleótido anticonexina 43 es un oligodesoxinucleótido no modificado;
e) el polinucleótido anticonexina 43 es un polinucleótido de ARNi o ARNip;
15 f) el polinucleótido anticonexina 43 comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1 o 2;
g) el polinucleótido anticonexina 43 tiene al menos un 70 por ciento de homología con SEQ ID NO: 1 o 2; o
h) el polinucleótido anticonexina 43 hibrida con el ARNm de conexina 43 en condiciones de media a alta astringencia.

20 8. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el polinucleótido anticonexina 43 es un polinucleótido antisentido de conexina 43.

25 9. Uso de una composición como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 7 y 8 para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto que tiene una herida que no se cura a una velocidad esperada administrando la composición a la herida.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9 en el que:

- 30 a) la herida es como se ha definido en la reivindicación 3;
b) el sujeto es como se ha definido en la reivindicación 4; o
c) el polinucleótido anticonexina 43 se administra como se ha definido en la reivindicación 5 o 6.

35 11. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la herida es una herida de curación retardada, de curación incompleta o crónica.

12. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el método para tratar a un sujeto es un método para promover la curación de heridas en el sujeto.

40 13. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la herida está inflamada.

14. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el método para tratar a un sujeto es un método para mejorar el cierre de heridas en un sujeto.

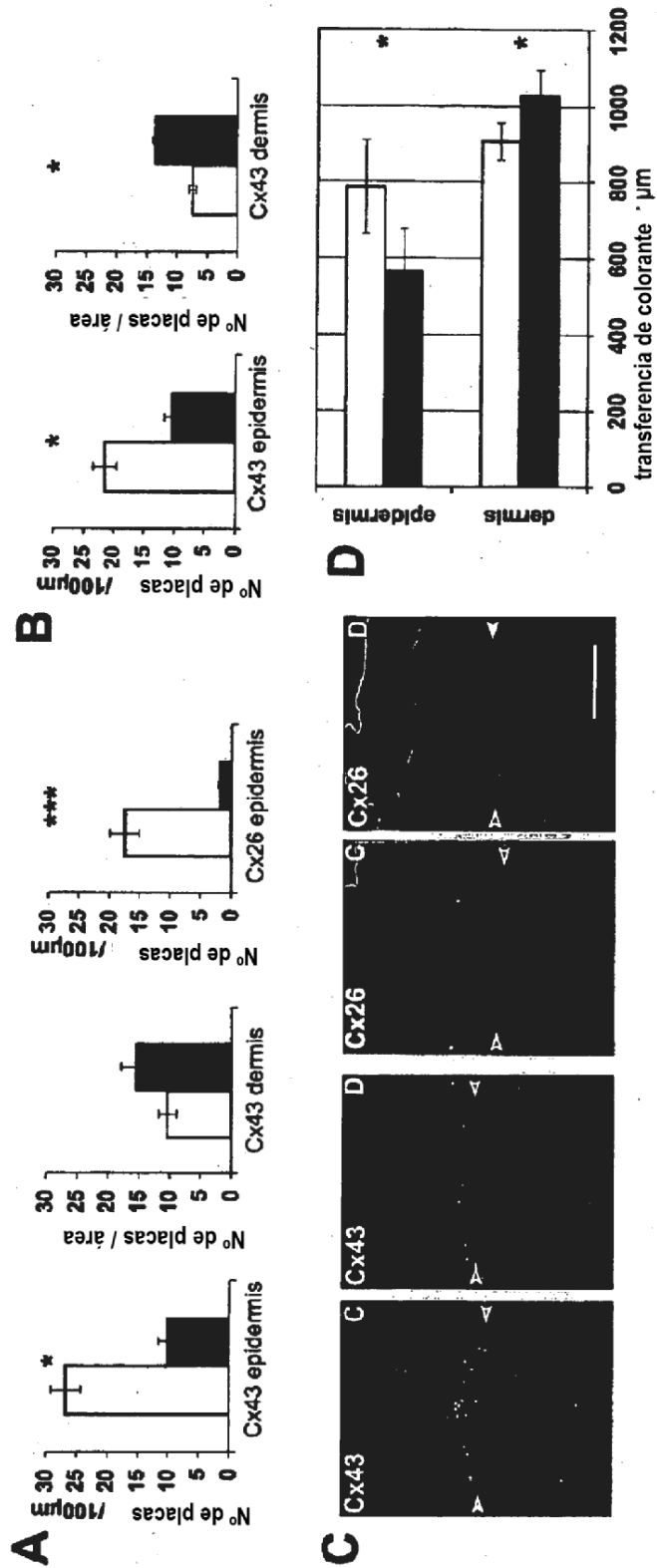


FIG. 1

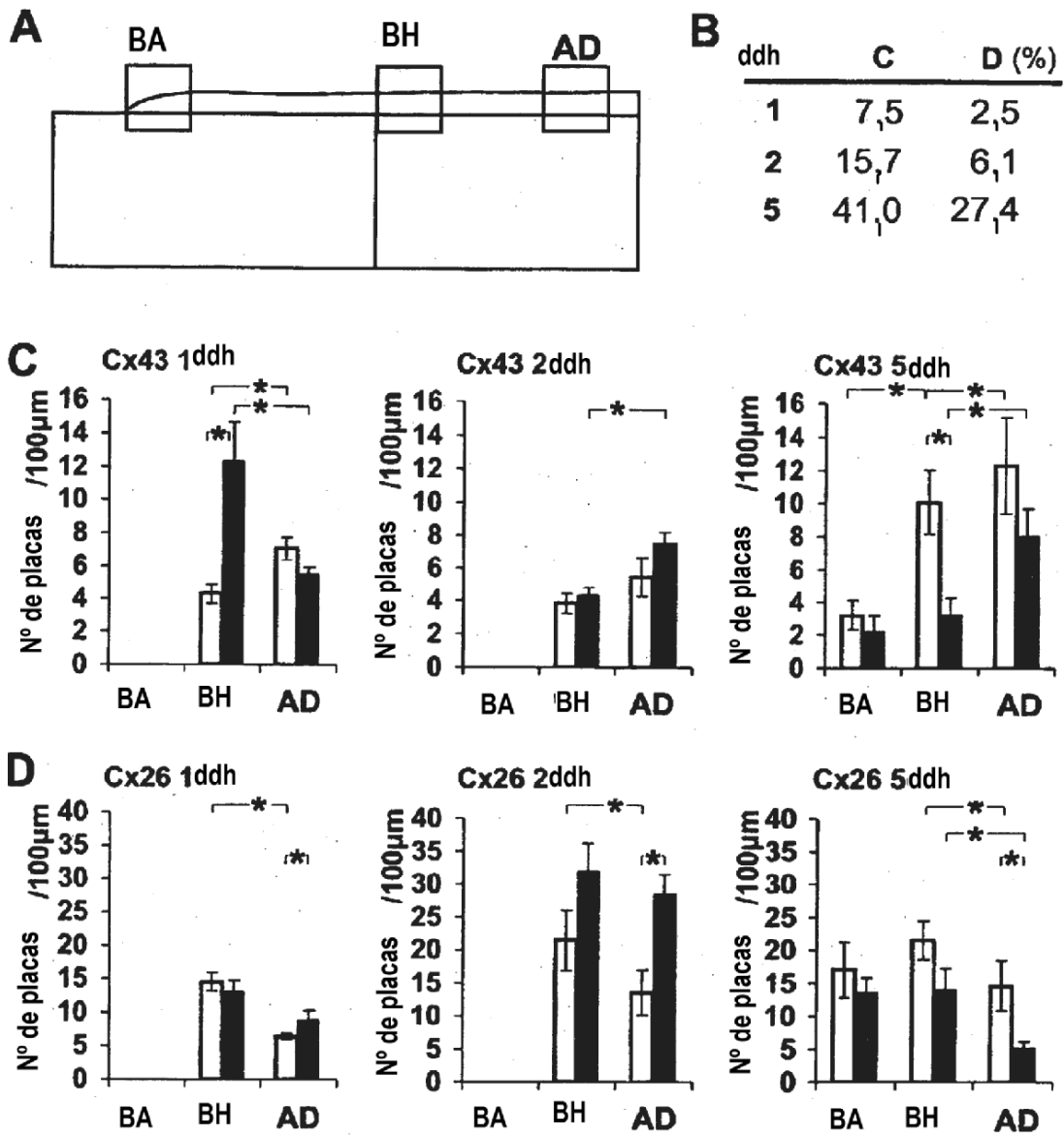


FIG. 2

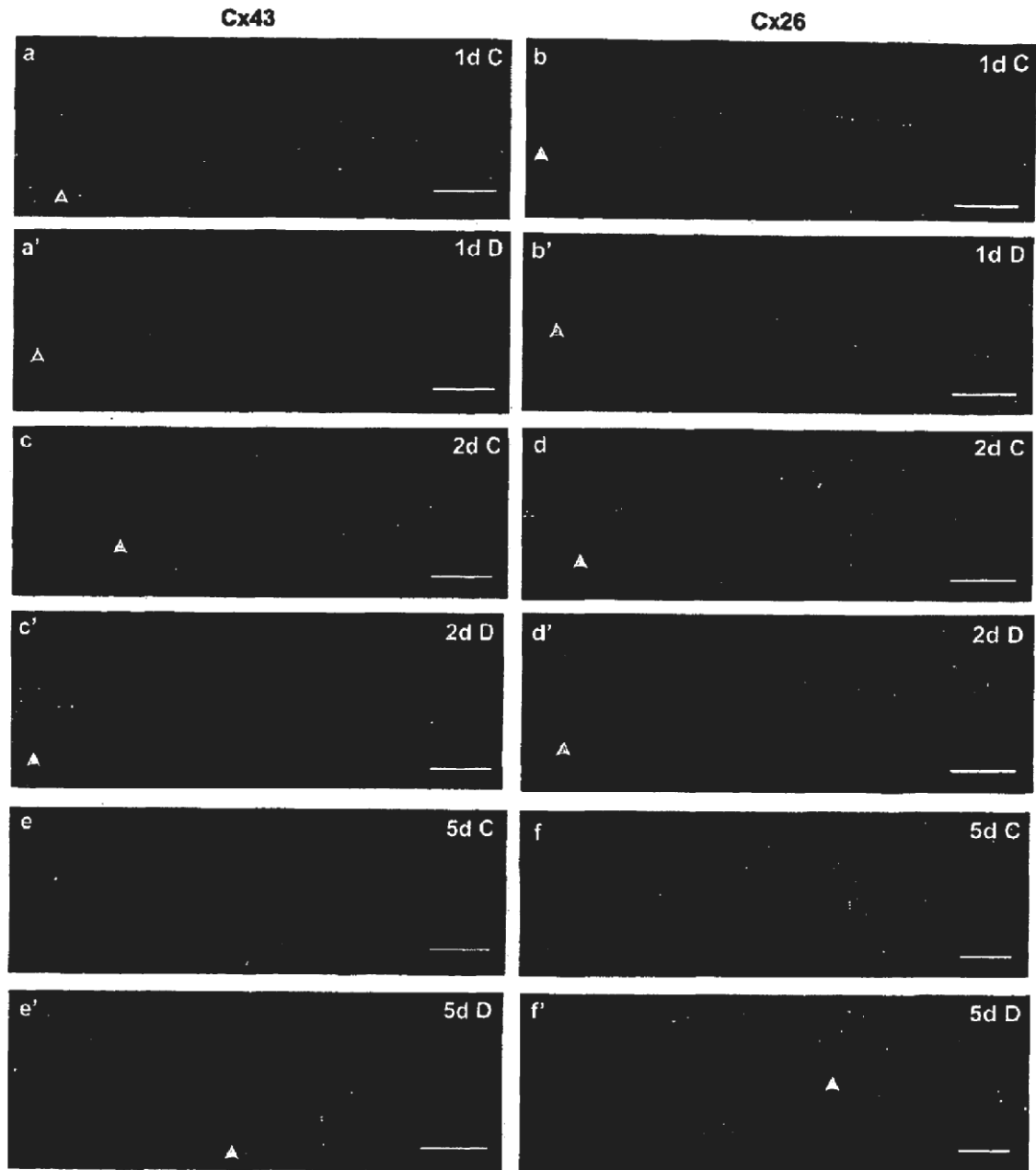


FIG. 3

