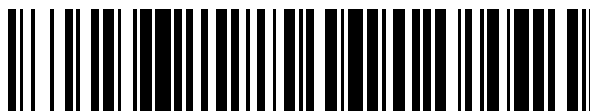


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 431**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/585 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2011 PCT/EP2011/060039**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11157798**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2011 E 11725465 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2582365**

54 Título: **Composiciones para estimular la reepitelialización durante la curación de heridas**

30 Prioridad:

28.06.2010 US 359078 P
16.06.2010 EP 10305648

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.07.2019

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (33.3%)
12, rue de l'Ecole de Médecine
75006 Paris, FR;
ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS
(33.3%) y
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)

72 Inventor/es:

FARMAN, NICOLETTE;
BEHAR-COHEN, FRANCINE y
JAISSER, FRÉDÉRIC

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 720 431 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

Composiciones para estimular la reepitelialización durante la curación de heridas

Campo

5 La presente divulgación se refiere a métodos y composiciones para estimular la reepitelialización durante la curación de heridas

Antecedentes

10 La principal función de la piel y la córnea es servir como una barrera protectora frente al ambiente. La pérdida de la integridad de porciones de la piel o la córnea como resultado de una lesión o una enfermedad puede conducir a una incapacidad importante o incluso a la muerte. Todos los años en los Estados Unidos más de 1,25 millones de personas sufren quemaduras y 6,5 millones sufren úlceras cutáneas crónicas provocadas por presión, estasis venosa y diabetes mellitus. Muchos problemas corneales están provocados además por una pérdida de integridad epitelial corneal como la observada en diversas enfermedades tales como úlcera corneal, erosión corneal, queratitis y ojo seco. La administración tópica de fármacos y situaciones quirúrgicas también pueden conducir a un retardo de la curación de heridas epiteliales.

15 La curación de heridas es un proceso interactivo dinámico que implica mediadores solubles, células sanguíneas, la matriz extracelular y células parenquimales. La curación de heridas tiene 3 fases que se solapan en el tiempo: fase vascular e inflamación, formación de nuevo tejido incluyendo reepitelialización, y remodelación tisular. Las heridas se tratan normalmente al aplicar un tratamiento de emergencia a una zona herida y esperar a que las heridas se curen espontáneamente por sí mismas a través del poder de recuperación biológica. Sin embargo, se puede observar una reepitelialización incompleta crónica y puede conducir a infección oportunista, formación de cicatrices irreversible y finalmente deterioro corneal o cutáneo. Según esto, los agentes existentes para curar heridas no tienen suficientes acciones para estimular la reepitelialización, de modo que son problemáticos ya que no pueden curar completamente las heridas en un tiempo breve.

20 El documento WO2008/078071 divulga que los compuestos que promueven la actividad estrogénica son adecuados para acelerar la curación de heridas. Chernoff et al. divulgaron que hormonas mineralocorticoides tales como aldosterona reducen la excrecencia epitelial en la curación de heridas pero no divulgaron que el agonista del receptor de mineralocorticoides sea adecuado para estimular la reepitelialización de la piel y la córnea durante la curación de heridas (Chernoff, Ellen AG y Susan Robertson. "Epidermal growth factor and the onset of epithelial epidermal wound healing." Tissue and Cell 22.2 (1990): 123-135).

30 **Compendio**

Un primer objetivo de la presente invención se refiere a un antagonista del receptor de mineralocorticoides o un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para el uso en un método para el tratamiento de la curación de heridas retardada observada durante tratamientos con corticoides, en pacientes ancianos o diabéticos, en el que se estimula la reepitelialización de la piel durante la curación de heridas.

35 Un segundo objetivo de la presente invención se refiere a un antagonista del receptor de mineralocorticoides o un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para el uso en un método para el tratamiento de una herida corneal, en el que se estimula la reepitelialización de la córnea durante la curación de la herida.

En particular, la presente invención se define mediante las reivindicaciones.

Descripción detallada

40 Un primer objetivo de la presente invención se refiere a un antagonista del receptor de mineralocorticoides o un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para el uso en un método para el tratamiento de la curación de heridas retardada durante tratamientos con corticoides, en pacientes ancianos o diabéticos, en el que se estimula la reepitelialización de la piel durante la curación de heridas.

45 Un segundo objetivo de la presente invención se refiere a un antagonista del receptor de mineralocorticoides o un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para el uso en un método para el tratamiento de una herida corneal, en el que se estimula la reepitelialización de la córnea durante la curación de la herida

Se ha de entender que el término "herida", según se usa en la presente, incluye incisiones quirúrgicas así como heridas provocadas por traumatismos accidentales.

50 Típicamente, las heridas cutáneas pueden resultar de úlcera del pie diabético, úlcera por estasis venosa, quemaduras. El término también incluye la curación de heridas retardada observada durante tratamientos con corticoides, curación de heridas retardada observada en ancianos (defecto de envejecimiento), estrés, curación de heridas retardada

observada en pacientes diabéticos, defectos de epitelialización de cicatrices quirúrgicas o después de injertos cutáneos, grietas en los dedos que se producen después de la exposición al frío, patologías ungueales asociadas con una curación retardada, ampollas en los pies que se producen durante caminatas o carreras prolongadas.

5 Las heridas corneales pueden resultar de diversas enfermedades observadas tales como úlcera corneal, erosión o traumatismo corneal, queratitis y ojo seco. La herida también puede resultar de la administración tópica de fármacos y situaciones quirúrgicas, tales como queratoplastia y durante el transcurso del tiempo de la recuperación de un injerto corneal.

10 Según se usa en la presente, el término "reepitelialización" se refiere a la migración de queratinocitos sobre la dermis lesionada y a la proliferación/maduración de queratinocitos que cubren progresivamente la herida y restauran la función de barrera; la misma noción se puede extender a la reparación del epitelio corneal.

15 Según se usa en la presente, el término "receptores de mineralocorticoides" o "MR" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la subfamilia 3, grupo C, miembro 2 de receptores nucleares (NR3C2), esto es un receptor con alta afinidad para mineralocorticoides. El receptor de mineralocorticoides también se denomina receptor de aldosterona. La actividad antagonista o agonista de MR de un compuesto se puede determinar usando diversos métodos como los descritos en J, Souque A, Wurtz JM, Moras D, Rafestin-Oblin ME. Mol Endocrinol. Ag 2000; 14(8): 1210-21; Fagart J, Seguin C, Pinon GM, Rafestin-Oblin ME. Mol Pharmacol. Mayo 2005;67(5):1714-22 o Hellal-Levy C, Fagart J, Souque A, Wurtz JM, Moras D, Rafestin-Oblin ME. Mol Endocrinol. Ag 2000;14(8):1210-21. Típicamente, la transfección del receptor de mineralocorticoides humano en células COS junto con un gen indicador que expresa luciferasa permite medir su actividad de transactivación en presencia de un posible compuesto.

20 En el contexto de la presente divulgación, los antagonistas del receptor de mineralocorticoides preferiblemente son selectivos para el receptor de mineralocorticoides en comparación con los receptores relacionados tales como receptor de andrógenos, receptores de estrógenos, receptor de glucocorticoides, receptor de progesterona, receptores de hormonas tiroideas, receptores activados por proliferadores de peroxisomas, receptor de ácido retinoico, receptor de farnesoide x, receptor de pregnano x, receptor hepático X, receptor de vitamina D, receptor de retinoide x y el receptor de androstano constitutivo. Por "selectivo" se entiende que la afinidad del antagonista para el receptor de mineralocorticoides es al menos 10 veces, preferiblemente 25 veces, más preferiblemente 100 veces, aún más preferiblemente 500 veces superior que la afinidad para los receptores relacionados.

25 En una realización, el antagonista del receptor de mineralocorticoides es un antagonista de bajo peso molecular, p. ej. una molécula orgánica pequeña. El término "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas usadas generalmente en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (p. ej. proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta aproximadamente 5000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da.

35 Típicamente, los antagonistas del receptor de mineralocorticoides según la presente divulgación son generalmente compuestos esteroideos de tipo espirolactona. El término "tipo espirolactona" está destinado a caracterizar una estructura que comprende un resto de lactona ligado a un núcleo esteroideo, típicamente en el anillo "D" del esteroide, a través de una configuración de enlace espiro. Una subclase de compuestos antagonistas del receptor de mineralocorticoides de tipo espirolactona consiste en compuestos antagonistas del receptor de mineralocorticoides epoxiesteroideos tales como eplerenona. Otra subclase de compuestos antagonistas de tipo espirolactona consiste en compuestos antagonistas del receptor de mineralocorticoides no epoxiesteroideos tales como espironolactona.

40 Los compuestos antagonistas del receptor de mineralocorticoides epoxiesteroideos usados en el método de la presente divulgación tienen generalmente un núcleo esteroideo sustituido con un resto de tipo epoxi. El término "tipo epoxi" está destinado a abarcar cualquier resto caracterizado por tener un átomo de oxígeno como un puente entre dos átomos de carbono.

45 El término "esteroideo", según se usa en la expresión "epoxiesteroideo", indica un núcleo proporcionado por un resto de ciclopentenofenantreno, que tiene los anillos "A", "B", "C" y "D" convencionales. El resto de tipo epoxi puede estar ligado al núcleo de ciclopentenofenantreno en cualesquiera posiciones ligables o sustituibles, esto es, fusionado a uno de los anillos del núcleo esteroideo o el resto puede estar sustituido en un miembro anular del sistema de anillos. La expresión "epoxiesteroideo" está destinada a abarcar un núcleo esteroideo que tiene uno o una pluralidad de restos de tipo esteroideo ligados al mismo.

50 Antagonistas epoxiesteroideos del receptor de mineralocorticoides adecuados para el uso en los presentes métodos incluyen una familia de compuestos que tienen un resto epoxídico fusionado al anillo "C" del núcleo esteroideo. Ejemplos incluyen compuestos de 20-espiroxano caracterizados por la presencia de un resto epoxídico sustituido en 9 α ,11 α , tales como:

- 55
- (7 α ,11 α ,17 β)-Éster metílico de 9,11-epoxi-17-hidroxi-3-oxo- γ -lactona de ácido pregn-4-eno-7,21-dicarboxílico
 - (7 α ,11 α ,17 β)-Éster 9,11-epoxi-17-hidroxi-3-oxo-dimetílico de ácido pregn-4-eno-7,21-dicarboxílico

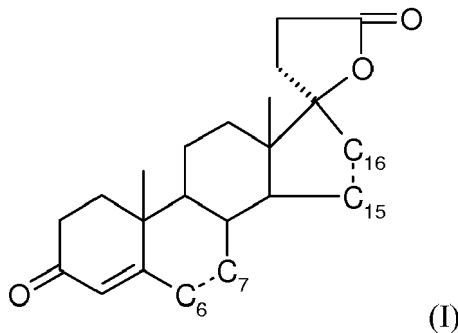
- (6 β ,7 β ,11 α ,17 β)-9,11-Epoxi-6,7-dihidro-17-hidroxi-3-oxo- γ -lactona de ácido 3'H-ciclopropa[6,7]pregna-4,6-dieno-21-carboxílico,
- (7 α ,11 α ,17 β)-Sal monopotásica de éster 9,11-epoxi-17-hidroxi-3-oxo-,7-(1-metiletilico) de ácido pregn-4-eno-7,21-dicarboxílico,
- 5 - (7 α ,11 α ,17 β)-Sal monopotásica de éster 9,11-epoxi-17-hidroxi-3-oxo-7-metiletilico) de ácido pregn-4-eno-7,21-dicarboxílico
- (6 β ,7 β ,11 α)-9,11-epoxi-6,7-dihidro-17-hidroxi-3-oxo- γ -lactona de ácido 3'H-ciclopropa[6,7]pregna-1,4,6-trieno-21-carboxílico,
- 10 - (6 β ,7 β ,11 α ,17 β)-Éster 9,11-epoxi-6,7-dihidro-17-hidroxi-3-oxo-metilico de ácido 3'H-ciclopropa[6,7]pregna-4,6-dieno-21-carboxílico,
- (6 β ,7 β ,11 α ,17 β)-Sal 9,11-epoxi-6,7-dihidro-17-hidroxi-3-oxo-monopotásica de ácido 3'H-ciclopropa[6,7]pregna-4,6-dieno-21-carboxílico,
- (6 β ,7 β ,11 α ,17 β)- 9,11-epoxi-6,7-dihidro-17- hidroxi-3-oxo- γ -lactona de ácido 3'H-ciclopropa[6,7]pregna-1,4,6-trieno-21-carboxílico,
- 15 - (7 α ,11 α ,17 β)-Éster etílico de 9,11-epoxi-17-hidroxi-3-oxo- γ -lactona de ácido pregn-4-eno-7,21-dicarboxílico,
- (7 α ,11 α ,17 β)-Éster 1-metiletilico de 9,11-epoxi-17-hidroxi-3-oxo- γ -lactona de ácido pregn-4-eno-7,21-dicarboxílico

Un beneficio particular del uso de antagonistas del receptor de mineralocorticoides epoxiesteroides, según se ejemplifican por la eplerenona, es la alta selectividad de este grupo de antagonistas del receptor de mineralocorticoides para el receptor de mineralocorticoides. La selectividad superior de la eplerenona da como resultado una reducción en los efectos secundarios que pueden ser provocados por los antagonistas del receptor de mineralocorticoides que exhiben una unión no selectiva a receptores relacionados, tales como receptores de andrógenos o progesterona.

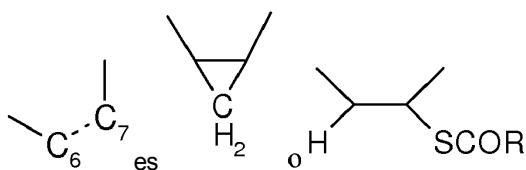
Estos epoxiesteroides se pueden preparar mediante procedimientos descritos en Grob et al., Pat. EE. UU. N° 4.559.332. Procedimientos adicionales para la preparación de compuestos 9,11-epoxiesteroides y sus sales se divulgan en Ng et al., documento WO97/21720 y Ng et al., documento WO98/25948.

De particular interés es el compuesto eplerenona (((7 α ,11 α ,17 β)-Éster metílico de 9,11-epoxi-17-hidroxi-3-oxo- γ -lactona de ácido pregn-4-eno-7,21-dicarboxílico) (N° CAS 107724-20-9), también conocida como epoximexrenona. La eplerenona es un antagonista del receptor de mineralocorticoides y tiene una selectividad superior para los receptores de mineralocorticoides que, por ejemplo, la espironolactona. La selección de eplerenona como el antagonista del receptor de mineralocorticoides en el presente método sería beneficiosa para reducir efectos secundarios tales como la ginecomastia que se produce con el uso de antagonistas del receptor de mineralocorticoides que tienen menos especificidad.

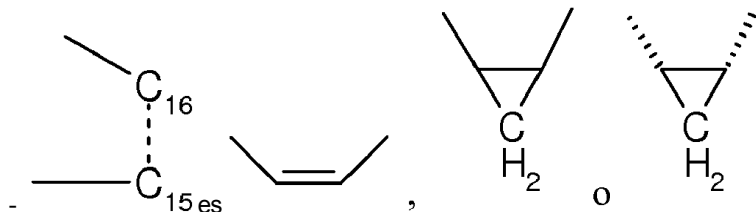
Antagonistas del receptor de mineralocorticoides no epoxiesteroides adecuados para el uso en los presentes métodos incluyen una familia de compuestos de tipo espirolactona definidos por la Fórmula I:



35 en la que:



- R es alquilo inferior de hasta 5 átomos de carbono, y



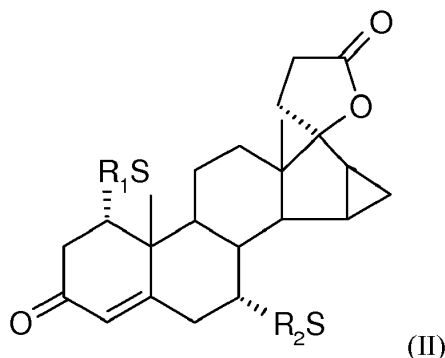
Los residuos de alquilo inferior incluyen grupos ramificados y no ramificados, por ejemplo, metilo, etilo y n-propilo.

5 Compuestos de interés específicos dentro de la Fórmula I son los siguientes:

- 7 α -acetiltio-3-oxo-4,15-androstadieno-[17(β -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona;
- 3-oxo-7 α -propioniltio-4,15-androstadieno-[17(β -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona;
- 6 β ,7 β -metilen-3-oxo-4,15-androstadieno-[17(β -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona;
- 15 α ,16 α -metilen-3-oxo-4,7 α -propioniltio-4-androsteno-[17(β -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona;
- 10 - 6 β ,7 β ,15 α ,16 α -dimetilen-3-oxo-4-androsteno-[17(β -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona;
- 7 α -acetiltio-15 β ,16 β -metilen-3-oxo-4-androsteno-[17(β -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona;
- 15 β ,16 β -metilen-3-oxo-7 β -propioniltio-4-androsteno-[17(β -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona; y
- 6 β ,7 β ,15 β ,16 β -dimetilen-3-oxo-4-androsteno-[17(β -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona.

15 Métodos para elaborar compuestos de Fórmula I se describen en la Pat. EE. UU. N° 4.129.564 de Wiechart et al. publicada el 12 de diciembre de 1978.

Otra familia de compuestos de interés no epoxiesteroides se define mediante la Fórmula II:



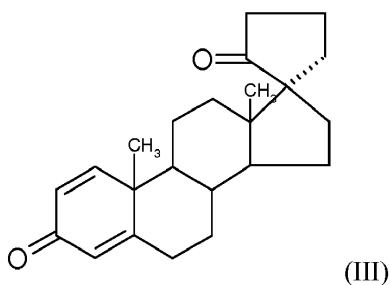
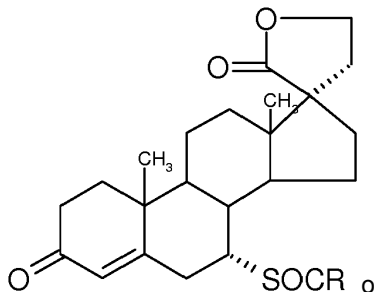
en la que R1 es alquilo C1-3 o acilo C1-3 y R2 es H o alquilo C1-3.

Compuestos de interés específicos dentro de la Fórmula II son los siguientes:

- 20 - 1 α -acetiltio-15 β ,16 β -metileno-7 α -metiltio-3-oxo-17 α -pregn-4-eno-21,17-carbolactona; y
- 15 β ,16 β -metileno-1 α ,7 α -dimetiltio-3-oxo-17 α -pregn-4-eno-21,17-carbolactona.

Métodos para elaborar los compuestos de Fórmula II se describen en la Pat. EE. UU. N° 4.789.668 de Nickisch et al. que se publicó el 6 de diciembre de 1988.

Otra familia más de compuestos no epoxiesteroides de interés se define mediante una estructura de Fórmula III:



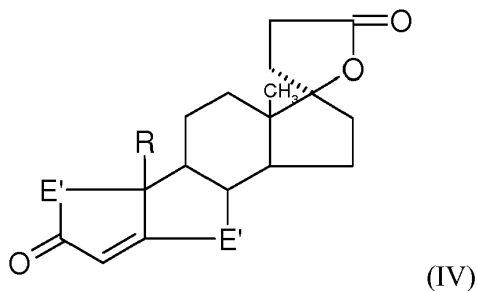
5

en la que R es alquilo inferior, ejemplos del cual incluyen grupos alquilo inferior de metilo, etilo, propilo y butilo. Compuestos específicos de interés incluyen:

- γ -lactona de ácido 3 β ,21-dihidroxi-17 α -pregna-5,15-dieno-17-carboxílico;
- 3-acetato de γ -lactona de ácido 3 β ,21-dihidroxi-17 α -pregna-5,15-dieno-17-carboxílico;
- 10 - γ -lactona de ácido 3 β ,21-dihidroxi-17 α -pregn-5-eno-17-carboxílico;
- 3-acetato de γ -lactona de ácido 3 β ,21-dihidroxi-17 α -pregn-5-eno-17-carboxílico;
- γ -lactona de ácido 21-hidroxi-3-oxo-17 α -pregn-4-eno-17-carboxílico;
- γ -lactona de ácido 21-hidroxi-3-oxo-17 α -pregna-4,6-dieno-17-carboxílico;
- γ -lactona de ácido 21-hidroxi-3-oxo-17 α -pregna-1,4-dieno-17-carboxílico;
- 15 - γ -lactona de ácido 7 α -aciltio-21-hidroxi-3-oxo-17 α -pregn-4-eno-17-carboxílico; y
- γ -lactona de ácido 7 α -acetiltio-21-hidroxi-3-oxo-17 α -pregn-4-eno-17-carboxílico.

Métodos para elaborar los compuestos de Fórmula III se describen en la Pat. de EE. UU. N° 3.257.390 de Patchett que se publicó el 21 de junio de 1966.

Otra familia más de compuestos no epoxiesteroides de interés se representa mediante la Fórmula IV:

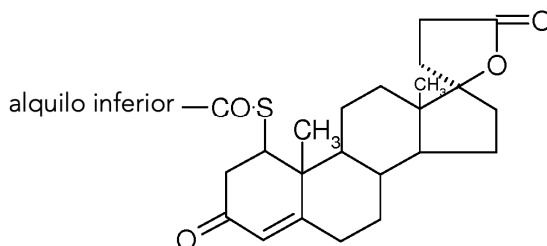


20

en la que E' se selecciona del grupo que consiste en radicales etileno, vinileno y (alcanoil inferior)tioetileno, E" se selecciona del grupo que consiste en radicales etileno, vinileno, (alcanoil inferior)tioetileno y (alcanoil inferior)tiopropileno; R es un radical metilo excepto cuando E' y E" son radicales etileno y (alcanoil inferior)tioetileno, respectivamente, en cuyo caso R se selecciona del grupo que consiste en radicales hidrógeno y metilo; y la selección de E' y E" es tal que está presente al menos un radical (alcanoil inferior)tio.

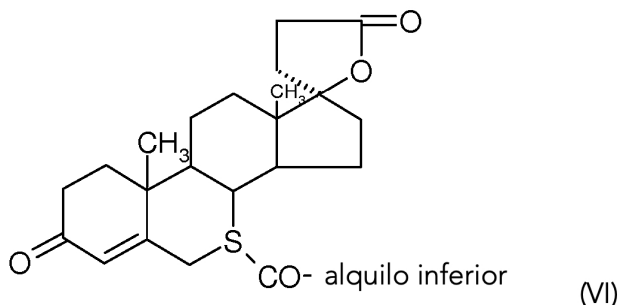
5

Una familia de compuestos no epoxiesteroideos dentro de la Fórmula IV está representada por la Fórmula V:



Otro compuesto de Fórmula V es lactona de 1-acetiltio-17 α -(2-carboxietil)-17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona.

Otra familia de compuestos no epoxiesteroideos dentro de la Fórmula IV está representada por la Fórmula VI:



10

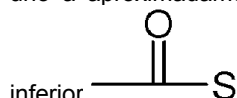
Compuestos ejemplares dentro de la Fórmula VI incluyen los siguientes:

- lactona de 7 α -acetiltio-17 α -(2-carboxietil)-17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona;
- lactona de 7 β -acetiltio-17 α -(2-carboxietil)-17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona;
- lactona de 1 α ,7 α -diacetiltio-17 α -(2-carboxietil)-17 β -hidroxi-androsta-4,6-dien-3-ona;
- lactona de 7 α -acetiltio-17 α e-(2-carboxietil)-17 β -hidroxi-androsta-1,4-dien-3-ona;
- lactona de 7 α -acetiltio-17 α -(2-carboxietil)-17 β -hidroxi-19-norandrost-4-en-3-ona; y
- lactona de 7 α -acetiltio-17 α -(2-carboxietil)-17 β -hidroxi-6 α -metilandrost-4-en-3-ona.

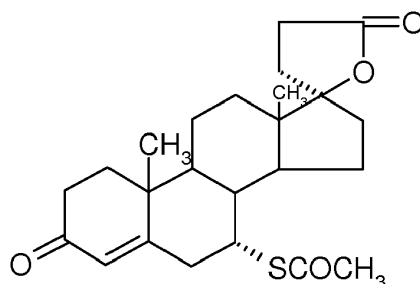
15

En las Fórmulas IV-VI, el término "alquilo" pretende abarcar radicales alquilo lineales y ramificados que contienen de uno a aproximadamente ocho carbonos. El término "(alcanoil inferior)tio" abarca radicales de la fórmula alquilo

20



De particular interés es el compuesto espirolactona (acetato de γ -lactona de ácido 17-hidroxi-7 α -mercapto-3-oxo-17 α -pregn-4-eno-21-carboxílico) que tiene la siguiente estructura:



Métodos para elaborar compuestos de Fórmulas IV-VI se describen en la Pat. EE. UU. N° 3.013.012 de Cella et al. que se publicó el 12 de diciembre de 1961. La espironolactona es vendida por G. D. Searle & Co., Skokie, Ill., bajo la marca comercial "ALDACTONE", en forma de dosificación en comprimidos en dosis de 25 mg, 50 mg y 100 mg por comprimido.

Otra familia de antagonistas del receptor de mineralocorticoides esteroideos se ejemplifica por la drospirenona, (6R-(6 α , 7 α , 8 β , 9 α , 10 β , 13 β , 14 α , 15 α , 16 α , 17 β))-1, 3', 4', 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 21-hexadecahidro-10, 13-dimetilspiro[17H-diciclopropano(6,7:15,16)ciclopentano(a)fenantreno-17,2'(5'H)-furano]-3,5'(2H)-diona, número de registro del CAS 67392-87-4. Métodos para elaborar y usar drospirenona se describen en la patente GB 1550568 1979, prioridad DE 2652761 1976.

Formas cristalinas que se manejan fácilmente, son reproducibles en la forma, se preparan fácilmente, son estables y que no son higroscópicas se han identificado para el antagonista del receptor de mineralocorticoides eplerenona. Estas incluyen la Forma H, la Forma L, diversos solvatos cristalinos y eplerenona amorfa. Estas formas, métodos para elaborar estas formas y el uso de estas formas para preparar composiciones y medicamentos se divulgan en Barton et al., documento WO 01/41535 y Barton et al., documento WO 01/42272.

Las moléculas orgánicas pequeñas que se pueden usar como antagonistas del receptor de mineralocorticoides según la presente divulgación también pueden ser no esteroideas. Por ejemplo, clases de antagonistas del MR no esteroideos han empezado a surgir a lo largo de los últimos años (Meyers, Marvin J1; Hu, Xiao Expert Opinion on Therapeutic Patents, Volumen 17, Número 1, enero 2007, pp. 17-23(7). Recientemente, se ha observado que las dihidropirimidinas presentan antagonismo para MR (Activation of Receptor of Mineralocorticoid Receptors by Exogenous Glucocorticoids and the Development of Cardiovascular Inflammatory Responses in Adrenalectomized Rats. Young MJ, Morgan J, Brolin K, Fuller PJ, Funder JW. Endocrinology. 21 de abril de 2010). Por otra parte, Arhancet et al. divulgan otra clase de antagonistas de MR no esteroideos (Arhancet GB, Woodard SS, Dietz JD, Garland DJ, Wagner GM, Iyanar K, Collins JT, Blinn JR, Numann RE, Hu X, Huang HC. Stereochemical Requirements for the Mineralocorticoid Receptor Antagonist Activity of Dihydropyridines. J Med Chem. 21 de abril de 2010). Otros antagonistas del receptor de mineralocorticoides no esteroideos ejemplares incluyen los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 20090163472 WO2004052847, WO 2008053300. Por ejemplo, el documento WO 06/076202 (publicado el 20 de julio de 2006) presenta una clase de imidazolcarboxamidas como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 06/012642 (publicado el 2 de febrero de 2006) presenta una clase de pirrolcarboxamidas como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 04/052847 (publicado el 24 de junio de 2004) presenta una clase de dibenzosuberanos como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 05/066161 (publicado el 21 de julio de 2005) presenta una clase de dibenzosuberanos como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 03/078394 (publicado el 25 de septiembre de 2003) presenta una clase de 3,3-bisariloxindoles como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 05/097118 (publicado el 20 de octubre de 2005) presenta una clase de 4-aril-1,4-dihidropiridinas como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 04/067529 (publicado el 12 de agosto de 2004) presenta una clase de 3-bencilindoles como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 06/077821 (publicado el 27 de julio de 2006) presenta clases de benzoxacinotinas y tetrahydroquinolinas como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 06/010142 (publicado el 26 de enero de 2006) presenta una clase de arilbenzoxazinonas/tionas como antagonistas del receptor de mineralocorticoides.

Otro ejemplo de antagonista incluye una sal del ácido canrenoico. El ácido canrenoico es un profármaco, que se metaboliza hasta canrenona en el cuerpo.

Alternativamente, el antagonista del receptor de mineralocorticoides puede consistir en un anticuerpo (incluyendo el término "fragmento de anticuerpo"). En particular, el antagonista del receptor de mineralocorticoides puede consistir en un anticuerpo dirigido contra el receptor de mineralocorticoides, de tal modo que dicho anticuerpo inhiba el receptor.

Los anticuerpos se pueden producir según métodos conocidos al administrar el antígeno o epítipo apropiado a un animal hospedador seleccionado de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Diversos adyuvantes conocidos en la técnica se pueden usar para mejorar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles para poner en práctica la presente divulgación pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonal se pueden preparar y aislar usando cualquier técnica que proporcione la

producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Técnicas para la producción y el aislamiento incluyen la técnica del hibridoma; la técnica del hibridoma de células B humanas; y la técnica del hibridoma de EBV. Alternativamente, técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, p. ej., la Pat. EE. UU. N° 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios contra el receptor de mineralocorticoides.

El antagonista del receptor de mineralocorticoides útil para poner en práctica la presente divulgación también incluye fragmentos de anticuerpos contra el receptor de mineralocorticoides incluyendo fragmentos F(ab')₂, que se pueden generar mediante la digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que se pueden generar al reducir los puentes de disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir la rápida identificación de fragmentos que tienen la especificidad deseada para el receptor de mineralocorticoides.

También se pueden preparar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanizados según técnicas conocidas. Los "anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (p. ej., de roedor) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las que residuos procedentes de una región hipervariable (CDRs) del receptor se reemplazan por residuos procedentes de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo del donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Por otra parte, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo del receptor o el anticuerpo del donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos un, y típicamente dos, dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las FRs son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante inmunoglobulínica (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Métodos para elaborar anticuerpos humanizados son descritos, por ejemplo, por Winter (Pat. EE. UU. N° 5.225.539) y Boss (Celltech, Pat. EE. UU. N° 4.816.397).

A continuación, después de producir anticuerpos según se describe anteriormente, el experto en la técnica puede seleccionar fácilmente los que sean un antagonista del receptor de mineralocorticoides.

En otra realización el antagonista del receptor de mineralocorticoides es un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en cuanto al reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias oligonucleotídicas u oligopeptídicas con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con afinidad y especificidad altas. Estos ligandos se pueden aislar a través de evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatoria, según se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias aleatoria se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de DNA. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, posiblemente químicamente modificado, de una secuencia única. Posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo conformacionalmente constreñida exhibida por una proteína de plataforma, tal como tiorredoxina A de E. coli, que se selecciona de bibliotecas combinatorias mediante dos métodos de hibridación (Colas et al., 1996).

A continuación, después de producir aptámeros dirigidos contra los receptores de mineralocorticoides según se describe anteriormente, el experto en la técnica puede seleccionar fácilmente los que son antagonistas del receptor de mineralocorticoides.

Los inhibidores de la expresión para el uso en la presente divulgación se pueden basar en construcciones oligonucleotídicas antisentido. Los oligonucleótidos antisentido, incluyendo moléculas de RNA antisentido y moléculas de DNA antisentido, actuarían para bloquear directamente la traducción del mRNA del receptor de mineralocorticoides a unirse al mismo y así evitar la traducción de proteínas o incrementar la degradación de mRNA, disminuyendo así el nivel, y así la actividad, del receptor de mineralocorticoides en una célula. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia del transcrito de mRNA que codifica el receptor de mineralocorticoides se pueden sintetizar, p. ej., mediante técnicas de fosfodiéster convencionales y administrar mediante, p. ej., inyección o infusión intravenosa. Se conocen en la técnica métodos para usar técnicas antisentido para inhibir específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia se conoce (p. ej., véanse las Pat. EE. UU. N° 6.566.135, 6.566.131, 6.365.354, 6.410.323, 6.107.091, 6.046.321 y 5.981.732).

Los RNA inhibidores pequeños (siRNAs) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión para el uso en la presente divulgación. La expresión génica del receptor de mineralocorticoides se puede reducir al poner en contacto un sujeto o una célula con un RNA bicatenario (dsRNA) pequeño, o un vector o una construcción que provoque la producción de un RNA bicatenario pequeño, de modo que la expresión génica del receptor de mineralocorticoides se inhiba específicamente (es decir, interferencia de RNA o RNAi). Métodos para seleccionar un dsRNA o vector que codifica dsRNA apropiado se conocen en la técnica para genes cuya secuencia se conoce (p. ej., véase Tuschl, T. et

al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); Pat. EE. UU. Nº 6.573.099 y 6.506.559; y las Publicaciones de Patente Internacional Nº WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836). Ventajosamente, la totalidad o parte de los enlaces fosfodiéster de los siRNAs de la presente divulgación están protegidos. Esta protección se pone en práctica generalmente a través de la vía química usando métodos que son conocidos en la técnica. Los enlaces fosfodiéster se pueden proteger, por ejemplo, mediante un grupo funcional tiol o amina o mediante un grupo fenilo. Los extremos 5' y/o 3' de los siRNAs de la presente divulgación también se protegen ventajosamente, por ejemplo, usando la técnica descrita anteriormente para proteger enlaces fosfodiéster. Las secuencias de siRNAs comprenden ventajosamente al menos doce dinucleótidos o sus derivados contiguos.

Según se usa en la presente, el término "derivados de siRNA" con respecto a las presentes secuencias de ácido nucleico se refiere a un ácido nucleico que tiene un porcentaje de identidad de al menos 90% con eritropoyetina o un fragmento de la misma, preferiblemente de al menos 95%, como un ejemplo de al menos 98%, y más preferiblemente de al menos 98%.

Según se usa en la presente, "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácido nucleico significa el porcentaje de ácido nucleico idéntico, entre las dos secuencias que se van a comparar, obtenido con el mejor alineamiento de dichas secuencias, siendo este porcentaje puramente estadístico y extendiéndose aleatoriamente las diferencias entre estas dos secuencias a lo largo de las secuencias de los ácidos nucleicos. Según se usa en la presente, "mejor alineamiento" o "alineamiento óptimo" significa el alineamiento para el que el porcentaje de identidad (véase posteriormente) determinado es el más alto. La comparación de secuencias entre dos secuencias de ácidos nucleicos se realiza habitualmente al comparar estas secuencias que se han alineado previamente según el mejor alineamiento; esta comparación se realiza sobre segmentos de comparación a fin de identificar y comparar las regiones locales de similitud. El mejor alineamiento de secuencias para realizar la comparación se puede conseguir, además de por un medio manual, al usar el algoritmo de homología global desarrollado por SMITH y WATERMAN (Ad. App. Math., vol.2, p:482, 1981), al usar el algoritmo de homología local desarrollado por NEDDLEMAN y WUNSCH (J. Mol. Biol., vol.48, p:443, 1970), al usar el método de similitudes desarrollado por PEARSON y LIPMAN (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85, p:2444, 1988), al usar softwares informáticos que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA en el software de Wisconsin Genetics Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI USA), al usar los algoritmos de alineamiento múltiple MUSCLE (Edgar, Robert C., Nucleic Acids Research, vol. 32, p:1792, 2004). Para obtener el mejor alineamiento local, se puede usar preferiblemente el software BLAST. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos se determina al comparar estas dos secuencias óptimamente alineadas, siendo capaces las secuencias de ácidos nucleicos de comprender adiciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia a fin de obtener el alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula al determinar el número de posición idéntica entre estas dos secuencias, y dividir este número por el número total de posiciones comparadas, y al multiplicar el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Los shRNAs (RNA de horquilla corto) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión para el uso en la presente divulgación.

Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión para el uso en la presente divulgación. Las ribozimas son moléculas de RNA enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de RNA. El mecanismo de acción de la ribozima implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima a RNA diana complementario, seguido por escisión endonucleolítica. Moléculas de ribozima con motivo de horquilla o cabeza de martillo manipuladas que catalizan específicamente y eficazmente la escisión endonucleolítica de secuencias de mRNA de receptor de mineralocorticoides son por lo tanto útiles dentro del alcance de la presente divulgación. Sitios de escisión con ribozima específicos dentro de cualquier diana de RNA potencial se identifican inicialmente al barrer la molécula diana con respecto a sitios de escisión con ribozima, que típicamente incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, secuencias de RNA cortas de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión se pueden evaluar con respecto a características estructurales predichas, tales como la estructura secundaria, que pueden hacer inadecuada la secuencia oligonucleotídica.

Tanto los oligonucleótidos antisentido como las ribozimas útiles como inhibidores de la expresión se pueden preparar mediante métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para síntesis química tales como, p. ej., mediante síntesis química de fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, se pueden generar moléculas de ARN antisentido mediante la transcripción in vitro o in vivo de secuencias de DNA que codifican la molécula de RNA. Estas secuencias de DNA se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de RNA polimerasa adecuados tales como los promotores de polimerasa de T7 o SP6. Se pueden introducir diversas modificaciones en los oligonucleótidos de la presente divulgación como un medio para incrementar la estabilidad y la semivida intracelulares. Posibles modificaciones incluyen la adición de secuencias de flanqueo de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de enlaces fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de fosfodiésterasa dentro del esqueleto oligonucleotídico.

Oligonucleótidos antisentido, siRNAs, shRNAs y ribozimas de la presente divulgación se pueden aportar in vivo solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la

transferencia del oligonucleótido antisentido, siRNA, shRNA o ácido nucleico de ribozima a las células y preferiblemente células que expresan receptor de mineralocorticoides. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a células con degradación reducida con relación al grado de degradación que daría como resultado la ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la presente divulgación incluyen plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o la incorporación del oligonucleótido antisentido, siRNA, shRNA o ácido nucleico de ribozima. Los vectores virales son un tipo preferido de vector e incluyen secuencias de ácido nucleico procedentes de los siguientes virus: retrovirus, tales como virus de leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del tumor mamario murino y virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociado; virus de tipo SV40; poliomavirus; virus de Epstein-Barr; papilomavirus; herpesvirus; virus variolovacunales; poliovirus; y virus de RNA tales como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la técnica.

Los vectores virales preferidos se basan en virus eucarióticos no citopáticos en los que genes no esenciales se han reemplazado por el gen de interés. Virus no citopáticos incluyen retrovirus (p. ej., lentivirus), cuyo ciclo vital implica la transcripción inversa de RNA viral genómico en DNA con integración proviral posterior en DNA celular del hospedador. Los retrovirus han sido aprobados para estudios de terapia génica humana. Los más útiles son los retrovirus que son de replicación deficiente (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de elaborar una partícula infecciosa). Estos vectores de expresión retrovirales alterados genéticamente tienen utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes in vivo. Protocolos estándar para producir retrovirus de replicación deficiente (que incluyen las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una línea celular de empaquetamiento con plásmido, producción de retrovirus recombinantes mediante la línea celular de empaquetamiento, recogida de partículas virales del medio de cultivo tisular e infección de las células diana con partículas virales) se proporcionan en Kriegler, 1990 y en Murry, 1991).

Virus preferidos para ciertas aplicaciones son los adenovirus y virus adenoasociados (AAV), que son virus de DNA bicatenarios que ya han sido aprobados para el uso en seres humanos en terapia génica. Actualmente, se conocen 12 serotipos diferentes de AAV (AAV1 a 12), cada uno con diferentes tropismos titulares (Wu, *Z Mol Ther* 2006; 14:316-27). Los AAV recombinantes se derivan del parvovirus dependiente AAV2 (Choi, *VW J Virol* 2005; 79:6801-07). El virus adenoasociado tipo 1 a 12 se puede manipular para que sea de replicación deficiente y es capaz de infectar una amplia gama de tipos celulares y especies (Wu, *Z Mol Ther* 2006; 14:316-27). Además, tiene ventajas tales como estabilidad al calor y los disolventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hemopoyéticas; y ausencia de inhibición de sobreinfección permitiendo así series múltiples de transducciones. Según se informa, el virus adenoasociado se puede integrar en DNA celular humano de un modo específico para el sitio, minimizando de ese modo la posibilidad de mutagénesis de inserción y la variabilidad de la expresión de genes insertados característica de la infección retroviral. Además, las infecciones con virus adenoasociados silvestres se han seguido en cultivo tisular durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, implicando que la integración genómica del virus adenoasociado es un episodio relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de un modo extracromosómico.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito extensamente en la técnica y son muy conocidos por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Sambrook et al., 1989. En los últimos años, los vectores plasmídicos se han usado como vacunas de DNA para aportar genes que codifican antígenos a células in vivo. Son particularmente ventajosos para esto debido a que no tienen los mismos problemas de seguridad que con muchos de los vectores virales. Sin embargo, estos plásmidos, que tienen un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido a partir de un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos plásmidos usados comúnmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son muy conocidos por los expertos normales en la técnica. Adicionalmente, los plásmidos se pueden diseñar a medida usando enzimas de restricción y reacciones de ligación para retirar y añadir fragmentos específicos de DNA. Los plásmidos se pueden aportar mediante una variedad de vías parenterales, mucosas y tópicas. Por ejemplo, el plásmido de DNA se puede inyectar mediante vías intramuscular, intradérmica, subcutánea u otras. También se puede administrar a la epidermis o una superficie mucosa usando una pistola génica. Los plásmidos se pueden aportar en una solución acuosa, secados sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de aporte de DNA incluyendo liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

En una realización preferida, el oligonucleótido antisentido, siRNA, shRNA o la secuencia de ácido nucleico de ribozima está bajo el control de una región reguladora heteróloga, p. ej., un promotor heterólogo. El promotor puede ser específico para células gliales de Muller, células de la microglía, células endoteliales, pericitos y astrocitos. Por ejemplo, es adecuada una expresión específica en células gliales de Muller que se puede obtener a través del promotor del gen de glutamina sintetasa. El promotor también puede ser, p. ej., un promotor viral, tal como promotor de CMV o cualesquiera promotores sintéticos.

Los ingredientes activos de la presente divulgación (es decir antagonistas del receptor de mineralocorticoides e inhibidores de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides) se pueden administrar en la forma de una composición farmacéutica, según se define posteriormente. Los ingredientes activos de la presente divulgación se pueden combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

Según esto, un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ingrediente activo de la divulgación para el uso en un método para estimular la reepitelialización de la piel o la córnea durante la curación de heridas.

5 El término "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra inadecuada cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, un diluyente, un material encapsulante o un adyuvante de formulación de cualquier tipo, sólidos, semisólidos o líquidos, atóxicos.

10 En las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación, los ingredientes activos de la presente divulgación se pueden administrar en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gelatina, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutáneas, transdérmicas, tópicas, intraperitoneales, intramusculares, intravenosas, subdérmicas, transdérmicas, intratecales e intranasales y
15 formas de administración rectales.

En una realización preferida, puede ser deseable administrar el ingrediente activo de la presente divulgación mezclado con un portador tópico farmacéuticamente o cosméticamente aceptable. El portador tópico farmacéuticamente aceptable es cualquier portador sustancialmente atóxico utilizable convencionalmente para la administración tópica de productos farmacéuticos en los que el ingrediente activo de la presente divulgación permanecerá estable y biodisponible cuando se aplique directamente a superficies cutáneas o corneales. Por ejemplo, portadores tales como los conocidos en la técnica eficaces para penetrar en la capa queratínica de la piel hacia el estrato córneo pueden ser útiles para aportar el ingrediente activo de la presente divulgación a la zona de interés. Estos portadores incluyen liposomas. El ingrediente activo de la presente divulgación se puede dispersar o emulsionar en un medio de modo convencional para formar una preparación líquida o se puede mezclar con un portador semisólido (gel) o sólido para formar una pasta, un polvo, una pomada, una crema o una loción.
20
25

Portadores tópicos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, solución salina tamponada, jalea de petróleo (vaselina), petrolato, aceite mineral, aceite vegetal, aceite animal, ceras orgánicas e inorgánicas, tales como cera microcristalina, de parafina y ozocerita, polímeros naturales, tales como xantanos, gelatina, celulosa, colágeno, almidón o goma arábiga, polímeros sintéticos, alcoholes y polioles. El portador puede ser una composición portadora miscible con agua. Esta composición portadora tópica farmacéuticamente aceptable miscible con agua puede incluir las elaboradas con uno o más ingredientes apropiados fuera de la terapia.
30

Debido a que las afecciones dermatológicas que se van a tratar pueden ser visibles, el portador tópico también puede ser un portador tópico cosméticamente aceptable. El portador tópico cosméticamente aceptable será cualquier portador sustancialmente atóxico utilizable convencionalmente para la administración tópica de cosméticos en los que el ingrediente activo de la presente divulgación permanecerá estable y biodisponible cuando se aplique directamente a la superficie cutánea. Portadores cosméticamente aceptables adecuados son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen líquidos, cremas, aceites, lociones, pomadas, geles o sólidos cosméticamente aceptables, tales como cremas de noche cosméticas, cremas de base, lociones bronceadoras, protectores solares, lociones de manos, maquillajes y bases de maquillaje y mascarillas. Portadores tópicos cosméticamente aceptables pueden ser de naturaleza similar o idéntica a los portadores tópicos farmacéuticamente aceptables descritos anteriormente. Las composiciones pueden contener otros ingredientes convencionales en cosméticos incluyendo perfumes, estrógeno, vitaminas A, C o E, alfa-hidroxi- o alfa-cetoácidos tales como ácidos pirúvico, láctico o glicólico, lanolina, vaselina, aloe vera, metil- o propilparabeno y pigmentos.
35
40

Puede ser deseable tener un sistema de aporte que controle la liberación de ingrediente activo de la presente divulgación a la herida y se adhiera a o se mantenga sobre la herida durante un período prolongado para incrementar el tiempo de contacto del ingrediente activo de la presente divulgación sobre la herida. La liberación sostenida o retardada del ingrediente activo de la presente divulgación proporciona una administración más eficaz que da como resultado una dosificación menos frecuente y/o reducida del ingrediente activo de la presente divulgación y un mejor cumplimiento terapéutico del paciente. Ejemplos de portadores adecuados para liberación sostenida o retardada en un ambiente húmedo incluyen gelatina, goma arábiga, polímeros de xantano. Portadores farmacéuticos capaces de liberar el ingrediente activo de la presente divulgación cuando se exponen a cualquier ambiente oleoso, graso, ceroso o húmedo en la zona que se trata incluyen una resina o un elastómero termoplásticos o termoestables flexibles incluyendo resinas termoplásticas tales como poli(haluros de vinilo), poli(ésteres vinílicos), poli(haluros de vinilideno) y poliolefinas halogenadas, elastómeros tales como brasiliensis, polidienos y cauchos naturales y sintéticos halogenados, y resinas termoestables flexibles tales como poliuretanos, y resinas epoxídicas. Sistemas de aporte controlado se describen, por ejemplo, en la Pat. EE. UU. N° 5.427.778 que proporciona formulaciones en gel y soluciones viscosas para el aporte del ingrediente activo de la presente divulgación a una zona herida. Los geles tienen las ventajas de tener un alto contenido de agua para mantener la herida húmeda, la capacidad de absorber exudado de la herida, una aplicación fácil y una retirada fácil mediante lavado. Preferiblemente, el portador de liberación sostenida o retardada es un gel, un liposoma, una microesponja o una microesfera.
45
50
55
60

El ingrediente activo de la presente divulgación también se puede administrar en combinación con otros agentes farmacéuticamente eficaces incluyendo antibióticos, otros agentes de curación de heridas y antioxidantes.

5 La vía de administración del ingrediente activo de la presente divulgación dependerá de la zona de la herida y del tipo y la extensión de la lesión. Se puede usar cualquier método de aplicación adecuado con la condición de que una cantidad eficaz del ingrediente activo de la presente divulgación sea capaz de alcanzar las zonas que requieren que se produzca reepitelialización. Las vías de administración incluyen tópica, transdérmica y parenteral. Típicamente, el ingrediente de la presente divulgación se administrará mediante aplicación tópica o transdérmica.

10 La administración tópica para tratamiento cutáneo se efectúa a través de una solución, una crema, una pomada o un gel aplicados tópicamente u otro vendaje curativo de formulación adecuada que se pueda aplicar a continuación a la herida de modo que el ingrediente activo de la composición de la presente divulgación entre en contacto con la herida. Ejemplos de dispositivos transdérmicos adecuados se describen, a modo de ejemplo, en la Pat. EE. UU. N° 4.818.540. El ingrediente activo de la presente divulgación puede mezclarse con una crema farmacéuticamente aceptable, aplicarse a la herida y cubrirse con un apósito oclusivo. Alternativamente, la zona de la herida se puede irrigar o embeber con una solución del ingrediente activo de la presente divulgación. La solución se aplicará de dos a doce veces al día. Para la aplicación transdérmica, el ingrediente activo de la presente divulgación se formula en una composición capaz de permitir que el ingrediente activo de la presente divulgación penetre en la piel y la zona de la herida. Estas composiciones se aplican directamente a la piel o se incorporan en un portador protector tal como un dispositivo transdérmico o de "parche". El ingrediente activo de las formulaciones de la presente divulgación para la administración transdérmica se puede usar para revestir las fibras de un apósito de gasa absorbente.

25 En una realización particular, la composición farmacéutica de la presente divulgación para tratar la córnea es una gota oftálmica o una pomada oftálmica. La gota ocular se proporciona en cualquier formulación usada generalmente, por ejemplo, en la forma de una gota ocular acuosa tal como una solución acuosa para gotas oculares, una suspensión acuosa para gotas oculares, una solución viscosa para gotas oculares, una solución solubilizada para gotas oculares o en la forma de una gota ocular no acuosa tal como una solución no acuosa para gotas oculares, una suspensión no acuosa para gotas oculares. Cuando la composición para tratar la córnea de la presente divulgación se prepara como una gota ocular acuosa, preferiblemente contiene un aditivo que se usa habitualmente en una gota ocular acuosa. Los ejemplos de este aditivo incluyen conservantes, agentes isotónicos, agentes tamponadores, un estabilizante o reguladores del pH. Cuando la composición se usa en forma de una pomada ocular, incluye cualesquiera formulaciones usadas habitualmente. Por ejemplo, se puede producir fácilmente al calentar opcionalmente una base de pomada ocular y mezclarla con un ingrediente activo de la presente divulgación. El ingrediente activo de la presente divulgación se puede disolver o suspender opcionalmente en un disolvente adecuado, por ejemplo, agua pura esterilizada, agua destilada para inyección, un aceite vegetal tal como aceite de ricino, antes de mezclar con la base de pomada ocular. Los ejemplos del agente de base de pomada ocular incluyen lanolina purificada, vaselina, Plastibase y parafina líquida. El susodicho conservante y estabilizante se pueden combinar opcionalmente con la condición de que no se dificulte el objetivo de la presente divulgación.

35 Según la presente divulgación, el antagonista del receptor de mineralocorticoides o el inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides se administra al paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz.

40 Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del ingrediente activo para estimular la reepitelialización durante la curación de heridas con una relación razonable beneficio/riesgo para cualquier tratamiento médico.

45 Se entenderá que la utilización diaria total de los compuestos y las composiciones de la presente divulgación será decidida por el médico responsable dentro del alcance de un juicio médico razonable. El nivel específico de dosis terapéuticamente eficaz dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que se trate y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el momento de la administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares muy conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está totalmente dentro de la experiencia de la técnica empezar con dosis del compuesto a niveles inferiores que los requeridos para alcanzar el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta que se alcance el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos se puede variar a lo largo de un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto al día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación para el sujeto que se va a tratar. Un medicamento contiene típicamente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra normalmente en un nivel de dosificación de 0,002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal al día.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos**Ejemplo 1: papel de MR/aldosterona en la curación de heridas cutáneas:**

Los presentes inventores han cuestionado el papel del MR en la curación de heridas cutáneas y la formación de cicatrices. En una lesión cutánea, la formación de cicatrices incluye fases sucesivas altamente controladas e interdependientes (inflamación, proliferación, remodelación tisular) para restaurar el defecto cutáneo (Lau K, Paus R, Tiede S, Day P, Bayat A: Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing, *Exp Dermatol* 2009, 18:921-933). Los presentes inventores se dirigen al papel de la aldosterona/MR en el proceso de reepitelialización, que se produce en la fase tardía de la curación de heridas. Con este propósito, los presentes inventores han usado un modelo de curación de heridas (Mazzalupo S, Wawersik MJ, Coulombe PA: An ex vivo assay to assess the potential of skin keratinocytes for wound epithelialization, *J Invest Dermatol* 2002, 118:866-870) que permite medir la contribución de la epidermis en piel cortada procedente de ratones neonatos. El ensayo de curación de heridas consiste en un cultivo organotípico de explantes cutáneos en el que los queratinocitos migran fuera del parche original y proliferan (excrecencia excéntrica), lo que imita el comportamiento in vivo de los queratinocitos en el margen de heridas cutáneas.

Los presentes inventores usaron su modelo en ratones transgénicos (ratones K5-MR) con sobreexpresión de MR en queratinocitos basales (Sainte Marie Y, Toulon A, Paus R, Maubec E, Cherfa A, Grossin M, Descamps V, Clemessy M, Gasc JM, Peuchmaur M, Glick A, Farman N, Jaisser F: Targeted skin overexpression of the mineralocorticoid receptor in mice causes epidermal atrophy, premature skin barrier formation, eye abnormalities, and alopecia, *Am J Pathol* 2007, 171:846-860) para cuestionar el impacto de MR en curación de heridas cutáneas neonatales. Brevemente, se cortó piel de ratones doblemente transgénicos recién nacidos y sus compañeros de camada de control (menos de 1 día de edad, es decir en un estadio que precede a la muerte posnatal temprana de crías de K5-MR). Se cortaron trozos de piel y perforaciones estériles de 4 mm se pusieron en pocillos de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos. Posteriormente, se añadieron 250 microlitros de medio y los explantes se cultivaron durante 7 días según se describe en Mazzalupo et al. (véase anteriormente). El medio del explante era DMEM-Ham F12 (2/1), con adición de 1 ml de penicilina-estreptomina, 1 ml de aminoácidos no esenciales, 1 ml de L-glutamina, adenina $2 \cdot 10^{-4}$ M, insulina 5 ug/ml, T3 $2 \cdot 10^{-9}$ M, transferrina 5 ug/ml, toxina del cólera 10^{-10} M, hidrocortisona 10^{-6} M, fungizona 0,5 ug/ml, suero bovino fetal no complementado 10%, factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml, para 100 ml de medio. Después de una semana de cultivo, los explantes cutáneos se fijaron en paraformaldehído al 4% (10 min) seguido por metanol (5 min), y las muestras se procesaron con respecto a la inmunohistoquímica de queratina 17 (K17) o K6 para visualizar la zona de excrecencia queratinocítica. La superficie de excrecencia queratinocítica se cuantificó (software Image J NIH).

El principal hallazgo de este estudio es la excrecencia queratinocítica notablemente reducida en los parches cutáneos procedentes de crías de K5-MR, en comparación con animales de control. Mientras que los explantes procedentes de crías normales están rodeados de queratinocitos crecientes que forman una zona homogénea de excrecencia teñida con el anticuerpo antiqueratinocítico, los presentes inventores observaron que los queratinocitos procedentes de crías de K5-MR formaban una excrecencia mucho menor con márgenes irregulares. La cuantificación de la superficie de excrecencia revelaba una diferencia principal entre el comportamiento de piel de control y de K5-MR. En efecto, la superficie de excrecencia queratinocítica era $30,6 \pm 1,31$ mm² en CT frente a $17,7 \pm 1,22$ mm² en K5-MR (media y SEM, $p < 0,0001$, $n = 28$ y 30 crías, respectivamente, procedentes de 10 camadas diferentes). Así, la sobreexpresión de MR en queratinocitos basales reduce su comportamiento de epitelialización. Para establecer la conexión entre la excrecencia alterada observada en explantes cutáneos de ratones K5-MR y la sobreexpresión de MR, este ensayo se repitió en presencia del antagonista de MR canrenoato potásico, añadido al medio de cultivo. Cuando los recortes de piel se incubaban con canrenoato potásico (0,1 mM), la excrecencia queratinocítica dificultada de los explantes procedentes de crías de K5-MR se mejoraba parcialmente pero significativamente, mientras que el antagonista no tenía efecto en explantes procedentes de crías de control. Por lo tanto, se puede concluir que la sobreexpresión de MR limita el componente epitelial de la curación de heridas, en este ensayo ex vivo sobre piel de ratón. Por lo tanto, los antagonistas del receptor de mineralocorticoides deben estimular la reepitelialización de la piel o de la córnea durante la curación de heridas

Ejemplo 2: El canal epitelial del sodio ENaC como una diana de MR en la curación de heridas cutáneas

La activación de aldosterona/MR regula genes implicados en el transporte de sodio en tejidos diana mineralocorticoides tales como el conducto colector renal (Farman N, Rafestin-Oblin ME: Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity, *Am J Physiol Renal Physiol* 2001, 280:F181-192; Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombres M: The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology, *Nucl Recept Signal* 2007, 5:e012). La activación de MR renal desencadena la transcripción (o represión) de varios genes que finalmente da como resultado un incremento en la actividad y el número de transportadores o canales del sodio. En una célula diana epitelial típica para la aldosterona, tal como la célula principal del conducto colector renal, la entrada de sodio en la célula depende de los canales del sodio apicales sensibles a amilorida (ENaC, para canal epitelial del sodio) que son la etapa limitativa para el transporte transepitelial de sodio (Rossier BC, Pradervand S, Schild L, Hummler E: Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors, *Annu Rev Physiol* 2002, 64:877-897). ENaC está

formado por 3 subunidades (alfa, beta y gamma) que forman el poro para el sodio. Los mecanismos fisiológicos que regulan subunidades de canales que se dirigen a la membrana (con un papel importante del suero y la cinasa sgk1 inducida por glucocorticoides), la activación por serina-proteasas (como proteasas activadoras de canales Cap1 y Cap3) así como la recuperación desde la membrana apical son de principal importancia para controlar la reabsorción de sodio (Rossier BC, Stutts MJ: Activation of the Epithelial Sodium Channel (ENaC) by Serine Proteases, *Annu Rev Physiol* 2008 ; Rotin D, Schild L: ENaC and its regulatory proteins as drug targets for blood pressure control, *Curr Drug Targets* 2008, 9:709-716).

Los presentes inventores también han observado que el canal del sodio ENaC también es expresado por queratinocitos (Brouard M, Casado M, Djelidi S, Barrandon Y, Farman N: Epithelial sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation, *J Cell Sci* 1999, 112 (Pt 19):3343-3352 ; Roudier-Pujol C, Rochat A, Escoubet B, Eugene E, Barrandon Y, Bonvalet JP, Farman N: Differential expression of epithelial sodium channel subunit mRNAs in rat skin, *J Cell Sci* 1996, 109 (Pt 2):379-385), además la inactivación de su subunidad alfa en la epidermis da como resultado hiperplasia epidérmica (Mauro T, Guitard M, Behne M, Oda Y, Crumrine D, Komuves L, Rassner U, Elias PM, Hummler E: The ENaC channel is required for normal epidermal differentiation, *J Invest Dermatol* 2002, 118:589-594). Se ha presentado una expresión mejorada de ENaC beta durante la diferenciación de queratinocitos humanos cultivados (Brouard M, Casado M, Djelidi S, Barrandon Y, Farman N: Epithelial sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation, *J Cell Sci* 1999, 112 (Pt 19):3343-3352). También se observó que los inhibidores de ENaC dificultaban la formación de cúpulas en monocapas queratinocíticas confluentes (Brouard M, Casado M, Djelidi S, Barrandon Y, Farman N: Epithelial sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation, *J Cell Sci* 1999, 112 (Pt 19):3343-3352). Conjuntamente, estos datos sugieren que ENaC puede representar un papel en la epidermis que todavía no se elucidado completamente. La epidermis también expresa altos niveles de algunas serina proteasas pertenecientes a cascadas de señalización que modifican la actividad de ENaC en epitelios sensibles a aldosterona. La matriptasa (también denominada MT/SP1 o Cap 3) escinde la forma inactiva de prostasina (Cap1 o PRSS8) en una proteasa activa que activa ENaC. De forma interesante, la inactivación de la serina proteasa Cap1 activadora de ENaC conduce a un impedimento intensivo de la permeabilidad de la barrera cutánea; la inactivación de Cap3 también da como resultado una función dificultada de la barrera epidérmica. Sin embargo, no existe información sobre la posible implicación de ENaC en la curación de heridas.

Los presentes inventores se aprovecharon del modelo de ratones K5-MR para plantear si la expresión de ENaC y sus principales reguladores puede ser alterada por la sobreexpresión de MR. Muestras cutáneas procedentes de neonatos de control y K5-MR se procesaron para el análisis por PCR en tiempo real de la expresión génica. Los presentes inventores mostraron que la sobreexpresión de MR en la epidermis conduce a una expresión de mRNA cutánea mejorada de las 3 subunidades de ENaC, mientras que los niveles de sgk1, Cap1 y Cap3 eran comparables a los de ratones de control. Este patrón de expresión anormal se mitiga cuando a los ratones preñados se les administraba canrenoato, indicando que el incremento en la expresión de ENaC en la epidermis de crías de K5-MR se debe en efecto a la actividad de MR.

Ejemplo 3: papel de MR/aldosterona en la curación de heridas corneales:

Como la epidermis, el epitelio de la córnea es un epitelio germinativo multiestratificado; está formado por varias capas de células, con células proliferativas basales que migran progresivamente hacia la superficie, cuando entran en el programa de diferenciación terminal. Los presentes inventores han identificado recientemente el receptor de mineralocorticoides en el epitelio corneal del ratón y la rata, localizado mediante inmunohistoquímica en las capas basales del epitelio. Los presentes inventores también tienen datos preliminares que indican que la aldosterona regula la expresión de un canal de iones/agua en la córnea de la rata. Mediante analogía con la piel, se puede anticipar que el MR corneal puede estar implicado en la curación de heridas epiteliales de la córnea.

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista del receptor de mineralocorticoides o un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para el uso en un método para el tratamiento de la curación de heridas retardada observada durante tratamientos con corticoides, la curación de heridas retardada observada en ancianos o la curación de heridas retardada observada en pacientes diabéticos, en el que se estimula la reepitelialización de la piel durante la curación de heridas.
- 5 2. Un antagonista del receptor de mineralocorticoides o un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para el uso en un método para el tratamiento de una herida corneal, en el que se estimula la reepitelialización de la córnea durante curación de heridas.
- 10 3. El antagonista del receptor de mineralocorticoides para el uso según la reivindicación 1 o 2, que se selecciona del grupo que consiste en compuestos antagonistas del receptor de mineralocorticoides epoxiesteroideos, compuestos antagonistas del receptor de mineralocorticoides no epoxiesteroideos y compuestos antagonistas del receptor no esteroideos.
- 15 4. El antagonista del receptor de mineralocorticoides para el uso según la reivindicación 1 o 2, que se selecciona del grupo que consiste en espironolactona, drospirenona y eplerenona.