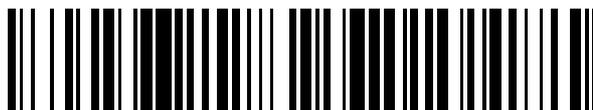


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 766 549**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2006 PCT/IB2006/001961**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2006 WO06134494**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2006 E 06795121 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 1959981**

54 Título: **Compuestos anticonexina 43 para el tratamiento de heridas crónicas**

30 Prioridad:

03.02.2005 US 650075 P

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

12.06.2020

73 Titular/es:

**CODA THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
3/4 Crescent Road
Epsom, Auckland 1003, NZ**

72 Inventor/es:

**GREEN, COLIN R. y
BECKER, DAVID L.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 766 549 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

Compuestos anticonexina 43 para el tratamiento de heridas crónicas

5 Campo

La presente invención se refiere a un compuesto anticonexina 43 para usar en un método de tratamiento de una herida crónica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto de 0,1 µg a 1 gramo del compuesto anticonexina 43.

10 Antecedentes de la invención

Lo siguiente incluye información que puede ser útil para comprender las presentes invenciones.

15 La enfermedad coronaria es la principal causa de muerte en la mayoría de los países occidentales. Se ha informado que las tasas de mortalidad por enfermedad cardiovascular varían desde 29 (en hombres, 24 para mujeres) por 100000 en Canadá, hasta 213 (hombres, mujeres 154) en la Federación Rusa. Para otros países occidentales, la tasa es de 31 a 55 (43 - 26). Aproximadamente la mitad de las muertes atribuibles al accidente cerebrovascular son el resultado de complicaciones médicas, tales como neumonía y sepsis, y la mitad son atribuibles a complicaciones neurológicas, tales como un nuevo infarto cerebral y edema cerebral. Brott, T. and Bogouslavsky, J., New Engl. J. Med. 343: 710 - 722 (2000).

20 Los accidentes cerebrovasculares son la tercera causa de muerte en los países desarrollados y tienen un impacto devastador en la salud pública. Aproximadamente cada año ocurren 700,000 nuevos casos de accidente cerebrovascular en los Estados Unidos (American Stroke Association). Aproximadamente el 25 % de los pacientes con accidente cerebrovascular mueren como un resultado del accidente cerebrovascular o de sus complicaciones resultantes. Además, casi el 50 % de las víctimas de accidente cerebrovascular tienen problemas de salud de moderados a graves y discapacidades a largo plazo. Aunque la incidencia de accidente cerebrovascular isquémico ha disminuido en los últimos 20 años, la edad media de la población ha aumentado, lo que resulta en un aumento continuo en el número absoluto de accidentes cerebrovasculares. Las proyecciones recientes indican que para el año 2050, se producirán más de 1 millón de accidentes cerebrovasculares cada año en los Estados Unidos. Los accidentes cerebrovasculares son, generalmente, el resultado de numerosas afecciones subyacentes que disminuyen el flujo de sangre al cerebro y causan discapacidad o muerte. Aproximadamente el 85 por ciento de los accidentes cerebrovasculares son de naturaleza isquémica (coágulo de sangre o bloqueo de un vaso sanguíneo). Foulkes MR, y otros, Stroke; 19:547-54 (1988). Un accidente cerebrovascular isquémico puede ser causado por un coágulo de sangre que se forma dentro de la arteria del cerebro (accidente cerebrovascular trombótico), o por un coágulo que se forma 35 que se forma en otra parte del cuerpo y viaja al cerebro (accidente cerebrovascular embólico), los accidentes cerebrovasculares trombóticos representan aproximadamente 52 % de todos los accidentes cerebrovasculares isquémicos. Los accidentes cerebrovasculares trombóticos son generalmente un resultado de la aterosclerosis (donde los vasos sanguíneos se obstruyen con una acumulación de depósitos grasos, calcio, y factores de coagulación de la sangre, tales como el fibrinógeno y el colesterol).

45 La inflamación es un proceso multifactorial, y se manifiesta en muchas enfermedades, trastornos, y afecciones que tienen enormes consecuencias acumulativas para la salud. Las enfermedades inflamatorias, que incluyen la artritis reumatoide, el lupus, la psoriasis, la esclerosis múltiple y el asma, persisten como una causa importante de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Además, las enfermedades autoinmunitarias se asocian con la inflamación y están en aumento, según los informes afectan más de 50 millones de personas en los EE.UU. En muchas enfermedades autoinmunitarias, el daño celular, tisular, articular y orgánico resulta de la activación incontrolada de una inmensa diversidad de vías inflamatorias. La artritis reumatoide (RA) es una de tales enfermedades inflamatorias crónicas que se caracteriza por la inflamación de las articulaciones, lo que provoca hinchazón, dolor, y pérdida de la función. La RA 50 afecta al menos un estimado de 2,5 millones de personas en los Estados Unidos, y es causada por una combinación de eventos que incluyen una infección o lesión inicial, una respuesta inmunitaria anormal, y factores genéticos. Cualquiera de al menos 80 enfermedades autoinmunitarias diferentes puede resultar cuando el sistema inmunitario deja de ser regulado y ataca el tejido sano.

55 Las conexinas, conocidas además como proteínas de unión de intersticio, son proteínas transmembranales de cuatro pasos con extremos C y N citoplasmáticos. Seis conexinas se combinan juntas para formar un hemicanal denominado "conexón".

60 Las uniones de intersticio son estructuras que proporcionan la comunicación directa de célula a célula. La unión de intersticio se compone por dos conexones que se acoplan, uno aportado por cada una de las células contiguas que al acoplarse forman una unión de intersticio funcional.

65 A medida que los ribosomas las traducen, las conexinas se insertan en la membrana del retículo endoplásmico. Bennett MV, Zukin RS. Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. Neuron. 2004 Feb 19;41(4):495-511. Allí se reúnen para formar hemicanales (conexones), que se transportan a la membrana celular en vesículas y se difunden a través de la membrana hasta que se encuentran con un hemicanal de la otra célula, con el

que pueden acoplarse para formar un canal. *Id.* Las moléculas sobre una conexina le permiten "reconocer" las otras conexinas en su hemicanal y las del hemicanal de la otra célula, y causan la alineación correcta y la formación del canal. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of Neural Science, 4ta Ed., pp.178-180. McGraw-Hill, Nueva York (2000).

5 Las proteínas conexinas tienen una topología transmembranal común, con cuatro dominios transmembranales alfa helicoidales, dos lazos extracelulares, un lazo citoplasmático, y dominios citoplasmáticos N-terminal y C-terminal. Las secuencias son más conservadas en los dominios transmembranales y extracelulares, aunque muchas de las diferencias funcionales claves entre las conexinas están determinadas por las diferencias entre los aminoácidos en estos dominios mayormente conservados. Cada lazo extracelular contiene tres cisteínas con espaciado invariante (excepto una isoforma) que se requieren para la función de canal. El canal de unión se compone de dos hemicanales unidos por los extremos, cada uno de los cuales es un hexámero de subunidades de conexina. En los canales de unión, las cisteínas en los lazos extracelulares forman enlaces disulfuro intramonómeros entre los dos lazos, no enlaces intermonómeros o interhemicanal. La unión homofílica de los extremos entre hemicanales es mediante interacciones no covalentes. Los estudios de mutagénesis sugieren que la región de acoplamiento contiene estructuras beta, y puede parecerse en algún grado a la estructura barril beta de los canales de porina. Los dos hemicanales que componen un canal de unión están escalonados rotacionalmente en aproximadamente 30 grados entre sí, de manera que las hélices alfa de cada monómero de conexina se alinean axialmente con las hélices alfa de los dos monómeros adyacentes en el hemicanal opuesto.

20 Cada conexón o hemicanal en la membrana debe, en condiciones normales, permanecer cerrado hasta que se acople con un conexón de una célula vecina. Sin embargo, los inventores creen que cuando una célula que expresa un hemicanal se expone a un estrés (por ejemplo, fisiológico, mecánico, *etcétera*) los hemicanales pueden abrirse incluso cuando no están acoplados. La inhibición de la comunicación extracelular por hemicanal incluye la inhibición del flujo de moléculas pequeñas a través de un hemicanal abierto hacia y desde un espacio extracelular o periplásmico. Si bien no tiene la intención de estar ligado o limitado a ningún mecanismo, los modos de acción incluyen el bloqueo (parcial o completo) del hemicanal, lo que desencadena la internalización del conexón que después se elimina de la membrana, lo que induce un cambio conformacional en las proteínas conexinas para ocasionar el cierre del conexón y el enmascaramiento o la unión a los sitios involucrados en la activación de la apertura del canal (tales sitios de unión al calcio).

25 Se han descrito nucleótidos antisentido (AS) para conexinas y los usos de estos. Ver el documento WO00/44409 de Becker y otros, presentado el 27 de enero de 2000, "Formulations Comprising Antisense Nucleotides to Connexins."

35 Sumario

La invención reivindicada en la presente descripción se refiere a compuestos anticonexina 43, que incluyen polipéptidos (por ejemplo, péptidos miméticos y peptidomiméticos, anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos y construcciones sintéticas) y polinucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos antisentido), para usar en un método de tratamiento de una herida crónica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto de 0,1 µg a 1 gramo del compuesto anticonexina 43.

45 Se describen compuestos y composiciones anticonexinas útiles para el tratamiento de diversas enfermedades, afecciones y trastornos en los que la modulación de las conexinas, los hemicanales, y las uniones de intersticio serían beneficiosas, por ejemplo, afecciones o trastornos cardiovasculares, neurológicos, vasculares, y otras afecciones o trastornos, que incluyen el tratamiento de las heridas. Además, se describen los métodos para usar estos compuestos y composiciones, así como también formulaciones farmacéuticas, kits, y dispositivos médicos, por ejemplo.

50 En un caso, se describen compuestos, composiciones, y los métodos para tratar un sujeto con un trastorno vascular. Tales métodos incluyen administrar al sujeto un compuesto anticonexina, por ejemplo, un compuesto antisentido, un péptido mimético, u otro compuesto anticonexina, que incluye los descritos en la presente descripción, capaces de inhibir la expresión, formación, o actividad de una conexina, hemicanal o unión de intersticio.

55 En otro caso, se describen compuestos y composiciones anticonexina, y los métodos para tratar a un sujeto con un trastorno inflamatorio. Tales métodos incluyen administrar al sujeto un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro compuesto anticonexina, que incluyen los descritos en la presente descripción, capaces de inhibir la expresión, formación, o actividad de una conexina, hemicanal, o unión de intersticio.

60 En otro caso, se describen compuestos y composiciones anticonexina, y los métodos para tratar a un sujeto que tiene una herida. Tales métodos incluyen administrar al sujeto un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro compuesto anticonexina, que incluye los descritos en la presente descripción, capaces de inhibir la expresión, formación, acción, o actividad de una conexina, hemicanal o unión de intersticio.

65 En otro caso, se describen compuestos y composiciones anticonexina y los métodos para tratar a un sujeto junto con un trasplante o procedimiento de injerto. Tales métodos incluyen administrar al sujeto un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro compuesto anticonexina, que incluye los descritos en la presente descripción, capaces de

inhibir la expresión, formación, acción, o actividad de un hemicanal de conexina. Tales métodos, además, son capaces de inhibir y/o prevenir el edema tisular asociado con los procedimientos de trasplante e injerto.

En otro caso, se describen proteínas de unión anticonexina, que incluyen péptidos miméticos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y similares, que son capaces de unir o modular la expresión, formación, acción, o actividad de un hemicanal de conexina. Las proteínas de unión son útiles como moduladoras de uniones de intersticio y hemicanales.

En determinadas modalidades no limitantes, el compuesto anticonexina 43 comprende un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región transmembranal de conexina 43. Las conexinas humanas son una especie preferida.

En un caso descrito, un compuesto anticonexina comprende un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una porción de una región transmembranal de una conexina 45. En casos particularmente descritos, por ejemplo, el compuesto anticonexina es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende aproximadamente 3 a aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:62, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:62, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende aproximadamente 8 a aproximadamente 15 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:62, o un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende aproximadamente 11, 12, o 13 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:62. Otros ejemplos descritos incluyen un compuesto anticonexina que es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, o 30 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:62. En determinados compuestos anticonexina descritos en la presente descripción, los péptidos miméticos se basan en los dominios extracelulares de conexina 45 correspondientes a los aminoácidos en las posiciones 46-75 y 199-228 de la SEQ ID NO: 62. Por lo tanto, determinados péptidos descritos en la presente descripción tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a las regiones en las posiciones 46-75 y 199-228 de la SEQ ID NO: 62. Los péptidos no necesitan tener una secuencia de aminoácidos idéntica a las porciones de la SEQ ID NO: 62, y pueden hacerse cambios conservativos de aminoácidos de manera que los péptidos retengan la actividad de unión o la actividad funcional en los ensayos descritos en la presente descripción y conocidos de cualquier otra manera en la técnica. En otros casos descritos, los péptidos miméticos se basan en regiones peptídicas diana dentro de la proteína conexina que no son los dominios extracelulares (por ejemplo, porciones de la SEQ ID NO:62 que no corresponden a las posiciones 46-75 y 199-228).

En otra modalidad no limitante pero preferida, un compuesto anticonexina comprende un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a una porción de una región transmembranal de una conexina 43. En modalidades particulares no limitantes, el compuesto anticonexina es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende aproximadamente 3 a aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:63, aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:63, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende aproximadamente 8 a aproximadamente 15 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:63, o un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende aproximadamente 11, 12, o 13 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:63. Otras modalidades no limitantes incluyen un compuesto anticonexina que es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, o 30 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 63. En otros compuestos anticonexina, los péptidos miméticos se basan en los dominios extracelulares de la conexina 43 correspondientes a los aminoácidos en las posiciones 37-76 y 178-208 de la SEQ ID NO: 63. Por lo tanto, determinados péptidos descritos en la presente descripción tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a las regiones en las posiciones 37-76 y 178-208 de la SEQ ID NO: 63. Los péptidos no necesitan tener una secuencia de aminoácidos idéntica a las porciones de la SEQ ID NO: 63, y pueden hacerse cambios conservativos de aminoácidos de manera que los péptidos retengan la actividad de unión o la actividad funcional en los ensayos descritos en la presente descripción y conocidos de cualquier otra manera en la técnica. En otras modalidades, los péptidos miméticos se basan en regiones peptídicas diana dentro de la proteína conexina que no son los dominios extracelulares (por ejemplo, las porciones de la SEQ ID NO:63 que no corresponden a las posiciones 37-76 y 178-208).

Otros compuestos particulares, los métodos para preparar estos compuestos, y los métodos para medir su actividad se describen con mayor detalle en la presente descripción.

Alternativamente, los compuestos anticonexina 43, que incluyen los que se usan en determinadas modalidades, comprenden uno o más compuestos antisentido. Los compuestos antisentido adecuados pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en oligonucleótidos antisentido, polinucleótidos antisentido, desoxirribosimas, oligonucleótidos de morfolino, moléculas de ARNi, moléculas de siARN, moléculas PNA, ADNzimas, y ARN nucleares pequeños U1 mutados en el extremo 5', y análogos de lo anterior. Estos y otros compuestos pueden usarse solos o en combinación con uno o más miméticos u otros péptidos de unión.

Un compuesto anticonexina tal como un compuesto antisentido o péptido mimético puede dirigirse, por ejemplo, a una o más de las conexinas 45, 43, 26, 37, 30 y/o 31.1. En determinadas modalidades no limitantes pero preferidas, un compuesto antisentido o péptido mimético se dirige a la conexina 43. En determinadas modalidades no limitantes pero

preferidas, un compuesto anticonexina 43 tal como un compuesto antisentido dirigido a al menos aproximadamente 8 bases nucleotídicas de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina 43 que tiene una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de la SEQ ID NO: 12. Un compuesto antisentido puede comprender, por ejemplo, un compuesto antisentido dirigido a al menos aproximadamente 12 bases nucleotídicas de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina que tiene una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de la SEQ ID NO:12. En otras determinadas modalidades, un compuesto antisentido comprende una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NOS:1-3. Un compuesto antisentido puede comprender, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 bases nucleotídicas de longitud, por ejemplo, aproximadamente 25-30 o aproximadamente 30.

Un compuesto antisentido puede comprender, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido que comprende bases nucleotídicas de origen natural y un enlace internucleosídico no modificado (por ejemplo, al menos un enlace internucleosídico modificado). El enlace internucleosídico modificado puede comprender un enlace fosforotioato. Otros compuestos antisentido pueden, por ejemplo, comprender un oligonucleótido que tiene al menos una porción de azúcar modificado. Aún otros compuestos antisentido pueden, por ejemplo, comprender oligonucleótidos que tienen al menos una base nucleotídica modificada.

En determinadas modalidades, un compuesto anticonexina tal como un compuesto antisentido o péptido mimético puede usarse en combinación con un segundo compuesto útil para reducir el daño tisular o promover la curación. El segundo compuesto, por ejemplo, puede ser un factor de crecimiento o una citocina o similares. Los compuestos de administración conjunta adecuados incluyen, por ejemplo, FGF, NGF, NT3, PDGF, TGF, VEGF, BDGF, EGF, KGF, integrinas, interleucinas, plasmina, y semaforinas. Para la terapia humana, tales compuestos de administración conjunta como los enumerados anteriormente son humanos o de origen humano.

Se describen métodos para administrar compuestos anticonexina a un sujeto, órgano diana, tejido diana, o célula diana en los que la modulación de hemicanal sería beneficiosa.

Se describen métodos para administrar compuestos anticonexina a un sujeto, órgano diana, tejido diana, o célula diana. Por lo tanto, en determinados casos descritos, un sujeto es tratado mediante la administración de un compuesto anticonexina que es capaz de unirse a, o modular un hemicanal para uno o más de los siguientes: enfermedad cardiovascular, enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, medio de almacenamiento o transporte cardiopléjico u otro órgano, lesión por reperfusión, acidosis respiratoria o metabólica, edema pulmonar (que incluye la exposición a gases tóxicos tales como el dióxido de nitrógeno), fisiopatología vascular por la cual se alteran las células endoteliales (tales como las lesiones hipercolesterolémicas inducidas por la dieta), trastornos vasculares (microvasculares y macrovasculares), accidente cerebrovascular, enfermedad cerebrovascular (isquemia cerebral), trombosis, lesiones vasculares resultantes de traumatismos (por ejemplo, heridas subcutáneas, inserción de stent, reestenosis o angioplastia), daño vascular resultante de niveles elevados de glucosa (diabetes), enfermedades vasculares de las extremidades, isquemia orgánica, neuropatía óptica, inflamación y artritis reumatoide (RA), inflamación subcrónica o crónica, epilepsia (eventos epilépticos y lesiones diseminadas después de eventos epilépticos), retinopatía diabética, degeneración macular, y otras determinadas indicaciones descritas en mayor detalle en Harrison's, Principles of Internal Medicine 15ª edición (McGraw Hill, Inc., Nueva York).

En determinados otros casos descritos, un sujeto es tratado mediante la administración de un compuesto anticonexina que es capaz de unirse o de cualquier otra manera modular un hemicanal para uno o más de los siguientes, por ejemplo: (1) prevención o tratamiento del edema en la médula espinal después o como un resultado de, por ejemplo, isquemia o trauma; (2) prevención o tratamiento de la degradación de la pared de los vasos sanguíneos en los tejidos después o como un resultado de, por ejemplo, isquemia o trauma (por ejemplo, en el cerebro, el nervio óptico, la médula espinal y el corazón); (3) prevención o tratamiento de la artritis inflamatoria y otros trastornos inflamatorios en los cuales, por ejemplo, el edema y/o la inflamación son sintomáticos, o en los cuales, por ejemplo, la muerte continua de los vasos sanguíneos ocurre como un resultado de, por ejemplo, la persistencia de inflamación; (4) prevención o tratamiento de heridas subagudas o crónicas, por ejemplo, heridas en la córnea del ojo en las cuales, a modo de ejemplo, la prevención de la muerte continua de los vasos sanguíneos permite la recuperación de la isquemia limbal; (5) prevención o tratamiento de heridas subagudas o crónicas, por ejemplo, heridas en la córnea del ojo como un medio, a modo de ejemplo, para desencadenar la reepitelización; (6) tratamiento de quemaduras, por ejemplo, quemaduras químicas en el ojo para, a modo de ejemplo, desencadenar la recuperación epitelial y lograr la recuperación de la isquemia limbal subaguda; (7) prevención o tratamiento de heridas cutáneas subagudas o crónicas, que incluyen, por ejemplo, úlceras diabéticas, en las que, a modo de ejemplo, la prevención de la muerte continua de los vasos sanguíneos permitirá la recuperación de la isquemia tisular; (8) tratamiento de heridas crónicas, que incluyen, por ejemplo, úlceras diabéticas en las que, a modo de ejemplo, la expresión continuada de conexina 43, por ejemplo, en el borde principal, evita la reepitelización; (9) prevención o tratamiento de la isquemia perinatal mediante el uso de los péptidos miméticos de conexina, que pueden, por ejemplo, administrarse directamente a los ventrículos del cerebro o por medio de la columna vertebral y/o la médula espinal; (10) inhibición o prevención del edema después de isquemia perinatal mediante el uso de los péptidos miméticos de conexina administrados, por ejemplo, directamente a los ventrículos del cerebro o por medio de la columna vertebral y/o la médula espinal; (11) tratamiento para la isquemia perinatal mediante el uso de los péptidos miméticos de conexina administrados por vía sistémica, por ejemplo; (12)

- tratamiento del accidente cerebrovascular o isquemia del CNS mediante el uso de los péptidos miméticos de conexina administrados, por ejemplo, sistémicamente y/o directamente a los ventrículos del cerebro o mediante la columna vertebral y/o la médula espinal; (13) prevención de la actividad epileptiforme (por ejemplo, epilepsia) en el cerebro, que incluye la actividad epileptiforme después de la isquemia; y/o, (14) prevención de la diseminación de la lesión, edema (y rechazo) con reperusión después del trasplante de órganos. Se describen compuestos anticonexina capaces de unir o modular las conexinas y las uniones de intersticio para la prevención y/o el tratamiento de tales métodos e indicaciones.
- 5
- Puede administrarse un compuesto anticonexina en diversos momentos predeterminados.
- 10
- En determinados casos descritos, se inhibe una actividad, acción, expresión o formación de hemicanal de conexina en las células endoteliales.
- 15
- En determinados casos descritos, se inhibe una actividad, acción, expresión o formación de hemicanal de conexina en las células epiteliales.
- 20
- En determinados casos descritos, un sujeto puede tratarse por un trastorno vascular que comprende un accidente cerebrovascular.
- 25
- En determinados casos descritos, un sujeto tratado en la presente descripción está en riesgo de pérdida de la función neurológica por isquemia.
- 30
- En determinados casos descritos, un sujeto puede tratarse por un trastorno vascular que comprende tratar o mejorar la muerte celular o la degeneración en el sistema nervioso central o periférico que puede ser causada por una isquemia.
- 35
- En determinados casos descritos, un sujeto puede tratarse por un trastorno vascular en donde se administra un compuesto anticonexina, por ejemplo, un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro péptido de unión, junto con un procedimiento vascular o coronario realizado en un sujeto. En otros casos descritos, se administra un compuesto anticonexina, por ejemplo, un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro péptido de unión durante dicho procedimiento vascular o coronario. El compuesto anticonexina puede administrarse, además, antes o después de un procedimiento vascular o coronario, o ambos.
- 40
- En determinados casos descritos, un compuesto anticonexina, que incluye un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro péptido de unión, se administra dentro de aproximadamente 1 hora después que se realiza un procedimiento vascular o coronario, o, por ejemplo, dentro de aproximadamente 2 horas después que se realiza un procedimiento vascular o coronario. En otros casos descritos, el compuesto anticonexina se administra dentro de aproximadamente 24 horas. Los compuestos anticonexina pueden administrarse, además, fuera de estos límites de tiempo, según sea conveniente o necesario.
- 45
- En determinados casos descritos, un compuesto anticonexina, que incluye un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro péptido de unión, se administra junto con un procedimiento cardíaco, tal como cirugía cardíaca, realizado en un paciente.
- 50
- En determinados casos descritos, se administra un compuesto anticonexina, que incluye un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro péptido de unión junto con un dispositivo médico para realizar un procedimiento vascular u otro.
- 55
- En otros casos, se describe una formulación farmacéutica para la administración a un sujeto, la formulación comprende un vehículo aceptable farmacéuticamente y un agente capaz de modular un hemicanal de conexina y la formación posterior del conexón, tal como, por ejemplo, mediante el bloqueo o la mejora de la expresión, formación, acción, y/o actividad del hemicanal.
- Breve descripción de las figuras
- 60
- La Figura 1 muestra segmentos de la médula espinal de rata 24 horas después de colocarlos en cultivo organotípico. En la médula control (Figura 1A) se observa una inflamación significativa en los extremos del corte (las líneas punteadas marcan los cortes originales). El segmento tratado con el ODN antisentido específico de conexina 43 (Figura 1B) muestra poca inflamación o edema.
- 65
- La Figura 2 muestra la tinción con azul de coomassie de secciones de resina de la médula espinal de control después de 24 horas en el cultivo organotípico. Las neuronas están vacuoladas y edematosas con "ampollas" evidentes a lo

largo de la membrana donde se abren los hemicanales y permiten que los fluidos extracelulares ingresen a la célula (flechas).

5 La Figura 3 muestra el marcaje inmunohistoquímico de conexina 43 mediante el uso de anticuerpos que se unen al lazo extracelular (anticuerpos Gap7M mostrado en verde en la Figura 3A) y a la cola del carboxilo citoplásmico de la proteína (mostrado en rojo en la Figura 3A). El anticuerpo citoplasmático marca todas las proteínas conexina 43 (rojo), y el Gap7M solo puede marcar los lazos extracelulares expuestos de los hemicanales (verde), ya que está impedido estéricamente de unirse a los conexones acoplados que están formando canales intactos entre las células. La Figura 3B muestra un marcaje doble con los dos anticuerpos en la médula espinal, 24 horas después de una herida por aplastamiento. La mayor parte del marcaje aparece en color amarillo donde los dos anticuerpos se localizan juntos, lo que indica que una porción significativa de la proteína presente no se ha acoplado a los conexones de las células vecinas y permanecen como hemicanales. Los ODN antisentido específicos de conexina 43 evitan la traducción de proteínas y se ven pocos hemicanales en las médulas tratadas (Figura 3C).

15 La Figura 4 muestra el marcaje de Isolectina B4 de un corte de tejido de una médula espinal que había estado en el cultivo organotípico durante cinco días. La lectina se une a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y a las microglías. Los vasos capilares en este segmento tratado con ODN antisentido específico de conexina 43 permanecen intactos después de cinco días (flechas). En las médulas de control, pocos vasos permanecen completamente intactos después de dos días; a los cinco días, el marcaje predominante en los controles es el de células gliales con fenotipo de macrófago activado.

25 La Figura 5 muestra secciones de tejido de la médula espinal 5 mm rostral a una herida por aplastamiento. Cuatro horas después del aplastamiento de la médula, se inyectó BSA marcado con FITC en la vena de la cola del animal, y después el tejido se retiró y se seccionó. En la médula de control (Figura 5A), la tinción se ha filtrado ampliamente desde los vasos sanguíneos, hasta 5 mm desde el sitio de la lesión, lo que indica la ruptura de las paredes de los vasos capilares sanguíneos y la ruptura de la barrera hematoencefálica. En la médula tratada con el antisentido ODN específico de conexina 43 (Figura 5B) hay muy poca tinción que no está contenida dentro de los capilares, lo que indica que se retuvo la integridad del vaso.

30 La Figura 6 muestra el triple marcaje del tejido cardíaco de oveja en la pared del ventrículo del corazón de oveja adyacente al tejido de infarto isquémico 24 horas después del infarto, y dentro del infarto. El tejido está marcado con Isolectina B4 que muestra las células endoteliales de los vasos sanguíneos (azul), con anticuerpos contra la conexina 43 (rojo) y con anticuerpos contra Gap7M (verde). Los anticuerpos contra Gap7M reconocen las regiones conservadas del lazo extracelular de las proteínas conexina (no específicos de la isoforma de conexina), pero marcan los hemicanales (se les impide estéricamente acceder a su epítipo en los canales intactos). La Figura 6A muestra un conjunto de cuatro imágenes de tejido distante a la región infartada que muestra el marcaje de Isolectina B4 de capilares (azul - superior izquierda) y uniones de intersticio de conexina 43 en los discos intercalados de miocitos (inferior izquierda - rojo). Prácticamente no hay marcaje específico de GAP7M de los hemicanales (arriba a la derecha - verde). La imagen inferior derecha es una fusión de las otras tres. Los vasos sanguíneos permanecen intactos y no hay signos de daño a los propios miocitos. En la Figura 6B, se muestra una región aún alejada pero más cercana al infarto. En este panel de 4 partes se muestran los mismos tres marcajes y la imagen fusionada. La mayoría de los vasos todavía están intactos, pero las paredes de los vasos están interrumpidas en áreas. En estas áreas, el marcaje del hemicanal se localiza junto con las paredes de los vasos rotos. El último panel de cuatro imágenes (Figura 6C) está dentro de la propia área del infarto. Pocos capilares permanecen intactos aparentemente después de la expresión extensa del hemicanal. El marcaje de conexina 43 se torna disperso y ya no está contenido en los discos intercalados, lo que indica que los miocitos se han dañado gravemente. En todos los casos, el marcaje del anticuerpo Gap7M no se localiza junto con el marcaje de conexina 43 (como lo hace en la médula espinal), lo que indica que se trata de una isoforma diferente de la proteína de unión de intersticio, muy probablemente la conexina 45.

50 La Figura 7 muestra la localización conjunta de Isolectina B4 (verde) que marca las células endoteliales de los capilares y el marcaje de anticuerpos de miomesina (rojo) que marca las líneas M en los sarcómeros de los miocitos en un infarto 24 horas después de la isquemia. Esta región es la misma que la que se muestra en la Figura 6C. Los capilares sanguíneos están completamente interrumpidos y el patrón de bandas sarcoméricas de miocitos normales se ha destruido, lo que indica que la muerte de las células musculares está ocurriendo en paralelo con la desintegración de la pared del vaso. La imagen superior en el panel muestra la Isolectina B4, la imagen central el marcaje de miomesina, y la imagen inferior es una fusión de esas dos.

60 La Figura 8 muestra un gráfico de barras que representa el porcentaje de inflamación en comparación con las áreas totales del segmento de la médula espinal. Se muestran un segmento del control (solamente el medio), los segmentos tratados con péptidos VDCFLSRPTEKT (SEQ ID NO:35) y SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36) que se mostraron en los experimentos de captación de colorantes para bloquear los hemicanales (mostrados como los péptidos 4 y 5 respectivamente en la Figura 8), y un segmento tratado con el péptido QQPGCENVCYDK (SEQ ID NO:39) que no bloqueó los hemicanales (mostrado como el péptido 8 en la Figura 8). El péptido SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36, péptido 5 en la Figura 8), un bloqueador superior basado en estudios histológicos, se usó en 5 concentraciones diferentes, la más baja de las cuales fue la más efectiva para reducir el edema.

La Figura 9 muestra el marcaje de hemicanal de conexina en cerebros de fetos de ovejas casi a término de un control simulado (izquierda) y 24 h después de 30 min. de isquemia cerebral (derecha), mediante el uso de un anticuerpo que reconoce las regiones del lazo extracelular de las proteínas conexinas. En el cerebro control, no se observa el marcaje del hemicanal de conexina, mientras que después de la isquemia hay una regulación positiva extensa de los hemicanales. La expresión de hemicanal es especialmente alta en los cuerpos celulares (flechas horizontales) y en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (flechas verticales). La conexina principal regulada después de la isquemia es la conexina 43.

La Figura 10 muestra ejemplos de infusión i.c.v. de CSF artificial o la infusión de péptidos que comienza 90 minutos después de un episodio de 30 minutos de isquemia cerebral en fetos de ovejas casi a término. La infusión en estos animales se continuó hasta 72 h después de la isquemia. El animal de la infusión de vehículo (CSF artificial) (izquierda) muestra un comienzo retardado de convulsiones graves y continuas (estado epiléptico; se muestra un ejemplo en el recuadro de inserción, arriba), seguido de un aumento progresivo de la impedancia cortical (abajo, una medida de la inflamación de la célula) máximo a las 48 h. Las convulsiones se resolvieron en aproximadamente 48 h. La infusión del peptidomimético (derecha) cambió los eventos convulsivos, de continuos a eventos convulsivos discretos, separados de comienzo tardío. Hubo un aumento notablemente retrasado y atenuado de la impedancia cerebral.

La Figura 11 muestra curvas de dosis respuesta para la inflamación del tejido del nervio óptico (Figura 11A) y la muerte celular (Figura 11B) en el control, y con concentraciones del AS-ODN específico de conexina 43 de 2,5, 5 y 10 μM . Ambos parámetros exhiben una tendencia decreciente con el aumento de la concentración. A 10 μM , la inflamación del tejido se reduce tan pronto como a las 6 h después del tratamiento, y en un 69 % a las 24 h en comparación con el control. La muerte celular en el segmento frontal y medio del nervio óptico disminuye con los tratamientos del antisentido.

La Figura 12 muestra el porcentaje de inflamación en el control y en los nervios ópticos tratados con AS-ODN (n=6 para todos los puntos de tiempo). El edema es más prominente en el tejido del control y la diferencia es estadísticamente significativa en todos los puntos de tiempo investigados. Los asteriscos indican significación estadística entre los dos grupos.

Figura 13: (Panel superior) Tinción con yoduro de propidio de células muertas en el medio del control (A, B, C) y en los segmentos de nervio óptico tratados con el AS-ODN (D, E, F) a las 2, 6 y 24 horas después de la inducción isquémica. El grupo tratado con el AS-ODN específico de conexina 43 exhibe poca tinción en comparación con los controles en los tres puntos de tiempo (panel inferior). Gráfico de líneas que muestra el número de células muertas por unidad de área en la región medial del nervio para el control y los nervios ópticos tratados con el AS-ODN. La muerte celular en el grupo de control aumenta inicialmente, alcanza su punto máximo a las seis horas y después disminuye (se cree que refleja el edema tisular que deja menos células por unidad de área). Solo se observó un ligero aumento en la muerte celular incluso después de 24 horas en cultivo para el tejido tratado con el AS-ODN. Los asteriscos indican significación estadística entre los tratamientos.

La Figura 14 muestra la media de la longitud del segmento de los vasos sanguíneos en el control (verde) y los nervios ópticos tratados con el antisentido específicos de conexina 43 (azul). En todos los puntos de tiempo, los nervios tratados con antisentido tienen segmentos más largos que indican una menor ruptura de los vasos como un resultado de la expresión de conexina, presumiblemente en la forma de hemicanales, o mediante un efecto circunstancial mediado por unión de intersticio.

Todos los colores a los que se hace referencia en la presente descripción están representados en una escala de grises en las figuras en blanco y negro correspondientes.

Descripción detallada

La práctica de las presentes invenciones puede incluir o emplear diversas técnicas convencionales de biología molecular (que incluye técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos, e inmunología, que están dentro de la habilidad de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, e incluyen, pero no se limitan a, a modo de ejemplo solamente, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook y otros, 1989) y Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook and Russel, 2001), referidos en la presente descripción juntos o individualmente como "Sambrook"; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel y otros, eds., 1987, que incluyen los suplementos hasta el 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis y otros, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan y otros, eds., 1991); The Immunoassay Handbook (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); Bioconjugate Techniques (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); Methods of Immunological Analysis (R. Masseyeff, W. H. Albert, and N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, y Harlow and Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (referidos en la presente descripción juntos o individualmente como Harlow and Lane), Beaucage y otros eds., Current Protocols in

Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000); y Agrawal, ed., Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties Humana Press Inc., Nueva Jersey, 1993).

Definiciones

Antes de describir más a fondo las invenciones en general y en términos de diversas modalidades específicas no limitantes, se exponen determinados términos usados en el contexto de la descripción de la invención. A menos que se indique de cualquier otra manera, los siguientes términos tienen los siguientes significados cuando se usan en la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas. Los términos que no se definen más abajo o en otra parte en la especificación tendrán su significado reconocido en la técnica.

Los aminoácidos usados en los compuestos descritos en la presente descripción (por ejemplo, péptidos y proteínas) pueden ser aminoácidos codificados genéticamente, aminoácidos de origen natural no codificados genéticamente, o aminoácidos sintéticos. Tanto los enantiómeros L como D de cualquiera de los anteriores pueden usarse en los compuestos. Las siguientes abreviaturas pueden usarse en la presente descripción para los siguientes aminoácidos codificados genéticamente (y los residuos de estos): alanina (Ala, A); arginina (Arg, R); asparagina (Asn, N); ácido aspártico (Asp, D); cisteína (Cys, C); glicina (Gly, G); ácido glutámico (Glu, E); glutamina (Gln, Q); histidina (His, H); isoleucina (Ile, I); leucina (Leu, L); lisina (Lys, K); metionina (Met, M); fenilalanina (Phe, F); prolina (Pro, P); serina (Ser, S); treonina (Thr, T); triptófano (Trp, W); tirosina (Tyr, Y); y valina (Val, V).

Determinados aminoácidos comúnmente encontrados que no están codificados genéticamente y que pueden estar presentes en los compuestos útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, β -alanina (b-Ala) y otros omega-aminoácidos tales como el ácido 3-aminopropiónico (Dap), ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr, Z), ácido 4-aminobutírico, etcétera; ácido α -aminoisobutírico (Aib); ácido ϵ -aminohexanoico (Aha); ácido δ -aminovalérico (Ava); metilglicina (MeGly); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (t-BuA); t-butilglicina (t-BuG); N-metilisoleucina (Melle); fenilglicina (Phg); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle, J); 2-naftilalanina (2-Nal); 4-clorofenilalanina (Phe(4-Cl)); 2-fluorofenilalanina (Phe(2-F)); 3-fluorofenilalanina (Phe(3-F)); 4-fluorofenilalanina (Phe(4-F)); penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (Tic); beta.-2-tienilalanina (Thi); sulfóxido de metionina (MSO); homoarginina (hArg); N-acetil lisina (AcLys); ácido 2,3-diaminobutírico (Dab); ácido 2,3-diaminobutírico (Dbu); p-aminofenilalanina (Phe(pNH₂)); N-metil valina (MeVal); homocisteína (hCys); 3-benzotiazol-2-il-alanina (BztAla, B); y homoserina (hSer), los análogos de aminoácidos adicionales contemplados incluyen fosfoserina, fosfotreonina, fosfotirosina, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, ácido hipúrico, ácido octahidroindol-2-carboxílico, estatina, α -metil-alanina, para-benzoil-fenilalanina, propargilglicina, y sarcosina. Los péptidos que están abarcados dentro del alcance de la invención pueden tener cualquiera de los aminoácidos anteriores en la configuración L o D, o cualquier otro aminoácido descrito en la presente descripción o conocido en la técnica, ya sea actualmente o en el futuro.

Los aminoácidos que son sustituibles entre sí generalmente residen dentro de clases o subclases similares. Como conoce un experto en la técnica, los aminoácidos pueden colocarse en diferentes clases en dependencia principalmente de las propiedades químicas y físicas de la cadena lateral del aminoácido. Por ejemplo, algunos aminoácidos generalmente se consideran aminoácidos hidrófilos o polares y otros se consideran aminoácidos hidrófobos o no polares. Los aminoácidos polares incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas, básicas o hidrófilas y los aminoácidos no polares incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas o hidrófobas. Los aminoácidos no polares pueden subdividirse adicionalmente para incluir, entre otros, los aminoácidos alifáticos. Las definiciones de las clases de aminoácidos como se usan en la presente descripción son las siguientes:

"Aminoácido no polar" se refiere a un aminoácido que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, que no es polar y que generalmente es repelida por una solución acuosa. Los ejemplos de aminoácidos hidrófobos codificados genéticamente incluyen Ala, Ile, Leu, Met, Trp, Tyr y Val. Los ejemplos de aminoácidos no polares no codificados genéticamente incluyen t-BuA, Cha y Nle.

"Aminoácido aromático" se refiere a un aminoácido no polar que tiene una cadena lateral que contiene al menos un anillo que tiene un sistema de electrones π conjugado (grupo aromático). El grupo aromático puede sustituirse adicionalmente con grupos sustituyentes tales como grupos alquilo, alqueno, alquino, hidroxilo, sulfonilo, nitro y amino, así como también otros. Los ejemplos de aminoácidos aromáticos codificados genéticamente incluyen fenilalanina, tirosina y triptófano. Los aminoácidos aromáticos no codificados genéticamente que se encuentran comúnmente incluyen fenilglicina, 2-naftilalanina, β -2-tienilalanina, 3-benzotiazol-2-il-alanina, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, 4-clorofenilalanina, 2-fluorofenilalanina, 3-fluorofenilalanina y 4-fluorofenilalanina.

"Aminoácido Alifático" se refiere a un aminoácido no polar que tiene una cadena lateral de cadena de hidrocarburo lineal saturada o insaturada, ramificada o cíclica. Los ejemplos de aminoácidos alifáticos codificados genéticamente incluyen Ala, Leu, Val e Ile. Los ejemplos de aminoácidos alifáticos no codificados incluyen Nle.

"Aminoácido Polar" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que está cargada o descargada a pH fisiológico y que tiene un enlace en el que el par de electrones compartidos en común por dos átomos está más cerca de uno de los átomos. Los aminoácidos polares son generalmente hidrófilos, lo que significa que tienen un aminoácido que tiene una cadena lateral que es atraída por una solución acuosa. Los ejemplos de aminoácidos polares

codificados genéticamente incluyen asparagina, cisteína, glutamina, lisina y serina. Los ejemplos de aminoácidos polares no codificados genéticamente incluyen citrulina, homocisteína, N-acetil lisina y sulfóxido de metionina.

5 "Aminoácido Ácido" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor de pK de cadena lateral de menos de 7. Los aminoácidos ácidos, típicamente, tienen cadenas laterales cargadas negativamente a pH fisiológico debido a la pérdida de un ion hidrógeno. Los ejemplos de aminoácidos ácidos codificados genéticamente incluyen ácido aspártico (aspartato) y ácido glutámico (glutamato).

10 "Aminoácido Básico" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor de pK de cadena lateral mayor que 7. Los aminoácidos básicos, típicamente, tienen cadenas laterales cargadas positivamente a pH fisiológico debido a la asociación con el ion hidronio. Los ejemplos de aminoácidos básicos codificados genéticamente incluyen arginina, lisina e histidina. Los ejemplos de aminoácidos básicos no codificados genéticamente incluyen ornitina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,4-diaminobutírico y homoarginina.

15 "Aminoácido Ionizable" se refiere a un aminoácido que puede cargarse a un pH fisiológico. Tales aminoácidos ionizables incluyen aminoácidos ácidos y básicos, por ejemplo, ácido D-aspártico, ácido D-glutámico, D-histidina, D-arginina, D-lisina, D-hidroxilisina, D-ornitina, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, L-histidina, L-arginina, L-lisina, L-hidroxilisina o L-ornitina.

20 Como se apreciará por los expertos en la técnica, las clasificaciones anteriores no son absolutas. Numerosos aminoácidos exhiben más de una propiedad característica y, por lo tanto, pueden incluirse en más de una categoría. Por ejemplo, la tirosina tiene un anillo aromático no polar y un grupo hidroxilo polar. Por lo tanto, la tirosina tiene numerosas características que podría describirse como no polar, aromático y polar. Sin embargo, el anillo no polar es dominante y, por lo tanto, la tirosina generalmente se considera no polar. De manera similar, además de poder formar enlaces disulfuro, la cisteína tiene, además, un carácter no polar. Por lo tanto, aunque no se clasifica estrictamente como un aminoácido hidrófobo o no polar, en muchos casos la cisteína puede usarse para conferir hidrofobicidad o no polaridad a un péptido.

30 En algunas modalidades, los aminoácidos polares contemplados por la presente invención incluyen, por ejemplo, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, histidina, homocisteína, lisina, hidroxilisina, ornitina, serina, treonina y aminoácidos relacionados estructuralmente. En una modalidad, el amino polar es un aminoácido ionizable tal como arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, hidroxilisina, lisina, u ornitina.

35 Los ejemplos de residuos de aminoácidos polares o no polares que pueden usarse incluyen, por ejemplo, alanina, valina, leucina, metionina, isoleucina, fenilalanina, triptófano, tirosina y similares.

40 Los "compuestos anticonexina" incluyen aquellos compuestos que afectan o modulan la actividad, expresión o formación de una conexina, un hemicanal de conexina (conexón), o una unión de intersticio. Los compuestos anticonexina incluyen, sin limitación, compuestos antisentido (por ejemplo, polinucleótidos antisentido), anticuerpos y fragmentos de unión de estos, y péptidos y polipéptidos que incluyen "peptidomiméticos" y "péptidos miméticos".

45 Los "compuestos antisentido" incluyen diferentes tipos de moléculas que actúan para inhibir la expresión génica, la traducción, o la función, que incluyen las que actúan mediante el direccionamiento específico de secuencia de ARNm para aplicaciones terapéuticas. Los compuestos antisentido incluyen compuestos de ADN antisentido y compuestos de ARN antisentido. Mientras que los oligonucleótidos antisentido son una forma preferida de compuesto antisentido, la presente invención comprende otros compuestos antisentido oligoméricos, que incluyen, pero no se limitan a miméticos de oligonucleótidos. Los compuestos antisentido de acuerdo con esta invención comprenden, preferentemente, de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 bases nucleotídicas (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleósidos unidos). Los compuestos antisentido particularmente preferidos son oligonucleótidos antisentido, incluso con mayor preferencia aquellos que comprenden de aproximadamente 12 a aproximadamente 30 bases nucleotídicas. Los compuestos antisentido incluyen ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS) (oligozimas), y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que se hibridan con el ácido nucleico diana y modulan su expresión. Además, incluyen oligodesoxinucleótidos de fosforioato (S-ODN).

55 Por lo tanto, los compuestos antisentido incluyen, por ejemplo, las principales moléculas de silenciamiento génico basadas en ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, ácidos oligodesoxirribonucleicos antisentido (ODN) modificados químicamente, ribozimas y siARN (Scherer, LJ y Rossi, JJ Nature Biotechnol. 21: 1457-1465 (2003). Los compuestos antisentido pueden incluir, además, moléculas antisentido tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (Braasch, D. A. and Corey, D. R., Biochemistry 41,4503-4510 (2002)), fosforodiamidatos de morfolino (Heasman, J., Dev. Biol., 243, 209-214 (2002), DNazymes (Schubert, S. y otros, Nucleic Acids Res. 31, 5982-5992 (2003). Chakraborti, S. and Banerjee, A. C., Mol. Ther. 7, 817-826 (2003), Santoro, S. W. and Joyce, G. F. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94, 4262-4266 (1997), y los ARN nucleares pequeños U1 mutados en el extremo 5' desarrollados recientemente (Fortes, P. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 8264-8269 (2003).

65

El término "secuencias antisentido" se refiere a polinucleótidos que tienen actividad de compuesto antisentido e incluyen, pero no se limitan a, secuencias complementarias o parcialmente complementarias o correspondientes a, por ejemplo, una secuencia de ARN. Por lo tanto, las secuencias antisentido incluyen, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico que se unen al ARNm o porciones de este para bloquear la transcripción del ARNm por los ribosomas. Los métodos antisentido son, generalmente, bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Publicación PCT WO94/12633y Nielsen y otros, Science 254:1497 (1991); Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, editado por F. Eckstein, IRL Press en Oxford University Press (1991); Antisense Research and Applications (1993, CRC Press. Las secuencias antisentido para dianas escogidas pueden, o no pueden, resultar en una unión no específica a las secuencias que no son dianas. Se prefieren las secuencias antisentido con una unión no específica mínima, nula, o no detectable a las secuencias que no son dianas.

Como se usa en la presente descripción, "ARN mensajero" incluye no solo la información de secuencia para codificar una proteína mediante el uso del código genético de tres letras, sino además, secuencias de ribonucleótidos asociadas que forman la región no traducida 5', la región no traducida 3' y la región del casquete 5', así como también secuencias de ribonucleótidos que forman diversas estructuras secundarias. Los oligonucleótidos pueden formularse de acuerdo con esta invención, los que están dirigidos total o parcialmente a cualquiera de estas secuencias.

En general, los ácidos nucleicos (que incluyen los oligonucleótidos) pueden describirse como "similares al ADN" (es decir, que tienen azúcares 2'-desoxi y, generalmente, bases T en lugar de U) o "similares al ARN" (es decir, que tiene azúcares 2'-hidroxilo o 2'-modificadas y, generalmente, bases U en lugar de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen una estructura similar a la forma B son "similares al ADN" y aquellos que tienen una estructura similar a la forma A son "similares al ARN".

El término "complementario" generalmente se refiere a la unión natural de polinucleótidos mediante apareamiento de bases, por ejemplo, bajo condiciones permisivas de sales y temperatura. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" se une a la secuencia complementaria "T-C-A". La complementariedad entre dos moléculas monocatenarias puede ser "parcial", de manera que solo algunos de los ácidos nucleicos se unen, o puede ser "completa", de manera que exista una complementariedad total entre las moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre las moléculas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficiencia y la fuerza de la hibridación entre ellas. "Hibridable" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad de manera que la unión, preferentemente, la unión estable suficiente para realizar una acción prevista, por ejemplo, se produce entre el ADN o ARN diana y el oligonucleótido. Se entiende que un oligonucleótido no necesita ser 100 % complementario a su secuencia de ácido nucleico diana para ser hibridable, y además, se entiende que la unión puede ser específica a la diana, o puede unirse a otras moléculas no diana siempre que la unión no específica no frustre de manera significativa o inconveniente el objetivo terapéutico u otro objetivo. Se usa un oligonucleótido para interferir con la función normal de la molécula diana para causar una pérdida o disminución de la actividad, y se prefiere que haya un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica o no deseada del oligonucleótido a las secuencias que no son diana en condiciones en las que es conveniente una unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos o tratamiento terapéutico *in vivo* o, en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos. No se requiere complementariedad absoluta. Generalmente, se prefieren los polinucleótidos que tienen suficiente complementariedad para formar un dúplex que tiene una temperatura de fusión superior a 20 °C, 30 °C, o 40 °C en condiciones fisiológicas.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con una molécula o composición útil en la invención, que incluye las descritas o reivindicadas en la presente descripción. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Como se usa en la presente descripción, "sujeto" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, que incluye humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos, o mascotas, tal como perros, caballos, gatos, ovejas, cerdos, vacas, *etcétera*. El sujeto preferido es un humano.

El "direccionamiento" de un oligonucleótido a un ácido nucleico diana elegido puede ser un proceso de múltiples etapas. El proceso puede comenzar con la identificación de una secuencia de ácido nucleico cuya función debe modularse. Esto puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm hecho a partir del gen) cuya expresión se asocia con un estado particular de enfermedad. El proceso de direccionamiento puede incluir, además, la determinación de un sitio o sitios dentro de la secuencia de ácido nucleico para que ocurra la interacción del oligonucleótido de manera que resultará el efecto conveniente, es decir, la inhibición de la expresión de proteínas, modulación de la actividad, *etcétera*. Una vez que se ha identificado un sitio o sitios diana, los compuestos antisentido (*por ejemplo*, oligonucleótidos) se eligen de manera que sean suficientemente o convenientemente complementarios a la diana, es decir, hibridan suficientemente y con una especificidad adecuada o de cualquier otra manera conveniente, para proporcionar una actividad deseada. En la presente invención, las dianas incluyen moléculas de ácido nucleico codificantes para conexina 43. El proceso de direccionamiento puede incluir, además, la determinación de un sitio o sitios para que ocurra la interacción antisentido de manera que resultará el efecto conveniente. Un sitio intragénico preferido, por ejemplo, es la región que abarca el codón de iniciación o de terminación de la traducción del marco abierto de lectura (ORF) del gen. El codón de iniciación de la traducción es, típicamente, 5'-AUG (en moléculas de

- ARNm transcritas; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), y puede denominarse, además, como el "codón AUG", "el codón de inicio" o "codón de inicio AUG." Una minoría de genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y 5'-AUA. Se ha demostrado que 5'-ACG y 5'-CUG funcionan in vivo. Por lo tanto, los términos "codón de iniciación de la traducción" y "codón de inicio" pueden abarcar muchas
- 5 secuencias de codones, incluso aunque el aminoácido iniciador en cada caso es, típicamente, metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Además, se conoce en la técnica que los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, cualquiera de los cuales puede usarse, preferentemente, para el inicio de la traducción en un tipo de célula o tejido particular, o bajo un conjunto particular de condiciones.
- 10 El término "oligonucleótido" incluye un oligómero o polímero de nucleótidos o monómeros de nucleósidos que consisten en bases, azúcares y enlaces interazúcar (cadena principal) de origen natural. El término "oligonucleótido" incluye, además, oligómeros o polímeros que comprenden monómeros de origen no natural, o porciones de estos, que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos a menudo se prefieren a las formas naturales debido a propiedades tales como, por ejemplo, absorción celular mejorada, estabilidad aumentada en
- 15 presencia de nucleasas, o afinidad mejorada por la diana. Se ha demostrado que numerosas modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido en el que se incorporan sea más resistente a la digestión de las nucleasas que el oligodesoxinucleótido natural (ODN). La resistencia a las nucleasas se mide rutinariamente mediante la incubación de los oligonucleótidos con extractos celulares o soluciones de nucleasas aisladas y se mide la extensión del oligonucleótido intacto que queda en el tiempo, generalmente, mediante electroforesis en gel. Los
- 20 oligonucleótidos, que se han modificado para mejorar su resistencia a las nucleasas, pueden sobrevivir intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos no modificados. Además, se ha demostrado que numerosas modificaciones aumentan la unión (afinidad) del oligonucleótido a su diana. La afinidad de un oligonucleótido por su diana se determina rutinariamente, por ejemplo, mediante la medición de la T_m (temperatura de fusión) de un par oligonucleótido/diana, que es la temperatura a la que el oligonucleótido y la diana se disocian. La disociación puede detectarse espectrofotométricamente. Cuanto mayor es la T_m, mayor es la afinidad que el oligonucleótido tiene por la
- 25 diana. En algunos casos, las modificaciones de los oligonucleótidos que mejoran la afinidad de unión a la diana son capaces, además, de mejorar la resistencia a las nucleasas.
- Un "polinucleótido" significa una pluralidad de nucleótidos. Por lo tanto, los términos "secuencia de nucleótidos" o "ácido nucleico" o "polinucleótido" u "oligonucleótido" u "oligodesoxinucleótido" todos se refieren a un heteropolímero de nucleótidos o a la secuencia de estos nucleótidos. Estas frases se refieren, además, al ADN o ARN de origen genómico o sintético que pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden representar la cadena sentido o antisentido, el ácido nucleico peptídico (ANP) o a cualquier material similar al ADN o similar al ARN.
- 30 Un polinucleótido que codifica una conexina, un fragmento de conexina, o una variante de conexina incluye un polinucleótido que codifica: la forma madura de la conexina que se encuentra en la naturaleza (y la de origen natural y especies variantes de esta); la forma madura de la conexina que se encuentra en la naturaleza y la secuencia codificante adicional, por ejemplo, una secuencia líder o de señal o una secuencia de preproteína (y la de origen natural y especies variantes de esta); cualquiera de las secuencias anteriores y las no codificantes (por ejemplo, intrones o secuencias no codificantes 5' y/o 3' de la secuencia codificante para las formas maduras del polipéptido encontrado en la naturaleza); fragmentos de la(s) forma(s) madura(s) de la conexina encontrada en la naturaleza; y, como se señaló, variantes de la(s) forma(s) madura(s) de la conexina encontrada en la naturaleza. Por lo tanto, "polinucleótido codificante de conexina" y similares abarca polinucleótidos que tienen solo una secuencia codificante para una conexina, fragmento o variante deseada, así como también polinucleótidos que incluyen otros nucleótidos
- 35 tales como secuencias codificantes y/o no codificantes adicionales.
- En el contexto de la invención, el ARN mensajero incluye no solo la información para codificar una proteína mediante el uso del código genético de tres letras, sino además, ribonucleótidos asociados que forman una región conocida por
- 40 tales expertos, como la región no traducida 5', la región no traducida 3', la región del casquete 5' y los ribonucleótidos de unión intrón/exón. Por lo tanto, los oligonucleótidos pueden formularse de acuerdo con la presente invención, estos se dirigen total o parcialmente a esos ribonucleótidos asociados, así como también a los ribonucleótidos informativos. Por lo tanto, el oligonucleótido puede hibridarse específicamente con una región del sitio de iniciación de la transcripción, una región del codón de inicio de la traducción, una región del casquete 5', una unión intrón/exón, secuencias codificantes, una región del codón de terminación de la traducción o secuencias en la región 5' o 3' no
- 45 traducida. Una minoría de genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG han demostrado funcionar in vivo. Por lo tanto, los términos "codón de iniciación de la traducción" y "codón de inicio" pueden abarcar muchas secuencias de codones, incluso aunque el aminoácido iniciador en cada caso es, típicamente, metionina (en eucariotas) o formilmetionina (procariotas). Además, se conoce en la técnica que los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, cualquiera de los cuales puede usarse, preferentemente, para el inicio de la traducción en un tipo de célula o tejido particular, o bajo un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la invención, "codón de inicio" y "codón de iniciación de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan *en vivo* para iniciar la traducción de una molécula de ARNm transcrita a partir de un gen codificante de conexina, independientemente de la(s) secuencia(s) de tales codones. Además, se conoce en la técnica que un codón de terminación de la traducción (o "codón de parada")
- 50 de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente). Los términos "región de codón de inicio", "región
- 55
- 60
- 65

AUG" y "región de codón de iniciación de la traducción" se refieren a una porción de tal ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') de un codón de iniciación de la traducción. Esta región es una región diana preferida. De manera similar, los términos "región de codón de parada" y "región de codón de terminación de la traducción" se refieren a una porción de tal ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') a partir de un codón de terminación de la traducción. Esta región es una región diana preferida. El marco abierto de lectura (ORF) o "región codificante", que se conoce en la técnica para referirse a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción es, además, una región a la que puede direccionarse eficazmente. Otras regiones diana preferidas incluyen la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la técnica por referirse a la porción de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de iniciación de la traducción, y por lo tanto que incluye nucleótidos entre el sitio del casquete 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm o los nucleótidos correspondientes en el gen y la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica por referirse a la porción de un ARNm en la dirección 3' del codón de terminación de la traducción, y por lo tanto que incluye nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm o los nucleótidos correspondientes en el gen. El casquete 5' de un ARNm comprende un residuo de guanosina metilada en N7 unido al residuo más 5' del ARNm a través de un enlace trifosfato 5'-5'. Se considera que la región del casquete 5' de un ARNm incluye la propia estructura del casquete 5' así como también los primeros 50 nucleótidos adyacentes al casquete. La región del casquete 5' puede ser, además, una región diana preferida.

Aunque algunos transcritos de ARNm eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrón." que se escinden de un transcrito pre-ARNm para producir uno o más ARNm maduros. Las regiones restantes (y por lo tanto traducidas) se conocen como "exones" y se empalman juntas para formar una secuencia continua de ARNm. Los sitios de empalme de ARNm, *es decir*, las uniones exón-exón o intrón-exón, pueden ser, además, regiones diana preferidas, y son particularmente útiles en situaciones en las que el empalme aberrante se implica en la enfermedad, o donde una sobreproducción de un producto de empalme de ARNm particular se implica en la enfermedad. Las uniones de fusión aberrantes debido a reordenamientos o deleciones son, además, dianas preferidas. Puede ser preferido, además, el direccionamiento a exones particulares en los ARNm empalmados alternativamente. Además, se descubrió que los intrones también pueden ser regiones diana eficaces y, por lo tanto, preferidas para los compuestos antisentido dirigidos, por ejemplo, al ADN o al pre-ARNm.

Los términos "peptidomimético" y "mimético" incluyen compuestos químicos sintéticos y de origen natural que pueden tener sustancialmente las mismas características estructurales y funcionales de las regiones proteicas que imitan. Para las conexinas, estas pueden imitar, por ejemplo, los lazos extracelulares de las conexinas opuestas involucrados en el acoplamiento conexón a conexón y en la formación de canales célula a célula.

Los análogos de péptidos con propiedades análogas a las del péptido molde pueden ser fármacos no peptídicos. Los "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos", que incluyen compuestos basados en péptidos, además, incluyen tales compuestos no basados en péptidos (Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29 (1986); Veber and Freidinger; TINS; 392 (1985); y Evans y otros, J. Med. Chem. 30: 1229 (1987); Beeley N., Trends Biotechnol. Jun;12(6): 213-6 (1994); Kieber-Emmons T, y otros; Curr Opin Biotechnol. Aug; 8(4): 435-41 (1997). Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico mejorado o equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente idénticos o similares a un polipéptido paradigmático (*es decir*, un polipéptido que tiene una función o actividad biológica o farmacológica), pero pueden, además, tener uno o más enlaces peptídicos reemplazados opcionalmente por un enlace seleccionado del grupo que consiste en, por ejemplo, -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, y -CH₂SO-. El mimético puede estar compuesto completamente de aminoácidos naturales, o de análogos de aminoácidos no naturales, o, es una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y de análogos de aminoácidos parcialmente no naturales. El mimético, además, puede comprender cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales siempre que tales sustituciones, además, no alteren sustancialmente la actividad mimética. Por ejemplo, una composición mimética es capaz de regular negativamente las acciones o actividades biológicas de las proteínas conexinas o conexones, tal como, por ejemplo, evitar el acoplamiento de los conexones para formar una comunicación célula a célula mediada por uniones de intersticio, o prevenir la apertura de los conexones para exponer el citoplasma celular al medio extracelular. Los peptidomiméticos, los péptidos miméticos, y los péptidos moduladores de conexina abarcan los descritos como peptidomiméticos, péptidos miméticos, y péptidos moduladores de conexina establecidos en la presente descripción, así como también los que pueden conocerse en la técnica, ya sea conocidos ahora o desarrollados posteriormente.

El término "composición" pretende abarcar un producto que comprende uno o más ingredientes.

Los términos "modulador" y "modulación" de la actividad de conexina, como se usan en la presente descripción en sus diversas formas, pretenden abarcar la inhibición, en todo o en parte, de la expresión o acción o actividad de una conexina. Tales moduladores incluyen moléculas pequeñas antagonistas de la función o expresión de conexina, moléculas antisentido, ribozimas, moléculas triples, y polinucleótidos de ARNi, métodos de terapia génica, *etcétera*, y otros.

La frase "porcentaje (%) de identidad" se refiere al porcentaje de similitud de secuencia que se encuentra en una comparación de dos o más secuencias. El porcentaje de identidad puede determinarse electrónicamente, por ejemplo, mediante el uso de cualquier programa informático adecuado. Igualmente, la "similitud" entre dos secuencias (o una o más porciones de una o ambas de estas) se determina mediante la comparación de secuencia de una secuencia con respecto a una segunda secuencia.

Los compuestos "aceptables farmacéuticamente" y otros ingredientes de una composición o formulación, por ejemplo, un vehículo, diluyente o excipiente, son aquellos que son adecuados para la administración a un receptor de estos.

Generalmente, el término "proteína" se refiere a cualquier polímero de dos o más aminoácidos individuales (ya sea de origen natural o no) unidos mediante enlaces peptídicos, como ocurre cuando el átomo de carbono carboxilo del grupo del ácido carboxílico unido al carbono alfa de un aminoácido (o residuo de aminoácido) se une covalentemente al átomo de nitrógeno amino del grupo amino unido al carbono alfa de un aminoácido adyacente. Estas uniones de enlaces peptídicos, y los átomos que los comprenden (es decir, los átomos de carbono alfa, los átomos del carbono carboxilo (y sus átomos de oxígeno sustituyentes) y los átomos del nitrógeno amino (y sus átomos de hidrógeno sustituyentes) forman el "esqueleto polipeptídico" de la proteína. Además, como se usa en la presente descripción, se entiende que el término "proteína" incluye los términos "polipéptido" y "péptido" (que, a veces, pueden usarse indistintamente en la presente descripción). De manera similar, los fragmentos de proteínas, análogos, derivados y variantes pueden denominarse en la presente descripción como "proteínas", y se considerarán como una "proteína" a menos que se indique de cualquier otra manera. El término "fragmento" de una proteína se refiere a un polipéptido que comprende menos que todos los residuos de aminoácidos de la proteína. Un "dominio" de una proteína es, además, un fragmento, y comprende los residuos de aminoácidos de la proteína que a menudo se requieren para conferir actividad o función.

El término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones que permiten la hibridación entre polinucleótidos. Las condiciones rigurosas pueden definirse por la concentración de sales, la concentración de solvente orgánico (por ejemplo, formamida), la temperatura, y otras condiciones bien conocidas en la técnica. La rigurosidad puede aumentarse mediante la disminución de la concentración de sales, aumentando la concentración de disolventes orgánicos (por ejemplo, formamida), o aumentando la temperatura de hibridación. Por ejemplo, la concentración de sales rigurosa normalmente será menos de aproximadamente NaCl 750 mM y citrato trisódico 75 mM, preferentemente, menos de aproximadamente NaCl 500 mM y citrato trisódico 50 mM, y con la máxima preferencia menos de aproximadamente NaCl 250 mM y citrato trisódico 25 mM. La hibridación de baja rigurosidad puede obtenerse en ausencia de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que la hibridación de alta rigurosidad puede obtenerse en presencia de un disolvente orgánico (por ejemplo, al menos aproximadamente 35 % de formamida, con la máxima preferencia al menos aproximadamente 50 % formamida). Las condiciones de temperatura rigurosas normalmente incluirán temperaturas de al menos aproximadamente 30 °C, con mayor preferencia de al menos aproximadamente 37 °C, y con la máxima preferencia de al menos aproximadamente 42 °C. La variación de diversos parámetros adicionales, por ejemplo, el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS), y la inclusión o exclusión de ADN portador, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Se logran diversos niveles de rigurosidad mediante la combinación de estas diversas condiciones según sea necesario, y están dentro de la habilidad en la técnica. Las condiciones de hibridación rigurosas pueden definirse, además, por las condiciones en un intervalo de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 20 °C o 25 °C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de la secuencia diana y una sonda con complementariedad exacta o casi exacta a la diana. Como se usa en la presente descripción, la temperatura de fusión es la temperatura a la que una población de moléculas de ácido nucleico bicatenario se disocia a la mitad, en cadenas simples. Los métodos para calcular la T_m de los ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Berger and Kimmel, Methods In Enzymology, Vol. 152: Guide To Molecular Cloning Techniques, San Diego (1987): Academic Press, Inc. y Sambrook y otros, Molecular Cloning (1989): A Laboratory Manual, 2da Ed., Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory). Como lo indican las referencias estándar, un estimado simple del valor de la T_m puede calcularse mediante la ecuación: $T_m = 81,5 + 0,41(\% G + C)$, cuando un ácido nucleico está en solución acuosa a 1 M de NaCl (ver, por ejemplo, Anderson and Young, "Quantitative Filter Hybridization" in Nucleic Acid Hybridization (1985)). La temperatura de fusión de un híbrido (y, por lo tanto, las condiciones para la hibridación rigurosa) se afecta por diversos factores, tales como la longitud y la naturaleza (ADN, ARN, composición de bases) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición de bases, si está presente en solución o inmovilizado, y similares), y la concentración de sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol). Los efectos de estos factores son bien conocidos y se discuten en las referencias estándar en la técnica, ver, por ejemplo, Sambrook, *supra*, y Ausubel, *supra*. Típicamente, las condiciones de hibridación rigurosas son concentraciones de sales menores de aproximadamente 1,0 M de iones de sodio, típicamente, aproximadamente 0,01 a 1,0 M de iones de sodio a pH 7,0 a 8,3, y temperaturas de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). Como se señaló, las condiciones rigurosas pueden lograrse, además, con la adición de agentes desestabilizadores tales como la formamida, en cuyo caso pueden emplearse temperaturas más bajas. En la presente invención, el polinucleótido puede ser un polinucleótido que hibrida con el ARNm de la conexina 43 en condiciones de rigurosidad media a alta, tales como cloruro de sodio 0,03 M y citrato de sodio 0,03 M, de aproximadamente 50 a aproximadamente 60 grados centígrados.

El término "cantidad con eficacia terapéutica" significa la cantidad del compuesto objetivo que provocará una respuesta conveniente, por ejemplo, una respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que se busca, por ejemplo, por un investigador, veterinario, doctor en medicina, u otro clínico.

5 "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como también aquellos en los que debe prevenirse el trastorno.

10 El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico vehículo para la amplificación, replicación y/o expresión en forma de un plásmido, fago, virus, u otro sistema (ya sea de origen natural o sintético) para el suministro de ácidos nucleicos a las células donde el plásmido, fago, o virus puede ser funcional con células huésped bacterianas, de levadura, de invertebrados y/o de mamífero. El vector puede permanecer independiente del ADN genómico de la célula huésped o puede integrarse total o parcialmente con el ADN genómico. El vector generalmente no necesitará contener todos los elementos necesarios para ser funcional en cualquier célula huésped con la que sea compatible. Un "vector de expresión" es un vector capaz de dirigir la expresión de un polinucleótido exógeno, por ejemplo, un polinucleótido que codifica el dominio de unión de una proteína de fusión, en condiciones apropiadas.

20 Como se describe en la presente descripción, los términos "homología y homólogos" incluyen polinucleótidos que pueden ser un homólogo de secuencia en el polinucleótido de conxina (por ejemplo, ARNm). Tales polinucleótidos tienen, típicamente, al menos aproximadamente 70 % de homología, preferentemente, al menos aproximadamente 80 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % de homología con respecto a la secuencia relevante, por ejemplo, en una región de al menos aproximadamente 15, 20, 30, 40, 50, 100 nucleótidos contiguos más (de la secuencia homóloga).

25 La homología puede calcularse en base a cualquier método en la técnica. Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo, en su configuración predeterminada) (Devereux y otros, *Nucleic Acids Research* 12, p387-395 (1984)). Los algoritmos PILEUP y BLAST pueden usarse para calcular secuencias de homología o alineación (típicamente, en su configuración predeterminada), por ejemplo, como se describe en Altschul S. F.; *J Mol Evol* 36: 290-300 (1993); Altschul, S. F. y otros; *J Mol Biol* 215: 403-10 (1990). El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/L>). Este algoritmo implica primero identificar un par de secuencia de puntaje alto mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden o satisfacen algún puntaje T de umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul y otros *supra*). Estas coincidencias iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar las HSP que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta que pueda aumentarse la puntuación de alineación acumulativa. Las extensiones para los aciertos de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineación acumulativa cae en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada va a cero o más abajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias.

40 Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff and Henikoff *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919 (1992)) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas.

45 El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; ver, por ejemplo, Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787 (1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P (N)), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual una coincidencia entre dos secuencias, de nucleótidos o aminoácidos, ocurre por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación con la primera secuencia es menos de aproximadamente 1, preferentemente, menos de aproximadamente 0,1, con mayor preferencia menos de aproximadamente 0,01, y con la máxima preferencia menos de aproximadamente 0,001.

50 La secuencia homóloga, típicamente, difiere de la secuencia relevante en al menos (o no más de) aproximadamente 1, 2, 5, 10, 15, 20 o más mutaciones (que pueden ser sustituciones, deleciones o inserciones). Estas mutaciones pueden medirse en 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 superior al del fondo. La hibridación selectiva se consigue, típicamente, mediante el uso de condiciones de rigurosidad media a alta (por ejemplo, cloruro de sodio 0,03 M y citrato de sodio 0,03 M a una temperatura de aproximadamente 50 grados C a aproximadamente 60 grados C). Sin embargo, tal hibridación puede realizarse bajo cualquier condición adecuada conocida en la técnica (ver Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989)). Por ejemplo, si se requiere alta rigurosidad, las condiciones adecuadas incluyen 0,2 x SSC a 60 grados C. Si se requiere menor rigurosidad, las condiciones adecuadas incluyen 2 x SSC a 60 grados C.

65 Una "célula" significa cualquier célula viva adecuada para la aplicación conveniente. Las células incluyen células eucariotas y procariontas.

El término "producto génico" se refiere a una molécula de ARN transcrita a partir de un gen, o un polipéptido codificado por el gen o traducido a partir del ARN.

El término "recombinante" se refiere a un polinucleótido sintetizado o manipulado de cualquier otra manera *in vitro* (por ejemplo, "polinucleótido recombinante"), a métodos de uso de polinucleótidos recombinantes para producir productos génicos en células u otros sistemas biológicos, o a un polipéptido ("proteína recombinante") codificado por un polinucleótido recombinante. Por lo tanto, un polinucleótido "recombinante" se define por su método de producción o por su estructura. En referencia a su método de producción, el proceso se refiere al uso de técnicas de ácido nucleico recombinante, por ejemplo, que implica la intervención humana en la secuencia de nucleótidos, típicamente, selección o producción. Alternativamente, puede ser un polinucleótido hecho generando una secuencia que comprende una fusión de dos o más fragmentos que no son contiguos naturalmente entre sí. Por lo tanto, por ejemplo, se abarcan los productos elaborados mediante la transformación de células con cualquier vector de origen no natural, al igual que los polinucleótidos que comprenden la secuencia derivada mediante el uso de cualquier proceso de oligonucleótido sintético. De manera similar, un polipéptido "recombinante" es uno que se expresa a partir de un polinucleótido recombinante.

Una "célula huésped recombinante" es una célula que contiene un vector, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión, o una célula que de cualquier otra manera se ha manipulado mediante técnicas recombinantes para expresar una proteína de interés.

La familia del gen conexina es diversa, con 20 miembros identificados en el genoma humano secuenciado. Los diferentes productos del gen de conexina se combinan para formar uniones de intersticio con diferentes propiedades, que incluyen conductancia de poros, selectividad por tamaño, selectividad por carga, propiedades de activación por voltaje, y propiedades de activación química, y se expresan en diferentes tejidos, y en diferentes momentos del desarrollo o durante procesos de enfermedad. En la literatura reciente, las conexinas se denominan más comúnmente de acuerdo con sus pesos moleculares, por ejemplo, Cx26 es la proteína conexina de 26 Kd. Esto puede generar confusión cuando se comparan genes de conexina de diferentes especies, por ejemplo, el Cx36 humano es homólogo al Cx35 del pez cebra. Como se usa en la presente descripción, por lo tanto, debe entenderse que la referencia a una conexina particular es una referencia a todas las variantes de especies de esta, incluso si sus pesos moleculares son diferentes. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a la "conexina 43" significa no solo la conexina humana 43 sino también a la conexina análoga de las otras especies, sin importar si también son de 43 Kd. De manera similar, la referencia a una "conexina 43" no humana es una referencia al análogo o variante de la conexina 43 en esa especie. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a la "conexina 43 del caballo" es una referencia al análogo o variante relevante de la conexina 43 humana en el caballo, incluso si no tiene un peso molecular de 43 Kd.

Compuestos

Los compuestos descritos en la presente descripción son útiles para mejorar, tratar, o prevenir una diversidad de trastornos y afecciones, que incluyen, pero no se limitan a afecciones cardiovasculares, inflamatorias, neurológicas, y vasculares, así como también el tratamiento de heridas. Los compuestos son útiles, además, en composiciones farmacéuticas y en relación con dispositivos y procedimientos médicos, que incluyen, por ejemplo, cirugías, procedimientos de injerto, y trasplantes de órganos o tejidos. Determinados compuestos preferidos descritos en la presente descripción son capaces de modular o afectar el transporte de moléculas dentro y fuera de las células (por ejemplo, bloqueo o inhibición). Por lo tanto, determinados compuestos anticonexina descritos en la presente descripción modulan la comunicación celular (por ejemplo, célula a célula). Determinados compuestos anticonexina modulan o efectúan la transmisión de moléculas entre el citoplasma celular y el espacio periplásmico o extracelular. Tales compuestos generalmente se dirigen a los hemicanales (conexones), porque los hemicanales están involucrados independientemente en el intercambio de moléculas pequeñas entre el citoplasma celular y un espacio o tejido extracelular. Por lo tanto, un compuesto descrito en la presente descripción puede reducir directa o indirectamente el acoplamiento entre células o entre una célula y un espacio extracelular o tejido, y la modulación del transporte de moléculas desde una célula a un espacio extracelular está dentro del alcance de determinados compuestos y casos descritos en la presente descripción.

En la presente descripción se describe cualquier molécula que sea capaz de provocar como respuesta una inhibición conveniente del paso (por ejemplo, el transporte) de moléculas a través de una unión de intersticio o un hemicanal de conexina. Los compuestos que modulan el paso de moléculas a través de una unión de intersticio o un hemicanal de conexina se describen, además, en casos particulares (por ejemplo, aquellos que modulan el paso de moléculas desde el citoplasma de una célula a un espacio extracelular). Tales compuestos pueden modular el paso de las moléculas a través de una unión de intersticio o hemicanal de conexina con o sin desacoplamiento de la unión de intersticio (mediante el bloqueo del transporte de las moléculas a través de las uniones de intersticio). Tales compuestos incluyen, por ejemplo, proteínas y polipéptidos, polinucleótidos y cualquier otro compuesto orgánico, y pueden, por ejemplo, bloquear la función o expresión de una unión de intersticio o un hemicanal en todo o en parte. Para obtener una lista de algunos inhibidores de la unión de intersticio, ver por ejemplo Evans, W.H. and Boitano, S. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 606 - 612 (2001).

Péptidos y polipéptidos inhibidores de conexina

Las proteínas de unión, que incluyen péptidos, péptidos miméticos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y similares. *etcétera*, son moduladores adecuados de las uniones de intersticio y hemicanales y uniones de intersticio. Las proteínas de unión incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (que incluyen, por ejemplo, Fab, F (ab')₂ y fragmentos Fv; anticuerpos de cadena única; cadena única de Fv; y moléculas de unión de cadena única tales como las que comprenden, por ejemplo, un dominio de unión, bisagra, dominios CH2 y CH3, todos como se describe en El documento WO02/056910 de Ledbetter y otros publicado el 25 de julio de 2002); anticuerpos recombinantes y fragmentos de anticuerpos que pueden unir un determinante antigénico (*es decir*, esa porción de una molécula, generalmente conocida como epítipo) que hace contacto con un anticuerpo particular u otra molécula de unión. Estas proteínas de unión, que incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos; etcétera, pueden ser quiméricas o humanizadas o de cualquier otra manera hechas para ser menos inmunogénicas en el sujeto al que se les administra, y pueden sintetizarse, producirse recombinantemente, o producirse en bibliotecas de expresión. Se prevé que cualquier molécula de unión conocida en la técnica o descubierta más tarde, tal como las mencionadas en la presente descripción y/o descritas con mayor detalle en la técnica. Ver Harlow, E., and Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 349 (1988). Por ejemplo, las proteínas de unión incluyen no solo anticuerpos, y similares, sino también ligandos, receptores, péptidos miméticos, u otros fragmentos o moléculas de unión (por ejemplo, producidos mediante la exposición en fagos) que se unen a una diana (por ejemplo, conexina, hemicanal, o moléculas asociadas).

Las moléculas de unión generalmente tendrán una especificidad conveniente, que incluye, pero no se limita a la especificidad de unión, y la afinidad conveniente. La afinidad, por ejemplo, puede ser una K_a mayor que o igual a aproximadamente 10^4 M^{-1} , mayor que o igual a aproximadamente 10^6 M^{-1} , mayor que o igual a aproximadamente 10^7 M^{-1} , mayor que o igual a aproximadamente 10^8 M^{-1} . Incluso, las afinidades mayores que aproximadamente 10^8 M^{-1} son adecuadas, tales afinidades igual a o mayor que aproximadamente 10^9 M^{-1} , aproximadamente 10^{10} M^{-1} , aproximadamente 10^{11} M^{-1} , y aproximadamente 10^{12} M^{-1} . Las afinidades de las proteínas de unión útiles en la presente invención pueden determinarse fácilmente mediante el uso de técnicas convencionales, por ejemplo, las descritas por Scatchard y otros, 1949 Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660.

Los inhibidores peptídicos (por ejemplo, péptidos miméticos) de uniones de intersticio y hemicanales se describen en la presente descripción. Ver por ejemplo Berthoud, V.M. y otros, Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 279: L619 - L622 (2000); Evans, W.H. and Boitano, S. Biochem. Soc. Trans. 29: 606 - 612, and De Vriese A.S., y otros. Kidney Int. 61: 177 - 185 (2001).

Mediante el uso de datos obtenidos de gráficos de hidropatía, se ha propuesto que una conexina contiene cuatro regiones transmembranales y dos lazos cortos extracelulares. Paul DL. J Cell Biol 103: 123-134 (1996). El posicionamiento de la primera y segunda regiones extracelulares de conexina se caracterizó adicionalmente mediante la producción informada de anticuerpos antipéptidos usados para la inmuno localización de los epítopos correspondientes sobre las uniones de intersticio separadas. Goodenough D.A. J Cell Biol 107: 1817-1824 (1988); Meyer R.A., J Cell Biol 119: 179-189 (1992).

Los dominios extracelulares de un hemicanal aportados por dos células adyacentes se "acoplan" entre sí para formar canales de unión de intersticio completos. Los reactivos que interfieren con las interacciones de estos dominios extracelulares perjudicarán la comunicación de célula a célula. Los péptidos cortos correspondientes a secuencias dentro de los lazos extracelulares de conexinas se informaron como inhibidores de la comunicación intercelular. Boitano S. and Evans W. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279: L623-L630 (2000). Se ha reportado el uso de péptidos como inhibidores de la formación de canales célula-célula producidos por la conexina (Cx) 32 expresada en ovocitos pareados de *Xenopus*. Dahl G, y otros, Biophys J 67: 1816-1822 (1994). Berthoud, VM y Seul, KH, resumieron algunos de estos resultados. Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 279: L619 - L622 (2000). La modulación de la función de hemicanal mediante la fosforilación de un residuo de tirosina se reportó por Jensen y otros, (US2004/0092429), cuyas enseñanzas no abarcan los compuestos anticonexina y los métodos descritos en la presente descripción.

En otro aspecto, un compuesto anticonexina comprende un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región transmembranal (por ejemplo, 1^{ra} a 4^{ta}) de una conexina (por ejemplo, conexina 45, 43, 26, 30, 31.1 y 37). En determinados casos descritos, el compuesto anticonexina comprende un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una porción de una región transmembranal de una conexina 45. En determinados casos descritos, el compuesto anticonexina es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende de 5 a 20 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:62, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende de 8 a 15 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:62, o un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende 11 a 13 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:62. Otros casos descritos se dirigen a un compuesto anticonexina que es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, o 30 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:62. En determinados compuestos anticonexina descritos en la presente descripción, los dominios extracelulares de conexina 45 correspondientes a los aminoácidos en las posiciones 46-75 y 199-228 de la SEQ ID NO: 62 se usan para desarrollar las secuencias peptídicas particulares. Por lo tanto, determinados péptidos descritos en la presente descripción tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a las regiones en las posiciones 46-75 y 199-228 de la SEQ ID NO: 62. Los péptidos

no necesitan tener una secuencia de aminoácidos idéntica a las porciones de la SEQ ID NO: 62, y pueden hacerse cambios conservativos de aminoácidos de manera que los péptidos retengan la actividad de unión o la actividad funcional en los ensayos descritos en la presente descripción y conocidos de cualquier otra manera en la técnica. En otros casos descrito, el péptido se dirige a la región diana de la proteína conexina distinta de los dominios extracelulares (por ejemplo, las porciones de la SEQ ID NO:62 no correspondientes a las posiciones 46-75 y 199-228).

En otras modalidades, el compuesto anticonexina comprende un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una porción de una región transmembranal de una conexina 43. En determinadas modalidades, el compuesto anticonexina es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende de 5 a 20 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:63, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende de 8 a 15 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:63, o un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende 11 a 13 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:63. Otras modalidades se dirigen a un compuesto anticonexina que es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 o 30 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:63. En otros compuestos anticonexina, los dominios extracelulares de la conexina 43 correspondientes a los aminoácidos en las posiciones 37-76 y 178-208 de la SEQ ID NO: 63 se usan para desarrollar las secuencias de péptidos particulares. Por lo tanto, determinados péptidos descritos en la presente descripción tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a las regiones en las posiciones 37-76 y 178-208 de la SEQ ID NO: 63. Los péptidos no necesitan tener una secuencia de aminoácidos idéntica a las porciones de la SEQ ID NO: 63, y pueden hacerse cambios conservativos de aminoácidos de manera que los péptidos retengan la actividad de unión o la actividad funcional en los ensayos descritos en la presente descripción y conocidos de cualquier otra manera en la técnica. En otras modalidades, el péptido se dirige a la región diana de la proteína conexina distinta de los dominios extracelulares (por ejemplo, las porciones de la SEQ ID NO:63 no correspondientes a las posiciones 37-76 y 178-208).

En determinadas modalidades no limitantes, los péptidos anticonexina 43 comprenden secuencias correspondientes a una porción de los dominios extracelulares de conexina con sustituciones conservativas de aminoácidos de manera que los péptidos son compuestos anticonexina 43 funcionalmente activos. Las sustituciones conservativas de aminoácidos ilustrativas incluyen, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido no polar con otro aminoácido no polar, la sustitución de un aminoácido aromático con otro aminoácido aromático, la sustitución de un aminoácido alifático con otro aminoácido alifático, la sustitución de un aminoácido polar con otro aminoácido polar, la sustitución de un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, la sustitución de un aminoácido básico con otro aminoácido básico, y la sustitución de un aminoácido ionizable con otro aminoácido ionizable.

Los péptidos ilustrativos dirigidos a la conexina 43 se muestran más abajo en la Tabla 1. M1, 2, 3 y 4 se refieren a la 1^{ra} a 4^{ta} regiones transmembranales de la proteína conexina 43, respectivamente. E2 se refiere al primer y segundo lazo extracelular, respectivamente.

Tabla 1. Inhibidores Peptídicos de la Comunicación Intercelular (cx43)

FEVAFLLIQWI	M3 & E2	(SEQ ID NO:32)
LLIQWYIGFSL	E2	(SEQ ID NO:33)
SLSAVYTCKRDPCPHQ	E2	(SEQ ID NO:34)
VDCFLSRPTEKT	E2	(SEQ ID NO:35)
SRPTEKTIFII	E2 & M4	(SEQ ID NO:36)
LGTAVESAWGDEQ	M1 & E1	(SEQ ID NO:37)
QSAFRCNTQQPG	E1	(SEQ ID NO:38)
QQPGCENVCYDK	E1	(SEQ ID NO:39)
VCYDKSFPISHVR	E1	(SEQ ID NO:40)

La Tabla 2 proporciona péptidos de conexina ilustrativos adicionales usados en la inhibición de la función del hemicanal o de la unión de intersticio. En otros casos descritos, se realizan cambios conservativos de aminoácidos en los péptidos o fragmentos de estos.

Tabla 2. Inhibidores Peptídicos Adicionales de la Comunicación Intercelular (cx32, cx43)

Conexina	Localización		AA y Secuencia	
Cx32	E1	39-7	AAESVWGDEIKSSFICNTLQPGCNSVCYDHFFPISHVR	(SEQ ID NO: 41)
Cx32	E1	41-52	ESVWGDEKSSFI	(SEQ ID NO: 42)

ES 2 766 549 T3

	Cx32	E1	52-63	ICNTLQPGCNSV	(SEQ ID NO: 43)
	Cx32	E1	62-73	SVCYDHFFPISH	(SEQ ID NO: 44)
5	Cx32	E2	164-188	RLVKCEAFPCPNTVDCFVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 45)
	Cx32	E2	166-177	VKCEAFPCPNTV	(SEQ ID NO: 46)
	Cx32	E2	177-188	VDCFVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 47)
10					
	Cx32	E1	63-75	VCYDHFFPISHVR	(SEQ ID NO: 48)
	Cx32	E1	43-59	VWGDEKSSFICNTLQPGY	(SEQ ID NO: 49)
15	Cx32	E1	46-59	DEKSSFICNTLQPGY	(SEQ ID NO: 50)
	Cx32	E2	182-192	SRPTEKTVFTV	(SEQ ID NO: 51)
20	Cx32/Cx43	E2	182-188	SRPTEKT	(SEQ ID NO: 52)
			201-207		
	Cx43	E1	64-76	VCYDKSFPISHVR	(SEQ ID NO: 53)
25	Cx43	E2	201-211	SRPTEKTIFII	(SEQ ID NO: 54)
	Cx32	E1	52-63	ICNTLQPGCNSV	(SEQ ID NO: 55)
30	Cx40	E2	177-192	FLDTLHVCRRSPCPHP	(SEQ ID NO: 56)
	Cx43	E2	180-195	SLSAVYTCKRDPCPHQ	(SEQ ID NO: 57)
35	Cx43	E1	64-76	VCYDKSFPISHVR	(SEQ ID NO: 58)
	Cx43	E2	201-211	SRPTEKTIFII	(SEQ ID NO: 59)
	Cx43	E2	188-205	KRDPCHQVDCFLSRPTEK	(SEQ ID NO: 60)

40 La Tabla 3 proporciona los lazos extracelulares para los miembros de la familia de la conexina que se usan para desarrollar los péptidos inhibidores descritos en la presente descripción. Los péptidos y los fragmentos de estos proporcionados en la Tabla 3, se usan como péptidos inhibidores. En otros casos descritos, los péptidos que comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 15, de aproximadamente 11 a aproximadamente 13 aminoácidos contiguos de los péptidos en esta Tabla son péptidos inhibidores. En otros casos descritos, se realizan cambios conservativos de aminoácidos en los péptidos o fragmentos de estos. Ver Boitano S. and Evans W. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279: L623-L630 (2000).

Tabla 3. Lazos extracelulares para diversos miembros de la familia conexina

50	E1		
	huCx26	KEVWGDEQADFVCNTLQPGCKNVCYDHYFPISHIR	(SEQ ID NO: 68)
	huCx30	QEVWGDEQEDFVCNTLQPGCKNVCYDHFFPVSHIR	(SEQ ID NO: 69)
55	huCx30.3	EEVWDDEQKDFVCNTKQPGCPNVCYDEFFPVSHVR	(SEQ ID NO: 70)
	huCx31	ERVWGDEQKDFDCNTKQPGCTNVCYDNYFPISNIR	(SEQ ID NO: 71)
	huCx31.1	ERVWSDDHKDFDCNTRQPGCSNVCDFEFPVSHVR	(SEQ ID NO: 72)
60	huCx32	ESWJGDEKSSFICNTLQPGCNSVCYDQFFPISHVR	(SEQ ID NO: 73)
	huCx36	ESVWGDEQSDFCNTAQPGCTNVCYDQAFPISHIR	(SEQ ID NO: 74)
	huCx37	ESVWGCEQSDFCNTAQPGCTNVCYDQAFPISHIR	(SEQ ID NO: 75)
65	huCx40.1	RPVYQDEQERFVCNTLOPGCANVCYDVFSPVSHLR	(SEQ ID NO: 76)

	huCx43	ESAWGDEQSAFRcntQQPGcENVcyCkSFPISHVR	(SEQ ID NO: 77)
	huCx46	EDVMGDEQSDFTcMTQQPGcEMVcyDRAFPISHIR	(SEQ ID NO: 78)
5	huCx46.6	EAIYSDEQAKFTcNTRQPGcDNVcyDAFAPLSHVR	(SEQ ID NO: 79)
	huCx40	ESSWGDEQADFRcDTIQFGcQNVCTDQAFPXSHIR	(SEQ ID NO: 80)
	huCx45	GESIYYDEQSKFVCNTEQPGcENVcyDAFAPLSHVR	(SEQ ID NO: 81)
10			
	E2		
	huCx26	MYVFYVKYDGFsMQRLVKcNAWPCNtVDCfVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 82)
15	huCx30	MYVFYFLYNGYHLPWVLKcGICPCPNLVDCfISRPEKT	(SEQ ID NO: 83)
	huCx30.3	LYZFHFLLYKDYDMPRVVAcSVEPCPHTVDCyISRPEKk	(SEQ ID NO: 64)
	huCx31	LYLLHTLWHGFNMPRLVQcANVAPCPNIVDCyIARPEKk	(SEQ ID NO: 85)
20	huCx31.1	LYVFHSFYPKYILPPWKcHADPCPNIVDCfISKPSEKN	(SEQ ID NO: 86)
	huCx32	MYVFYLLYPGYAMVRLVKcDVYPCNtVDCfVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 87)
	huCx36	LYGWTMEPVIVCQRAPcPYLVDCfVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 88)
25	huCx37	LYGWTMEPVFVCORAPcPYLVDCfVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 89)
	huCx40.1	GALHYFLFGFLAPKkFPCTRPPCTGVDCyVSRPTEKs	(SEQ ID NO: 90)
	huCx43	LLIQWYIYGfSLSAVYtCKRDPCPHQVDCfLSRPEKT	(SEQ ID NO: 91)
30	huCx46	IAGQYFLYGFELKPLYRCdRWPCNtVDCfISRPEKT	(SEQ ID NO: 92)
	huCx46.6	LVGQYLLYGfEVRPFfPCSRQCPHVDCfVSRPTEKT	(SEQ ID NO: 93)
	huCx40	IVGQYFIYGfLTLHVCRRSPcPHVNCyVSRPEKtN	(SEQ ID NO: 94)
35	huCx45	LXGQYFLYGFQVHPfYVCSRLPcHPKIDCFISRPEKT	(SEQ ID NO: 95)

Las secuencias del dominio E2 de diferentes isotipos de conexina se muestran con aminoácidos homólogos al péptido de la SEQ ID NO:35 y al péptido de la SEQ ID NO:36, en negrita. Tenga en cuenta que los últimos 4 aminoácidos del péptido de la SEQ ID NO:36 son parte del cuarto dominio de membrana. La Tabla 4 proporciona el dominio extracelular para los miembros de la familia de conexina que se usan para desarrollar los péptidos inhibidores descritos en la presente descripción. Los péptidos y los fragmentos de estos proporcionados en la Tabla 4, se usan como péptidos inhibidores. En otros casos descritos, los péptidos que comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 15, de aproximadamente 11 a aproximadamente 13 aminoácidos contiguos de los péptidos en esta Tabla son péptidos inhibidores. En otros casos descritos, se realizan cambios conservativos de aminoácidos en los péptidos o fragmentos de estos.

Tabla 4. Dominios extracelulares

	Péptido	VDCFLSRPEKT	(SEQ ID NO: 35)
50	Péptido	SRPEKTIFII	(SEQ ID NO: 36)
	huCx43	LLIQWYIYGfSLSAVYtCKRDPCPHQ VDCFLSRPEKTIFII	(SEQ ID NO: 96)
55	huCx26	MYVFYVMYDGFsMQRLVKcNAWPCNt VDCfVSRPEKTVFTV	(SEQ ID NO: 97)
	huCx30	YVFYFLYNGYHLPWVLKcGIDPCPNLVDCfISRPEK TVFTI	(SEQ ID NO: 98)
	huCx30.3	LYIFHRLYKDYDMPRVWAcSVEPCPHT VDCyISRPEKkVFTY	(SEQ ID NO: 99)
60	huCx31	LYLLHTLWHGFNMPRLVQcANVAPCPNIVDCyIARPEK KTY	(SEQ ID NO: 100)
	huCx31.1	LYVFHSFYPKYILPPWKcHADPCPNIVDCfISKPSEKN IFTL	(SEQ ID NO: 101)
	huCx32	MYVFYLLYPGYAMVRLVKcDVYPCNtVDCfVSRPEK TVFTV	(SEQ ID NO: 102)
65	huCx36	LYGWTMEPVFVCQRAPcPYLVDCfVSRPEKT IFII	(SEQ ID NO: 103)
	huCx37	LYGWTMEPVFVCQRAPcPYLVDCfVSRPEKT IFII	(SEQ ID NO: 104)

ES 2 766 549 T3

huCx40.1	GALHYFLFGFLAPKKFPCTRPCTGV VDCYVSRPTEK SLML	(SEQ ID NO: 105)
huCx46	IAGQYFLYGFELKPLYRCDRWPCNT VDCFISRPEKTIFII	(SEQ ID NO: 106)
5 huCx46.6	LVGQYLLYGFEVRFPPFCSRQPCPHV VDCFVSRPTEKTVFLL	(SEQ ID NO: 107)
huCx40	IVGQYFIYGIFLTTLHVCRRSPCPHP VNCYVSRPTEKNVFIV	(SEQ ID NO: 108)
huCx45	LIGQYFLYGFQVHPFYVCSRLPCHPKID CFISRPEKTIFLL	(SEQ ID NO: 109)

10 La Tabla 5 proporciona los péptidos inhibidores de conexina 40 mostrados con referencia a los lazos extracelulares (E1 y E2) de conexina 40. Los aminoácidos en negrita se dirigen a las regiones transmembranales de conexina 40.

Tabla 5. Péptidos inhibidores de Cx40

15	E1		
		LGTA AESSWGDEQADFRCDTIQPGCQNVCTDQAFPISHIR FWVLQ	(SEQ ID NO: 110)
		LGTAAESSWGDEQA	(SEQ ID NO: 111)
20		DEQADFRCDTIQ P	(SEQ ID NO: 112)
		TIQPGCQNVCTD Q	(SEQ ID NO: 113)
		VCTDQAFPISHIR	(SEQ ID NO: 114)
25		AFPISHIRFWVL Q	(SEQ ID NO: 115)
	E2		
		MEVG FIVGQYFIYGIFLTTLHVCRRSPCPHPVNCYVSRPTEKN VFIV	(SEQ ID NO: 116)
30		MEVG FIVGQYF	(SEQ ID NO: 117)
		IVGQYFIYGIFL	(SEQ ID NO: 118)
		GIFLTTLHVCRR SP	(SEQ ID NO: 119)
35		RRSPCPHPVNCY	(SEQ ID NO: 120)
		VNCYVSRPTEKN	(homólogo de la SEQ ID NO:35)
40		SRPTE RVFIV	(SEQ ID NO: 36)

La Tabla 6 proporciona los péptidos inhibidores de conexina 45 que se muestran con referencia a los lazos extracelulares (E1 y E2) de conexina 45. Los aminoácidos en negrita se dirigen a las regiones transmembranales de conexina 45

Tabla 6. Péptidos inhibidores de Cx45

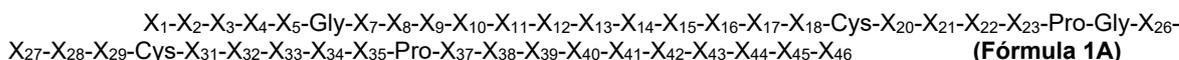
50	E1		
		LTAVGGESIYYDEQSKFVCNTEQPGCENVCYDAFAPLSHVR FWVFQ	(SEQ ID NO: 121)
		LTAVGGESIYYDEQ S	(SEQ ID NO: 122)
55		DEQSKFVCNTEQ P	(SEQ ID NO: 123)
		TEQPGCENVCY DA	(SEQ ID NO: 124)
60		VCYDAFAPLSHVR	(SEQ ID NO: 125)
		APLSHVRFWV FQ	(SEQ ID NO: 126)
65			

	E2	
5		FEVGFLIGQYFLYGFQVHPFYVCSRLPCHPKIDCFISRPTTEKTIFLL (SEQ ID NO: 127)
		FEVGFLIGQYF (SEQ ID NO: 128)
10		LIGQYFLYGFQV (SEQ ID NO: 129)
		GFQVHPFYVCSRLP (SEQ ID NO: 130)
15		SRLPCHPKIDCF (SEQ ID NO: 131)
		IDCFISRPTTEKT (SEQ ID NO: 36)
20		SRPTEKTIFLL (SEQ ID NO: 37)

Se prefiere que determinados péptidos inhibidores bloqueen los hemicanales sin un bloqueo conveniente de las uniones de intersticio. Si bien no desea vincularse a ninguna teoría o mecanismo en particular, se cree, además, que determinados péptidos miméticos (por ejemplo, VCYDKSFPISHVR, SEQ ID NO: 53) bloquean los hemicanales sin causar el desacoplamiento de las uniones de intersticio (Ver Leybeart y otros, *Cell Commun Adhes* **10**: 251 - 257 (2003)). El péptido SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:54) puede usarse, además, por ejemplo, para bloquear los hemicanales sin desacoplar las uniones de intersticio. El péptido SRGGEKNVFIV (SEQ ID NO:61) puede usarse como una secuencia de control (DeVriese y otros, *Kidney Internat.* **61**: 177 - 185 (2002)). Ejemplos de péptidos inhibidores de conexina 45 YVCSRLPCHP (SEQ ID NO:132), QVHPFYVCSRL (SEQ ID NO:133), FEVGFLIGQYFLY (SEQ ID NO:134), GQYFLYGFQVHP (SEQ ID NO:135), GFQVHPFYVCSR (SEQ ID NO:136), AVGGESIYYDEQ (SEQ ID NO:137), YDEQSKFVCNTE (SEQ ID NO:138), NTEQPGCENVCY (SEQ ID NO:139), CYDAFAPLSHVR (SEQ ID NO:140), FAPLSHVRFWVF (SEQ ID NO:141) y LIGQY (SEQ ID NO:142), QVHPF (SEQ ID NO:143), YVCSR (SEQ ID NO: 144), SRLPC (SEQ ID NO:145), LPCHP (SEQ ID NO:146) y GESIY (SEQ ID NO:147), YDEQSK (SEQ ID NO:148), SKFVCN (SEQ ID NO: 149), TEQPGCEN (SEQ ID NO:150), VCYDAFAP (SEQ ID NO:151), LSHVRFWVFQ (SEQ ID NO:152). Los péptidos solamente pueden ser de 3 aminoácidos en longitud, que incluyen SRL, PCH, LCP, CHP, IYY, SKF, QPC, VCY, APL, HVR, o más largos, por ejemplo: LIQYFLYGFQVHPF (SEQ ID NO:153), VHPFYCSRLPCHP (SEQ ID NO:154), VGGESIYYDEQSKFVCNTEQPG (SEQ ID NO:155), TEQPGCENVCYDAFAPLSHVR (SEQ ID NO:156), AFAPLSHVRFWVFQ (SEQ ID NO:157).

En determinados casos descritos, los péptidos que comprenden de aproximadamente 3 a aproximadamente 30, de aproximadamente 8 a aproximadamente 15, de aproximadamente 11 a aproximadamente 13 aminoácidos contiguos de los péptidos en la Fórmula 1A son péptidos inhibidores.

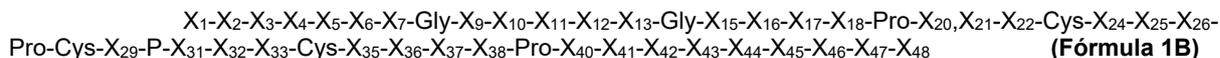
Fórmula 1A



en donde X_1 y X_{37} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Leu, Ile, Met y Val; X_2 se selecciona del grupo que consiste en Thr, Asn, Ser y Ala; X_3 se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ser, Gly and Thr; X_4 , X_{18} , X_{29} , X_{40} y X_{44} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Val, Ile, Met and Leu; X_5 se selecciona de un grupo que consiste en Gly, Glu, Asp, Ser y Ala; X_7 , X_{13} , X_{22} y X_{27} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Glu, Asp, Gln and Lys; X_8 , X_{15} y X_{38} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Ser, Ala, Asn y Thr; X_9 se selecciona de un grupo que consiste en Ile, Val, Leu y Met; X_{10} , X_{11} y X_{31} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Tyr, Phe, Trp y His; X_{12} y X_{32} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Asp, Glu y Asn; X_{14} y X_{23} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Gln, Glu, Arg y Lys; X_{16} se selecciona del grupo que consiste en Lys, Arg, Glu y Gln; X_{17} y X_{34} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Phe, Tyr y Trp; X_{20} y X_{28} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Asn, Ser, His y Asp; X_{21} se selecciona del grupo que consiste en Thr y Ser; X_{33} y X_{35} se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Ala y Ser; X_{39} se selecciona del grupo que consiste en His, Tyr y Asn; X_{41} se selecciona de un grupo que consiste en Arg, Lys y Gln; X_{42} y X_{45} se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Phe, Tyr, Cys, Leu y Tyr; X_{43} se selecciona de un grupo que consiste en Trp, Tyr, Arg, Lys, Cys y Phe; y X_{46} se selecciona de un grupo que consiste en Gln, His, Glu, Lys, Arg, Asn y Asp.

En determinados casos descritos, los péptidos que comprenden de aproximadamente 3 a aproximadamente 30, de aproximadamente 8 a aproximadamente 15, de aproximadamente 11 a aproximadamente 13 aminoácidos contiguos de los péptidos en la Fórmula 1B son péptidos inhibidores.

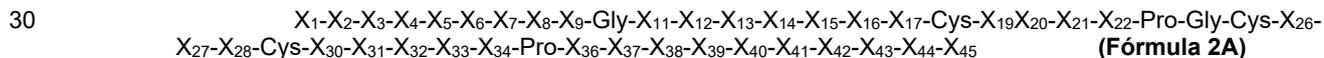
5 **Fórmula 1B:**



10 y X₂₂ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Val, Ile, Met y Leu; X₄ se selecciona de un grupo que consiste en Gly, Glu, Asp, Ser y Ala; X₆, X₁₂ y X₂₆ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Leu, Ile, Met y Val; X₇, X₃₂, X₃₆, X₄₄ y X₄₈ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Ile, Val, Leu y Met; X₉, y X₁₆ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Gln, Glu, Arg y Lys; X₁₀, X₁₃ y X₂₁ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Tyr, Phe, Trp y His; X₁₁, X₁₅, X₂₀ y X₃₅ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Phe, Tyr y Trp; X₁₈ y X₂₉ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en His, Tyr y Asn; X₂₄ y X₃₇ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Ser, Ala, Asn y Thr; X₂₅ y X₃₈ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Arg, Lys y Gln; X₃₁ y X₄₂ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Lys, Arg, Glu y Gln; X₃₃ se selecciona de un grupo que consiste en Asp, Glu y Asn; X₄₀ y X₄₃ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Thr y Ser; X₄₁ se selecciona de un grupo que consiste Glu, Asp, Gln y Lys; y X₄₆ y X₄₇ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Val, Ile, Met, Leu y Phe.

25 En determinados casos descritos, los péptidos que comprenden de aproximadamente 3 a aproximadamente 30, de aproximadamente 8 a aproximadamente 15, de aproximadamente 11 a aproximadamente 13 aminoácidos contiguos de los péptidos en la Fórmula 2A son péptidos inhibidores.

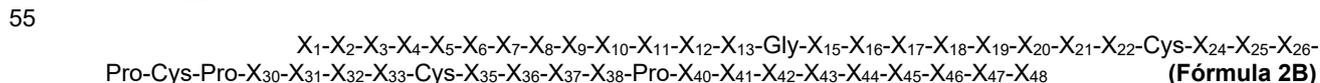
Fórmula 2A



35 en donde X₁ y X₄₄ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Leu, Ile, Met, Val y Pro; X₂ se selecciona de un grupo que consiste en Gly, Glu, Asp, Ser y Ala; X₃ se selecciona de un grupo que consiste en Thr, Ser, Asn y Ala; X₄ se selecciona de un grupo que consiste en Ala, Ser, Gly y Thr, X₅, X₂₈, X₃₉ y X₄₃ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Val, Ile, Met y Leu; X₆, X₁₂, y X₂₆ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Glu, Asp, Gln y Lys; X₇, X₁₄, X₃₃ y X₃₇ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Ser, Ala, Asn y Thr; X₈ y X₁₅ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Ala y Ser; X₉ se selecciona de un grupo que consiste en Trp, Tyr y Phe; X₁₁ y X₃₁ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Asp, Glu y Asn; X₁₃, X₂₁, y X₂₂ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Gln, Glu, Arg y Lys; X₁₆ y X₃₄ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Phe, Tyr y Trp; X₁₇ y X₄₀ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Arg, Lys y Gln; X₁₉ y X₂₇ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Asn, Ser, His y Asp; X₂₀ se selecciona de un grupo que consiste en Thr y Ser, X₃₀ se selecciona de un grupo que consiste en Tyr, Phe, Trp e His; X₃₂ se selecciona de un grupo que consiste en Lys, Arg, Glu y Gln; X₃₆ se selecciona de un grupo que consiste en Ile, Val, Leu y Met; X₃₈ se selecciona de un grupo que consiste en His, Tyr y Asn; X₄₁ se selecciona de un grupo que consiste en Phe, Tyr, Cys, Leu y Trp; X₄₂ se selecciona de un grupo que consiste en Trp, Tyr, Phe, Arg, Lys y Cys; y X₄₅ se selecciona de un grupo que consiste en Gln, His, Glu, Lys, Arg, Asn y Asp.

50 En determinados casos descritos, los péptidos que comprenden de aproximadamente 3 a aproximadamente 30, de aproximadamente 8 a aproximadamente 15, de aproximadamente 11 a aproximadamente 13 aminoácidos contiguos de los péptidos en la Fórmula 2B son péptidos inhibidores.

Fórmula 2B



60 en donde X₁, X₅ y X₄₅ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Phe, Tyr, Cys, Trp y Leu; X₂ se selecciona de un grupo que consiste en Glu, Asp, Gln, Gly, His, Arg, Asn y Lys; X₃, X₁₇, y X₂₂ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Val, Ile, Met y Leu; X₄ se selecciona de un grupo que consiste en Gly, Glu, Asp, Ser y Ala; X₆, X₁₂ y X₂₆ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Leu, Ile, Met y Val; X₇, X₃₂, X₃₆, X₄₄ y X₄₈ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Ile, Val, Leu y Met; X₉, y X₁₆ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Gln, Glu, Arg y Lys; X₁₀, X₁₃ y X₂₁ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Tyr, Phe, Trp y His; X₁₁, X₁₅, X₂₀ y X₃₅ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Phe, Tyr y Trp; X₁₈ y X₂₉ se seleccionan independientemente de un

grupo que consiste en His, Tyr y Asn; X₂₄ y X₃₇ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Ser, Ala, Asn y Thr; X₂₅ y X₃₈ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Arg, Lys y Gln; X₃₁ y/o X₄₂ se selecciona de un grupo que consiste en Lys, Arg, Glu y Gln; X₃₃ se selecciona de un grupo que consiste en Asp, Glu y Asn; X₄₀ and X₄₅ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Thr y Ser; X₄₁ se selecciona de un grupo que consiste en Glu, Asp, Gln y Lys; y X₄₆ y X₄₇ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en Val, Ile, Met, Leu y Phe.

Ensayos de Unión de Afinidad para Péptidos

Los ensayos de precipitación pueden usarse para verificar la interacción proteína-péptido. En este ensayo, el péptido puede marcarse, con una etiqueta que reacciona o se fusiona a las proteínas, es decir, GST (Glutathione-S-Transferasa), que se usará para capturar y 'precipitar' la pareja de unión a una proteína mediante la unión a una perla de celulosa, agarosa o níquel. Después de la elución del complejo mediante el uso del tampón de carga SDS-PAGE o, alternativamente, la elución de analito competitiva, el complejo se visualiza mediante una corrida en un gel SDS-PAGE y mediante el uso de métodos de detección de Análisis de transferencia Western. Los métodos conocidos en la técnica para realizar ensayos de unión se describen en Einarson, M.B. and Orlinick, J.R., "Identification of Protein-Protein Interactions with Glutathione S-Transferase Fusion Proteins" In Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 37-57 (2002), Einarson, M.B. Detection of Protein-Protein Interactions Using the GST Fusion Protein Pulldown Technique. En Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ra Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.18.55-18.59 (2001), y Vikis, H.G. and Guan, K.L. Glutathione-S-Transferase-Fusion Based Assays for Studying Protein-Protein Interactions. En Protein-Protein Interactions, Methods and Applications, Methods in Molecular Biology, 261, Fu, H. Ed. Humana Press, Totowa, N.J., pp. 175-186 (2004).

Las interacciones y la afinidad de proteínas y péptidos pueden evaluarse mediante el uso de la tecnología de resonancia de plasmones superficiales que permite medir estas interacciones en tiempo real (disponible a través de BIACore). Este enfoque tiene la ventaja de detectar las interacciones de proteínas de baja afinidad. La resonancia de plasmones superficiales se basa en un fenómeno óptico que se usa para medir los cambios en la concentración de la solución de moléculas en una superficie bioespecífica. Esta señal surge en películas metálicas delgadas en condiciones de reflexión interna total. Esta señal depende del índice de refracción de las soluciones en contacto con la superficie. Las moléculas en solución exhiben cambios en el índice de refracción y, por lo tanto, dan lugar a una señal medible si se produce una interacción bioespecífica. Típicamente, la proteína se inmoviliza mediante uno de diversos métodos posibles sobre una superficie carboximetilada de dextrano-oro. El péptido de interacción de interés se inyecta sobre la superficie y se mide la cinética de unión en tiempo real. Los métodos conocidos en la técnica para realizar ensayos de unión se describen en Schuck, P., "Reliable determination of binding affinity and kinetics using surface plasmon resonance biosensors", Current Opinion in Biotechnology, 8(4):498-502 (1997), y Zhang, X., Oglesbee, M. "Use of surface plasmon resonance for the measurement of low affinity binding interactions between HSP72 and measles virus nucleocapsid protein." Biological Procedures Online. 5(1): 170-181 (2003).

Ensayos Funcionales

Para determinar si los péptidos miméticos son capaces de bloquear la apertura de los hemicanales pueden usarse ensayos funcionales. La línea celular de cáncer cervical humano HeLa se transfeció de manera estable con Cx43, Cx45 u otra conexina de interés particular. Las células se incubaron en una solución cero calcio (HBSS-HEPES que contiene EGTA 1 mM), que se ha demostrado que activa a los hemicanales de conexina (Ver Braet, K., y otros, "Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-tibphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells. Journal of Cellular Physiology", 197(2): p. 205-213 (2003), DeVries, S.H. and EA. Schwartz, "Hemi-gap-junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina." Journal of Physiology, 445: p. 201-230 (1992), y Li, H., y otros, Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. Journal of Cell Biology, 134(4): p. 1019-1030 (1996)). Después, las células se incubaron durante 30 minutos en una solución de HBSS-HEPES que contiene EGTA 1 mM y yoduro de propidio 2 mM. El yoduro de propidio es un colorante fluorescente que es impermeable a las membranas, pero debido a su pequeño peso molecular es capaz de entrar a través de los hemicanales. La absorción de yoduro de propidio se determinará mediante microscopía de fluorescencia. Las células se incubarán con yoduro de propidio en presencia de los péptidos miméticos para determinar si estos pueden evitar la absorción de colorantes.

Polinucleótidos y ácidos nucleicos inhibidores de conexina

Los compuestos antisentido pueden usarse, además, en ciertas modalidades. Los compuestos antisentido incluyen polinucleótidos tales como desoxinucleótidos antisentido, nucleótidos de morfolino, ARNi y desoxirribosimas dirigidos a isoformas específicas de conexina que resultan en una traducción reducida de la isoforma de la proteína e interfieren con la función de las uniones de intersticio. La administración de estos compuestos antisentido resulta en la reducción de la comunicación célula-célula mediada por la unión de intersticio en el sitio en el cual se regula negativamente la expresión de conexina.

Los compuestos antisentido, por ejemplo, se han usado para la modulación de la expresión de los genes implicados en enfermedades virales, fúngicas y metabólicas. La patente de los EE.UU. Núm. 5.166.195, propone oligonucleótidos

inhibidores del HIV. La patente de los EE.UU. Núm. 5,004,810 propone oligómeros para hibridar con el ARNm del virus del herpes simple Vmw65 e inhibir la replicación.

5 Se describen compuestos antisentido, que incluyen los oligonucleótidos, para usar con el propósito de modular la función de las moléculas de ácido nucleico que codifican las conexinas, lo que modula finalmente la cantidad de conexinas producidas. Esto se logra proporcionando, por ejemplo, oligonucleótidos que hibridan específicamente con ácidos nucleicos, preferentemente ARNm, codificantes de conexinas.

10 Un oligonucleótido o polinucleótido antisentido puede, por ejemplo, hibridarse con todo o parte de un ARNm de conexina. Típicamente, el polinucleótido antisentido hibrida con la región de unión al ribosoma o con la región codificante del ARNm de conexina. El polinucleótido puede ser complementario a todo o a una región de un ARNm de conexina. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser el complemento exacto de todo o una parte del ARNm de conexina. El polinucleótido antisentido puede inhibir la transcripción y/o la traducción de conexina. Preferentemente, el polinucleótido es un inhibidor específico de la transcripción y/o la traducción del gen de conexina, y no inhibe la transcripción y/o la traducción de otros genes. El producto puede unirse al gen de conexina o al ARNm ya sea (i) 5' a la secuencia codificante, y/o (ii) a la secuencia codificante, y/o (iii) 3' a la secuencia codificante. Generalmente, el polinucleótido antisentido hará que se reduzca la expresión de ARNm y/o proteína de conexina en una célula. El polinucleótido antisentido es, generalmente, antisentido para el ARNm de conexina. Tal polinucleótido puede ser capaz de hibridarse con el ARNm de conexina y puede inhibir la expresión de conexina mediante la interferencia con uno o más aspectos del metabolismo del ARNm de conexina, que incluye la transcripción, el procesamiento de ARNm, el transporte de ARNm desde el núcleo, la traducción o la degradación del ARNm. El polinucleótido antisentido, típicamente, hibrida con el ARNm de conexina para formar un dúplex que puede causar inhibición directa de la traducción y/o desestabilización del ARNm. Tal dúplex puede ser susceptible a la degradación por nucleasas.

25 La hibridación de oligonucleótidos antisentido con el ARNm interfiere con una o más de las funciones normales del ARNm. Las funciones del ARNm a interferirse incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, la translocación del ARN al sitio de traducción de proteína, la traducción de la proteína a partir del ARN, el empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm, y la actividad catalítica que puede asociarse al ARN. La unión de proteínas específicas al ARN puede interferirse, además, mediante la hibridación del oligonucleótido antisentido al ARN.

35 El efecto general de la interferencia con la función del ARNm es la modulación de la expresión de conexina. En el contexto de esta invención, la "modulación" incluye inhibición o estimulación; es decir, una disminución o un aumento en la expresión. Esta modulación puede medirse de formas que son rutinarias en la técnica, por ejemplo, mediante ensayos de transferencia Northern de la expresión del ARNm, o PCR de transcriptasa inversa, como se enseña en los ejemplos de la aplicación instantánea o mediante transferencia Western o ensayo ELISA de expresión de proteínas, o mediante un ensayo de inmunoprecipitación de expresión de proteínas. Los efectos sobre la proliferación celular o el crecimiento de células tumorales pueden medirse, además, como se muestra en los ejemplos de la aplicación instantánea. Actualmente se prefiere la inhibición.

40 Una vez que se han identificado el sitio o los sitios diana, se eligen oligonucleótidos que son suficientemente complementarios a la diana, es decir, hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para proporcionar la modulación conveniente. Los ácidos nucleicos antisentido (ADN, ARN, modificados, análogos y similares) pueden prepararse mediante el uso de cualquier método adecuado para producir un ácido nucleico. Los oligodesoxinucleótidos dirigidos a otras proteínas de conexina pueden seleccionarse en términos de su secuencia de nucleótidos mediante cualquier enfoque reconocido en la técnica, tal como, por ejemplo, los programas informáticos MacVector y OligoTech (de Oligos, etcétera) Eugene, Oregon, EE.UU.). El equipo para tal síntesis está disponible a través de numerosos proveedores, que incluyen MacVector y OligoTech (de Oligos, etcétera, Eugene, Oregon, EE.UU.). Para los métodos generales relacionados con los polinucleótidos antisentido, ver *Antisense RNA and DNA*, D. A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988)). Ver, además, Dagle y otros, *Nucleic Acids Research*, 19: 1805 (1991). Para la terapia antisentido, ver, por ejemplo, Uhlmann y otros, *Chem. Reviews*, 90: 543-584 (1990). Típicamente, al menos una porción de la secuencia de nucleótidos se conoce para conexinas en las que la inhibición de la expresión es conveniente. Las dianas de polinucleótidos pueden identificarse adicionalmente mediante técnicas de caminata génica y caminata de PCR. Tales enfoques para la identificación de secuencias de polinucleótidos desconocidas adyacentes a secuencias de nucleótidos conocidas, son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Parker J.D., y otros, *Nucleic Acids Res* 19:3055-60 (1991) para una descripción de caminata de PCR). Preferentemente, un compuesto antisentido se dirige a uno o más isotipos específicos de conexina. Los isotipos de conexina particulares pueden seleccionarse, por ejemplo, en base a su expresión temporal o espacial. Las uniones de intersticio se expresan en los tejidos vasculares y, en determinados casos descritos, se seleccionan los isotipos de conexina expresados en los tejidos vasculares (por ejemplo, en las células endoteliales). Ver Camelliti P. y otros, *Cardiovasc. Res.* 62: 414 - 425 (2004). Se ha informado que las células endoteliales, las células endoteliales progenitoras, y las células del músculo liso expresan las conexinas 37, 40, 43 y 45. Ver De Wit, (2004); Haefliger y otros, (2004), Sohl and Willecke, (2004), y Szmitko y otros, (2003). Además, se ha informado que la conexina 43 está regulada positivamente en los vasos sanguíneos adyacentes a los sitios de heridas. Qiu C y otros, *Current Biology*, 13: 1967 - 1703 (2003).

En otros casos descritos, se seleccionan otros isotipos. Los isotipos específicos de conexinas que pueden seleccionarse mediante los compuestos antisentido incluyen, sin limitación, 45, 43, 37, 31.1, 26 y otros descritos en la presente descripción. En determinados casos, el compuesto anticonexina se dirige a la conexina 43, 45 y/o 40, y en otros el compuesto anticonexina se dirige a la conexina 7, 32 y/o 26. Puede seleccionarse una o más de una conexina.

En determinadas modalidades, un compuesto anticonexina se dirige a más de una conexina (por ejemplo, conexina 43 y conexina 45). En otras modalidades, se incluye más de un compuesto anticonexina en una formulación o composición (por ejemplo, una composición farmacéutica). Cualquier conexina puede seleccionarse mediante uno o más de un compuesto anticonexina descritos en la presente descripción, conocidos en la técnica, o descubiertos más tarde.

Se prefiere, pero no se requiere, que las conexinas seleccionadas sean humanas. Una conexina puede, por ejemplo, tener una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NOS:12-31. En determinados casos descritos, los compuestos antisentido se dirigen al menos a 8 bases nucleotídicas de una molécula de ácido nucleico codificante de una conexina que tiene una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NOS:12-31.

Las conexinas dianas variarán en dependencia del tipo de tejido a ser modificado genéticamente o remodelado y la secuencia precisa del polinucleótido antisentido dependerá de la proteína conexina diana. La proteína o proteínas conexinas seleccionadas mediante los oligonucleótidos dependerán del sitio al que se dirige la regulación negativa. Esto refleja la composición no uniforme de la(s) unión(es) de intersticio en diferentes sitios en todo el cuerpo, en términos de la composición de subunidades de conexina. Sin embargo, algunas proteínas conexina son más ubicuas que otras en términos de la distribución en el tejido. Como se describe en la presente descripción,

Los oligonucleótidos, ya sean solos o en combinación, pueden dirigirse hacia las conexinas 45, 43, 26, 37, 30 y/o 31.1 (por ejemplo, ver las SEQ. ID. NOS: 12-31) que son adecuadas para la aplicación del remodelado o transformación de la córnea. En un aspecto de la invención, los oligodesoxinucleótidos pueden ser oligómeros de fosfodiéster no modificados. En otro aspecto de la invención, los polinucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

En determinados ejemplos no limitantes, los compuestos antisentido se dirigen a regiones específicas de una molécula de ARNm o pre-ARNm de conexina, que incluye los exones, intrones, sitios de empalme de ARNm (uniones exón-exón o intrón-exón), la región 5' no traducida, y la región 3' no traducida.

Además, se contempla que los oligonucleótidos dirigidos a proteínas conexina separadas pueden usarse en combinación (por ejemplo, pueden seleccionarse una, dos, tres, cuatro o más conexinas diferentes). Por ejemplo, los ODN destinados a la conexina 45, y uno o más miembros de la familia de conexina (tal como conexina 43, 26, 30, 31.1, 37 y 43) pueden usarse en combinación. Además, se contempla que 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 generalmente se dirigirán a secuencias en el gen o ARNm de conexina que no son conservadas entre conexinas, mientras que los polinucleótidos no específicos se dirigirán a secuencias conservadas. Por lo tanto, en determinados casos descritos, los compuestos antisentido se dirigen al menos a 8 bases nucleotídicas de una molécula de ácido nucleico codificante de conexina 26 humana, conexina 30, conexina 31.1, conexina humana 37, conexina 43, conexina 45, en donde dicho compuesto antisentido inhibe la expresión de una proteína conexina humana en células asociadas con el ojo de dicho paciente.

En determinados casos descritos, las moléculas de ácido nucleico correspondientes a una conexina tienen una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ. ID NOS:12-31 que se incluyen en la lista de secuencias de esta aplicación (correspondiente a los complementos que incluyen, por ejemplo, las porciones de ADNc codificantes de una proteína conexina, etcétera). En determinadas modalidades, las composiciones se dirigen a dos o más proteínas conexina humana e inhiben la expresión de dos o más proteínas conexina humana. En determinadas modalidades adicionales, los compuestos antisentido son oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido ilustrativos para conexina 43 incluyen 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). Un ejemplo de un oligonucleótido antisentido para conexina 26 tiene la secuencia TCC TGA GCA ATA CCT AAC GAA CAA ATA (SEQ ID NO: 4). Los oligonucleótidos antisentido ilustrativos para conexina 37 seleccionados incluyen 5' CAT CTC CTT GGT GCT CAA CC 3' (SEQ ID NO: 5) y 5' CTG AAG TCG ACT TGG CTT GG 3' (SEQ ID NO: 6). Los oligonucleótidos antisentido ilustrativos para conexina 30 seleccionados incluyen 5'CTC AGA TAG TGG CCA GAA TGC 3' (SEQ ID NO: 7) y 5' TTG TCC AGG TGA CTC CAA GG 3' (SEQ ID NO: 8). Los oligonucleótidos antisentido ilustrativos para conexina 31.1 seleccionados incluyen 5' CGT CCG AGC CCA GAA AGA TGA GGT C 3' (SEQ ID NO: 9); 5' AGA GGC GCA CGT GAG ACA C 3' (SEQ ID NO: 10); y 5' TGA AGA CAA TGA AGA TGT T 3'(SEQ ID NO: 11).

En una modalidad adicional, los oligodesoxinucleótidos seleccionados de las siguientes secuencias son particularmente adecuados para regular negativamente la expresión de conexina 43:

5' GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC 3' (SEQ ID NO: 1)
 5', GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC 3'; y (SEQ ID NO: 2)
 5' GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT 3' (SEQ ID NO: 3)

Aún en otro caso descrito, los oligodesoxinucleótidos seleccionados del grupo de las siguientes secuencias son particularmente adecuados para las conexinas 26, 37, 30 y 31.1:

- 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)

Los compuestos antisentido descritos en la presente descripción generalmente comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 bases nucleotídicas (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 nucleósidos unidos), y más típicamente aquellos que comprenden de aproximadamente 12 a aproximadamente 40 bases nucleotídicas, e incluso más típicamente aproximadamente 30 bases nucleotídicas. Los compuestos antisentido que comprenden polinucleótidos pueden tener al menos aproximadamente 40, por ejemplo, al menos aproximadamente 60 o al menos aproximadamente 80, nucleótidos de longitud y hasta 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000 o 3000 o más nucleótidos de longitud. Los compuestos antisentido adecuados incluyen, por ejemplo, un ODN de 30 mer.

En determinados casos descritos, los compuestos antisentido se dirigen al menos aproximadamente a 8 bases nucleotídicas de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina que tiene una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NOS:12-31. En otro caso descrito, el compuesto antisentido se dirige al menos a aproximadamente 10, al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 14, al menos aproximadamente 16, al menos aproximadamente 18, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, y al menos aproximadamente 35 bases nucleotídicas de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina que tiene una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NOS:12-31. El tamaño de los compuestos antisentido, que incluye los oligonucleótidos dirigidos a entre al menos aproximadamente 8 y 35 bases nucleotídicas de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina humana, puede ser de 8 bases nucleotídicas de longitud o más, entre 8 y 100 bases nucleotídicas, entre ocho y 50 bases nucleotídicas, entre ocho y 40 bases nucleotídicas, entre 10 y 50 bases nucleotídicas, entre 12 y 50 bases nucleotídicas, entre 14 y 50 bases nucleotídicas, entre 16 y 50 bases nucleotídicas, entre 18 y 50 bases nucleotídicas, entre 20 y 50 bases nucleotídicas, entre 25 y 50 bases nucleotídicas, entre 15 y 35 bases nucleotídicas de longitud, y similares. Otros compuestos antisentido útiles en la invención pueden tener un tamaño más pequeño o más grande, por ejemplo, que tengan más de 100 bases nucleotídicas de longitud.

Los compuestos antisentido incluyen, sin limitación, oligonucleótidos antisentido (ODN), polinucleótidos antisentido, desoxirribosimas, oligonucleótidos de morfolino, moléculas de ARNi o análogos de estas, moléculas de siARN o análogos de estas, moléculas de PNA o análogos de estas, ADNzimas o análogos de estas, pequeños ARN nucleares U1 mutados en el extremo 5' y análogos de estos.

Como se describe en la presente descripción, el compuesto antisentido puede incluir el uso de oligodesoxinucleótidos (ODN). Los ODN generalmente tienen una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos y actúan mediante la hibridación con pre-ARNm y ARNm para producir un sustrato para la ribonucleasa H (RNasa H), que degrada específicamente la cadena de ARN de los dúplex de ARN-ADN formados. Si se modifica de una manera para evitar la acción de la RNasa H, los ODN pueden inhibir la traducción del ARNm a través del impedimento estérico, o mediante la inhibición del empalme de los pre-mRNA. Los ODN y las modificaciones de estos se han usado para dirigirse a los dsDNA para la inhibición de la transcripción mediante la formación de hélices triple. El ODN puede obtenerse mediante los métodos reconocidos en la técnica de síntesis automatizada y es relativamente sencillo obtener los ODN de cualquier secuencia y bloquear la expresión génica mediante el apareamiento de bases antisentido.

En determinados aspectos, la cadena principal del fosfodiéster de los ODN puede modificarse para aumentar su eficacia como agentes específicos de la diana para bloquear la expresión génica. Estas modificaciones de la cadena principal se desarrollaron para mejorar la estabilidad de los ODN y para mejorar su absorción celular. La modificación más ampliamente usada es una en la que el oxígeno que no forma puente se reemplaza por un átomo de azufre, lo que crea los ODN de fosforotioato. Al menos un ODN de fosforotioato se aprobó por la FDA, y numerosos otros ODN antisentido de fosforotioato se encuentran en etapas iniciales de ensayos clínicos para una diversidad de cánceres y enfermedades inflamatorias.

Los mecanismos de acción de los ODN con respecto al bloqueo de la función génica varían en dependencia de la cadena principal del ODN (Branch, A. D. Hepatology 24, 1517-1529 (1996); Dias, N. and Stein, C. A. Mol. Cancer Thor. 1,347-355 (2002); Stein, C.A. and Cohen, J. S., Cancer Res. 48, 2659-2668 (1988); Zon, G. Ann. N.Y. Acad Sci., 616, 161-172 (1990). Los ODN con carga neta negativa, tales como los fosfodiésteres y los fosforotioatos, provocan como respuesta la escisión del ARNm diana mediada por la RNasa H. Otras modificaciones de la cadena principal que no reclutan la RNasa H, debido a su falta de carga o al tipo de hélice formada con el ARN diana, pueden clasificarse

como ODN de impedimento estérico. Los miembros más usados de este último grupo incluyen morfolinós, U-O-metilos, 2"-O-alilojs, ácidos nucleicos bloqueados y ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Estos ODN pueden bloquear el empalme, la traducción, el transporte y la traslación del núcleo al citoplasma, entre otras dianas de inhibición.

5 En otro aspecto, la modulación de la expresión de conexina implica el uso de ribozimas. Las ribozimas son moléculas de ARN que actúan como enzimas, incluso en ausencia total de proteínas. Tienen la actividad catalítica de romper y/o formar enlaces covalentes con extraordinaria especificidad, lo que acelera de esta manera las velocidades naturales de las reacciones dirigidas en muchos órdenes de magnitud.

10 Las ribozimas se unen al ARN a través del apareamiento de bases de Watson - Crick y actúan para degradar el ARN diana mediante la catálisis de la hidrólisis de la cadena principal del fosfodiéster. Hay numerosas clases diferentes de ribozimas, la ribozima 'cabeza de martillo' es la más ampliamente estudiada. Como su nombre lo indica, la ribozima cabeza de martillo forma una estructura secundaria única cuando se hibrida con su ARNm diana. Los residuos importantes catalíticamente dentro de la ribozima están flanqueados por secuencias complementarias a la diana que
15 flanquean el sitio de escisión del ARN diana. La escisión por una ribozima requiere iones divalentes, tales como el magnesio, y además, depende de la estructura y la accesibilidad del ARN diana. La localización conjunta de una ribozima con un ARN diana dentro de la célula mediante el uso de señales de localización aumenta en gran medida su eficiencia de silenciamiento. Las ribozimas cabeza de martillo son lo suficientemente cortas como para sintetizarse químicamente o pueden transcribirse a partir de vectores, lo que permite la producción continua de ribozimas dentro
20 de las células.

La capacidad del ARN para servir como un catalizador se demostró por primera vez para el intrón del grupo I de auto-empalme de *Tetrahymena thermophila* y la porción de ARN de la ARNasa. Después del descubrimiento de estas dos
25 enzimas de ARN, se descubrió que la catálisis mediada por ARN se asocia con los intrones del grupo II de auto-empalme de las mitocondrias de levadura, hongos y plantas (así como también de los cloroplastos), ARN viroides y virusoides monocatenarios de plantas, virus de la hepatitis delta y un ARN satélite de la mitocondria de *Neurospora crassa*. Las ribozimas se producen de forma natural, pero además, pueden diseñarse artificialmente para la expresión y el direccionamiento de secuencias específicas en *cis* (en la misma cadena de ácido nucleico) o *trans* (un ácido nucleico unido de forma no covalente). Se están desarrollando nuevas actividades bioquímicas mediante el uso de protocolos de selección *in vitro*, así como también mediante la generación de nuevos motivos de ribozima que actúan sobre sustratos distintos al ARN.
30

El intrón del grupo I de *T. thermophila* fue la primera ribozima de *escisión en cis* en convertirse en una forma de *reacción en trans*, a la que nos referimos como un intrón/ribozima, por lo que es útil tanto en la investigación genómica y como un posible producto terapéutico. En la reacción de empalme en *trans*, puede cambiarse un exón defectuoso de un ARNm seleccionado por un exón correcto que se une covalentemente al intrón/ribozima. Esto ocurre a través de una reacción de empalme en la que el exón unido al intrón es posicionado mediante el apareamiento de bases con el ARNm diana de manera que pueda unirse covalentemente al extremo 5" del transcrito diana en una reacción de transesterificación. Esta reacción se ha usado para *empalme en trans* de secuencias de tipo silvestre en los transcritos de globina de células falciforme y en transcritos mutantes de *p53* y en el reemplazo de los tripletes expandidos en el 3"-UTR de los transcritos de la proteína quinasa en un alelo de distrofia miotónica.
40

La endorribonucleasa ARNasa P se encuentra en los organismos de toda la naturaleza. Esta enzima tiene ARN y uno o más componentes proteicos en dependencia del organismo del que se aísla. El componente de ARN de las enzimas de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* pueden actuar como un agente de escisión sitio específico en ausencia de la proteína mediadora, de determinadas condiciones salinas e iónicas. Los estudios de los requisitos de sustrato para las enzimas humanas y bacterianas demostraron que los sustratos mínimos para cualquiera de las enzimas se asemejan a un segmento de una molécula de ARN de transferencia. Esta estructura puede imitarse por los ARN antisentido diseñados excepcionalmente, que se aparean con el ARN diana, y sirven como sustratos para la escisión sitio específica mediada por RNAasa P, tanto en el tubo de ensayo como en las células. Además, se demostró que el componente antisentido puede unirse covalentemente al ARN de la RNAasa P, de esta manera dirige la enzima solamente al ARN diana de interés. Los investigadores tomaron ventaja de esta propiedad en el diseño de los ARN antisentido, que se aparean con los ARNm de interés para estimular la escisión sitio específica de la diana y para la inhibición dirigida tanto del virus del herpes simple como del citomegalovirus en cultivo celular.
50

Numerosos ARN patógenos de plantas pequeñas (viroides, ARN satélite y virusoides), un transcrito de un plásmido de ADN mitocondrial de *N. crassa* y el virus de la hepatitis delta animal experimentan una reacción de autoescisión *in vitro* en ausencia de proteína. Las reacciones requieren pH neutro y Mg^{2+} . La reacción de auto escisión es una parte integral del mecanismo de replicación *in vivo* de círculo rodante. Estos ARN auto-escindidos pueden subdividirse en grupos en dependencia de la secuencia y de la estructura secundaria formada alrededor del sitio de escisión. Las ribozimas pequeñas se han derivado de un motivo que se encuentra en los ARN viroides y virusoides monocatenarios de plantas. Sobre la base de una estructura secundaria compartida y un conjunto conservado de nucleótidos, el término "cabeza de martillo" se ha dado a un grupo de este dominio de auto escisión. La ribozima cabeza de martillo está compuesta por 30 nucleótidos. La simplicidad del dominio catalítico de cabeza de martillo lo ha convertido en una opción popular en el diseño de ribozimas que actúan *en trans*. Mediante el uso del apareamiento de bases de Watson-Crick, la ribozima cabeza de martillo puede diseñarse para escindir cualquier ARN diana. Los requisitos en el sitio de
60

escisión son relativamente simples, y prácticamente cualquier motivo de secuencia UH (donde H es U, C o A) puede ser seleccionado.

Un segundo motivo de auto-escisión derivado de plantas, inicialmente identificado en la cadena negativa del ARN satélite del mosaico del tabaco, se ha denominado "horquilla" o "clip de papel." Las ribozimas de horquilla escinden sustratos de ARN en una reacción reversible que genera extremos 2', fosfato cíclico Y y 5' -hidroxT1, versiones modificadas genéticamente de este motivo catalítico, además, escinden y eliminan múltiples copias de una diversidad de dianas en *trans*. Los requisitos de sustrato para la horquilla incluyen un GUC, con una escisión que ocurre inmediatamente en dirección 5' de la G. La ribozima de horquilla, además, cataliza una reacción de ligación, aunque se usa con más frecuencia para reacciones de escisión.

Ha habido numerosas aplicaciones de ribozimas de cabeza de martillo y horquilla en las células para regular negativamente dianas celulares y virales específicas. Haseloff y Gerlach diseñaron un motivo cabeza de martillo (Haseloff and Gerlach; Nature. Aug 18; 334(6183): 585-91 (1988)) que puede diseñarse para escindir cualquier diana mediante la modificación de los brazos que se aparean con la diana correcta. Ramemzani y *otros* demostraron que este motivo de la ribozima cabeza de martillo tenía aplicaciones terapéuticas potenciales en un estudio en el que había una inhibición virtual completa de la expresión y replicación de genes virales mediante el uso de células modificadas genéticamente para expresar una ribozima *gag* anti-virus de inmunodeficiencia humana (HIV) (Ramezani A. y otros, Frontiers in Bioscience 7:a, 29-36; (2002)).

En otro aspecto, la modulación de la expresión de conexina implica el uso de ADN catalíticos (o ADNzimas). Se han desarrollado pequeños ADN capaces de escindir específicamente el sitio de ARN diana a través de la evolución *in vitro* (ya que no se conocen enzimas de ADN en la naturaleza). Se identificaron dos motivos catalíticos diferentes, con diferentes especificidades del sitio de escisión. Las 10-20 enzimas usadas más comúnmente se unen a sus sustratos de ARN a través del apareamiento de bases de Watson-Crick y escinden el ARN diana específicamente en un sitio, al igual que las ribozimas cabeza de martillo y horquilla, lo que resulta en extremos 2'; 3" fosfato cíclico y 5"-OH. La escisión de los ARNm diana resulta en su destrucción y las ADNzimas se reciclan y escinden múltiples sustratos. Los ADN catalíticos son relativamente baratos de sintetizar y tienen buenas propiedades catalíticas, lo que los convierte en sustitutos útiles del ADN antisentido o las ribozimas.

Se han publicado numerosas aplicaciones de ADNzimas en cultivo celular, que incluyen la inhibición de FmRNA *veg* y la consiguiente prevención de la angiogénesis, y la inhibición de la expresión del transcrito de fusión *bcr/abl* característico de la leucemia mielógena crónica. Los ADN catalíticos pueden suministrarse de manera exógena, y pueden modificarse su cadena principal para optimizar el suministro sistémico en ausencia de un vehículo.

En otro aspecto de la presente invención, la modulación del gen constitutivo de conexina 43 implica el uso de oligonucleótidos que tienen estructuras de la cadena principal de morfolino. Summerton, J.E. and Weller, D.D. patente de los EE.UU. Núm. 5,034,506.

En otro aspecto de la invención, los polinucleótidos antisentido pueden modificarse químicamente para mejorar su resistencia a las nucleasas y aumentar la eficacia de la entrada a la célula. Por ejemplo, pueden usarse oligonucleótidos de cadena principal mezcladas (MBO) que contienen segmentos de oligodesoxinucleótidos de fosforotioato y segmentos de oligodeoxi u oligoribonucleótidos modificados colocados apropiadamente. Los MBO tienen segmentos de enlaces de fosforotioato y otros segmentos de otros oligonucleótidos modificados, tales como metilfosfonatos, fosforamidatos, fosforoditioatos, fosforamidatos de N3'P5' y fosforotioatos de oligoribonucleótidos y sus análogos de 2'-O-alquil y de 2'-O-metilribonucleótido metilfosfonatos, que son no iónicos, y muy resistentes a las nucleasas o los 2'-O-alquiloligoribonucleótidos.

Como se sabe en la técnica, un nucleósido es una combinación de base nucleotídica y azúcar. La porción de base nucleotídica del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que además incluyen un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede unirse a cualquiera de las porciones hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Al formar oligonucleótidos, los grupos fosfato unen covalentemente los nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de esta estructura polimérica lineal pueden unirse posteriormente para formar una estructura circular, sin embargo, generalmente se prefieren estructuras lineales abiertas. Dentro de la estructura del oligonucleótido, los grupos fosfato se denominan comúnmente en la medida que forman la cadena principal internucleosídica del oligonucleótido. El enlace o cadena principal normal del ARN y el ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

Los compuestos antisentido útiles en esta invención pueden incluir oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales. Los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. En el contexto de esta invención, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica pueden, además, considerarse oligonucleósidos.

Los compuestos antisentido con cadenas principales de oligonucleótidos modificados útiles en esta invención pueden incluir, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquilfosfonatos que incluyen fosfonatos de alquileo 3' y fosfonatos quirales, fosfinatos, -fosforamidatos que incluyen 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres, y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, enlaces 2'-5' análogos de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida, en donde los pares de unidades de nucleósidos adyacentes son enlaces 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. Además, se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

En un aspecto, se contempla que las cadenas principales de oligonucleótidos modificados que no incluyen un átomo de fósforo contengan cadenas principales formadas por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomo mixto y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heterocíclicos o heteroatómicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte por la porción de azúcar de un nucleósido); cadena principal de siloxano; cadena principal de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadena principal de formacetil y tioformacetil; cadena principal de metileno formacetil y tioformacetil; cadena principal que contienen alquenos; cadena principal de sulfamato; cadena principal de metilenoimino y metilenoimidazino; cadena principal de sulfonato y sulfonamida; cadena principal de amida; y otros que tienen partes componentes mixtos de N, O, S y CH₂.

En un aspecto, se contempla que los oligonucleótidos miméticos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, la cadena principal de las unidades de nucleótidos, se sustituyan con grupos novedosos. Las unidades de base nucleotídica se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana apropiado. Uno de tales compuestos oligoméricos, un oligonucleótido mimético que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, se denomina como un ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos PNA, la cadena principal de azúcar de un oligonucleótido se sustituye con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las bases nucleotídicas se retienen y se unen directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal. Puede encontrarse más información sobre los compuestos PNA en Nielsen y otros, (Science, 254, 1497-1500 (1991)).

En un aspecto, se contemplan los oligonucleótidos con cadena principal de fosforotioato y oligonucleósidos con cadena principal de heteroátomos, y en particular -CH₂-NH--O--CH₂--, --CH--2 N(CH₃)--O--CH--2 [conocido como un metileno (metilimino) o cadena principal MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- y --O--N(CH₃)--CH₂--CH₂-- [en donde la cadena principal fosfodiéster natural se representa como --O--P--O--CH₂--]. Aún en otro aspecto, se contemplan, además, oligonucleótidos que tienen estructuras de cadena principal de morfolino y amida.

En otro aspecto, se contempla que los oligonucleótidos modificados pueden contener, además, una o más porciones de azúcar sustituidas. Por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O--, S--, o N-alquilo, O-alquilo-O-alquilo, O--, S--, o N-alqueno, u O--, S-- o N-alquino, en donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser C₁ a C₁₀ alquilo o C₂ a C₁₀ alqueno y alquino sustituidos o no sustituidos. Particularmente preferidos son O[(CH₂)_n O]_m CH₃, O(CH₂)_n OCH₃, O(CH₂)₂ ON(CH₃)₂, O(CH₂)_n NH₂, O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n ONH₂, y O(CH₂)_n ON[(CH₂)_n CH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos pueden comprender uno de los siguientes en la posición 2': C₁ a C₁₀ alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂ CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo reportero, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tiene propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'--O--CH₂ CH₂ OCH₃, conocido, además, como 2'--O--(2-metoxietil) o 2-MOE) (Martin y otros Helv. Chim. Acta 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcoxicoxi. Otra modificación incluye 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un O(CH₂)₂ ON(CH₃). 2 grupo, conocido además como 2-DMAOE, y 2'-dimetilamino-etoxietoxi (2'-DMAEOE), es decir, 2'--O-CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂.

Se contempla, además, que las modificaciones pueden incluir 2'-metoxi (2'--O--CH₃), 2'-aminopropoxi (2'--OCH₂ CH₂ NH₂) y 2'-fluro (2'-F). Además, pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en los oligonucleótidos unidos 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos pueden tener, además, miméticos de azúcar, tales como las porciones de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo.

En otro aspecto, se contempla que los oligonucleótidos pueden incluir, además, modificaciones o sustituciones de las bases nucleotídicas (a menudo referidas en la técnica simplemente como "base"). Como se usa en la presente descripción, bases nucleotídicas "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases nucleotídicas modificadas incluyen otras bases nucleotídicas sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C o m5c), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-amincadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-

deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Las bases nucleotídicas adicionales incluyen las descritas en la Patente de los EE.UU. Núm. 3,687,808, las descritas en la Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-959 (1990), Kroschwitz, J. John Wiley & Sons, las descritas por Englisch y otros, (Angewandte Chemie, Edición Internacional, 30, 613-722 (1991)), y las descritas por Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B., ed., CRC Press (1993). Algunas de estas bases nucleotídicas son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos. Estas incluyen pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se demostró que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad dúplex del ácido nucleico en 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, páginas 276-278 (1993)) y son sustituciones de bases actualmente preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

En otro aspecto, se contempla que la modificación de los oligonucleótidos implica la unión química al oligonucleótido de una o más porciones o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Tales porciones incluyen, pero no se limitan a porciones lipídicas tales como una porción de colesterol (Letsinger y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6553-6556 (1989)), ácido cólico (Manoharan y otros, Bioorg. Med. Chem. Lett. 4, 1053-1059 (1994)), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitol (Manoharan y otros, Ann. N.Y. Acad. Sci. 660,306-309; Manoharan y otros, Bioorg (1992). Med. Chem. Let. 3, 2765-2770 (1993)), un tiocolesterol (Oberhauser y otros, Nucl. Acids Res., 20, 533-538 (1992)), una cadena alifática, por ejemplo, residuos dodecandiol o undecil (Saison-Behmoaras y otros, EMBO J. 10, 1111-1118 (1991)); Kabanov y otros, FEBS Lett. 259, 327-330 (1990); Svinarchuk y otros, Biochimie 75,49-54 (1993)), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan y otros, Tetrahedron Lett. 36, 3651-3654 (1995); Shea y otros, Nucl. Acids Res. 18, 3777-3783 (1990)), una poliamina o una cadena de polietilén glicol (Manoharan y otros, Nucleosides & Nucleotides 14, 969-973 (1995)), o ácido adamantano acético (Manoharan y otros, Tetrahedron Lett. 36, 3651-3654 (1995)), una porción palmitil (Mishra y otros, Biochim. Biophys. Acta 1264, 229-237 (1995)), o una porción octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke y otros, J. Pharmacol. Exp. Ther. 277, 923-937 (1996)).

Además, se contempla el uso de oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos. Los oligonucleótidos "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta de al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos, típicamente, contienen al menos una región en donde el oligonucleótido se modifica para conferir al oligonucleótido mayor resistencia a la degradación de las nucleasas, mayor absorción celular, y/o mayor afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir los híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la RNasa H, por lo tanto, resulta en la escisión del ARN diana, mejorando de esta manera, en gran medida, la eficacia de la inhibición antisentido de la expresión génica. La escisión del ARN diana puede detectarse rutinariamente mediante electroforesis en gel y, si es necesario, mediante técnicas de hibridación de ácido nucleico asociadas, conocidas en la técnica. Esta escisión del ARN diana mediada por la RNasa H es distinta del uso de ribozimas para escindir ácidos nucleicos.

Los ejemplos de oligonucleótidos quiméricos incluyen, pero no se limitan a, "gapmeros", en los que están presentes tres regiones distintas, normalmente con una región central flanqueada por dos regiones que son químicamente equivalentes entre sí, pero distintas de la brecha. Un ejemplo preferido de un gapmero es un oligonucleótido en el que una porción central (el "gap") del oligonucleótido sirve como sustrato para la RNasa H y se compone preferentemente de 2'-desoxinucleótidos, mientras que las porciones flanqueantes (las "alas" 5' y 3') se modifican para tener una mayor afinidad por la molécula de ARN diana pero son incapaces de soportar la actividad nucleasa (por ejemplo, fluoro- o 2'-O-metoxietil-sustituido). Los oligonucleótidos quiméricos no se limitan a aquellos con modificaciones en el azúcar, sino que, además, pueden incluir oligonucleósidos u oligonucleótidos con cadena principal modificada, por ejemplo, con regiones de fosforotioato (P = S) y enlaces de cadena principal de fosfodiéster (P = O) o con regiones de MMI y enlaces de cadena principal P = S. Otras quimeras incluyen "wingmeros", además conocidos en la técnica como "hemímeros", es decir, oligonucleótidos con dos regiones distintas. En un ejemplo preferido de un wingmero, la porción 5' del oligonucleótido sirve como sustrato para la RNasa H y está compuesta, preferentemente, de 2'-desoxinucleótidos, mientras que la porción 3' se modifica de tal manera que tiene una mayor afinidad por la molécula de ARN diana, pero no puede soportar la actividad nucleasa (por ejemplo, 2'-fluoro- o 2-O-metoxietil-sustituido), o viceversa. En una modalidad, los oligonucleótidos útiles en la presente invención contienen una modificación 2'-O-metoxietil (2'--O--CH₂ CH₂ OCH₃) en la porción de azúcar de al menos un nucleótido. Se demostró que esta modificación aumenta la afinidad del oligonucleótido por su diana y la resistencia del oligonucleótido a las nucleasas. De acuerdo con la invención, una pluralidad o todas las subunidades de nucleótidos de los oligonucleótidos pueden portar una modificación 2'-O-metoxietil (--O--CH₂ CH₂ OCH₃): Los oligonucleótidos que comprenden una pluralidad de subunidades de nucleótidos que tienen una modificación 2'-O-metoxietilo pueden tener una modificación de este tipo en cualquiera de las subunidades de nucleótidos dentro del oligonucleótido, y pueden ser oligonucleótidos quiméricos. Aparte de, o además de, las modificaciones de 2'-O-metoxietilo, además, se contemplan los oligonucleótidos que contienen otras modificaciones que mejoran la eficacia antisentido, la potencia o la afinidad por la diana.

Además, en la presente invención son útiles los polinucleótidos (por ejemplo, ADN, ARN, ANP o similares) que se unen a ácidos nucleicos de conexina, bicatenarios o dúplex (por ejemplo, en una región plegada del ARN de conexina o en el gen de conexina), que forman una triple hélice que contiene, o ácido nucleico "triple". La formación de triple hélice resulta en la inhibición de la expresión de conexina, por ejemplo, porque previene la transcripción del gen de conexina, por lo tanto, reduce o elimina, la actividad de conexina en una célula. Sin pretender estar vinculado por ningún mecanismo en particular, se cree que el apareamiento de triple hélice compromete la capacidad de la doble hélice para abrirse suficientemente para que se produzca la unión de polimerasas, factores de transcripción, o moléculas reguladoras.

Los oligo y polinucleótidos triples se construyen mediante el uso de las reglas de apareamiento de bases de la formación de triple hélice (ver, por ejemplo, Cheng y otros, J. Biol. Chem. 263: 15110 (1988); Ferrin and Camerini-Otero, Science 354:1494 (1991); Ramdas y otros, J. Biol. Chem. 264:17395 (1989); Strobel y otros, Science 254:1639 (1991); y Rigas y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 9591 (1986)) y el ARNm de conexina y/o la secuencia génica. Típicamente, los oligonucleótidos formadores de triple comprenden una secuencia específica de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 nucleótidos o más largo "complementaria" a una secuencia específica en el ARN o gen de conexina (*es decir*, lo suficientemente grande como para formar una triple hélice estable, pero lo suficientemente pequeña, en dependencia del modo de suministro, para administrar *en vivo*, si es conveniente). En este contexto, "complementario" significa capaz de formar una triple hélice estable. En una modalidad, los oligonucleótidos se diseñan para unirse específicamente a las regiones reguladoras del gen de conexina (por ejemplo, la secuencia flanqueante 5' de conexina, promotores, y potenciadores) o al sitio de inicio de la transcripción (por ejemplo, entre -10 y +10 a partir del sitio de inicio de la transcripción). Para una revisión de los avances terapéuticos recientes que usan ADN triple, ver Gee y otros, in Huber and Carr, 1994, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co, Mt Kisco NY y Rininsland y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5854 (1997).

Las ribozimas, además, son útiles para inhibir la actividad de conexina. Las ribozimas se unen y específicamente escinden e inactivan el ARNm de conexina. Las ribozimas útiles pueden comprender secuencias terminales 5' y 3' complementarias al ARNm de conexina y pueden diseñarse por un experto sobre las bases de la secuencia de ARNm de conexina. Se contempla que las ribozimas descritas en la presente descripción incluyen aquellas que tienen características de ribozimas de intrón del grupo I (Cech, Biotechnology 13:323 (1995)) y otras ribozimas cabeza de martillo (Edgington, Biotechnology 10:256 (1992)).

Las ribozimas incluyen las que tienen sitios de escisión tales como GUA, GUU y GUC. Los oligonucleótidos de ARN corto entre 15 y 20 ribonucleótidos de longitud correspondientes a la región del gen de conexina diana que contiene el sitio de escisión, pueden evaluarse por las características estructurales secundarias que pueden hacer que el oligonucleótido sea más conveniente. La idoneidad de los sitios de escisión puede evaluarse, además, mediante la evaluación de la accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, mediante el uso de ensayos de protección de ribonucleasa, o mediante la evaluación *in vitro* de la actividad de ribozima de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica.

Además, se contemplan compuestos antisentido en los que las funciones antisentido y de ribozima pueden combinarse en un único oligonucleótido. Además, las ribozimas pueden comprender uno o más nucleótidos modificados o enlaces modificados entre nucleótidos, como se describió anteriormente junto con la descripción de oligonucleótidos antisentido ilustrativos descritos en la presente descripción.

Además, se describen polinucleótidos útiles para inhibir la actividad de conexina mediante métodos tales como ARN de interferencia (ARNi). Esta y otras técnicas de supresión génica son bien conocidas en la técnica. Una revisión de esta técnica se encuentra en Science 288:1370-1372 (2000). El ARNi opera en un nivel post-transcripcional y es específico de una secuencia. El proceso comprende la introducción del ARN con carácter parcial o totalmente bicatenario, o precursores de dicho ARN o capaces de codificarlo en la célula o en el entorno extracelular.

Según lo descrito por Fire y otros, Patente de los EE.UU. núm. 6,506,559, el ARN puede comprender una o más cadenas de ribonucleótido polimerizado. La estructura bicatenaria puede estar formada por una única cadena de ARN autocomplementaria o dos cadenas de ARN complementarias. El ARN puede incluir modificaciones, bien sea, en la cadena principal de fosfato y azúcar o en los nucleósidos. La formación de dúplex de ARN puede iniciarse dentro o fuera de la célula.

Los estudios demostraron que una o más ribonucleasas se unen específicamente y escinden el ARN bicatenario en fragmentos cortos. La ribonucleasa(s) permanece asociada con estos fragmentos, que a su vez se unen específicamente al ARNm complementario, *es decir*, se unen específicamente a la cadena del ARNm transcrito por el gen de la conexina. El ARNm para el gen de conexina se degrada, además, por la ribonucleasa(s) en fragmentos cortos, por lo que se obvia la traducción y la expresión del gen de conexina, y de esta manera se inhibe la actividad de conexina. Además, una ARN polimerasa puede actuar para facilitar la síntesis de numerosas copias de los fragmentos cortos, que aumenta exponencialmente la eficiencia del sistema. Una característica única de esta vía de supresión génica es que el silenciamiento no se limita a las células donde se inicia. Los efectos de silenciamiento génico pueden diseminarse a otras partes de un organismo e incluso transmitirse a través de la línea germinal a numerosas generaciones.

En un aspecto, la estrategia del ARNi de silenciamiento postranscripcional específico del gen de doble cadena dependiente de (ds)ARN implica el uso de ARN interferentes cortos (siARN). El uso del enfoque general de ARNi está sujeto a determinadas limitaciones, que incluye el mecanismo de defensa antiviral no específico en células de mamífero activadas en respuesta a moléculas de dsARN largas (Gil J, Esteban M, "Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): Mechanisms of action". *Apoptosis* 2000, 5:107-114). Se han logrado avances en el campo con la demostración de que los dúplex sintéticos de 21 nucleótidos de ARN podrían mediar el ARNi específicos de genes en células de mamífero sin invocar mecanismos de defensa antivirales genéricos (Elbashir S, y otros, "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells". *Nature*, 411:494-498 (2001); Caplen N. y otros, *Proc Natl Acad Sci*, 98:9742-9747 (2001)). Por lo tanto, los siARN se reconocen cada vez más como herramientas poderosas para la modulación génica específica.

Como se describe en la presente descripción, el ARNi incluye a un grupo de mecanismos relacionados con el silenciamiento génico que comparten muchos componentes bioquímicos comunes en los que la molécula efectora terminal es, por ejemplo, pero no se limita a, un pequeño ARN antisentido de 21-23 nucleótidos. Un mecanismo usa un dsARN relativamente largo 'disparador'; que se procesa por la enzima celular Dicer en cortos, por ejemplo, pero no limitado a, dsARN de 21-23 nucleótidos, denominados como siARN. La hebra del siARN complementaria al ARN diana se incorpora en un complejo multi-proteína denominado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), donde sirve como una guía para la escisión endonucleolítica de la hebra de ARNm dentro del sitio diana. Esto conduce a la degradación de todo el ARNm; después el siARN antisentido puede reciclarse. En organismos inferiores, la RNA-polimerasa dependiente de ARN utiliza, además, la guía siARN de hibridación como un cebador, generando más dsARN a partir de la diana, que sirve a su vez como un sustrato Dicer, que genera más siARN y amplifica la señal del siARN. Esta vía se usa comúnmente como un mecanismo de defensa viral en las plantas.

Como se describió en la presente descripción, el siARN puede consistir en dos cadenas individuales hibridadas, separadas de, por ejemplo, pero no limitadas a, 21-23 nucleótidos, donde los dos nucleótidos terminales 3' no están apareados (saliente 3'). Alternativamente, el siARN puede estar en la forma de un único tallo-lazo, a menudo referido como un ARN de horquilla corta (shARN). Típicamente, pero no siempre, la cadena antisentido de los shARN es, además, absolutamente complementaria a la cadena sentido pareja del si/shARN.

En células de mamíferos, los dsARN largos (generalmente mayores de 30 nucleótidos de longitud) desencadenan la vía del interferón, proteína activadora de quinasa R y 2; 5'-oligoadenilato sintetasa. La activación de la vía del interferón puede conducir a una regulación negativa total de la traducción, así como también a la degradación total del ARN. Sin embargo, se ha informado que los siARN más cortos introducidos exógenamente en células de mamífero evitan la vía del interferón.

El producto antisentido siARN puede, además, derivarse de los microARN endógenos. En las células humanas, independientemente de la forma inicial (siARN y microARN) o de la ruta de procesamiento, un ARN antisentido de 21-23 nucleótidos con maduración final, por ejemplo, pero sin limitarse a esto, que es completamente homólogo al ARNm dirigirá la escisión del ARNm. En general, el efecto de los desapareamientos entre siARN y los sitios diana puede variar desde casi ninguno hasta la abolición completa de la actividad, por razones que se entienden sólo parcialmente; sin embargo, en al menos un caso, la homología parcial resultó en la inhibición de la traducción de ARNm. En general, el siARN con desapareamiento de la diana diseñado para imitar una interacción prototípica microARN-diana puede mediar diversos grados de represión traduccional, en dependencia de la interacción específica y del número de sitios diana en el ARNm. El ARNi puede activarse mediante el suministro exógeno de siARN preformados o mediante la expresión de siARN o shARN basada en promotores.

Los ARN de interferencia cortos (siARN) pueden sintetizarse químicamente o generarse mediante sistemas de vectores basados en ADN. En general, esto implica la transcripción de ARN de horquilla corta (sh)RNA que se procesan eficientemente para formar siARN dentro de las células (Paddison P, Caudy A, Hannon G: Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1443-1448 (2002); Paddison P, Caudy A, Bernstein E, Hannon G, Conklin D: Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes & Dev* 16:948-958 (2002); Sui G, y otros, *Proc Natl Acad Sci* 8:5515-5520 (2002); Brummelkamp T, y otros, *Science* 296:550-553 (2002)). Por lo tanto, en el contexto, los siARN pueden emplearse como una estrategia efectiva para el direccionamiento específico a un tejido y la modulación de la expresión génica.

Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta invención pueden hacerse convenientemente y rutinariamente mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para tal síntesis se vende por numerosos proveedores conocidos en la técnica. Además, puede emplearse cualquier otro medio para tal síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos es bien reconocida en la técnica. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados de 2'-alcoxi o 2'-alcoxiacoxi, que incluye los oligonucleótidos de 2'-O-metoxietilo (Martin, P. *Helv. Chim. Acta* 78, 486-504 (1995)). Además, es bien conocido el uso de técnicas similares y amiditas modificadas disponibles en el mercado y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditas modificadas con psoraleno y/o CPG (comercializado por de Glen Research, Sterling, Va.) para sintetizar oligonucleótidos marcados con fluorescencia, biotinilados u otros oligonucleótidos conjugados.

Métodos

Además, en la presente descripción se describen métodos para tratar un sujeto (por ejemplo, un paciente), un órgano diana, un tejido diana o una célula diana mediante la administración de los compuestos descritos en la presente descripción.

Determinados casos descritos están dirigidos a los métodos para tratar un sujeto, órgano diana, tejido diana o célula diana con un trastorno vascular que comprende administrar a un sujeto un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro compuesto descrito en la presente descripción capaz de inhibir la expresión, formación, o actividad de un hemicanal de conexina. Los trastornos vasculares incluyen, por ejemplo, cualquier trastorno o afección asociada con arterias, vasos sanguíneos, y el sistema vascular y/o cardiovascular, que incluye los trastorno o afecciones en órganos o tejidos asociados. Los ejemplos representativos incluyen, sin limitación, aterosclerosis, trastornos microvasculares, trastornos macrovasculares, accidente cerebrovascular, enfermedad cerebrovascular (isquemia cerebral), trombosis, lesiones vasculares resultantes de traumatismos (por ejemplo, heridas subcutáneas, inserción de stent, reestenosis, o angioplastia), daños vasculares resultantes de la elevación de los niveles de glucosa (diabetes), retinopatía diabética, enfermedades vasculares de las extremidades, isquemia de órganos, y dehiscencia de las células endoteliales.

Otros casos descritos están dirigidos a métodos para tratar un trastorno inflamatorio que comprende administrar a un sujeto, órgano diana, tejido diana o célula diana un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro compuesto descrito en la presente descripción capaz de inhibir la expresión, formación, o actividad de un hemicanal de conexina.

Otros casos descritos están dirigidos a los métodos para tratar un sujeto, órgano diana, tejido diana o célula diana en relación con un trasplante o procedimiento de injerto que comprende la administración a dicho paciente de un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro compuesto descrito en la presente descripción capaz de inhibir la expresión, formación, o actividad de un hemicanal de conexina e inhibición o prevención del edema tisular asociado con dicho trasplante o procedimiento de injerto.

Otros casos descritos están dirigidas a los métodos para tratar el infarto del miocardio y sus enfermedades cardíacas asociadas que comprenden administrar a un sujeto un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro compuesto descrito en la presente descripción capaz de inhibir la expresión, formación, o actividad de un hemicanal de conexina.

Aún otros casos descritos están dirigidos a los métodos para tratar la enfermedad de la arteria coronaria, que comprenden administrar a un sujeto, órgano diana, tejido diana o célula diana un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro compuesto descrito en la presente descripción capaz de inhibir la expresión, formación, o actividad de un hemicanal de conexina.

Otros casos descritos están dirigidos a los métodos para tratar el daño asociado con la isquemia, que incluye el daño isquémico inicial y una lesión posterior por reperfusión.

Otros casos descritos están dirigidos a los métodos para tratar el infarto del miocardio y sus enfermedades cardíacas asociadas, que comprenden la coadministración a un sujeto de un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro compuesto descrito en la presente descripción capaz de inhibir la expresión, formación, o actividad de un hemicanal de conexina en combinación con otros enfoques terapéuticos conocidos o procedimientos para el tratamiento de afecciones isquémicas asociadas con el corazón, que incluye los descritos en Baker DW y otros, (ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult, 2001; American College of Cardiology and the American Heart Association). Tales procedimientos incluyen, por ejemplo, trasplante cardíaco, abordajes quirúrgicos y mecánicos, reparación o reemplazo de la válvula mitral para mejoras hemodinámicas y clínicas, dispositivos extracorpóreos para soporte circulatorio, dispositivos de asistencia ventricular izquierda, descompresión mecánica, ventriculoectomía izquierda (procedimiento Batista), cardiomioplastia y una variante del procedimiento de aneurismectomía para el manejo de pacientes con cardiomiopatía isquémica.

Los implantes y otros dispositivos quirúrgicos o médicos pueden recubrirse con (o de cualquier otra manera adaptarse para liberar) agentes (por ejemplo, compuestos y composiciones anticonexinas) de varias maneras, que incluyen, por ejemplo: (a) mediante la fijación directamente al implante o dispositivo de un agente o composición anticonexina (por ejemplo, pulverizando el implante o dispositivo con una película de polímero/fármaco, o sumergiendo el implante o dispositivo en una solución de polímero/fármaco, u otros medios covalentes o no covalentes); (b) mediante el recubrimiento del implante o dispositivo con una sustancia tal como un hidrogel que a su vez absorbe la composición anticonexina (o anteriormente factor anticonexina); (c) entrelazando un hilo recubierto de la composición anticonexina (o el propio polímero formado en un hilo) en el implante o dispositivo; (d) mediante la inserción del implante o dispositivo en un manguito o malla que está compuesto o recubierto con una composición anticonexina; (e) construir el implante o el propio dispositivo con un agente o composición anticonexina; o (f) adaptando de cualquier otra manera el implante o dispositivo para liberar el agente anticonexina. Dentro de los casos descritos preferidos, la composición debe adherirse firmemente al implante o dispositivo durante el almacenamiento y en el momento de la inserción. Además, el agente o composición anticonexina no debe degradarse, preferentemente, durante el almacenamiento, antes de la inserción, o cuando se calienta a la temperatura corporal después de la inserción dentro del cuerpo (si es necesario). Además, preferentemente, debe recubrir el implante o dispositivo lisa y equitativamente, con una distribución uniforme

del agente anticonexina, sin cambiar el contorno del stent. Dentro de los casos descritos preferidos, el agente o composición anticonexina debería proporcionar una liberación uniforme, predecible, y prolongada del factor anticonexina en el tejido que rodea el implante o dispositivo una vez que se ha puesto en uso. Para los stent vasculares, además de las propiedades anteriores, la composición no debe hacer que el stent sea trombogénico (lo que causa la formación de coágulos sanguíneos), ni causar turbulencias significativas en el flujo sanguíneo (más de lo que cabría esperar si el propio stent no estuviese recubierto).

Los compuestos anticonexinas, composiciones y métodos descritos en la presente descripción pueden usarse en una diversidad de procedimientos que utilizan los implantes, dispositivos médicos y quirúrgicos, y similares. En un aspecto, los implantes, dispositivos quirúrgicos o stents, están recubiertos con, o contruidos de cualquier otra manera para contener y/o liberar cualquiera de los agentes anticonexina descritos en la presente descripción. Los ejemplos representativos incluyen dispositivos cardiovasculares (por ejemplo, catéteres venosos implantables, puertos venosos, catéteres venosos tunelizados, líneas o puertos de infusión crónica, que incluyen catéteres de infusión de arteria hepática, cables de marcapasos, desfibriladores implantables); dispositivos neurológicos/neuroquirúrgicos (por ejemplo, derivaciones ventriculares peritoneales, derivaciones ventriculares auriculares, dispositivos de estimulación nerviosa, parches duros e implantes para prevenir la fibrosis epidural después de la laminectomía, dispositivos para infusiones subaracnoideas continuas); dispositivos gastrointestinales (por ejemplo, catéteres permanentes crónicos, tubos de alimentación, y derivaciones) implantes oftalmológicos (por ejemplo, implantes multino y otros implantes para el glaucoma neovascular, lentes de contacto liberadores de fármacos para pterigio, férulas para dacrocistalrinostomía fallida, lentes de contacto liberadores de fármacos para la neovascularización corneal, implantes para la retinopatía diabética, lentes de contacto liberadores de fármacos para trasplantes corneales de alto riesgo); dispositivos de otorrinolaringología (por ejemplo, implantes oscilares, férulas de la trompa de Eustaquio o endoprótesis para el oído adhesivo u otitis crónica, como una alternativa a los drenajes transtimpánicos); implantes de cirugía plástica (por ejemplo, prevención de contractura fibrosa en respuesta a implantes mamarios que contienen gel o solución salina en los abordajes subpectorales o subglandulares o post-mastectomía, o implantes de mentón), e implantes ortopédicos (por estiramiento, prótesis ortopédicas cementadas).

Un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro compuesto descrito en la presente descripción puede administrarse en un momento predeterminado en determinados casos descritos. En determinados casos descritos, se inhibe la expresión, formación, o actividad de hemicanal de conexina antisentido en las células endoteliales. En determinados casos descritos, un sujeto puede tratarse por un trastorno vascular que comprende un accidente cerebrovascular. En determinados casos descritos, un sujeto puede tratarse por un trastorno vascular que comprende una isquemia. Tal isquemia puede ser, por ejemplo, una isquemia tisular, una isquemia miocárdica, o una isquemia cerebral. En determinados casos descritos, un sujeto tratado en la presente descripción está en riesgo de perder la función neurológica por isquemia. En otros casos descrito, un sujeto puede tratarse por un trastorno vascular que comprende tratar o mejorar la muerte celular o la degeneración en el sistema nervioso central o periférico causada por una isquemia. En determinados casos descritos, un sujeto puede tratarse por un trastorno vascular donde un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro compuesto descrito en la presente descripción se administra junto con un procedimiento vascular o coronario realizado en un sujeto. En otros casos descritos, se administra un compuesto antisentido, péptido mimético, u otro compuesto descrito en la presente descripción durante dicho procedimiento vascular o coronario.

La administración de los compuestos descritos en la presente descripción puede ser anterior o posterior a un punto de tiempo seleccionado. El "punto de tiempo seleccionado" puede corresponder, por ejemplo, al inicio de un trastorno o afección tal como un trastorno cardiovascular, inflamación, un trastorno vascular, o un evento isquémico, o con la realización de un procedimiento médico tal como un procedimiento vascular o coronario. Los compuestos descritos en la presente descripción (por ejemplo, compuestos antisentido, péptido mimético, etcétera), pueden por ejemplo, administrarse antes, coincidiendo con, o después de un punto de tiempo seleccionado. En determinadas modalidades, los compuestos se administran inmediatamente y hasta aproximadamente 24 horas posteriores a un punto de tiempo seleccionado. En otras modalidades, los compuestos se administran dentro de aproximadamente 1 hora después de un punto de tiempo seleccionado, dentro de aproximadamente 2 horas después del punto de tiempo seleccionado, dentro de aproximadamente 3 horas después de un punto de tiempo seleccionado, dentro de aproximadamente 4 horas después de un punto de tiempo seleccionado, dentro de aproximadamente 5 horas después de un punto de tiempo seleccionado, dentro de aproximadamente 6 horas después de un punto de tiempo seleccionado, dentro de aproximadamente 8 horas después de un punto de tiempo seleccionado, dentro de aproximadamente 10 horas después de un punto de tiempo seleccionado, dentro de aproximadamente 12 horas después de un punto de tiempo seleccionado, dentro de aproximadamente 14 horas después de un punto de tiempo seleccionado, dentro de aproximadamente 16 horas después de un punto de tiempo seleccionado, dentro de aproximadamente 20 horas después de un punto de tiempo seleccionado, o dentro de aproximadamente 24 horas después de un punto de tiempo seleccionado. En determinadas modalidades, un compuesto descrito en la presente descripción se administra junto con una cirugía de corazón u otra realizada en un paciente. Los "puntos de tiempo seleccionados," como se refieren en la presente descripción, incluyen un tiempo de lesión, un tiempo de realización de un procedimiento, por ejemplo, un procedimiento cardíaco o vascular, *etcétera*. En determinados otros casos descritos, un compuesto descrito en la presente descripción se administra junto con un dispositivo médico para realizar un procedimiento vascular.

5 En determinados casos descritos, el trastorno vascular tratado se selecciona entre uno o más de accidente cerebrovascular isquémico, ataque isquémico transitorio, hemorragia intracerebral, hemorragia subaracnoidea, accidente cerebrovascular tromboembólico, trombosis venosa, embolismo pulmonar, accidente cerebrovascular embólico, trastorno cerebrovascular, enfermedad arterial oclusiva periférica, malformación arteriovenosa y un aneurisma.

10 En determinados casos descritos, el trastorno vascular tratado se asocia con uno o más de enfermedad coronaria, trastorno vascular coronario, enfermedad vascular aterosclerótica, ruptura de la placa aterosclerótica y/o tromboembólica, un trastorno vascular asociado con hipertensión, infarto de miocardio, angina, enfermedad isquémica cardíaca, trastorno aórtico, enfermedades arteriales periféricas, displasia fibromuscular, enfermedad de Moyamoya, y tromboangiitis.

15 En determinados casos descritos, un trastorno inflamatorio tratado se selecciona entre uno o más de artritis, artritis reumatoide (RA), inflamación, destrucción o daño de las articulaciones, trastorno inflamatorio, enfermedad de Grave, enfermedad de Hashimoto, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogrens, púrpura trombocitopénica inmunitaria, esclerosis múltiple, miastenia gravis, esclerodermia, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, sepsis y choque séptico, y enfermedades autoinmunitarias del sistema digestivo

20 En determinados otros casos descritos, un sujeto, un órgano diana, un tejido diana o una célula diana se trata por una afección que se asocia con una o más de hemostasis, trombosis, fibrinólisis, enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus, trastornos endocrinos que afectan el corazón, enfermedad cardiovascular asociada con el embarazo, fiebre reumática, trastornos cardiovasculares asociados con la infección por HIV, trastornos hematológicos y oncológicos asociados con la enfermedad cardíaca, trastornos neurológicos asociados con la enfermedad cardíaca, y trastornos renales asociados con la enfermedad cardíaca.

30 En determinados otros casos descritos, un sujeto, un órgano diana, un tejido diana o una célula diana se trata en asociación con un trasplante o procedimiento de injerto asociado con insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca congénita, enfermedad cardíaca adquirida en niños, enfermedad cardíaca valvular, endocarditis infecciosa, cardiomiopatía, tumores del corazón, enfermedad cardíaca pericárdica, enfermedad cardíaca traumática, embolismo pulmonar, hipertensión pulmonar, cor pulmonale, y síndrome del corazón atlético, trastornos de la circulación arterial periférica, trastorno vascular que afecta a un sistema orgánico, trastorno vascular que afecta el sistema nervioso central, trastorno vascular que afecta el cerebro, trastorno vascular que afecta la retina, trastorno vascular que afecta el riñón, trastorno vascular que afecta los nervios, trastorno microvascular y trastorno macrovascular. El sujeto puede tratarse con un trasplante o procedimiento de injerto asociado seleccionado de uno o más de un trasplante de corazón, trasplante de riñón, trasplante de hígado, trasplante de pulmón, trasplante pancreático, trasplante intestinal, o un trasplante combinado de órganos. El sujeto puede tratarse con un trasplante o procedimiento de injerto que involucra uno o más tejidos oculares, piel, válvulas cardíacas, huesos, tendones, venas, ligamentos, trasplantes de médula ósea, tejido dental o de encías, injerto o implante asociado con cirugía estética, injerto o implantación asociada con un procedimiento de reemplazo de cadera o articulación, e injerto de tejido o implantes que involucran células madre.

45 Sin pretender asociarse o limitarse a un mecanismo particular, en determinados casos descritos, un sujeto, órgano diana, tejido diana o célula diana se trata mediante la administración de un compuesto anticonexina que es capaz de unirse o modular un conexón (hemicanal) con el propósito de lograr un efecto conveniente, que incluye, por ejemplo, uno o más de los siguientes: para la prevención del edema en la médula espinal después de isquemia o trauma, para la prevención de la degradación de la pared de los vasos sanguíneos en los tejidos después de isquemia o trauma (por ejemplo, en el cerebro, el nervio óptico, la médula espinal y el corazón), para el tratamiento de la artritis inflamatoria y otros trastornos inflamatorios en los que el edema y la inflamación son sintomáticos o en los que se produce la muerte continua de los vasos sanguíneos como resultado de una inflamación persistente, para el tratamiento de las heridas subagudas o crónicas en la córnea del ojo en las que la prevención de la muerte continua de los vasos sanguíneos permite la recuperación de la isquemia limbal, para el tratamiento de las heridas subagudas o crónicas en la córnea del ojo como un medio para desencadenar la reepitelización, para el tratamiento de quemaduras químicas en el ojo con el propósito de desencadenar la recuperación epitelial y para lograr la recuperación de la isquemia limbal subaguda, para el tratamiento de las heridas subagudas o crónicas de la piel o las úlceras diabéticas en las que la prevención de la muerte continuada de los vasos sanguíneos permitirá la recuperación de la isquemia tisular, para el tratamiento de heridas crónicas de la piel o úlceras diabéticas en las que la expresión continua de conexina 43 en el borde de cierre impide la recuperación de la reepitelización, para el tratamiento de la isquemia perinatal mediante el uso de péptidos miméticos de conexina administrados directamente a los ventrículos del cerebro o por medio de la columna vertebral/médula, para la inhibición o prevención del edema secundario a la isquemia perinatal mediante el uso de péptidos miméticos de conexina administrados directamente a los ventrículos del cerebro o mediante columna vertebral/médula, como un tratamiento para la isquemia perinatal mediante el uso de péptidos miméticos de conexina administrados por vía sistémica, como un tratamiento para el accidente cerebrovascular o la isquemia del CNS mediante el uso de péptidos miméticos de conexina administrados directamente a los ventrículos del cerebro o a través de la columna vertebral/médula espinal, como un tratamiento para el accidente cerebrovascular o la isquemia del CNS mediante el uso de péptidos miméticos de conexina administrados sistémicamente, para la prevención de la actividad epileptiforme en el cerebro secundaria a la isquemia, para la prevención de la actividad epileptiforme en el cerebro

(por ejemplo, epilepsia), para la prevención del edema tisular mediante el uso de péptidos miméticos de conexión o polinucleótidos antisentido específicos de conexina, y/o para la prevención de la propagación de lesiones, edema (y rechazo) con la reperfusión secundaria al trasplante de órgano.

- 5 En otro aspecto, los compuestos útiles en la invención se administran en una cantidad conveniente para modular la expresión, formación o actividad de una conexina, un hemicanal o una unión de intersticio.

10 Sin pretender asociarse o limitarse a ningún mecanismo y sin pretender ninguna limitación, se cree que en determinadas modalidades un hemicanal de conexina 43 diana se ubica en una membrana citoplasmática celular y puede ser conveniente efectuar una inhibición de la transmisión no conveniente de moléculas desde el citoplasma de dicha célula a un espacio extracelular. Nuevamente, sin pretender limitarse a ningún mecanismo en particular, en determinados casos descritos, puede ser conveniente administrar un compuesto descrito en la presente descripción capaz de inhibir o prevenir el infarto progresivo y la lesión por reperfusión en el corazón, mediante el mantenimiento de la integridad de las células endoteliales de los vasos sanguíneos, para promover la reperfusión de sangre al tejido dañado en una cantidad eficaz para mejorar la supervivencia celular y/o la reparación de tejidos, para mantener la barrera hematoencefálica mediante la inhibición de la dehiscencia de las células endoteliales después a un accidente cerebrovascular o lesión del sistema nervioso central, para mantener la integridad vascular posterior al daño tisular, o para inhibir o prevenir el edema tisular asociado con un trasplante o procedimiento de injerto.

20 Composiciones farmacéuticas

Además, en la presente descripción se describen composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos descritos, que incluyen compuestos antisentido y péptidos miméticos.

25 Los compuestos antisentido descritos en la presente descripción pueden incluir, además, compuestos bioequivalentes, que incluyen sales y profármacos aceptables farmacéuticamente. Esto se destina a abarcar cualquier sal, éster, o sales de tales ésteres aceptables farmacéuticamente, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, que incluye un ser humano, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o residuo biológicamente activo de este. Los péptidos, por ejemplo, pueden alterarse para mejorar su estabilidad en el cuerpo. Por ejemplo, pueden agregarse cadenas laterales sintéticas que se unen entre sí lo que resulta en que el péptido se vuelve circular. Esta circularización puede lograrse, además, mediante la unión de los extremos N y C terminal juntos que forma un profármaco que, después de la inserción en el cuerpo, se hace lineal por la actividad de las proteasas. En consecuencia, por ejemplo, la descripción se basa, además, en sales aceptables farmacéuticamente de los ácidos nucleicos y profármacos de tales ácidos nucleicos. Las "sales aceptables farmacéuticamente" son sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos descritos en la presente descripción: es decir, sales que retienen la actividad biológica conveniente del compuesto original y no imparten efectos toxicológicos no deseados a este (ver, por ejemplo, Berge y otros, J. of Pharma Sci. 66, 1-19 (1977)).

40 Los péptidos o variantes de estos pueden sintetizarse *in vitro*, por ejemplo, mediante el método sintético de péptidos en fase sólida o mediante la síntesis de péptidos catalizados por enzimas o con la ayuda de la tecnología del ADN recombinante. El método sintético de péptidos en fase sólida es un método establecido y ampliamente usado, que se describe en referencias tales como las siguientes: Stewart y otros, Solid Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 2149 (1963); Meienhofer in "Hormonal Proteins and Peptides," ed.; C.H. Li, Vol.2 (Academic Press, 1973), pp.48-267; y Bavaay and Merrifield. "The Peptides," eds. E. Gross and F. Meienhofer, Vol.2 (Academic Press, 1980) pp.3-285. Estos péptidos pueden purificarse adicionalmente mediante fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico; precipitación de etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio aniónico tal como DEAE; cromatografía de SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel mediante el uso de, por ejemplo, Sephadex G-75; cromatografía de afinidad de ligando; o cristalización o precipitación a partir de solvente no polar o mezclas de solvente no polar/polar. Se prefiere la purificación mediante cristalización o precipitación.

55 Las formulaciones farmacéuticas útiles en la presente invención pueden incluir, como ingredientes opcionales, vehículos, diluyentes, agentes solubilizantes o emulsionantes y sales aceptables farmacéuticamente del tipo que esté disponibles en la técnica. Los ejemplos de tales sustancias incluyen soluciones salinas normales tales como soluciones salinas tamponadas fisiológicamente y agua. Los ejemplos específicos no limitativos de los vehículos y/o diluyentes que son útiles en las formulaciones farmacéuticas usadas en la presente invención incluyen agua y soluciones salinas tamponadas fisiológicamente aceptables tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato pH 7,0-8,0. Los vehículos farmacéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, soluciones salinas (tales como la solución de Ringer), alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, ésteres de ácido graso, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etcétera. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y, convenientemente, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos activos. Además, pueden combinarse donde sea conveniente con otras sustancias activas, por ejemplo, inhibidores enzimáticos, para reducir la degradación metabólica.

65

Las sales de grupos carboxilo de un péptido o variante de péptido útil en la invención pueden prepararse de la manera habitual mediante el contacto del péptido con uno o más equivalentes de una base conveniente tal como, por ejemplo, una base de hidróxido metálico, por ejemplo, hidróxido de sodio; una base de carbonato o bicarbonato de metal tal como, por ejemplo, carbonato de sodio o bicarbonato de sodio; o una base de amina tal como, por ejemplo, trietilamina, trietanolamina, y similares.

Los derivados de N-acilo de un grupo amino del péptido o de las variantes del péptido pueden prepararse mediante el uso de un aminoácido protegido con N-acilo para la condensación final, o mediante la acilación de un péptido protegido o no protegido. Los derivados de O-acilo pueden prepararse, por ejemplo, mediante la acilación de un péptido hidroxilado o resina peptídica libre. Cualquiera de las acilaciones puede realizarse mediante el uso de reactivos de acilación estándar tales como haluros de acilo, anhídridos, imidazoles de acilo, y similares. Tanto la N-acilación como la O-acilación pueden realizarse juntas, si es conveniente.

Las sales de adición de ácido del péptido o variante del péptido, o de residuos amino del péptido o variante del péptido, pueden prepararse mediante el contacto del péptido o la amina con uno o más equivalentes del ácido inorgánico u orgánico conveniente, tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico. Además, los ésteres de grupos carboxilo de los péptidos pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos habituales conocidos en la técnica.

Para los oligonucleótidos, los ejemplos de sales aceptables farmacéuticamente incluyen, pero no se limitan a (a) sales formadas con cationes tal como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etcétera; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico y similares; y (d) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloro, bromo y yodo.

Los oligonucleótidos descritos en la presente descripción pueden prepararse adicionalmente o alternativamente para administrarse en forma de "profármaco". El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, fármaco) dentro del cuerpo o de las células de este mediante la acción de enzimas endógenas u otras sustancias químicas y/o condiciones. En particular, las versiones de profármacos de los oligonucleótidos pueden prepararse como derivados de SATE [(S-acetil-2-tioetil) fosfato], de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 93/24510 de Gosselin y otros, publicado el 9 de diciembre de 1993.

Los compuestos descritos en la presente descripción pueden formularse en una composición farmacéutica, que puede incluir vehículos aceptables farmacéuticamente, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos, lípidos neutros o catiónicos, complejos lipídicos, liposomas, potenciadores de la penetración, compuestos transportadores y otros vehículos o excipientes aceptables farmacéuticamente y similares, además del oligonucleótido.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir, además, uno o más ingredientes activos tales como interferones, agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos, y similares. Las formulaciones para administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles que, además, pueden contener tampones, liposomas, diluyentes y otros aditivos adecuados. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los oligonucleótidos descritos en la presente descripción pueden incluir potenciadores de la penetración para mejorar el suministro alimentario de los oligonucleótidos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco categorías amplias, es decir, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, tensioactivos y no tensioactivos (Lee y otros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 8, 91-192 (1991); Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 7, 1-33 (1990)). Pueden incluirse uno o más potenciadores de la penetración de una o más de estas categorías amplias.

Diversos ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, recinleato, monooleína (un k.a. 1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, gliceril 1-monocaprato, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, mono y diglicéridos y sales aceptables fisiológicamente de estos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etcétera). Lee y otros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* page 92 (1991); Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 7, 1 (1990); El-Hariri y otros, *J. Pharm. Pharmacol.* 44, 651-654 (1992)).

The physiological roles of bile include the facilitation of dispersion and absorption of lipids and fat-soluble vitamins (Brunton, Capítulos 38 In: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9na Ed., Hardman y otros McGraw-Hill, Nueva York, N. Y., páginas 934-935 (1996)). Diversas sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan como potenciadores de la penetración. Por lo tanto, el término "sal biliar" incluye cualquiera de los componentes de origen natural de la bilis, así como también cualquiera de sus derivados sintéticos.

Pueden usarse formulaciones complejas que comprenden uno o más potenciadores de la penetración. Por ejemplo, pueden usarse las sales biliares en combinación con ácidos grasos para hacer formulaciones complejas. Los agentes quelantes incluyen, pero no se limitan a, etilendiaminetetraacetato disódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), derivados de N-acilo de colágeno, lauret-9 y derivados de N-amino acilo de beta-dicetonas (enaminas) [Lee y otros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* página 92 (1991); Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 7, 1-33 (1990); Buur y otros, *J. Control Rel.* 14, 43-51 (1990)]. Los agentes quelantes tienen la ventaja adicional de servir, además, como inhibidores de la ADNasa.

Los tensioactivos incluyen, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, polioxietilen-9-lauril éter y polioxietilen-20-cetil éter (Lee y otros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* page 92 (1991)); y emulsiones perfluoroquímicas, tales como FC-43 (Takahashi y otros, *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 252-257 (1988)). Los no tensioactivos incluyen, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-alkilo- y 1-alkenilazacido-alcano (Lee y otros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* page 92 (1991)); y agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como diclofenaco sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita y otros, *J. Pharm. Pharmacol.* 39, 621-626 (1987)).

Como se usa en la presente descripción, "compuesto vehículo" incluye un ácido nucleico, o análogo de este, que es inerte (es decir, no posee actividad biológica per se) pero se reconoce como un ácido nucleico por los procesos in vivo que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica, por ejemplo, mediante la degradación del ácido nucleico biológicamente activo o promoviendo su eliminación de la circulación. La administración conjunta de un ácido nucleico y un compuesto vehículo, típicamente, con un exceso de esta última sustancia, puede resultar en una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperado en el hígado, riñón u otros depósitos extracirculatorios, presumiblemente, debido a la competencia entre el compuesto vehículo y el ácido nucleico por un receptor común. A diferencia de un compuesto vehículo, un "vehículo aceptable farmacéuticamente" (excipiente) es un disolvente, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte aceptable farmacéuticamente para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El vehículo aceptable farmacéuticamente puede ser líquido o sólido y se selecciona teniendo en cuenta la forma de administración planificada para proporcionar el volumen, la consistencia, etcétera, conveniente, cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Los vehículos aceptables farmacéuticamente típicos incluyen, pero no se limitan a, agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etcétera); agentes de relleno (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrógeno fosfato de calcio, etcétera); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etcétera); desintegrantes (por ejemplo, almidón, almidón glicolato de sodio, etcétera); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etcétera).

Las composiciones descritas en la presente descripción pueden contener adicionalmente otros componentes adyuvantes que se encuentran convencionalmente en composiciones farmacéuticas, a los niveles de uso establecidos en la técnica. Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos adicionales compatibles, tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles para formular físicamente diversas formas de dosificación de la composición útiles en el presente invención, tales como colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificadores, agentes espesantes y estabilizadores. Sin embargo, tales materiales, cuando se agregan, no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones descritas en la presente descripción.

Independientemente del método por el cual los compuestos (por ejemplo, oligonucleótidos, péptidos miméticos, etcétera) se introducen en un paciente, los sistemas de dispersión coloidal pueden usarse como vehículos de administración para mejorar la estabilidad in vivo de los oligonucleótidos y/o dirigir los oligonucleótidos a un órgano, tipo de tejido o célula particular. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen, pero no se limitan a, complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, liposomas y complejos lípido:oligonucleótido de estructura no caracterizada. Un sistema de dispersión coloidal preferido es una pluralidad de liposomas. Los liposomas son esferas microscópicas que tienen un núcleo acuoso rodeado por una o más capas externas formadas por lípidos dispuestos en una configuración de bicapa (ver, generalmente, Chonn y otros, *Current Op. Biotecnología* 6, 698-708 (1995)).

En determinadas modalidades, los compuestos antisentido y los péptidos miméticos pueden incorporarse o usarse junto con una porción que dirige la biodistribución, que incluye uno o más polímeros, para dirigir la biodistribución del compuesto antisentido, péptido mimético, u otro compuesto descrito en la presente descripción a la proximidad de una diana conveniente o para permitir la liberación continua de este. Los agentes activos incluyen, por ejemplo, compuestos útiles para aumentar la eficacia terapéutica, para optimizar la biodistribución y la biodisponibilidad, para reducir el daño tisular, para promover la cicatrización, o para aumentar la comodidad del paciente; los agentes activos ilustrativos incluyen agentes vasoactivos, anestésicos, agentes terapéuticos para isquemia, factores de crecimiento y citocinas. Alternativamente, pueden usarse formas de dosificación de perlas poliméricas microparticuladas o nanoparticuladas en la composición descrita en la presente descripción. Los compuestos descritos en la presente

descripción pueden usarse en combinación con un agente activo y encapsulados en una forma de dosificación particulada con una serie de moléculas de ligando o anti-ligando unidas a este.

De esta manera, los péptidos miméticos, los compuestos antisentido, y otros compuestos descritos en la presente descripción, solos o en combinación con otros agentes activos, se liberan en ese sitio a lo largo del tiempo para proporcionar un beneficio terapéutico sostenido. Las formas de dosificación de liberación sostenida son útiles, además, con respecto a otros agentes activos útiles en la práctica de la presente invención, tales como factores de crecimiento, citocinas, y similares. La liberación del agente activo de las formas de dosificación particulada útiles en la presente invención puede ocurrir como un resultado de la difusión y la erosión de la matriz particulada. La tasa de biodegradación impacta directamente la cinética de liberación del agente activo.

En determinadas modalidades, las formulaciones parenterales de liberación controlada de las composiciones de péptidos miméticos, compuestos antisentido, y compuestos útiles en la presente invención pueden prepararse como implantes, inyecciones oleosas, o como sistemas particulados. Los sistemas particulados incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas, y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como un núcleo central. En las microesferas, el producto terapéutico se dispersa por toda la partícula. Los liposomas pueden usarse para la liberación controlada, así como también para el direccionamiento del fármaco, del fármaco atrapado.

Los polinucleótidos antisentido pueden estar presentes en una forma sustancialmente aislada. Se entenderá que el producto puede mezclarse con vehículos o diluyentes que no interferirán con el propósito previsto del producto y aún se considerarán sustancialmente aislados. Un producto puede, además, estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso generalmente comprenderá el 90 %, por ejemplo, al menos aproximadamente el 95 %, 98 % o 99 % del polinucleótido o la masa seca de la preparación.

En determinadas modalidades, la composición farmacéutica útil en la invención, que incluye compuestos antisentido o péptidos miméticos, puede administrarse localmente, o por las vías nasal, oral, gastrointestinal, intrabronquial, intravesical, intravaginal, en el útero, subcutáneamente, intramuscularmente, periarticularmente, intraarticularmente, en el líquido cefalorraquídeo (ICSF), en el tejido cerebral (por ejemplo, administración intracraneal), en la médula espinal, en heridas, intraperitonealmente o intrapleuralmente, o sistémicamente, por ejemplo, intravenosamente, intraarterialmente, intraportalmente o directamente dentro del órgano, tal como el corazón. Un agente administrado por vía intravenosa se vuelve biodisponible más rápido que un agente administrado por otras vías, por lo tanto, generalmente hace que los agentes administrados por vía intravenosa sean más tóxicos. Alternativamente, la administración intraarterial de los compuestos antisentido, péptidos miméticos, y otros compuestos útiles en la invención puede aplicarse a enfermedades diana presentes en órganos o tejidos para los que las arterias de suministro son accesibles. Las aplicaciones para el suministro intraarterial incluyen, por ejemplo, el tratamiento de afecciones relacionadas con el hígado mediante la administración en las arterias hepáticas, afecciones relacionadas con el cerebro mediante la administración en las arterias carótidas, afecciones relacionadas con los pulmones mediante administración en las arterias bronquiales y afecciones relacionadas con riñones mediante administración en las arterias renales. Por lo tanto, por ejemplo, en determinadas modalidades, el compuesto es un péptido/polipéptido (por ejemplo, péptido mimético) para administración sistémica, y en otras modalidades, el compuesto es un péptido/polipéptido (por ejemplo, péptido mimético) para administración directa (por ejemplo, a los ventrículos del cerebro o dentro de la médula espinal).

Por ejemplo, la patente de los EE.UU. 6.752.987 y la Aplicación publicada de los EE.UU. Núm. 20030148968 de Hammond, que describen la administración *in vivo* para la enfermedad cardíaca, que puede lograrse mediante la inyección de la composición farmacéutica en un vaso sanguíneo u otro conducto que suministra directamente al miocardio o al tejido. Preferentemente, la inyección puede realizarse mediante la administración en una o ambas arterias coronarias u otras arterias específicas del tejido (o mediante una inyección en bolo en el tejido periférico). A modo de ilustración, para la administración al miocardio, tal inyección se logra, preferentemente, mediante un catéter que se introduce sustancialmente (típicamente al menos aproximadamente 1 cm) dentro del lumen de una o ambas arterias coronarias o una o más venas safenas o injertos de arteria mamaria interna u otros conductos que transportan sangre al miocardio. Preferentemente, la inyección se realiza en las arterias coronarias izquierda y derecha para proporcionar una distribución general a todas las áreas del corazón. Para aumentar aún más el suministro localizado de los péptidos miméticos o péptidos miméticos en combinación con el agente activo, y para mejorar la eficacia del suministro, de acuerdo con la presente invención, puede infundirse un agente vasoactivo, preferentemente histamina o un agonista de histamina o una proteína factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o un donante de óxido nítrico (por ejemplo, nitroprusiato de sodio), en el tejido a tratar, ya sea coincidentemente o, preferentemente, dentro de varios minutos antes de la introducción de los péptidos miméticos o péptidos miméticos en combinación con agentes activos.

En un aspecto, los métodos de administración espinal incluyen, pero no se limitan a, técnicas de inyecciones espinales conocidas en la técnica. Los métodos generales de inyección o administración intraespinal incluyen, por ejemplo, inyecciones epidurales (que incluyen inyecciones de bloqueo caudal, translumbar y transforaminal); inyecciones de la articulación facetaria (que incluyen las inyecciones interarticulares y de bloqueo nervioso); inyecciones mediante máquinas; inyecciones de la articulación sacroilíaca, e inyecciones diferenciales de las extremidades inferiores. Con

la mayoría de las inyecciones espinales, se inyecta conjuntamente un anestésico local (medicamento anestésico) tal como, por ejemplo, lidocaína (o Xilocaína) o Bupivacaína (Marcaine), en un área específica de la columna vertebral.

5 En determinados aspectos, los compuestos antisentido o péptidos miméticos pueden administrarse solos o administrarse conjuntamente en combinación con agentes usados para el tratamiento general del accidente cerebrovascular e isquemia. Estos incluyen, por ejemplo, el accidente cerebrovascular isquémico, que se trata mediante la eliminación de la obstrucción y restableciendo el flujo sanguíneo al cerebro, y 2) el accidente cerebrovascular hemorrágico, que implica la introducción de una obstrucción para evitar la ruptura y el sangrado de aneurismas y malformaciones arteriovenosas. En un aspecto, los tratamientos para el accidente cerebrovascular isquémico pueden incluir el uso de destructores de coágulos, tal como el tPA. Generalmente, el tPA se administra dentro de un período de tres horas a partir del inicio de los síntomas. En otro aspecto, el tratamiento puede incluir medidas preventivas con la administración de anticoagulantes/antiplaquetarios. Los agentes antiplaquetarios tales como la aspirina, y los anticoagulantes tales como la warfarina interfieren con la capacidad de coagulación de la sangre y pueden usarse para prevenir la aparición de un accidente cerebrovascular. En un aspecto, los tratamientos para el accidente cerebrovascular isquémico pueden incluir la Endarterectomía Carotídea, que es un procedimiento en el que se extrae quirúrgicamente lo que obstruye el vaso sanguíneo de la arteria carótida. En otro aspecto, los tratamientos para el accidente cerebrovascular isquémico pueden incluir Angioplastia/Stents, que implica el uso de angioplastia con balón y pantallas de acero implantables llamadas stents para tratar enfermedades cardiovasculares en las que se usan dispositivos mecánicos para remediar la acumulación de grasa que obstruye el vaso. Para el accidente cerebrovascular hemorrágico, a menudo se recomienda el tratamiento quirúrgico para colocar un clip de metal en la base, llamado huesillo, del aneurisma o para eliminar los vasos anormales que comprenden una Malformación Arteriovenosa (AVM). Uno de tales ejemplos son los Procedimientos Endovasculares, por ejemplo, "bobinas", que son menos invasivos e implican el uso de un catéter que se introduce a través de una arteria principal en la pierna o el brazo, guiado hacia el aneurisma o AVM donde deposita un agente mecánico, tal como como una bobina, para evitar la ruptura.

En determinados aspectos, los compuestos antisentido o péptidos miméticos pueden administrarse conjuntamente como una modalidad combinada para el tratamiento quirúrgico del accidente cerebrovascular y la isquemia. Las intervenciones quirúrgicas para el tratamiento del accidente cerebrovascular incluyen, pero no se limitan a, las modalidades quirúrgicas convencionales para el tratamiento del accidente cerebrovascular, que pueden usarse para prevenir el accidente cerebrovascular, tratar el accidente cerebrovascular agudo, o reparar el daño vascular o las malformaciones (por ejemplo, AVM) en y alrededor del cerebro. Estos incluyen, por ejemplo, la endarterectomía carotídea, que es un procedimiento usado para eliminar la placa aterosclerótica de la arteria carótida cuando este vaso está bloqueado; y la derivación extracraneal/intracraneal (EC/IC); que es un procedimiento que restaura el flujo sanguíneo hacia un área de tejido cerebral privado de sangre, mediante el redireccionamiento de una arteria sana en el cuero cabelludo hacia el área del tejido cerebral afectado por una arteria bloqueada.

En otros aspectos, las modalidades quirúrgicas para el accidente cerebrovascular o la isquemia incluyen, por ejemplo, la técnica del clampeo, que es útil para el tratamiento de aneurismas cerebrales que causan hemorragia subaracnoidea. El clampeo implica el pinzamiento del aneurisma del vaso sanguíneo, lo que reduce la posibilidad de que explote y sangre. En otro aspecto, la modalidad quirúrgica puede incluir una "técnica de bobina desmontable" para el tratamiento de aneurismas intracraneales de alto riesgo. La técnica generalmente implica la inserción de una pequeña bobina de platino a través de una arteria en el muslo y enhebrada a través de las arterias hasta el sitio del aneurisma. Después, la bobina se libera en el aneurisma, donde evoca una respuesta inmunitaria del cuerpo. El cuerpo produce un coágulo de sangre dentro del aneurisma, lo que fortalece las paredes arteriales y reduce el riesgo de ruptura. Una vez que el aneurisma se estabiliza, un neurocirujano puede recortar el aneurisma con menos riesgo de hemorragia y muerte para el paciente. Además, se contempla que el tratamiento quirúrgico del accidente cerebrovascular incluya técnicas desarrolladas recientemente, tal como la Microcirugía Estereotáctica para AVM y Aneurismas. Esta emplea tecnología informática sofisticada y principios geométricos para determinar la ubicación precisa de la AVM. Durante el procedimiento, se fija un marco a la medida de la cabeza del paciente y se establecen puntos de referencia tridimensionales mediante CT o MRI. Esta técnica permite a los neurocirujanos ubicar las AVM dentro de uno o dos milímetros de manera que puedan operar, mediante el uso de métodos mejorados con microscopio e instrumentos delicados, sin afectar el tejido cerebral normal. Otras modalidades incluyen, por ejemplo, la Radiocirugía Estereotáctica para AVM, que es un procedimiento mínimamente invasivo y de riesgo relativamente bajo que usa las mismas técnicas básicas que la microcirugía estereotáctica para determinar la ubicación precisa de las AVM. Una vez ubicada, la AVM puede ser obliterada mediante el enfoque de un haz de radiación que hace que se coagule y después desaparezca. Debido a la precisión de esta técnica, el tejido cerebral normal generalmente no se ve afectado. Otras modalidades incluyen, por ejemplo, la Hipotermia, que utiliza la hipotermia (enfriamiento del cuerpo) para prevenir el accidente cerebrovascular durante el tratamiento quirúrgico de aneurismas gigantes y complejos o AVM difíciles. Bajar la temperatura del cerebro le da al cirujano el tiempo necesario para operar con un riesgo mínimo de accidente cerebrovascular inducido por la cirugía. El equipo especial conocido como máquina de derivación cardiopulmonar a veces se usa para desviar completamente el flujo sanguíneo del cerebro mientras el cuerpo se encuentra bajo una hipotermia profunda. Otras modalidades incluyen, por ejemplo, la revascularización, que es una técnica quirúrgica para tratar aneurismas o arterias cerebrales bloqueadas. La técnica esencialmente proporciona una nueva ruta de sangre al cerebro mediante el injerto de otro vaso en una arteria cerebral o al proporcionar una nueva fuente de flujo sanguíneo al cerebro.

En determinadas modalidades, la administración dirigida puede realizarse mediante el uso de compuestos antisentido o péptidos miméticos solos o en combinación con otros agentes activos tales como, por ejemplo, compuestos útiles para aumentar la eficacia, reducir el daño tisular, promover la cicatrización, o aumentar la comodidad del paciente. La solicitud de patente publicada en EE.UU. 20040259768 describe métodos y agentes para la liberación dirigida.

Puede usarse una diversidad de catéteres y rutas de suministro para lograr el suministro intracoronario, como se conoce en la técnica. Por ejemplo, una diversidad de catéteres de propósito general, así como también catéteres modificados, adecuados para su uso en la presente invención están disponibles de proveedores comerciales tales como Advanced Cardiovascular Systems (ACS), Target Therapeutics y Cordis. Además, cuando el suministro al miocardio se logra mediante inyección directamente en una arteria coronaria (que actualmente es la más preferida), pueden usarse numerosos enfoques para introducir un catéter en la arteria coronaria, como se conoce en la técnica. A modo de ilustración, un catéter puede introducirse convenientemente en una arteria femoral y enhebrarlo en sentido retrógrado a través de la arteria ilíaca y la aorta abdominal y dentro de una arteria coronaria. Alternativamente, un catéter puede introducirse primero en una arteria braquial o carótida y enhebrarlo en sentido retrógrado hacia una arteria coronaria. Pueden encontrarse descripciones detalladas de estas y otros procedimientos en la técnica (ver, por ejemplo, Topol, E J (ed.), *The Textbook of Interventional Cardiology*, 2da Ed. (W.B. Saunders Co. 1994); Rutherford, R B, *Vascular Surgery*, 3ra Ed. (W.B. Saunders Co. 1989); Wyngaarden J B y otros, (eds.), *The Cecil Textbook of Medicine*, 19na Ed. (W. B. Saunders, 1992); y Sabiston, D, *The Textbook of Surgery*, 14va Ed. (W.B. Saunders Co. 1991)).

Los compuestos descritos en la presente descripción pueden administrarse por vía parenteral. A veces se prefiere que determinados compuestos se combinen con un vehículo o diluyente aceptable farmacéuticamente para producir una composición farmacéutica. Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. La composición puede formularse para administración parenteral, intramuscular, intracerebral, intravenosa, subcutánea o transdérmica. La absorción de ácidos nucleicos por las células de mamíferos se potencia mediante numerosas técnicas conocidas de transfección, por ejemplo, las que usan agentes de transfección. La formulación que se administra puede contener tales agentes. Ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos (por ejemplo, fosfato de calcio y DEAE-dextrano) y lipofectantes (por ejemplo, lipofectamTM y transfectamTM).

Las formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o convenientes. Además, pueden ser útiles guantes recubiertos, condones y similares. Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, bolsitas o tabletas. Pueden ser convenientes los espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, agentes dispersantes o aglutinantes. Las composiciones para administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles que, además, pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. En algunos casos, puede ser más efectivo tratar a un paciente con un oligonucleótido junto con otras modalidades terapéuticas tradicionales para aumentar la eficacia de un régimen de tratamiento. Como se usa en la presente descripción, el término "régimen de tratamiento" pretende abarcar modalidades terapéuticas, paliativas y profilácticas.

La dosificación puede depender de una serie de factores, que incluyen la gravedad y la capacidad de respuesta del estado de la enfermedad a tratar, y que el curso del tratamiento perdure de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución del estado de la enfermedad. La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos descritos en la presente descripción pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación. Por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los compuestos que exhiben grandes índices terapéuticos. Si bien pueden usarse compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado al diseñar un sistema de administración que dirija tales compuestos al sitio de los tejidos afectados para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y de estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para usar en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra, preferentemente, dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo en dependencia de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis con eficacia terapéutica puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra la mitad de una inhibición máxima de los síntomas) como se determinó en el cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución. Los horarios de dosificación pueden calcularse a partir de mediciones de la acumulación de los fármacos en el cuerpo del paciente. Las dosis pueden variar en dependencia de la potencia relativa de los compuestos individuales, que incluye

los péptidos miméticos u oligonucleótidos, y generalmente pueden estimarse en función de las EC50 encontradas como eficaces *in vitro* y en modelos animales *in vivo*.

Las cantidades de dosificación adecuadas pueden variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 ug hasta una dosis total de aproximadamente 1 gramo, en dependencia de la vía de administración. En la literatura se proporciona orientación sobre dosificaciones particulares y los métodos de administración y, generalmente, está disponible para los profesionales de la técnica. Los expertos en la técnica emplearán formulaciones diferentes para nucleótidos que para proteínas o sus inhibidores. De manera similar, el suministro de polinucleótidos, polipéptidos, y compuestos descritos en la presente descripción será específico para células, afecciones, y localizaciones particulares. En general, la dosificación es de 0,01 mg/kg a 100 mg por kg de peso corporal, y puede administrarse una o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. En determinados casos descritos, la dosificación puede administrarse inmediatamente después de la cirugía hasta las 24 horas, en otros casos descritos; la dosificación se administra a partir de 2 horas y hasta 24 horas. Las composiciones de acción prolongada pueden administrarse cada 3 a 4 días, cada semana, o quincenalmente, en dependencia de la vida media y de la velocidad de eliminación de la formulación particular. Los expertos en la técnica pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para la dosificación en base a los tiempos de residencia medidos y a las concentraciones del fármaco en fluidos o tejidos corporales. Después de un tratamiento exitoso, puede ser conveniente que el paciente se someta a una terapia de mantenimiento para evitar la recurrencia del estado de la enfermedad, en donde el péptido mimético se administra en dosis de mantenimiento, que varían desde 0,01 mg/kg a 100 mg por kg de peso corporal, una o más veces al día, a una vez cada 20 años. En el tratamiento o la prevención de afecciones que requieren modulación de la conexina, un nivel de dosificación apropiado generalmente será de aproximadamente 0,001 a 100 mg por kg de peso corporal del paciente por día, que puede administrarse en dosis única o múltiples. Un nivel de dosificación adecuado puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 mg/kg por día. En determinados casos descritos, los compuestos descritos en la presente descripción, que incluyen específicamente compuestos antisentido o péptidos miméticos, se administran en una cantidad para lograr concentraciones *in vivo* de aproximadamente 1 micromolar a aproximadamente 1 milimolar, de aproximadamente 10 micromolar a aproximadamente 500 micromolar, o de aproximadamente 30 micromolar a aproximadamente 300 micromolar, y de aproximadamente 25 micromolar a aproximadamente 300 micromolar de la concentración final sobre el sitio dañado, e incluye, aproximadamente 25 micromolar, o aproximadamente 160 micromolar, o aproximadamente 300 micromolar de la concentración final sobre el sitio dañado, y aún más típicamente entre aproximadamente 1 micromolar a aproximadamente 10 micromolar.

En otro aspecto, pueden administrarse inhibidores peptídicos y péptidos miméticos para lograr de aproximadamente 0,1 microgramos por mL a aproximadamente 1 mg por mL, de aproximadamente 10 microgramos por mL a aproximadamente 500 microgramos por mL, o de aproximadamente 100 microgramos por mL a aproximadamente 500 microgramos por mL, aproximadamente 250 microgramos por mL, o aproximadamente 300 microgramos por mL de la concentración final sobre el sitio dañado.

El compuesto anticonexina (por ejemplo, moléculas miméticas peptídicas) se introduce en varias concentraciones diferentes, preferentemente, entre 1×10^{-10} M a 1×10^{-4} M. Una vez que se identifica la concentración mínima que puede modular adecuadamente una conexina (que incluye el control de la expresión génica), la dosis optimizada se traduce en una dosificación adecuada para usar *in vivo*. Por lo tanto, puede administrarse un compuesto anticonexina para lograr la concentración conveniente *in vivo* en una célula, tejido u órgano particular de un sujeto (por ejemplo, un mamífero). Por ejemplo, en determinadas modalidades se administra un péptido mimético u otro compuesto anticonexina basado en péptido (por ejemplo, sistémica, oral o parenteralmente, por ejemplo, IV, etcétera) para lograr una concentración final de péptido *in vivo* de aproximadamente 0,1 micromolar (1×10^{-7} M), aproximadamente 1 micromolar (1×10^{-6} M), aproximadamente 2 micromolar (2×10^{-6} M), aproximadamente 3 micromolar (3×10^{-6} M), aproximadamente 5 micromolar (5×10^{-6} M), aproximadamente 10 micromolar (1×10^{-5} M), aproximadamente 50 micromolar (5×10^{-5} M), aproximadamente 250 micromolar (2.5×10^{-4} M), aproximadamente 500 micromolar (5×10^{-4} M), y 1 milimolar (1×10^{-3} M), y 5 milimolar (1×10^{-3} M) o mayor. Con algunos péptidos miméticos, es conveniente una concentración *in vivo* de aproximadamente 1 a 10 micromolar (1×10^{-6} M a 1×10^{-5} M), que incluye aproximadamente 5 micromolar (5×10^{-6} M). En otro aspecto, un compuesto anticonexina basado en péptido se administra directamente a un tejido (por ejemplo, ventrículos del cerebro de un mamífero) en una cantidad de aproximadamente 0,1 micromol/kg, 1 micromol/kg, 10 micromol/kg, 50 micromol/kg, 250 micromol/kg, 500 micromol/kg, 1000 micromol/kg, 5000 micromol/kg. Por ejemplo, una concentración inhibidora en cultivo de 1×10^{-7} M se traduce en una dosis de aproximadamente 0,6 mg/kg de peso corporal para determinados compuestos. Los niveles de un compuesto anticonexina (por ejemplo, compuesto antisentido o moléculas de péptidos miméticos) que se aproximan a 100 mg/kg de peso corporal o más pueden ser posibles después de evaluar la toxicidad del compuesto en animales de laboratorio. Además, se contempla que las células del vertebrado se eliminen, se traten con el péptido mimético, y se reintroduzcan en el vertebrado.

Los compuestos descritos en la presente descripción pueden usarse en diagnósticos, terapéuticos, profilaxis, y como reactivos de investigación y en kits. Dado que los oligonucleótidos útiles en esta invención se hibridan con ácidos nucleicos codificantes de conexina 43, pueden construirse fácilmente ensayos tipo sándwich, colorimétricos y otros para explotar este hecho. La provisión de medios para detectar la hibridación de oligonucleótidos con los genes o ARNm de conexina puede lograrse de manera rutinaria. Tal provisión puede incluir conjugación enzimática, marcaje

radioactivo o cualquier otro sistema de detección adecuado. Además, pueden prepararse kits para detectar la presencia o ausencia de conexina.

5 Los compuestos descritos en la presente descripción pueden usarse, además, con fines de investigación. Por lo tanto, la hibridación específica que exhiben los oligonucleótidos puede usarse para ensayos, purificaciones, preparaciones de productos celulares y en otras metodologías que pueden apreciarse por los expertos en la técnica.

Los siguientes Ejemplos se incluyen con fines ilustrativos y no limitativos.

10 Ejemplo 1: sistema nervioso central

El daño al sistema nervioso central puede ser devastador con un enorme costo a largo plazo para la sociedad en la atención al paciente. Los cambios patológicos que ocurren en el tejido neuronal gravemente lesionado comparten características comunes. Dentro de las 24 a 48 horas posteriores a la lesión, el daño se extiende significativamente aumentando el tamaño del área afectada. Esta propagación se extiende por el efecto circunstancial mediado por las uniones de intersticio mediante el cual los canales de unión de intersticio propagan neurotoxinas y ondas de calcio desde el sitio del daño al tejido saludable. Lin, J.H. y otros, *Nature Neurosci.* 1: 431-432 (1998). Sin embargo, esto se acompaña, además, de la hinchazón inflamatoria que resulta en el cierre del espacio extracelular y en la muerte celular durante las siguientes 24 a 48 horas. En el daño cerebral fetal, la inflamación, por ejemplo, puede monitorearse como un cambio en la impedancia eléctrica cortical que mide el edema citotóxico Reddy, K., y otros, *Pediatric Research* 43: 674 - 682 (1998). Este nuevo daño, que no es un resultado inmediato del insulto inicial sino eventos posteriores, que ocurren entre 6 y 48 horas después de la lesión, pero puede ser tan temprano como dos horas, proporciona una ventana de oportunidad para el tratamiento que previene la propagación del daño.

25 La Figura 1 muestra que el edema y la inflamación se producen incluso cuando la médula se extirpa del animal (Figura 1A). En ambos casos, el edema puede bloquearse mediante el uso de oligodesoxinucleótidos antisentido (ODN) que impiden la traducción de la proteína de unión de intersticio Conexina 43 (Figura 1B). En los segmentos de médula extirpada, el volumen de inflamación evaluado es significativamente diferente entre los tratados y los controles (evaluados midiendo el área de inflamación vista desde arriba, $p=0,001$).

30 Esta inflamación observada después del daño del CNC y bloqueada mediante el uso de los ODN antisentido específicos de conexina indica que se están expresando hemicanales de unión de intersticio y que se abren en condiciones patológicas, lo que conduce a una vía directa entre el citoplasma celular y el espacio extracelular. Las neuronas mueren posteriormente. El examen de las células 24 horas después de la lesión muestra vacuolización y ampollas internas de la membrana (Figura 2) causadas por la absorción de líquido extracelular. Como se describe en las leyendas de la Figura 3A para las fotografías en color, el marcaje inmunohistoquímico de conexina 43 mediante el uso de anticuerpos que se unen al lazo extracelular (banda ancha en la parte superior izquierda del diagrama de topografía de conexina y marcado con Gap7M) y los anticuerpos contra la cola del carboxilo citoplasmático de la proteína (banda ancha en la parte inferior derecha del diagrama de topografía de conexina y marcado con GAPIA). El anticuerpo citoplasmático marca todas las proteínas conexas 43 y se usa con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia roja. El anticuerpo Gap7M solo puede marcar lazos extracelulares expuestos de hemicanales y se usa con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia verde. Gap7M está impedido estéricamente de unirse a los conexones acoplados que forman canales intactos entre las células y los únicos conexones que se marcan con ambos anticuerpos (y, por lo tanto, aparecerán amarillo cuando los anticuerpos secundarios rojo y verde se localizan juntos) existen como hemicanales. Figura 3B: Como se describió en las leyendas de la Figura para las fotografías en color, esta imagen muestra un marcaje doble con los dos anticuerpos descritos en la Figura 3A aplicados a las secciones de la médula espinal 24 horas después de una herida por aplastamiento. La imagen tiene pequeños puntos brillantes que son conexas marcadas y puntos grandes y sombreados más claros que señalan los núcleos celulares marcados con DAPI. Una porción significativa de las conexas marcadas aparece amarilla en las imágenes combinadas, lo que indican que los dos anticuerpos (Gap7M y GAPIA) se localizan juntos. Esto significa que los lazos extracelulares de conexina están expuestos y la mayoría de los conexones presentes no se han acoplado con los conexones de la célula vecina y permanece como hemicanales. Figure 3C: Como se describe en las leyendas de la Figura para las fotografías en color, esta imagen muestra un marcaje doble con los dos anticuerpos anti conexina descritos en la Figura 3A aplicados a la médula espinal 24 horas después de una herida por aplastamiento. En este caso, la aplicación de los ODN antisentido específicos de Conexina 43 se aplicaron para evitar la traducción de la proteína. Los hemicanales aparecerán como puntos brillantes (que aparecen de color amarillo en las imágenes en color donde el Gap7M marcado con fluorescencia verde y el GAPIA marcado con fluorescencia roja se localizan juntos). Los puntos más grandes y claros son los núcleos celulares marcados con DAPI. Se marcó poca proteína de unión de intersticio, y se ven pocos hemicanales en estas médulas tratadas.

60 Además, se demostró que los anticuerpos de unión de intersticio que se unen y marcan los lazos extracelulares de la proteína conexina (anticuerpos Gap7M - Figura 3A) marcaron niveles extensos de proteína 24 horas después de la lesión de la médula espinal de rata (Figura 3B). Estos anticuerpos solo se unen a las porciones de hemicanales que interactúan para formar un multímero al acoplarse en la membrana. Estos datos indican que gran parte de la regulación positiva de conexina 43 observada en las primeras etapas después del daño del CNC permanece en forma de hemicanal.

La expresión de la proteína conexina y la formación de hemicanal se bloquea mediante el uso de los ODN antisentido específicos de conexina 43 aplicados en un gel Pluronic F-127 (Poloxámero) en el momento de la herida (Figura 3C).

Este tratamiento indica que el tratamiento con ODN en un modelo de explante tiene un efecto máximo sobre los niveles de proteína (caída máxima) a las 6 - 8 horas después de la aplicación, con una caída aparente dentro de las 2 horas y los niveles de proteína se recuperan después de aproximadamente 24 horas (ver Qiu y otros, 2003; Becker y otros, 1999). De manera similar, en el cerebro, los cortes de tejido colocados en el cultivo se inflaman, pero la inflamación puede bloquearse con los ODN antisentido específicos de conexina 43 que evitan la formación de hemicanal (C Verde - datos no mostrados).

Después de la lesión, la regulación positiva de los niveles de conexina conduce a la formación de hemicanal lo que causa edema y muerte celular. Sin embargo, esto no se restringe a la población neural. En los segmentos de la médula espinal extirpados, el marcaje de Isolectina B4 (que se une a los carbohidratos en la superficie de las células microgliales y en las células endoteliales de los vasos sanguíneos) perfila los capilares sanguíneos, incluso después de 5 días en cultivo, en el tejido tratado con el antisentido (Figura 5). En los segmentos de control quedan pocos capilares después de dos días (y después de 5 días, el marcaje predominante de Isolectina B4 es de células gliales de fenotipo de macrófago activado (espuma)). En los cortes de cerebro tratado con antisentido de conexina 43, los capilares permanecen intactos incluso después de dos semanas en cultivo; mientras que ninguno permanece en los cortes del control (datos no mostrados).

Después de una lesión *in vivo*, en la médula espinal de rata, las ratas se trataron con ODN antisentido específicos de conexina y 24 horas después se inyectó albúmina de suero bovino fluoresceínada (BSA marcada con FITC) en la vena de la cola de la rata. Los animales del control muestran una fuga extensa del colorante desde el sistema vascular hacia los tejidos circundantes, incluso en el control simulado rostral al sitio de la herida (Figura 5A). En un contraste agudo, los animales tratados con antisentido muestran pocos signos de fuga con el colorante restringido al lecho capilar (Figura 5B). Además, las células endoteliales de los capilares, que expresan conexina 43, están formando hemicanales y se tornan dehiscentes. Es importante destacar que el tratamiento con el ODN antisentido específico de conexina 43, proporcionado en la presente descripción, previene la ruptura de la barrera hematoencefálica, la ruptura del sistema vascular (necesaria para la reperusión y la recuperación) y la propagación del daño. Los resultados muestran que esta ruptura en el sistema capilar/de los vasos sanguíneos no se restringe al sistema nervioso central, y que una gama más amplia de aplicaciones, tales como para el tratamiento de las afecciones vasculares, se beneficiarían de la modulación de las conexinas. Como se describió en las leyendas de la Figura 5A para las fotografías en color, esta imagen muestra el triple marcaje de la pared del ventrículo del corazón de oveja 24 horas después de un infarto isquémico. Los cuatro paneles que comprende esta imagen son de tejido distante a la región infartada. El tejido está marcado con Isolectina B4 (panel superior izquierdo) que se une a las células endoteliales de los vasos sanguíneos, y con anticuerpos contra Gap7M (panel superior derecho) y anticuerpos contra conexina 43 (panel inferior izquierdo). Los anticuerpos Gap7M reconocen las regiones conservadas del lazo extracelular de las proteínas conexina, por lo que no son específicos de la isoforma de conexina, pero sí marcan los hemicanales (a estos se les impide estéricamente acceder a su epítipo en los canales intactos). La imagen superior izquierda muestra que la estructura capilar normal está presente en esta región. No hay hemicanales presentes (superior derecha) pero la conexina 43 está presente en discos intercalados del miocardio funcional (abajo a la izquierda). El panel inferior derecho muestra una superposición de las otras tres imágenes. Un pequeño marcaje de conexina 43 se superpone a las paredes de los vasos capilares ya que se asocia, predominantemente, con las células musculares. Como se describió en las leyendas de la Figura 5B para las fotografías en color, esta imagen muestra el triple marcaje de la pared del ventrículo del corazón de oveja 24 horas después de un infarto isquémico. La región observada está lejos del infarto, pero más cerca de este que lo que se mostró en la Figura 5B, que muestra que el tejido se marca con la Isolectina B4 (panel superior izquierdo) la cual se une a las células endoteliales de los vasos sanguíneos. La mayoría de los vasos aún están intactos, pero las paredes de los vasos están interrumpidas en áreas (áreas de marcaje disperso más amplio). Los anticuerpos contra Gap7M (panel superior derecho) marcan los hemicanales. Son evidentes parches alargados de marcaje denso de hemicanal. El panel inferior izquierdo muestra el marcaje de anticuerpos contra conexina 43. La comparación cuidadosa entre estos primeros tres paneles, o el análisis de los patrones presentes en el panel inferior derecho que muestra las otras tres fusiones, muestra que la conexina 43 únicamente se asocia con las células musculares. Sin embargo, el anticuerpo contra hemicanal tiene regiones marcadas de la pared de los vasos sanguíneos que parecen estar interrumpidas, lo que indica la presencia de hemicanales de conexón en esas áreas. Como se describió en las leyendas de la Figura 5C para las fotografías en color, esta imagen muestra el triple marcaje de la pared del ventrículo del corazón de oveja 24 horas después de un infarto isquémico. La región que se muestra está dentro de la propia área infartada. El tejido está marcado con Isolectina B4 (panel superior izquierdo) que se une a las células endoteliales de los vasos sanguíneos. La mayoría de los vasos aparecen interrumpidos (áreas de marcaje disperso en líneas discontinuas más amplio). Los anticuerpos contra Gap7M (panel superior derecho) marcan los hemicanales. Múltiples parches de marcaje denso del hemicanal son evidentes en todo el panel. El panel inferior izquierdo muestra el marcaje de anticuerpos contra conexina 43. La comparación cuidadosa entre estos tres primeros paneles, o el análisis de los patrones presentes en el panel inferior derecho que muestra los otros tres paneles fusionados, muestra que la conexina 43 se asocia con las células musculares, pero el marcaje está en parches cortos, muy diferente al marcaje habitual de conexina 43 en los discos intercalados del músculo cardíaco. Esto indica que los miocitos, además, se han dañado gravemente en esta región central del infarto. El anticuerpo anti hemicanal marcó conjuntamente regiones extensas de la pared de los vasos sanguíneos que parecen interrumpidas, lo que indica

la presencia de hemicanales de conexón en la pared de los vasos sanguíneos. Pocos capilares permanecen intactos aparentemente después de esta expresión de hemicanal. Aquí, como en la Figura 6B, el marcaje del anticuerpo Gap7M no se localiza junto con el marcaje de conexina 43 (como lo hace en la médula espinal - Figura 2B), lo que indica que deben ser de una isoforma diferente de proteína de unión de intersticio, muy probablemente conexina 45 (ver Carnelliti, P., y otros, *Cardiovasc. Res.* 62: 414 - 425 (2004)).

Ejemplo 2: sistema cardiovascular

Este ejemplo examina la regulación y el papel de los hemicanales de unión de intersticio para mantener la integridad vascular en el lecho capilar adyacente al daño del tejido isquémico. Se administró una espuma de gel estéril a través de la arteria descendente anterior izquierda o circunfleja para inducir infartos transmurales del miocardio. El gel se suministró esencialmente de acuerdo con los métodos de Devlin, G., y otros, *J. An ovine model of chronic stable heart failure. J. Card. Fail.* 6: 140 - 143 (2000). El marcaje con Isolectina-B4 de las células endoteliales de los capilares muestra que el lecho capilar adyacente al tejido isquémico se está rompiendo. Recientemente hemos analizado el infarto progresivo en el modelo de infarto de oveja (Camelliti y otros, *Spatially and temporally distinct expression of fibroblast connexins after sheep infarction, Cardiovascular Research*, 62:415-425 (2004)), y propusimos que esto es causado por un efecto circunstante mediado por unión de intersticio. Los datos presentados en la presente descripción indican un papel clave del efecto circunstante mediado por la unión de intersticio asociado con la dehiscencia de las células endoteliales y que sigue a la expresión de los hemicanales de unión de intersticio. En el marcaje triple del corazón de oveja isquémico de 24 horas mediante el uso de anticuerpos anti Isolectina-B4, anti conexina 43 y anti hemicanal los datos muestran que en este caso los hemicanales no son conexina 43, sino que parecen ser conexina 45 (Figuras 6A, 6B, 6C). Tenga en cuenta que el anticuerpo Gap7M reconoce regiones conservadas del primer lazo extracelular de la proteína conexina y no es específico de conexina; este reacciona de forma cruzada con numerosos miembros de la familia conexina. La conexina 45 es la primera conexina que se regula positivamente después de una lesión cardíaca isquémica (Camelliti y otros, 2004). Esta serie de paneles (Figuras 6A, 6B, 6C) muestran que si bien el daño a las paredes de los vasos no aparece distante de la región infartada (Figura 6A), se vuelve progresivamente peor más cerca de la región del infarto (Figura 6B) y junto con la expresión del hemicanal. Dentro de la propia región del infarto (Figura 6C), la expresión de la proteína del hemicanal es alta, las paredes capilares están muy alteradas y los discos intercalados de miocitos (donde se encuentran las uniones de intersticio de conexina 43) se están dispersando. Como se describió en las leyendas de la Figura 6 para las fotografías en color, esta imagen muestra la Isolectina B4 (panel superior) que marca las células endoteliales capilares y el marcaje de anticuerpos contra la miomesina (panel central) que marca las líneas M en los sarcómeros de los miocitos en un infarto ventricular de corazón de oveja, 24 horas después de la isquemia. Esta región es la misma que la que se muestra en la Figura 6C. Los capilares sanguíneos están completamente interrumpidos y el patrón de bandas sarcoméricas de miocitos normales se ha destruido, lo que indica que la muerte de las células musculares está ocurriendo en paralelo con la desintegración de la pared del vaso. La imagen inferior es una fusión de las dos superiores que muestra la relación entre los capilares interrumpidos y el marcaje anormal de la banda muscular.

La Figura 7 muestra el marcaje de Isolectina B4 de vasos sanguíneos interrumpidos dentro de la zona de infarto que se correlaciona con la interrupción del sarcómero ilustrada mediante el uso de los anticuerpos para miomesina que marcan las bandas M de los sarcómeros. Al igual que en los tejidos neurales, el daño posterior a las paredes de los vasos sanguíneos parece seguir a la expresión del hemicanal, y la muerte celular en general se vuelve significativa y como un resultado de la apertura del hemicanal.

Se informó que en los corazones hipóxicos durante 30 minutos y reperfundidos con heptanol (un bloqueador no específico del canal de unión de intersticio) en el medio evitó la paradoja del oxígeno que conduce a la hipercontracción y a la muerte de los miocitos. Garcia-Dorada y otros, *Circulation* 96:3579-3586 (1997). Estos autores informaron que la hipercontractura puede transmitirse a los miocitos adyacentes a través de las uniones de intersticio. Nuestros datos son consistentes con la idea de que en 30 minutos la expresión del hemicanal puede jugar un papel importante en la hipercontractura.

El aumento de la expresión de la proteína de unión de intersticio y la apertura del hemicanal en condiciones patológicas es lo que conduce a la dehiscencia de las células endoteliales y a la ruptura del sistema vascular cardíaco en las regiones que rodean el tejido dañado por isquemia. Este hallazgo, descrito por primera vez en la presente descripción, se cree que tiene una enorme importancia para el tratamiento de la lesión por reperfusión y es un mecanismo probable para el infarto progresivo. Robbins, S. and Cotran, R. 1979. *Pathologic basis of disease*. 2da Edición. WB Saunders Company, Philadelphia.

Ejemplo 3: diseño de péptidos miméticos

Diseño de péptidos miméticos

En este ejemplo, se diseñaron nueve peptidomiméticos superpuestos para tener la misma secuencia de aminoácidos que las regiones del lazo extracelular de conexina 43, que se cree están involucradas en el proceso de acoplamiento del conexón (Foote y otros, *J Cell Biol* 140(5): 1187-97, (1998)). Todos estos péptidos particulares se diseñaron para tener una longitud de 11 - 13 residuos. Algunos péptidos incluyeron aminoácidos que coinciden con las porciones

externas de las subunidades transmembrana alfa helicoidales, que pueden mostrar una inhibición funcional mejorada. No todos estos péptidos son necesariamente específicos de conexina 43 debido a la conservación de secuencias de conexina en las regiones del lazo extracelular.

5 Los péptidos dirigidos al conexón 43 (hemicanal) se muestran a más abajo. M1, 2, 3 y 4 se refieren a la 1^{era} a 4^{ta} regiones transmembranales de la proteína conexón 43 respectivamente. E1 y E2 se refieren al primer y segundo lazo extracelular respectivamente:

10	FEVAFLLIQWI (SEQ ID NO:32)	M3 & E2
	LLIQWYIGFSL (SEQ ID NO:33)	E2
	SLSAVYTCKRDPCPHQ (SEQ ID NO:34)	E2
15	VDCFLSRPTEKT (SEQ ID NO:35)	E2
	SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36)	E2 & M4
	LGTAVESAWGDEQ (SEQ ID NO:37)	M1 & E1
20	QSAFRCNTQQPG (SEQ ID NO:38)	E1
	QQPGCENVCYDK (SEQ ID NO:39)	E1
	VCYDKSFPISHVR (SEQ ID NO:40)	E1

Ejemplo 5: pruebas funcionales de péptidos miméticos

25 Se realizaron dos pruebas funcionales mediante el uso de los péptidos. Estas pruebas funcionales fueron (i) bloqueo de la absorción del colorante (Lucifer Yellow) por las células en los cortes de la médula espinal, y (ii) prevención del edema en los segmentos de la médula espinal (mediante el uso del antisentido específico de conexina 43 como un control positivo). Todos los péptidos usados se sintetizaron por Sigma-Genosys (Australia).

30 Bloqueo de la absorción del colorante (Lucifer Yellow) por las células en los cortes de la médula espinal.

35 Lucifer Yellow es un colorante pequeño soluble en agua, que se fija, capaz de pasar de una célula a otra a través de canales de unión de intersticio, pero no a través de la membrana celular. La adición de Lucifer Yellow al medio extracelular hace posible verificar la presencia de hemicanales de unión de intersticio abiertos. El colorante aparecerá en el citoplasma de las células que expresan los canales abiertos.

40 Las ratas Wistar p7 se anestesiaron con dióxido de carbono e inmediatamente se decapitaron. La médula espinal se extirpó y se transfirió a una solución salina de Hank (HBSS) fría, equilibrada a pH 7,4. Cada rama de nervios y ligamentos se extrajo y la médula se transfirió a un cortador manual de tejidos y se cortaron una serie de cortes de 500 micras de espesor. El daño causado por el corte induce la regulación positiva de conexina 43 a través de todo el corte (exacerbada por el efecto circunstante mediado por la unión de intersticio), y conduce a la expresión de los hemicanales de conexina. Los cortes se colocaron en insertos Millipore de 3 cm de diámetro en placas de 24 pocillos y se cultivaron en presencia de péptidos miméticos en el medio. La concentración final para los 9 péptidos evaluados fue de 500 micromolar. Los controles fueron; sin péptido añadido, o con 1 % de etanol o 1 % de DMSO que se adicionaron ya que algunos péptidos se disolvieron nuevamente en estos compuestos (los péptidos se recibieron liofilizados). Algunos cortes, además, se trataron en este momento con oligodesoxinucleótidos antisentido específicos de conexina 43 en gel Pluronic F-127 al 30 % o solo con gel, como experimentos de control. Los cortes tratados con oligodesoxinucleótidos antisentido indicaron que el antisentido impedía la expresión de conexina y, posteriormente, la absorción de colorantes, y por lo tanto, estos actuaban como un control positivo.

50 Los cortes se incubaron durante cuatro horas a 37 grados C, y después se adicionó Lucifer Yellow 2,5 mg por mL a cada pocillo durante 30 minutos (en la oscuridad). Después, los tejidos se lavaron dos veces en PBS, con otros tres lavados de 10 minutos, y los cortes se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Después se visualizaron mediante el uso de un microscopio confocal de escaneo láser Leica TCS4D para evaluar la absorción de colorante en las células, o no.

55 Los resultados mostraron que los cortes cultivados solo con medio, y los cortes tratados con DMSO, etanol y gel solamente tuvieron una absorción de colorante significativa. Los cortes tratados con conexina 43 no tuvieron absorción del colorante. Los cortes tratados con péptidos mostraron una absorción del colorante considerable, con la excepción de los tratados con los siguientes péptidos (que tienen secuencias superpuestas):

60 VDCFLSRPTEKT (SEQ ID NO:35), y
SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36)

65

El nivel de absorción del colorante para los cortes tratados con los péptidos que tienen las SEQ ID NOS:32-34 ((FEVAFLLIQWI (SEQ ID NO:32), LLIQWYIGFSL (SEQ ID NO:33), SLSAVYTCKRDPCPHQ (SEQ ID NO:34)) y SEQ ID NOS:37-40 (LGTAVESAWGDEQ (SEQ ID NO:37), QSAFRCNTQQPG (SEQ ID NO:38), QQPGCENVCYDK (SEQ ID NO:39), y VCYDKSFPISHVR (SEQ ID NO:40)) fue comparable con los cortes de control.

En resumen, estos datos muestran que los cortes de la médula espinal expresan hemicanales que se abren dentro de las 4 horas de la lesión. Es importante destacar que los datos muestran, además, que los péptidos correspondientes a las SEQ ID NOs: 35 y 36 son capaces de prevenir y/o bloquear y/o cerrar la apertura de los hemicanales y prevenir la inflamación.

Prevención del edema en la médula espinal.

El sistema descrito en el Ejemplo 1 se usó para examinar los efectos de los péptidos VDCFLSRPTEKT (SEQ ID NO:35) y SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36) en segmentos de médula espinal cultivados para evaluar su capacidad para bloquear la inflamación.

El péptido QQPGCENVCYDK (SEQ ID NO:39) se usó como control negativo porque permitía la absorción del colorante en los cultivos de los cortes descrito anteriormente, y por lo tanto se creía que no podía bloquear el edema en los segmentos. Nuevamente se usó DMSO como control adicional.

Se colocaron segmentos de la médula espinal de 5 mm de largo en pocillos separados de una placa de 24 pocillos en HBSS. Los segmentos se mantuvieron en el fondo del pocillo mediante el uso de una pequeña gota de Superglue. Se eliminó el HBSS y se añadió péptido 500 micromolar (concentración final) a los medios (sin péptido para medio solo o controles de DMSO). Las placas se incubaron durante 24 horas, se retiraron los medios y el tejido se fijó con el fijador de Bouin durante 24 horas. El análisis implicó fotografiar segmentos de médula desde arriba, el programa Imagen J se usó para calcular el área total del segmento de médula en comparación con el área de inflamación en los extremos cortados de los segmentos. La inflamación (edema) se calculó como (área cultivada - área original dividida por el área original) para dar el % de inflamación. El análisis de varianza de factor único se usó para determinar la significación estadística, con un nivel de corte para la significación en $p=0,05$.

Los resultados fueron que los segmentos de médula tratados con DMSO se inflamaron más (33 %) que todos los segmentos de médula de control inflamados 21 - 23 %. Los segmentos tratados con el péptido QQPGCENVCYDK (SEQ ID NO:39) mostraron, además, un 23 % de inflamación, pero los péptidos VDCFLSRPTEKT (SEQ ID NO:35) y SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36) mostraron una reducción del 15 y 17 % respectivamente (Figura 8). La diferencia entre los segmentos de médulas tratadas con los péptidos VDCFLSRPTEKT (SEQ ID NO: 35) y SRPTEKTIFII (SEQ ID NO: 36) y los controles fue significativa ($p = 0,43$). El examen histológico posterior de los tejidos reveló que los segmentos tratados con el péptido SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36) conservaron una mejor morfología y, por lo tanto, los experimentos de dosis respuesta se realizaron con este péptido.

La determinación de la concentración más efectiva del péptido SRPTEKTIFII (SEQ ID NO: 36) para bloquear el edema en los segmentos de la médula espinal se realizó mediante el uso del mismo protocolo. En este caso, se determinó una respuesta a la dosis con la concentración final de péptidos usados a 5, 10, 50, 250 y 500 micromolar. Los resultados se muestran en la Figura 8. Curiosamente, la concentración más baja del péptido (5 micromolar) propició el mejor resultado (menos edema) en comparación con el medio solo ($p= 0,001$). El intervalo medio de 50 micromolar fue algo menos efectivo en experimentos repetidos.

El análisis inmunohistoquímico mostró astrocitosis reducida (expresión de GFAP) en los segmentos tratados con el péptido SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36) después de 24 horas en cultivo. Nuevamente, 5 micromolar fue la dosis más eficaz para prevenir la respuesta inflamatoria, aunque la diferencia entre las concentraciones usadas fue menos marcada que en los experimentos de edema. Todos los tratamientos mostraron una expresión de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) significativamente reducida (área de marcaje por área de sección analizada mediante el uso de Imagen J) (Tabla 7).

Nuestros experimentos indicaron que una dosis de 5 $\mu\text{mol/kg}$ de peso cerebral para el experimento de oveja perinatal (promedio de 25 g a esta edad fetal) del peptidomimético seleccionado (SEQ ID NO: 36) administrado en 1 mL de CSF artificial i.c.v. (vs. vehículo de LCR solo) durante una hora, seguido de 1 mL adicional por día, perfundido en el cerebro durante 72 horas, tuvo un efecto significativo. Además, son posibles dosis de aproximadamente 5 $\mu\text{mol/kg}$ de cerebro, 50 $\mu\text{mol/kg}$ y 250 $\mu\text{mol/kg}$ de peso cerebral. En el caso de la administración intravenosa (administración sistémica), el efecto de los aumentos del orden logarítmico en las concentraciones plasmáticas puede usarse para determinar una dosis adecuada, comenzando con las dosis de carga para alcanzar 0,5 $\mu\text{mol/L}$ (el volumen sanguíneo fetal promedio es de aproximadamente 350 mL en nuestras ovejas perinatales a esta edad), después 5, 10, 50, 250, 500 y 5000 μM .

El ImageJ es un programa informático de análisis de imágenes de dominio público y código abierto de Java desarrollado originalmente por NIH (y denominado NIH Image).

Tabla 7

Tratamiento	Área de marcaje de GFAP (unidades cuadradas)
Control	2450
5 micromolar péptido 5	300
50 micromolar péptido 5	950
250 micromolar péptido 5	1000
500 micromolar péptido 5	750

Tabla 7: Áreas de marcaje de GFAP en imágenes tomadas en la médula espinal 24 horas después del corte. Las médulas de control tienen altos niveles de GFAP que indican una respuesta inflamatoria y un mayor efecto circunstancial con respecto a los segmentos tratados. La menor concentración de péptidos es la más efectiva para limitar la astrocitosis.

Los recuentos de células microgliales activadas no revelaron diferencias a las 24 horas como se esperaba. Este proceso inflamatorio secundario (diferenciación y proliferación de las células microgliales en reposo al fenotipo de macrófagos) generalmente demora de tres a siete días.

Ejemplo 6: aplicación de péptidos miméticos específicos de conexina para bloquear la isquemia y la actividad cerebral epileptiforme en un modelo de oveja perinatal *in vivo*

El daño cerebral resultante de la isquemia cerebral permanece como un problema importante en todas las etapas de la vida. En el recién nacido a término, el daño moderado a severo al nacer ocurre en 2 a 3 por 1000 nacidos vivos. Una de las características más llamativas es que la lesión se extiende con el tiempo desde las áreas más severamente dañadas hacia el exterior, a regiones previamente no dañadas. Inmediatamente después de la isquemia cerebral, hay una recuperación transitoria del metabolismo cerebral que dura algunas horas. Después de esto, sin embargo, hay un fallo mitocondrial progresivo, junto con una inflamación celular secundaria, que alcanza un máximo de 36 a 48 h después de la lesión inicial.

El acoplamiento activo de las uniones de intersticio, entre las glías y las neuronas, media un efecto circunstancial en el que las señales de muerte celular se transfieren de las células moribundas a las células menos gravemente lesionadas o saludables. Estudios anteriores mostraron que, *in vivo*, la aplicación tópica de oligodesoxinucleótidos antisentido específicos de la proteína de unión de intersticio conexina 43 puede restringir la propagación de la lesión y la inflamación secundaria después de un trauma. Ver el documento WO2000/44409 de Becker, D. y Green, C., titulado "Formulaciones que Comprenden Nucleótidos Antisentido para Conexinas."

El péptido SRPTEKTIFII (SEQ ID NO:36) se usó en un modelo *in vivo* de isquemia perinatal de oveja. Los datos indican que los péptidos miméticos específicos de conexina proporcionan un tratamiento con potencial para reducir significativamente el daño secundario en el cerebro perinatal isquémico o después de un accidente cerebrovascular. El análisis preliminar mostró que 24 h después de la isquemia cerebral, en las ovejas fetales casi a término, hay una mayor expresión de hemicanales de unión de intersticio (es decir, conexones desacoplados) (Figura 9).

Una oveja fetal cruzada Romney-Suffolk se instrumentó entre 117 y 124 días de gestación (0,85 término) bajo anestesia general como se describe en otro sitio, en detalle (Gerrits y otros, *Pediatr Res* 57(3):342-6, (2005); Guan y otros, *Neuroscience* 95(3):831-839, (1999); Guan y otros, *J Cereb Blood Flow Metab* 21(5):493-502, (2001); Gunn y otros, *J Clin Invest* 99(2):248-256, (1997), Gunn y otros, *Pediatrics* 102(5):1098-1106, (1998), Gunn y otros, *Pediatr Res* 46(3):274-280, (1999); Roelfsema y otros, *J Cereb Blood Flow Metab* 24(8):877-886, (2004)). La instrumentación incluyó catéteres de venas y arterias braquiales, electrodos de EKG, un oclisor inflable alrededor de una arteria carótida fetal (Gunn y otros, 1997; Roelfsema y otros, 2004), electrodos EEG parietales de 5 y 15 mm anteriores y 10 mm posteriores a bregma, un par de electrodos localizados lateralmente a estos para medir la impedancia cortical (una medida de edema citotóxico (Gunn y otros, 1997) y una cánula i.c.v. izquierda de 17 mm de largo 4 mm anterior y 6 mm lateral a bregma. La instrumentación se exteriorizó al flanco materno, se cerraron las paredes uterina y abdominal, y los catéteres vasculares fetales se heparinizaron (20 UI/mL). La herida materna se infiltró con un anestésico local de acción prolongada, bupivacaína (100 mg/20 mL).

Después de 5 días de recuperación, se indujo la hipoperfusión cerebral fetal durante un período de 30 minutos de oclusión bilateral de la arteria carótida (Gunn y otros, 1997; Roelfsema y otros, 2004; Tan y otros, *Ann Neurol* 32(5):677-682, (1992); Tan y otros, *Pediatr Res* 39(5):791-797, (1996)). Se inició una infusión intracerebroventricular del péptido 5 mimético de conexina 90 minutos después de la isquemia y se continuó durante 72 horas. Se administró una dosis de 5 μ mol/kg de peso cerebral (promedio de 25 g a esta edad fetal) del peptidomimético 5 en 1 mL de LCR artificial i.c.v. (vs. vehículo de LCR solo) durante una hora, seguido de 1 mL adicional por día perfundido en el cerebro durante 72 horas. El experimento finalizó con una sobredosis intravenosa materna de pentobarbital sódico (30 mL, 300 mg/mL). El cerebro fetal se extrajo para histología y análisis inmunohistoquímico.

Los resultados (Figura 10) muestran que la infusión temprana del péptido atenúa la actividad secundaria de ataques retardados y el edema citotóxico.

5 En resumen, estos datos demuestran que una proteína peptidomimética que se dirige al dominio extracelular de los hemicanales de conexina 43 puede suprimir el edema secundario y la inflamación después de la isquemia cerebral. En una oveja fetal casi a término, encontramos que la isquemia cerebral se asoció con una inducción dramática de conexina 43 y de hemicanales dentro de las 24 h posteriores a la isquemia, mientras que una infusión i.c.v. de la proteína peptidomimética en el feto a término desde 90 min después de la reperfusión mostró una significativa
10 atenuación de las convulsiones secundarias y el edema citotóxico.

Ejemplo 7: tratamiento de un paciente humano con antisentido específico a conexina 43 en una herida subaguda - la prevención de la muerte continua de los vasos sanguíneos permite la recuperación de la isquemia limbal

15 En este estudio, un paciente se presentó con una herida subaguda no cicatrizante (inflamación química) en el ojo. El ojo permaneció inflamado y la isquemia limbal todavía estaba presente después de 8 días (lo que indica una pobre vascularización limbal). El limbo contiene las células madre necesarias para la recuperación epitelial de la córnea. Después del tratamiento con antisentido específico de conexina 43, la isquemia limbal había desaparecido en 20 horas y había comenzado la reepitelización. La conclusión es que la inflamación continua conduce a una muerte continua
20 persistente de los vasos sanguíneos que exacerba la lesión a través de la isquemia limbal. El tratamiento del ojo con el antisentido de conexina 43 redujo la respuesta inflamatoria y desencadenó la recuperación epitelial (Qiu y otros, Curr Biol 13: 1697-1703, (2003)). Sin embargo, tenga en cuenta que esta fue una herida subaguda que implica el tratamiento de heridas crónicas: tales heridas en humanos retienen niveles altos de conexina 43 en el borde epitelial (Brandner y otros, J Invest Dermatol 122: 1310-1320, (2004)). Además, el tratamiento permitió la recuperación de los
25 vasos sanguíneos. Proponemos que el mecanismo involucrado es la prevención de una expresión adicional de hemicanal en la pared del vaso, lo que permite el nuevo crecimiento del vaso.

Paciente: El paciente era un hombre de 25 años. Primero presentó quemaduras alcalinas en el ojo izquierdo después de un accidente en el sitio de construcción con una manguera de concreto de alta presión (concreto/álcali en el ojo,
30 junto con la demora para recibir el primer tratamiento). El ojo dañado no tenía epitelio remanente que cubriera la parte frontal del ojo (que incluye toda la córnea).

Tratamiento inicial: El paciente recibió gotas de ascorbato 10 %, citrato 10 %, acetato de prednisona (esteroides) 1 %, ciclopentalato y cloranfenicol 1 %, además de vitamina C oral y desoxiciclina. La prednisona se administró cada hora
35 durante los primeros cinco días, después de lo cual la dosis se redujo a cuatro veces por día.

El cuarto día se suturó una membrana amniótica sobre la córnea.

40 Tratamiento con el antisentido de Conexina 43 (DÍA CERO): En el día ocho después de la lesión, el paciente todavía tenía un alto grado de inflamación, isquemia limbal, y ningún signo de recuperación epitelial. Se obtuvieron los permisos éticos en base a la falta de alternativas de tratamiento viables que pudieran salvar la vista del paciente. El otro ojo tiene signos de queratocono y, por lo tanto, no fue adecuado para el trasplante limbal en una fecha posterior. El ojo lesionado se habría extirpado quirúrgicamente o se le permitiría convertirse en un "ojo conjuntivo" (en donde la conjuntiva, en forma de vaina blanca, crece sobre el ojo para dejar al paciente ciego).
45

El antisentido de conexina 43 en gel F-127 Pluronic al 30 % se inyectó con un catéter de aguja debajo de la membrana amniótica en dos lugares a cada lado de la córnea. Se inyectaron aproximadamente 100 microlitros de anticonexina 43, dos micromolar, y se extendieron suavemente alrededor de la córnea mediante el uso de una varita de algodón sobre la membrana amniótica. El gel se inyectó frío y se convirtió inmediatamente en una sustancia gelatinosa suave.
50

Se retiró al paciente de todos los demás tratamientos durante ocho horas para evitar posibles efectos adversos sobre el tratamiento. Después, el paciente volvió a recibir gotas de esteroides (tres veces al día), ciclopentalato (una vez al día), y gotas de ascorbato, citrato y cloranfenicol (cuatro veces al día).

55 Tratamiento con el Antisentido de Conexina 43 (DÍA UNO): Dentro de las 20 horas posteriores al tratamiento con el antisentido de conexina 43, el ojo se había vuelto sustancialmente más calmo (inflamación reducida) y el epitelio estaba creciendo nuevamente en tres lugares. El limbo estaba bien vascularizado con buen flujo sanguíneo, y sin signos de isquemia limbal, es decir, había un flujo de humor completo de regreso al limbo dentro de las 20 horas posteriores al tratamiento.

60 Antisentido de Conexina 43 (DÍA TRES): Dentro de las 72 horas posteriores al tratamiento con el antisentido de conexina 43, el paciente continuó su mejoría. El ojo estaba calmo, el suministro de sangre limbal era excelente, y el epitelio estaba creciendo nuevamente alrededor de 360 grados. Sobre un lado parecía haber una pequeña área de reptación lamelipodial, pero en el resto de la circunferencia de la córnea había un buen crecimiento incluso hacia adentro.
65

Tratamiento con el Antisentido de Conexina 43 (DÍA SEIS): Dentro de los seis días posteriores al tratamiento (14 días después de la lesión), el epitelio se recuperó por completo (creció por completo) aunque parecía ligeramente granular en algunos lugares y quizás irregular o delgado en algunos lugares (evaluado mirando a través de la membrana amniótica). La región limbal permaneció bien vascularizada con flujo sanguíneo completo.

Cuarenta días después del tratamiento, el paciente tuvo una recuperación excelente para una quemadura química, que mostró una visión sin ayuda de 6/48 y un orificio de 6/15. Dos tercios del epitelio estaban absolutamente sanos, un tercio en la periferia mostraba un crecimiento conjuntival pero no cubría la pupila y no estaba vascularizado. Muy buena vascularización limbal.

Neuropatía del Nervio Óptico

La neuropatía óptica isquémica (ION), conocida además como accidente cerebrovascular del nervio óptico, es una colección de enfermedades que afectan el suministro de sangre al nervio óptico. La ION puede clasificarse en base a la localidad o la etiología. La ION anterior (AAOIN) se refiere a enfermedades que afectan los segmentos nerviosos antes de la lámina cribosa, mientras que lo opuesto es cierto para la ION posterior (PION) (Buono y otros, *Survey of Ophthalmology* 50:15-26, (2005); Collignon y otros, *Ophthalmology* 111:1663-1672, (2004)). La PION se observa con menos frecuencia, y se cree que es causada por un infarto de la porción intraorbital del nervio óptico, probablemente debido a una arteritis de células gigantes (ACG) o como una complicación secundaria de los procedimientos quirúrgicos (Buono y Foroosan, 2005; Ho y otros, *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* 17: 38-44, (2005)). La ION puede dividirse, además, según la etiología en arterítica (ION arterítica) y no arterítica (NAION). La ION arterítica siempre es causada por GCA y generalmente resulta en oclusión trombótica de la arteria ciliar posterior, lo que puede conducir a la obstrucción concomitante de otras arterias en el nervio óptico (Galasso y otros, *Seminars in Ophthalmology* 19:75-77, (2004)). La NAION es la forma más común de neuropatía óptica no glaucomática con una incidencia anual de 2,3/10,000 (Collignon-Robe y otros, *Ophthalmology* 111: 1663-1672, (2004)). La ACG es una vasculitis crónica de vasos grandes y medianos en el cerebro caracterizada por un aumento en el recuento de células gigantes inflamatorias (Buono y otros, *Survey of Ophthalmology* 50:15-26, (2005); Khosla y otros, *Journal of Postgraduate Medicine* 50:219-221, (2004); Penn y otros, *Autoimmunity Reviews* 2:199-203, (2003)). La pérdida visual no es común, pero ocurre como una complicación secundaria debido a la oclusión de los vasos anteriores que irrigan el nervio óptico, y a menudo es irreversible (Khosla y otros, 2004). La incidencia de ACG en los países occidentales varía de 1~30/10,000 con una prevalencia mucho mayor en la población mayor de 50 años (Penn y Dasgupta, 2003).

La consecuencia típica de la ION es la degeneración de los tractos axónicos, acompañado de deterioro o incluso pérdida de visión (Buono y otros, 2005; Khosla y otros, 2004; Penn y Dasgupta, 2003).

Los tratamientos convencionales de ION incluyen la administración de corticosteroides y agentes antiplaquetarios (Arnold y otros, *Seminars in Ophthalmology* 17: 39-46, (2002)), pero los pacientes tratados con estos fármacos no han demostrado una mejoría significativa de la enfermedad.

En el nervio óptico, tanto los astrocitos como los oligodendrocitos expresan moléculas de conexina. La conexina 43 se encuentra abundantemente en los astrocitos y está potencialmente involucrada en diversos procesos de enfermedades. Además, las células endoteliales de los vasos sanguíneos en el nervio óptico expresan conexina 43.

En este estudio, se indujo isquemia del nervio óptico en un modelo *ex vivo* y se colocaron los segmentos de los nervios en un cultivo organotípico tratado con oligodesoxinucleótidos antisentido específicos de conexina 43 suministrados en gel Plurónic F-127 al 30 %, o gel de control.

Preparación de tejidos:

Se usaron ratas Wistar de 21 a 25 días postnatales (p21 a p25). Las ratas Wistar se sacrificaron mediante una sobredosis con dióxido de carbono, los cráneos se abrieron en una orientación sagital media, y la región caudal al cerebelo se escindió y se desechó. Después se hicieron incisiones debajo de los lóbulos olfativos para revelar las regiones intracraneales del nervio óptico. A través de este método pueden obtenerse aproximadamente 0,3 a 0,5 mm de nervio óptico que abarca el quiasma óptico y el punto terminal del canal óptico. Después, los nervios se sometieron a isquemia como a continuación.

Un modelo de cultivo organotípico viable del protocolo ION se sugirió por Sundstrom y otros, *Drug Discovery Today* 10:993-1000, (2005), que trabaja en la isquemia del CNS. Antes del experimento, se burbujearon 10 mL de medio preparado en un tubo Falcón sin glucosa y glutamina con la mezcla de gases 95 % de N₂ y 5 % de CO₂ durante 30 minutos para eliminar todo el oxígeno. Los nervios ópticos disecados se transfirieron a la solución de oxígeno sin glucosa (OGD) y se sellaron con parafilm y celofán. Los nervios ópticos se incubaron en solución isquémica durante dos horas a 37 °C y posteriormente se devolvieron a las condiciones del cultivo organotípico durante los períodos de tiempo necesarios.

Se usó una metodología de cultivo interfásica. Después de la incubación en soluciones OGD, los nervios ópticos se colocaron en una membrana semiporosa y en una placa de seis pocillos que contenía 1 mL de medio Neurobasal con

suplemento B27, D-glucosa y L-glutamina y antibióticos (Gibco, EE.UU.). Para el tratamiento con el antisentido, se administraron 7 µL de gel Pluronic F-127 (#P2443, Sigma, EE.UU.) que contiene 10 µM del AS-ODN específico para bloquear la traducción de conexina 43, para cubrir cada nervio óptico. Esta cantidad fue suficiente para cubrir todo el segmento sin inundar demasiado el tejido. Para los grupos de gel solo y control, se aplicó la misma cantidad (7 µl) de gel y medio Pluronic F-127 a los nervios, respectivamente. Después las placas de cultivo se colocaron en una incubadora con temperatura establecida a 37 °C con 5 % de CO₂. La principal ventaja de esta técnica de cultivo es que garantiza un suministro constante de oxígeno desde la parte superior, mientras que los nutrientes pueden difundirse desde la parte inferior.

Después del cultivo, los nervios se enjuagaron durante 15 minutos en PBS 1x (# BR14, oxoid, Inglaterra) y se fijaron en paraformaldehído al 4 % (PFA) durante aproximadamente dos horas antes de ser crioprotectados pasando por sacarosa en PBS 20 % y después al 30 %. Los nervios se almacenaron en sacarosa al 15 % en PBS hasta estar listos para su procesamiento posterior. Para seccionar los tejidos, los nervios ópticos se embebieron en OCT (#4583, Tissue Tek®, EE.UU.), se congelaron a -20 °C y posteriormente se cortaron en secciones longitudinales de 14 y 18 µm de espesor. Los cortes se recolectaron en portaobjetos Histobond (#0810001, Marienfeld, Alemania) y se almacenaron para su procesamiento posterior en un congelador a -80 °C.

La inflamación (edema) se evaluó mediante la fotografía de los nervios ópticos desde arriba y midiendo (área cultivada - área original dividida por área original) para dar el % de inflamación. La muerte celular se evaluó mediante el uso de yoduro de propidio para marcar los núcleos de las células comprometidas. La muerte celular se evaluó cerca de los extremos cortados de los nervios y en la región media de los nervios.

La Figura 11 muestra una curva de dosis respuesta para nervios ópticos tratados con el antisentido y el control, cultivados durante 6 horas y 24 horas después de la lesión isquémica. La Figura 11A muestra el porcentaje de inflamación, y la Figura 11B, la muerte celular evaluada mediante el uso de recuentos de yoduro de propidio en el extremo cortado (frontal) y en el medio del nervio. El edema se redujo en los nervios con el antisentido de conexina 43, especialmente a la concentración de 10 micromolar que previamente hemos demostrado que es óptima para las heridas por aplastamiento en los estudios de la médula espinal (no publicados). La muerte celular tanto en el extremo cortado como hacia la mitad del nervio se redujo mediante el uso del antisentido, lo que resulta en un recuento de células muertas más bajo en ambas regiones en una manera dependiente de la dosis.

La Figura 12 más abajo muestra que la reducción de la inflamación (edema) se mantuvo en el tiempo. La Figura 13 muestra la tinción con yoduro de propidio de las células muertas en el medio del control y en los segmentos de nervio óptico tratados con AS-ODN específico de conexina 43 a las 2, 6 y 24 horas después de la inducción isquémica. El grupo tratado con AS-ODN específico de conexina 43 exhibe poca tinción en comparación con los controles en los tres puntos temporales. El gráfico de líneas en la Figura 13 muestra el número de células muertas por unidad de área en la región medial del nervio para el control y los nervios ópticos tratados con AS-ODN. La muerte celular en el grupo control aumenta inicialmente, alcanza su punto máximo a las seis horas y después disminuye ligeramente (probablemente debido al edema tisular que deja menos células por unidad de área). Solo se observó un ligero aumento en la muerte celular incluso después de 24 horas en el cultivo para el tejido tratado con AS-ODN.

Longitudes del Segmento de los Vasos Sanguíneos: Tinción del Factor von Willebrand:

Para demostrar que la integridad de los vasos sanguíneos estaba siendo comprometida por la expresión de conexina en los vasos, en el control y en los nervios ópticos tratados con antisentido específico de conexina 43 en el modelo isquémico, se marcaron con factor von Willebrand, un marcador de células endoteliales. A medida que los vasos se descompusieron, pudo contarse un número creciente de segmentos más pequeños y medirse la longitud del segmento. La longitud media y el número de vasos sanguíneos por sección se investigaron en más de sesenta vasos, en seis secciones separadas obtenidas de dos animales para cada punto.

En promedio, el número de segmentos de vasos sanguíneos en los controles fue menor que en el de los nervios tratados con AS-ODN específicos de conexina 43, excepto en el punto de tiempo más largo investigado (Tabla 8). El gráfico de barras (Figura 14) muestra que la longitud media de los vasos en los nervios ópticos tratados con AS-ODN específico de conexina 43 permaneció relativamente constante durante los primeros tres días, pero comenzó a caer aproximadamente un 30 % para el día 6. Se observó un patrón temporal similar para el grupo control, pero para todos los puntos de tiempo, la longitud promedio del segmento del vaso es significativamente más corta que para el grupo tratado con antisentido.

TABLA 8

Número de segmentos por sección		
	AS	Control
Día 1	10,8	23,5
Día 2	13,3	19,2

Día 3	29,7	41
Día 6	18,2	13,8

5

La Tabla B muestra el número promedio de segmentos de vasos sanguíneos contados en los grupos control y tratado. En los primeros tres días, los grupos tratados con AS, en promedio, tienen 28~ 50 % menos segmentos de vasos sanguíneos en comparación con el control. Solo después de 6 días en cultivo organotípico, el nervio tratado con AS tiene un mayor recuento de segmentos que en los controles, con un 24 % más de vasos contados. Para entonces, los tiempos de cultivo extendidos pueden tener un efecto.

10

Este ejemplo muestra que la prevención de la expresión de conexina 43 después de la isquemia del nervio óptico reduce el edema (inflamación reducida), la propagación de la lesión (número de células muertas por unidad de área lejos de la zona de daño original) y la degradación de los vasos sanguíneos. Por lo tanto, se comporta de manera similar a la informada en el Ejemplo 1 - médula espinal. Esto tiene aplicaciones terapéuticas ya que el mismo edema y la pérdida de vasos se informó en los estudios *in vivo* (Bernstein y otros, Invest Ophthalmol Vis Sci 44:4153-4162, (2003)).

15

20

Listado de secuencias

<110> CODA THERAPEUTICS LTD

<120> COMPUESTOS ANTICONEXINA Y EL USO DE ESTOS

25

<130> E3697-00019

<140> A asignar

<141> 2006-02-03

30

<150> US 60/650075

<151> 2005-02-03

35

<160> 131

<170> PatentIn ver. 3.3

<210> 1

<211> 30

40

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

gtaattgCGG caagaagaat tGtttctgtc 30

45

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Homo sapiens

50

<400> 2

gtaattgCGG caggaggaat tGtttctgtc 30

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

<213> Homo sapiens

55

<400> 3

ggcaagagac accaaagaca ctaccagcat 30

60

<210> 4

<211> 27

<212> ADN

65

<213> Homo sapiens

ES 2 766 549 T3

<400> 4
 tcctgagcaa tacctaacga acaaata 27

 5 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 10 <400> 5
 catctccttg gtgctcaacc 20

 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 6
 ctgaagtcga cttggcttg 20

 20 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 25 <400> 7
 ctcagatagt ggccagaatg c 21

 <210> 8
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 ttgtccaggt gactccaagg 20
 35
 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 9
 cgtccgagcc cagaaagatg aggtc 25

 <210> 10
 45 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 10
 50 agaggcgcac gtgagacac 19

 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 55 <213> Homo sapiens

 <400> 11
 tgaagacaat gaagatgtt 19
 60
 <210> 12
 <211> 3088
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 65 <400> 12

	acaaaaaagc	ttttacgagg	tatcagcact	tttctttcat	tagggggaag	gcgtgaggaa	60
	agtaccaaac	agcagcggag	ttttaaacct	taaatagaca	ggctctgagt	cctgaacttg	120
	ccttttcatt	ttacttcac	ctccaaggag	ttcaatcact	tggcgtgact	tcactacttt	180
	taagcaaaa	agtggtgccc	aggcaacatg	ggtagactgga	gCgccttagg	caaactcctt	240
5	gacaaggttc	aagcctactc	aactgctgga	gggaagggtg	ggctgtcagt	acttttcatt	300
	ttccgaatcc	tgctgctggg	gacagcgggt	gagtcagcct	ggggagatga	gcagtctgcc	360
	tttcgttgta	acactcagca	acctggttgt	gaaaatgtct	gctatgacaa	gtctttccca	420
	atctctcatg	tgcgcttctg	ggctctgcag	atcataattg	tgctgtacc	cacactcttg	480
	tacctggctc	atgtgttcta	tgtgatgcca	aaggaaagaga	aactgaacaa	gaaagaggaa	540
	gaactcaagg	ttgcccaaac	tgatgggtgc	aatgtggaca	tgcaactgaa	gcagattgag	600
10	ataaagaagt	tcaagtacgg	tattgaagag	catggtaagg	tgaaaatgcg	aggggggttg	660
	ctgcgaacct	acatcatcag	tatcctcttc	aagtctatct	ttgaggtggc	cttcttgctg	720
	atccagtggt	acatctatgg	attcagcttg	agtgctgttt	acacttgcaa	aagagatccc	780
	tgccacatc	agggtgactg	tttctctctc	cgccccacgg	agaaaaccat	cttcatcatc	840
	ttcatgctgg	tggtgtcctt	gggtgtccctg	gccttgaata	tcattgaact	cttctatgtt	900
	ttcttcaagg	gcttaagga	tcgggttaag	ggaaagagcg	acccttacca	tgcgaccagt	960
15	gggtgcgctga	gccccgcaa	agactgttgg	tctcaaaaat	atgcttattt	caatggctgc	1020
	tcctcaccaa	ccgctcccct	ctgcctatg	tctcctcctg	ggtacaagct	ggttactggc	1080
	gacgaagaaca	attcttcttg	ccgcaattac	aacaagcaag	caagtgaagca	aaactgggct	1140
	aattacagtg	cagaacaata	tcgaatgggg	caggcgggaa	gcacctctc	taactcccat	1200
	gcacagccti	ttgatttccc	cgatgataac	cagaattcta	aaaaactagc	tgctggacat	1260
	gaattacagc	cactagccat	tgtggaccag	cgacctcaa	gcagagccag	cagtctgtcc	1320
20	agcagcagac	ctcggcctga	tgacctggag	atctagatac	aggcttgaaa	gcatcaagat	1380
	tccactcaat	tgtggagaag	aaaaaagggt	ctgtagaag	tgaccaggt	gtaattttg	1440
	atccggtgga	gggtgctact	aacagcctta	ttcatgaggt	ttagaaaaca	caaagacatt	1500
	agaataccta	ggttcactgg	gggtgtatgg	ggtagatggg	tgagagggga	ggggataaga	1560
	gaggtgcatg	ttggtattta	aagttagtga	ttcaaagaac	ttagattata	aataagagtt	1620
	ccattaggtg	atacatagat	aagggctttt	tctccccgca	aacaccctta	agaatggttc	1680
	tgtgtatgtg	aatgagcggg	tggtaatgtg	ggctaaatat	ttttgtttta	ccaagaaact	1740
25	gaaataattc	tgccaggaa	taataacttc	ctgaacatct	taggtctttt	caacaagaaa	1800
	aagacagagg	attgtcctta	agtcctctgt	aaaacattcc	attgttaaaa	tttgaccttt	1860
	gaaggtaaag	tttctaggcc	tgaccctcca	gggtgtcaatg	gactgtgtct	actatatttt	1920
	tttattcttg	gtatcagttt	aaaattcaga	caaggcccac	agaataagat	tttccatgca	1980
	tttgcaata	cgatatattc	ttttccatcc	acttgcacaa	tatcattacc	atcacttttt	2040
	catcattcct	cagctactac	tcacattcat	ttaatggttt	ctgtaaacat	ttttaagaca	2100
30	gttgggatgt	cacttaacat	tttttttttt	tgagctaaag	tcagggaaatc	aagccatgct	2160
	taataatttaa	caatcactta	tatgtgtgtc	gaagagtttg	ttttgtttgt	catgtattgg	2220
	tacaagcaga	tacagtataa	actcacaaac	acagatttga	aaataatgca	catatgggtg	2280
	tcaaatttga	acctttctca	tggatttttg	tggtgtgggc	caatatgggtg	tttacattat	2340
	ataattcctg	ctgtggcaag	taaagcacac	tttttttttc	tcctaaaatg	ttttccctg	2400
	tgtatcctat	tatggactac	ggttttgtta	attatgattc	tttattttct	ctcctttttt	2460
35	taggatatag	cagtaatgct	attactgaaa	tgaatttctt	ttttctgaaa	tgtaatcatt	2520
	gatgcttgaa	tgatagaatt	ttagtagctg	aaacaggctt	tagtcattaa	tgtgagagac	2580
	ttagaaaaaa	ctctagatg	ggactattaa	atgtgcctaa	atgaattttg	cagtaactgg	2640
	tattcttggg	tttctact	taatacacag	taattcagaa	ctgtatttct	attatgagtt	2700
	tagcagctct	ttggagtgac	cagcaacttt	gatgtttgca	ctaagatttt	atttggaaatg	2760
	caagagaggt	tgaaagagga	ttcagtagta	cacatacaac	taatttattt	gaactatag	2820
	ttgaagacat	tcaccagttt	ctccaaatgc	cttttttaaa	actcatcaca	gaagattggt	2880
40	gaaaaatgctg	agtatgacac	ttttcttctt	gcatgcatgt	cagctacata	aacagttttg	2940
	tacaatgaaa	attactaatt	tgtttgacat	tccatgttaa	actacgggtca	tgttcagctt	3000
	cattgcatgt	aatgtagacc	tagtcatca	gatcatgtgt	tctggagagt	gttctttatt	3060
	caataaagtt	ttaatttagt	ataaacat				3088

<210> 13
 <211> 1308
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

	atgggcgact	ggagctttct	gggaagactc	ttagaaaatg	cacaggagca	ctccacggtc	60
	atcggaagg	tttggctgac	cgtgctgttc	atcttccgca	tcttgggtgct	gggggccgcg	120
	gCGgaggacg	tgtggggcga	tgagcagtca	gacttcaact	gcaacaccca	gcagccgggc	180
	tgCGagaacg	tctgctacga	cagggccttc	cccactccc	acatccgctt	ctgggcgctg	240
	cagatcatct	tcgtgtccac	gcccaccctc	atctacctgg	gccacgtgct	gcacatcgtg	300
	cgcatggaag	agaagaagaa	agagagggag	gaggaggagc	agctgaagag	agagagccc	360
55	agccccagg	agccaccgca	ggacaatccc	tcgtcgcggg	acgaccgagg	caggggtgctc	420
	atggccgggg	cgctgctgcg	gacctacgtc	ttcaacatca	tcttcaagac	gctgttccag	480
	gtgggcttca	tgcggcgcca	gtactttctg	tacggcttcg	agctgaagcc	gctctaccgc	540
	tgcgaccgct	ggcccgtccc	caacacgggtg	gactgcttca	tctccaggcc	cacggagaag	600
	acctcttca	tcacttctat	gctggcgggtg	gcctgcgctg	ccctgctgct	caacatgctg	660
	gagatctacc	acctgggctg	gaagaagctc	aagcagggcg	tgaccagccg	cctcggcccg	720
	gacgctctcg	aggcctctgt	ggggacagcc	gatccccgc	ccctgcccc	cagctcccgg	780
60	ctgcgcccg	ttgacctgg	gttcccacc	tactatgctc	acaccgctgc	gccccggga	840
	caggcccgcg	ccgtgggcta	ccccggggcc	ccgccaccag	ccgcggactt	caactgcta	900
	gccctgaccg	agggcgcg	aaagggccag	tccgccaaag	tctacaacgg	ccaccaccac	960
	ctgctgatga	ctgagcagaa	ctgggccaac	caggcgcccg	agcggcagcc	cccggcctc	1020
	aaggcttacc	cggcagcgtc	cacgcctgca	gccccagcc	ccgtcggcag	cagctccccg	1080
	ccactcgcgc	acgaggtgta	ggcggggcgc	gcgcccctgc	tgctggatgg	gagcggcagc	1140
65	agttctggag	ggacggcctt	ctcagggacc	cccagggagg	aggagcagcc	cgtgaccacc	1200
	gcggcccgca	tgcaccagcc	gcccctgccc	ctcggagacc	caggctgggc	cagcaaggcc	1260

agcagggcca gcagcgggcg ggcagaccg gaggacttgg ccatctag 1308

<210> 14
 <211> 1601
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 14

10	ctccggccat	cgtccccacc	tccacctggg	ccgcccgcga	ggcagcggac	ggaggccggg	60
	agccatgggt	gactggggct	tcctggagaa	gttgctggac	caggctccgag	agcactcgac	120
	cgtgggggt	aagatctggc	tgacgggtgt	cttcatcttc	cgcatcctca	tcctgggcct	180
	ggccggcgag	tcagtgtggg	gtgacgagca	gtcagatttc	gagtgttaaca	cggcccagcc	240
	aggctgcacc	aacgtctgtc	atgaccaggc	cttccccatc	tccccacatcc	gctactgggt	300
	gctgcagttc	ctctctgtca	gcacacccac	cctggctctac	ctggggccatg	tcattttacct	360
	gtctcggcga	gaagagcggc	tggcgcagaa	ggagggggag	ctgcgggcac	tgccggccaa	420
15	ggacccacag	gtggagcggg	cgctggccgg	catagagctt	cagatggcca	agatctcggg	480
	ggcagaagat	ggtcgcctgc	gcattcccgc	agcactgatg	ggcacctatg	tcgccagtggt	540
	gctctgcaag	agtgtgctag	aggcaggcct	ctctctatgg	cagtggcggc	tgtacggctg	600
	gacctgggag	cccgtgtttg	tgtgccagcg	agcaccctgc	ccctacctcg	tggactgctt	660
	tgtctctcgc	cccacggaga	agaccatctt	catcatcttc	atgttggtgg	ttggactcat	720
	ctccctgggt	cttaacctgc	tggagttggt	gcacctgctg	tgtcgtctcc	tcagccgggg	780
20	gatgagggca	cggcaaggcc	aagacgcacc	cccgaaccag	ggcacctcct	cagaccctta	840
	cacggaccag	ggtctctctc	tacctcccgc	tggccagggg	ccctcatccc	caccatgcc	900
	cacctacaat	gggctctcat	ccagtgagca	gaactggggc	aacctgacca	cagaggagag	960
	gctggcgctt	ctcaggcccc	ctctcttctc	ggaccaccag	cctcagaatg	gccaaaaacc	1020
	ccaagtctgt	cccagcagct	ctgcttctaa	gaagcagtat	gtatagaggc	ctgtggctta	1080
	tgtcacccaa	cagaggggtc	ctgagaagtc	tygctgcctg	ggatgcccc	tgccccctcc	1140
25	tggaaggctc	tgcagagatg	actgggctgg	ggaagcagat	gcttgctggc	catggagcct	1200
	cattgcaagt	tgttcttgaa	cacctgaggc	cttctgtggg	cccaccaggc	actacggctt	1260
	cctctccaga	tgtcttttgc	ctgagcacag	acagtcagca	tggaatgctc	ttggccaagg	1320
	gtactggggc	cccttgccct	tttgcagctg	atccagagga	accagagacc	aacttaccct	1380
	aacctcacc	tatggaacag	tcacctgtgc	gcagggtgtc	ctcaaacctt	ctctcacag	1440
	gaaaaggcgg	attgaggctg	ctgggtcagc	cttgatcgca	cagacagagc	ttgtgcccga	1500
30	tttggccctg	tcaaggggac	tgggtccctg	ttttcatcac	tccttccctag	ttctactggt	1560
	caagcttctg	aaataaacag	gacttgatca	caaaaaaaaa	a		1601

<210> 15
 <211> 2574
 35 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 15

40	gcaaaaagcg	tgggcagttg	gagaagaagc	agccagagtg	tgaagaagcc	cacggaagga	60
	aagtccaggg	aggaggaaaa	gaagcagaag	ttttggcatc	tgttccctgg	ctgtgccaa	120
	atgggcgatt	ggagcttcct	gggaaatttc	ctggaggaag	tacacaagca	ctcgaccgtg	180
	gtaggcaagg	tctggctcac	tgtcctcttc	atattccgta	tgtctgtgct	gggacacagt	240
	gctgagtctt	cctgggggga	tgagcaggct	gatttccggt	gtatacagat	tcagcctggc	300
	tgccagaatg	tctgctacga	ccaggcittc	cccattctcc	acattcgcta	ctgggtgctg	360
	cagatcatct	tcgtctccac	gccctctctg	gtgtacatgg	gccacgccat	gcacactgtg	420
	cgcatgcagg	agaagcgcaa	gctacgggag	gccgagaggg	ccaaagaggt	ccggggctct	480
45	ggctcttacg	agtaaccggg	ggcagagaag	gcagaactgt	cctgctggga	ggaaggggat	540
	ggaaggattg	ccctccaggg	cactctgtct	aacacctatg	tgtgcagcat	cctgatccgc	600
	accaccatgg	aggtgggctt	cattgtgggc	cagtacttca	tctacggaat	cttctgacc	660
	accctgcatg	tctgcccag	gagtcctgt	ccccaccgg	tcaactgtta	cgtatcccgg	720
	cccacagaga	agaatgtctt	cattgtcttt	atgctggctg	tggctgcact	gtccctctc	780
	cttagcctgg	ctgaactcta	ccacctgggc	tggagaaga	tcagacagcg	atgtgtcaa	840
	ccgcggcagc	acatggctaa	gtgccagctt	tctggcccc	ctgtgggcat	agtccagagc	900
50	tgcacaccac	ccccgactt	taatcagtgc	ctggagaatg	gccctggggg	aaaattcttc	960
	aatcccttca	gcaataatat	ggcctcccaa	caaaacacag	acaacctggg	caccgagcaa	1020
	gtacgaggtc	aggagcagac	tcctggggaa	ggtttcatcc	aggttcgtta	tggccagaag	1080
	cctgaggtgc	ccaatggagt	ctcaccaggt	caccgccttc	cccatggcta	tcatagtgc	1140
	aagcgaactc	ttagtaaggc	cagcagcaag	gcaaggtcag	atgacctatc	agtgtgacct	1200
	tcctttatgg	gaggatcagg	accaggtggg	aacaaaggag	gctcagagaa	gaaagacgtg	1260
55	tccttctga	actgatgctt	tctcactgtc	atcactgctt	ggctcctttg	agccccgggt	1320
	ctcaatgacg	ttgtctatta	attctagaaa	ctataaccag	ggctctggga	tagtaagaga	1380

60

65

5
10
15

```

ggtgacaacc caccagact gcagttccct cccaccctc taccagtat acgaagcctt 1440
tcagattact catgaaacag ggttagagga aagaagggaa gcatggcaaa agctggcctg 1500
gaagggatag ccagaaggat agaatgactc tctctctaca taccagcagc ataccaaatg 1560
cgttctctaa gttcttacct ccttgacctg atcaccctcc ctctccaag gaagagctca 1620
aagttcccgag ccaatagaca gcatgaatca aggaacttgc attatatgtg ctcttgaatc 1680
tgttgtctcc atggaccatt cctcggagta gtggtgagat ggccttgggt tgcccttggc 1740
ttctctctcc tctactcagc cttaaaaagg gcttcttggg actttaccag cagcctcagc 1800
tttacaatg ccttggatg tacctctggc aaatgcccca ccttgggtgat gtigcaacct 1860
ttccttctgc tagggtgtac acctagcctg tgcaggtgtc agccttgcta gggagtcact 1920
gtacacacaa actctactgg aattcctgcc aacatctgtc accctgcagc tcctttacag 1980
ttcaatcaa tgatagaaac catcccttcc ttttctcct tggctgttca ccagccatt 2040
ccctgaaggc cttaccaaca ggaatatcca agaagctgtt gtccctctc gaaccctgac 2100
cagatcatca gccactgagg ccagtggaaat ttcccaggc cttgttaaaa caaagaaagc 2160
attgtacctc tcagattccc cttgtggaaa aaaaaattct gctgtgaaga tgaaaataaa 2220
aatggagaga acaactgga aaactatttt cccctcctat ttacttctct tgctgactgc 2280
caacttagtg caaagaggag gtgtgatgac agctatggag gcccccagat ctctctctcc 2340
tggaggcttt agcaggggca aggaaatagt aggggaaatc ccagctctct tggcagggcc 2400
tttatttaaa agcgcagag attcctatgt ctccctagtg cccctaatag gactgccaag 2460
tggggctgtg agaaaagcct tgccttccc agggattggc ctggctctctg tattcactgg 2520
atccataatg ggttgcctgt gttttggatg aaggtaaacg atgtcttgaa ttgg 2574

```

<210> 16
<211> 1191
20 <212> ADN
<213> Homo sapiens

25
30
35
40

```

<400> 16
atgagttgga gctttctgac tgcctgcta gaggagattc acaaccattc cacatttgtg 60
gggaagatct ggctcactgt tctgattgct ttccggatcg tccttacagc tgtaggagga 120
gaatccatct attacgatga gcaaaagcaaa tttgtgtgca acacagaaca gccgggctgt 180
gagaatgtct gttatgatgc gtttgacct ctctccatg tacgcttctg ggtgttccag 240
atcatcttgg tggcaactcc ctctgtgatg tacctgggct atgttatcca caagattgcc 300
aaaaatggagc acggtgaagc agacaagaag gcagctcggg gcaagcccta tgcaatgcgc 360
tggaaaacaac accgggctct ggaagaaacg gaggaggaca acgaagagga tcctatgatg 420
tatccagaga tggagttaga aagtgataag gaaaataaag agcagagcca acccaaacct 480
aagcatgatg ccgacgagc gattcgggaa gatgggctca tgaaaatcta tgtctgagc 540
ttgctggcaa ggaaccgtgt ttaggtgggt tttctgatag ggcagtattt tctgtatggc 600
ttccaagtcc acccgtttta tgtgtgtagc agacttctct gtcctcataa gatagactgc 660
tttatttcta gaccactga aaagaccatc ttcttctga taatgtatgg tgttacaggc 720
ctttgctctg tcttaacat ttgggagatg cttcatttag ggtttgggac cattcgagac 780
tcactaaaca gtaaaaggag ggaacttgag gatccgggtg ctataatta tcctttcact 840
tggaaatacac catctgtctc ccctggctat aacattgctg tcaaaccaga tcaaatccag 900
tacaccgaac tgtccaatgc taagatcgcc tacaagcaaa acaaggccaa cacagcccag 960
gaacagcagt atggcagcca tgaggagaac ctccagctg acctggaggc tctgcagcgg 1020
gagatcagga tggctcagga acgcttggat ctggcagttc aggcctacag tcaccaaaa 1080
aacctcatg gtccccggga gaagaaggcc aaagtggggt ccaaagctgg gttccaacaa 1140
agcactgcca gtagcaaatc aggggatggg aagaactctg tctggattta a 1191

```

<210> 17
<211> 1362
<212> ADN
<213> Homo sapiens

45
50
55
60
65

```

<400> 17
agcgccaaga gagaaagagc acatatttct ccgtgggaca ctcttgtat tgggtgggtga 60
gaaatgggag actggagttt cctggggaac atcttggagg aggtgaatga gcactccacc 120
gtcatcggca gactctggct caccgtgctt ttcatcttcc ggatcctcat ccttggcagc 180
gccgcagagt tctgttgggg ggatgagcaa tccgacttct tgtgcaacac ccagcagcct 240
ggctgcgaga acgtctgcta cgacgaggcc tttcccatct cccacattcg cctctgggtg 300
ctgcagatca tcttctctc caccctgctc ctgatgtacg tggggcacgc ggtgactac 360
gtccgcatgg aggagaagcg caaaagccgc gacgaggagc tgggcccagca ggcggggact 420
aacggcgggc cggaccaggg cagcgtcaag aagagcagc gcagcaagg cactaagaag 480
ttccggctgg aggggacct gctgaggacc tacatctgcc acatcatctt caagaccctc 540
tttgaagtgg gcttcaactg tggccactac ttctgtacg ggttccgat cctgcctctg 600
taccgctgca gccgggtggc ctgcccctaat gtggtggact gcttctgtct cgggccacg 660

gagaaaacca tcttcatcct gttcatgttg tctgtggcct ctgtgtcct attcctcaac 720
gtgatggagt tgagccacct gggcctgaag gggatccggt ctgcctttaa gaggcctgta 780
gagcagcccc tgggggagat tctctgagaaa tccctccact ccattgctgt ctctccatc 840
cagaaaagcca agggctatca gcttctagaa gaagagaaaa tcgtttccca ctatttccc 900
ttgaccgagg ttgggatggg ggagaccagc ccactgcctg ccaagccttt caatcagttc 960
gaggagaaga tcagcacagg acccctgggg gacttgtccc ggggctacca agagacactg 1020
ccttctctag ctcaggtggg ggcacaagaa gtggagggcg aggggcccgc tgagaggag 1080
ggagccgaac ccgaggtggg agagaagaag gaggaaagcag agaggctgac cacggaggag 1140
caggagaagg tggcctgtcc agagggggag aaagttagaga cccccggagt ggataaggag 1200
ggtgaaaaag aagagccgca gtcggagaag gtgtcaaagc aagggtgccc agctgagaag 1260
acacctctac tctgtccaga gctgacaaca gatgatgcca gaccctgag caggctaagc 1320
aaagccagca gccgagccag gtcagacgat ctaaccgtat ga 1362

```

ES 2 766 549 T3

<210> 18
 <211> 966
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 18

atgggggaa	ggaccatctt	ggagaggctg	ctagaagccg	cggtgcagca	gcactccact	60
atgatacggaa	ggatcctggt	gactgtgggtg	gtgatcttcc	ggatcctcat	tgtggccatt	120
gtgggggaga	cgggtgacga	tgatgagcag	accatgtttg	tgtgcaacac	cctgcagccc	180
ggctgtaacc	aggcctgcta	tgaccgggcc	ttccccatct	cccacatacg	ttactgggtc	240
ttccagatca	taatgggtgtg	taccccaggt	ctttgcttca	tcacctactc	tgtgcaccag	300
tccgccaagc	agcgagaacg	ccgctactct	acagtcttcc	tagccctgga	cagagacccc	360
cctgagtcca	taggaggtcc	tggaggaaact	gggggtgggg	gcagtgggtg	gggcaaacga	420
gaagataaga	agtgcacaaa	tgctattgtg	aatggggtgc	tgcaaacac	agagaacacc	480
agtaaggaga	cagagccaga	ttgtttagag	gttaaggagg	tgactccaca	cccatcaggt	540
ctaccgactg	catcaaaatc	caagctcaga	aggcaggaag	gcatctcccg	cttctacatt	600
atcccagtgg	tgttccgaaa	tgccctggaa	attgggttcc	tggttggcca	atattttctc	660
tatggcttta	ggttcccagg	gttgtagag	tgtaaccgct	acccttgcac	caaggagggtg	720
gaatgttatg	tgtcccggcc	aactgagaag	actgtctttc	tagtgttcat	gtttgcgtga	780
agtggcatct	gtgttgtgct	caacctggct	gaactcaacc	acctgggatg	gcgcaagatc	840
aagctggctg	tgcgaggggc	tcaggccaag	agaaagtcaa	tctatgagat	tcgtaacaag	900
gacctgccaa	gggtcagttg	tcccaatttt	ggcaggactc	agtccagtga	ctctgcctat	960
gtgtga						966

<210> 19
 <211> 1901
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25

<400> 19

cagggagttg	tggttgcac	actgtactcc	agcctgggca	acagagggag	actctgtctc	60
aacaacacaa	caaacacaga	aaaaacccca	cagctatcta	gggaaaaagt	aaagcaacca	120
gcataatagaa	gtgacatatt	gttatatttt	caccataggt	ttgctttaag	aaatagtgtc	180
cccttcagaa	tggagaattt	tatctgcctc	ttatttgatg	tggatcagag	ctaagatggc	240
tgactaaata	aacatggggg	actggaatct	ccttggagat	actctggagg	aagttcacat	300
ccactccacc	atgattggaa	agaftctggt	caccatcctg	ttcatatttc	gaatgcttgt	360
tctgggtgta	gcagctgaag	atgtctggaa	tgatgagcag	tctggcttca	tctgcaatac	420
agaacaacca	ggctgcagaa	atgtatgcta	cgaccaggcc	tttcttatct	ccctcattag	480
atactgggtt	ctgcaggtga	tatttgtgtc	ttcaccatcc	ctgggtctaca	tgggccatgc	540
attgtaccga	ctgagagttc	ttgaggaaga	gaggcaaaag	atgaaagctc	agttaagagt	600
agaactggag	gaggttagat	ttgaaatgcc	tagggatcgg	aggagatttg	agcaagagct	660
ttgtcagctg	gagaaaagga	aactaaataa	agctccactc	agaggaacct	tgctttgcac	720
ttatgtgata	cacattttca	ctcgtctgtg	ggttgaagtt	ggattcatga	ttggacagta	780
ctttttatat	ggatttcact	tagagccgct	atttaagtgc	catggccacc	cggttccaaa	840
tataatcgac	tgttttgtct	caagaccaac	agaaaagaca	atattcctat	tatttatgca	900
atctatagcc	actatttcac	ttttcttaaa	cattcttgaa	attttccacc	taggttttaa	960
aaagattaaa	agagggcttt	ggggaaaata	caagttgaag	aaggaacata	atgaattcca	1020
tgcaaacacg	gcaaacacaa	atgtagccaa	ataccagagc	acatctgcaa	attcactgaa	1080
gcgactccct	tctgcccctg	attataatct	gtagtgggaa	aagcaaacac	acactgcagt	1140
gtaccctagt	ttaaattcat	cttctgtatt	ccagccaaat	cctgacaatc	atagtgtaaa	1200
tgatgagaaa	tgcatttttg	atgaacagga	aactgtactt	tctaatagaga	tttccacact	1260
tagtactagt	tgtagtcatt	ttcaacacat	cagttcaaac	aataacaag	acactcataa	1320
aatatttggg	aaagaactta	atggtaacca	gttaatggaa	aaaagagaaa	ctgaaggcaa	1380
agacagcaaa	aggaaactact	actctagagg	tcaccgttct	attccagggtg	ttgctataga	1440
tggagagaac	aacatgaggg	agtcacccca	aacagttttc	tccttgccag	ctaactgcga	1500
ttggaaaccg	cggtggctta	gagctacatg	gggttcctct	acagaacatg	aaaaccgggg	1560
gtcacctcct	aaaggtaacc	tcaagggcca	gttcagaaaag	ggcacagtca	gaacccttcc	1620
tccttcacaa	ggagattctc	aatcacttga	cattccaaac	actgctgatt	ctttgggagg	1680
gctgtccttt	gagccagggg	tggtcagaac	ctgtaataat	cctgtttgtc	ctccaaatca	1740
cgtagtgtcc	ctaacgaaca	atctcattgg	taggcgggtt	cccacagatc	ttcagatcta	1800
aacagcggtt	ggcttttaga	catttatata	attatcagag	aagtagccta	gtggtcgtgg	1860
ggcacagaaa	aaatagatag	gggcagctct	aaagaccagc	t		1901

55

<210> 20
 <211> 1311
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60

<400> 20

65

ES 2 766 549 T3

atgagctgga gcttcctgac gcggctgctg gaggagatcc acaaccactc caccttcgtg 60
 ggcaaggtgt ggctcacggt gctggtggtc ttccgcatcg tgctgacggc tgtgggcggc 120
 gaggccatct actcggacga gcaggccaag ttactctgca acacgcggca gccaggctgc 180
 gacaacgtct gctatgacgc cttcgcgccc ctgtcgacag tgcgcttctg ggtcttccag 240
 atttgtgtca tctccacgcc ctccggtcatg tacctgggct acgcccgtgca ccgcctggcc 300
 5 cgtgctctg agcaggagcg gcgcccgcgc ctcccgcgcc gcccggggcc acgcccgcgc 360
 ccccagcgc acctgcccgc cccgcacgcc ggctggcctg agcccgccga cctgggcgag 420
 gaggagccca tgttggcctt gggcgaggag gaggaggagg aggagacggg ggagccgag 480
 ggccgcccgc aggaagcgga ggaggcaggc gcggaggagg cgtgactaa ggccgtcggc 540
 gctgacggca aggcggcagg gaccccgggc ccgaccgggc aacacgatgg gcggaggcgc 600
 atccagcggg agggcctgat gcgcgtgtac gtggcccagc tgggtggccag ggccagcttc 660
 10 gagggtggcct tcctgggtggg ccagtacctg ctgtacggct tcgagggtcg accgttcttt 720
 ccctgacgac gccagccctt cccgcacgtg gtggactgtc tcgtgtcgcg ccctactgaa 780
 aagacgggtc tcctgctggg tatgtacgtg gtcagctgcc tgtgctgctt gctcaacctc 840
 tgtgagatgg cccacctggg cttgggcagc gcgaggagc cgggtgcgcg ccgccgcggc 900
 cccccggcct cgcccccgc ccccgcgccg cggccccgc cctgcccctt ccctgcccgc 960
 gccgctggct tggcctgccc gcccgaactc agcctgggtg tgcgggcggc cgagcgcgct 1020
 15 cgggcgcgat accagaacct ggcaaacctg gccctgcagg cgtgcccga cggggcagcg 1080
 gctgtgggacc gcgaccggga cagttcgcgc tgcgtcggcc tccctgcggc ctcccggggg 1140
 cccccagag caggcgcgcc cgcgtcccgc acgggcagtg ctacctctgc gggcactgtc 1200
 ggggagcagg gccgcccgg caccacagag cggccaggag ccaagcccag ggctggctcc 1260
 gagaagggca gtgcccagcag cagggacggg aagaccaccg tgtggatctg a 1311

20 <210> 21
 <211> 1588
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 21

agacattctc tgggaaaggg cagcagcagc caggtgtggc agtgacaggg aggtgtgaa 60
 gaggcaggat gaactggaca ggtttgtaca ccttgcctag tggcgtgaaac cggcattcta 120
 ctgccattgg ccgagtatgg ctctcggta tcttcatctt cagaatcatg gtgctggtgg 180
 tggctgcaga gagtgtgtgg ggtgatgaga aatcttctt catctgcaac acactccagc 240
 30 ctggctgcaa cagcgtttgc tatgaccaat tcttccccat ctcccattgt cggctgtggt 300
 ccctgcagct catcctagtt tccaccccag ctctctcgt ggccatgcac gtggtctacc 360
 agcaacacat agagaagaaa atgctacggc ttgagggcca tggggacccc ctacacctgg 420
 aggaggtgaa gaggcacaag gtccacatct cagggacact gtggtggacc tatgtcatca 480
 gcgtggtggt catggtgctg tttgaggccg tcttcatgta tgtcttttat ctgctctacc 540
 ctggctatgc catggtgctg ctggtaagt gcgacgtcta cccctgcccc aacacagtgg 600
 actgctcgt gtcccgcgcc accgagaaaa ccgtcttcc cgtcttcatg ctagctgctt 660
 35 ctggcatctg catcatctc aatgtggccg aggtggtgta cctcatcate cgggcctgtg 720
 cccgccgagc ccagcggcgc tccaatccac cttcccgcaa gggctcgggc ttcggccacc 780
 gcctctcacc tgaataacaag cagaatgaga tcaacaagct gctgagtgag caggatggct 840
 ccctgaaaga catactgccc cgcagcccctg gcaccggggc tgggctggct gaaaagagcg 900
 accgctgctc ggctgctga tgccacatac caggcaacct cccatcccac ccccgaacct 960
 gccctgggcg agcccctct tctcccctgc cgggtcacag gccctgctt gctggggatt 1020
 40 actcgatcaa aaccttctt ccctggetac ttcccttctt cccggggcct tccttttgag 1080
 gagctggagg ggtggggagc tagaggccac ctatgccagt gctcaagggt actgggagtg 1140

tgggctgccc ttgtgctg cacccttccc tcttcccctt cctctctctt gggaccctg 1200
 ggtacaagag atgggatgct ccgacagcgt ctccaattat gaaactaatc ttaaccctgt 1260
 gctgtcagat accctgtttc tggagtcaca tcagtggagg gggatgtggg taagaggagc 1320
 agagggcagg ggtgctgtgg acatgtgggt ggagaagggg ggggtggccag cactagtaa 1380
 45 ggaggaatag tgcctgctgg ccacaaggaa aaggaggagg tgtctggggg gagggagtta 1440
 gggagagaga agcaögcaga taagtggag caggggttgg tcaaggccac ctctgcctct 1500
 agtcccacag gcctctctct gctgaaatg ttacacatta aacaggattt tacagcaaaa 1560
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

50 <210> 22
 <211> 2263
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

55 <400> 22

60

65

5
10
15
20
25
30

```

cggagcccct cggcggcgcc cggcccagga cccgcctagg agcgcaggag ccccagcgca 60
gagaccccaa cgccgagacc cccgcgccgg cccgcgccgg cttcctcccg acgcagagca 120
aaccgcccag agtagaagat ggattggggc acgctgcaga cgatcctggg ggggtgtgac 180
aaacactcca ccagcattgg aaagatctgg ctaccgctcc tcttcatttt tgcattatg 240
atcctcgttg tggctgcaaa ggaggtgtgg ggagatgagc aggccgactt tgtctgcaac 300
accctgcagc caggctgcaa gaacgtgtgc tacgatcact acttccccat ctccacatc 360
cggctatggg cctgcagact gatcttcgtg tccacgccag cgctcctagt ggccatgcac 420
gtggcctacc ggagacatga gaagaagagg aagttcatca agggggagat aaagagtga 480
ttaaggaca tcgaggagat caaaaccag aaggtccgca tcgaaggctc cctgtgggg 540
acctacacaa gcagcatctt cttccgggtc atcttcaag ccgccttcat gtacgtctt 600
tatgtcatgt acgacggctt ctccatgcag cggctgggta agtgcaacgc ctggccttgt 660
cccaacactg tggactgctt tgtctggaat ttgcatcttg ccacagggaga agactgtctt cacagtgtt 720
atgattgcag tgtctggaat ttgcatcttg ctgaatgtca ctgaattgtg ttatttgcta 780
attagatatt gttctgggaa gtcaaaaaag ccagtttaac gcattgcca gttgttagat 840
taagaaatag acagcatgag agggatgagg caaccctgctc tcagctgtca aggctcagtc 900
gcagcatttt ccacacaaa agattctgac cttaaatgca accatttgaa acccctgtag 960
gacctcaggtg aaactccaga tgccacaatg gagctctgct cccctaaagc ctcaaaaaca 1020
aggcctaatt ctatgcctgt cttaattttc ttactttaa gtttagttcca ctgagacccc 1080
aggctgttag gggttattgg tgtaaggtag ttcatattt taacacagag atatcgcat 1140
ttgtttcttt ctctgaggac aagagaaaaa agccaggttc cacagaggac acagagaagg 1200
tttgggtgtc ctccctgggtt tctttttgcc aactttcccc acgttaaagg tgaacattgg 1260
ttctttcatt tgctttgaa gttttaact ctacacgttg acaaagtac cagtgcctta 1320
aactctgtta cactttttgg aagtgaaaac ttgtagtat gataggttat tttgatgta 1380
agatgttctg gataccatta tatgttcccc ctgtttcaga ggctcagatt gtaatatgta 1440
aatggatagt caticgctac tatgaaatat ttgaaatat ggtcttttgg ttatgaatac 1500
tttgcagcac agctgcagag ctgtctgttg tattcttgt ggtcatagca cctaacaaca 1560
ttgtagcctc aatcgagtga gacagactag aagttcctag tgatggctta tgatagcaaa 1620
tggcctcatg tcaaatattt agatgtaatt ttgtgtaaga aatacagact ggatgtacca 1680
ccaactacta cctgtaatga caggcctgtc caacacatct cctttttcca tgactgtgt 1740
agccagcatc gaaagaacg ctgatttaa gaggtcgctt gggaaattta ttgacacagt 1800
accatttaat ggggaggaca aaatggggc ggggagggag aagtttctgt cgtaaaaaa 1860
agatttgaa agactggact ctaaattctg ttgattaaag atgagcttgg tctacttcaa 1920
aagtttgttt gcttaccctc tcagcctcca atttttaag tgaaaatata actaataaca 1980
tgtgaaaaga atagaagcta aggttagat aaatattgag cagatctata ggaagattga 2040
accctgaatat tgccattatg cttgacatgg ttccaaaaa atgggtactcc acatacttca 2100
gtgagggtaa gtaitttctt gttgtcaaga atagcattgt aaaagcattt tgaataata 2160
aagaatagct ttaatgatat gcttgaactt aaaaataatt tgtaatgtat caaatacatt 2220
taaaacatta aataataatc tctataataa aaaaaaaaaa aaa
    
```

<210> 23
<211> 2220
<212> ADN
35 <213> Homo sapiens

<400> 23

40
45
50
55
60
65

```

gaacttcttt cctggcacag gactcactgt gccccttccc gctgtgggta caaggctctg 60
ccccacccc agctctccaa agcccaccgg cctccttggg ggcgaggtc gacggcccgt 120
cgcaccggga gggggggctc ccaggggtgc cccacgcacg gtcagggtcc cgcgccaaac 180
ggggaccggg ctgggcccga agcgggcacg gtaactgcgg caaactagcg tggcgagtc 240
ctgattgcag tcggacctgc cgcccgggca cttaacagtt tgcagagtc tcccccccc 300
tgatctcatt ggagccttcg gacagcccag cccatggcca ccgatgcccc catttcacgc 360
ctgaggaagc ggaggctcag acgggccacc agcccctccc gaggctggcc cgggagcgc 420
tggcagcgtc gggcttagga gcggctccc tcttctccc tcttccgctc cgccgggggt 480
gtgcccgcgg tctgtgtgca cactgctga gccagctcc ggcgcccctc cctctgctgt 540
gggcccggg gacgcccggg caggccaccg cgttggccag gccgctgca gtaggcacgg 600
ccccaccag gcgcaatgga ctggaagaca ctccaggccc tactgagcgg ttgaaacaag 660
tactccacag cgttcggcgg catctggctg tccgtgggtg tcgtcttccg ggtgctggta 720
tacgtgggtg ctgcagagcg cgtgtggggg gatgagcaga aggactttga ctgcaacacc 780
aagcagccc gctgcaccaa cgtctgctac gacaactact tccccatctc caacatccg 840
ctctggggcc tgcagctcat ctctgtcaca tgcctctcgc tgtgtgtcat cctgcacgtg 900
gcctaccgty aggagcggga gcgcggcac cgccagaaac acggggacca gtgcgccaag 960
ctgtacgaca acgcaggcaa gaagcacgga ggcctgtggt ggacctacct gttcagcctc 1020
atcttcaagc tcatcattga gttctcttc ctctacctgc tgcaactct ctggcatggc 1080
ttcaatatgc cgcgcctggt gcagtgtgcc aacgtggccc cctgccccaa catctgtggc 1140
tgctacattg cccgacctac cgagaagaaa atcttacct acttcattgt gggcgctcc 1200
gccgtctgca tcgtaactac catctgtgag ctctgtacc ctctctgcca cagggtcctg 1260
cgagggcctg acaaggaca gcttcgagg gtttgcagcc cctctctctc cgccagccga 1320
gcttccacct gctgctgcca ccacaagctg gtggagctg gggaggtgga tccagaccca 1380
ggcaataaca agctgcaggc ttacgacccc aacctgacc ccatctgacc acagggcagg 1440
gggtggggcaa catgcccggc gccaatggga catgcaaggc ggtgtggcag gtggagaggt 1500
cctacagggg ctgagtgacc tccactgtag ttcaactaag tatgcaactt tctgtttggc 1560
agatattttt tgacactggg aactgggctg tctagccggg tataggtaac ccacagggccc 1620
agtggcagcc ctcaaaggac atagactttg aaacaagcga attaactatc tacgtctgct 1680
gcaagggggc gctgctgcca ggcttcaacc ggttcaacc aggaagggat caaccagga 1740
agggatgatc aggagaggct tccctgaggc cataatgtgt aagagaggtg agaagtgtc 1800
ccaagcagac acaacagcag cacagaggtc tggagggcac acaaaaagtg atgtctgccc 1860
tgggctagcc tcagcagacc taaggcatct ctactcctc cagagagacc gccagattc 1920
ctgcagtgga gaggaggtct tccagcagca gcaggctgtg agggctgaga atgaacctga 1980
ctagaggttc tggagatacc cagaggtccc ccaggctcat acttggctca gtggaagccc 2040
tctttcccca aatcctactc cctcagcttc aggcagtgtt gctcccactc tctccccac 2100
aactgtgctc aggctgtgtc cagcctttca gaccctgtc ccagggactt ggggtgatgc 2160
gctgatagaa catcctcaag acagtttctt tgaatcaat aataactgtg ttttataaaa 2220
    
```

ES 2 766 549 T3

<210> 24
 <211> 1243
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 24

caaggctccc	aaggcctgag	tgggcaggtg	gcacccaggt	atagaccttc	cacgtgcagc	60
accaggaca	cagccagcat	gaactgggca	tttctgcagg	gcctgctgag	tggcgtgaac	120
aagtactcca	cagtgctgag	ccgcatctgg	ctgtctgtgg	tgctcatctt	tcgtgtgctg	180
gtgtactggt	tggcagcggg	ggaggtgtgg	gacgatgagc	agaaggactt	tgctgcaac	240
accaagcagc	ccggctgccc	caacgtctgc	tatgacgagt	tcttccccgt	gtcccacgtg	300
cgctctggg	ccctacagct	catcctggtc	acgtgcccct	cactgctcgt	ggcatgcac	360
gtggcctacc	gcgaggaacg	cgagcgcaag	caccacctga	aacacggggc	caatgccccg	420
tccctgtacg	acaacctgag	caagaagcgg	ggcggactgt	ggtggacgta	cttgctgagc	480
ctcatcttca	aggccgccgt	ggatgctggc	ttcctctata	tcttccaccg	cctctacaag	540
gattatgaca	tgccccgctg	ggtggcctgc	tccgtggagc	cttgccccca	cactgtggac	600
tgttacatct	cccggcccac	ggagaagaag	gtcttcaact	acttcatggt	gaccacagct	660
gccatctgca	tcctgctcaa	cctcagtgaa	gtcttctacc	tggtgggcaa	gaggtgcatg	720
gagatcttcg	gccccaggca	ccggcggcct	cggtgcccgg	aatgcctacc	cgatagctgc	780
ccaccatag	tccttcccga	cctgaggatg	ggaggggac	ggaactctgt	cctaatagag	840
gctgggtcgg	ccccagtgga	tgcaggtggg	tatccataac	ctgagagatc	agcagataag	900
atcaacaggt	cccccccaca	tgaggccacc	caggaaaaaa	ggcaggggca	gtggcatcct	960
tgccgtagca	gggtgggtgc	gaggtggctc	gtgggggctc	aggaagctcg	cccagggggc	1020
aatgtgggag	gttgggggta	gtttgggtccc	tgggtcctga	gcctcagggg	agggaggttg	1080
atagctactg	gggattttgt	atatggcaac	agtatatgtc	aaacctctta	ttaaataatga	1140
ttttcccagt	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1200
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaa		1243

<210> 25
 <211> 1299
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 25

atgaaattca	agctgcttgc	tgagtcctat	tgccggctgc	tgggagccag	gagagccctg	60
aggagtagtc	actcagtagc	agctgacgcg	tgggtccacc	atgaaactgga	gtatctttga	120
gggactcctg	agtgggggtca	acaagtactc	cacagccttt	gggcgcatct	ggctgtctct	180
ggctttcatc	ttccgctgac	tggtgtacct	ggtgacggcc	gagcgtgtgt	ggagtgatga	240
ccacaaggac	ttcgactgca	atactcgcca	gcccggctgc	tccaacgtct	gctttgatga	300
gttcttccct	gtgtcccctg	tgcgcctctg	ggccctgcag	cttatacctg	tgacatgcc	360
ctcactgctc	gtggctatgc	acgtggccta	ccgggaggtt	caggagaaga	ggcaccgaga	420
agcccatggg	gagaacagtg	ggcgcctcta	cctgaacccc	ggcaagaagc	gggggtggct	480
ctggtggaca	tatgtctgca	gcctagtgtt	caaggcgagc	gtggacatcg	cctttctcta	540
tgtgttccac	tcattctacc	ccaaatata	cctcccctct	gtggtaagt	gccacgcaga	600
tccatgtccc	aatatagtgg	actgcttcat	ctccaagccc	tcagagaaga	acattttcac	660
cctcttcatg	gtggccacag	ctgccatctg	catcctgctc	aacctcgtgg	agctcatcta	720
cctggtgagc	aagagatgcc	acgagtgctt	ggcagcaagg	aaagctcaag	ccatgtgcac	780
aggtcatcac	cccacgggta	ccacctcttc	ctgcaaacaa	gacgacctcc	tttcgggtga	840
cctcatcttt	ctgggctcag	acagtcatcc	tctctcttta	ccagaccgcc	cccagacca	900
tgtgaagaaa	accatcttgt	gaggggctgc	ctggactggg	ctggcaggtt	gggcctggat	960
ggggaggctc	tagcatctct	cataggtgca	acctgagagt	gggggagcta	agccatgagg	1020
taggggcagg	caagagagag	gattcagacg	ctctgggagc	cagttcctag	tcctcaactc	1080
cagccacctg	cccagctcgt	acggcactgg	gccagttccc	ctctgctct	gcagctcggg	1140
ttccttttct	agaatggaaa	tagtgagggc	caatgcccg	ggttgagggg	aggagggcgt	1200
tcatagaaga	acacacatgc	gggcaccttc	atcgtgtgtg	gcccactgtc	agaacttaat	1260
aaaagtcaac	tcatttgctg	gaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa			1299

50 <210> 26
 <211> 1805
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

55 <400> 26

60

65

ctgggaagac gctggtcagt tcacctgccc cactggttgt tttttaaaca aattctgata 60
 caggcgacat cctcactgac cgagcaaaaga ttgacattcg tatcatcact gtgcaccatt 120
 ggcttcagg cactccagtg gggtaggaga aggaggtctg aaacctcgc agaggatct 180
 tgccctcatt ctttgggtct gaaacactgg cagtctgttg aaacaggact cagggataaa 240
 ccagcgaat ggattggggg acgctgcaca ctttcatcgg ggggtgcaac aaacactcca 300
 ccagcatcgg gaagggtggt atcacagtca tctttatfff ccgagtcag atcctctggt 360
 tggctgcca ggaaggtggt ggtgacgagc aagaggactt cgtctgcaac acactgcaac 420
 cgggatgcaa aaatgtgtgc tatgaccact ttttccgggt gtcccacatc cggctgtggg 480
 ccctccagct gatcttcgct tccaccccag cgctgctggt ggccatgcat gtggcctact 540
 acaggcacga aaccactcgc aagttcaggc gaggagagaa gaggaatgat ttcaaagaca 600
 tagaggacat taaaaagcag aaggttcgga tagaggggtc gctgtggtgg acgtacacca 660
 gcagcatctt tttccgaatc atctttgaa gacgctttat gtatgtgttt tacttctttt 720
 acaatgggta ccacctgccc tgggtgttga aatgtgggat tgaccctcgc cccaaccttg 780
 ttgactgctt tatttctagg ccaacagaga agaccgtgtt taccatffff atgatttctg 840
 cgtctgtgat ttgcatgctg cttaacgtgg cagagtgttg ctacctgctg ctgaaagtgt 900
 gtttttaggag atcaagagaga gcacagacgc aaaaaaatca cccaatcat gccctaaagg 960
 agagtaagca gaatgaaatg aatgagctga tttcagatag tggcaaaaat gcaatcacag 1020
 gtttccaag ctaaacattt caaggtaaaa tgtagctgcg tcataaggag acttctgtct 1080
 ictccagaag gcaataccaa ccttctgtag cctgaagagt cctgaagagt ttgtaaatga 1140
 ctttcataat aaatagacac ttgagttaac tttttgtagg atacttgctc cattcataca 1200
 caacgtaatc aaatagtggt tccatctctg aaaacaagag actgcttgac aaaggagcat 1260
 tgcatgact ttgacaggtt ctttttaagt ggactctctg acaagtgagg tactttctga 1320
 aaatttatat aactgttgtt gataaggaac atttatccag gaattgatac ttttattagg 1380
 aaaagatatt tttatagggt tggatgtttt tagttctgac ttgtaattta tataaagtat 1440
 ttttaaatg actggtcttc cttaactgga aaaacatgcg atgttagttt tagaattaca 1500
 ccacaagtat ctaaaatttg aacttacaaa gggctctatc tgaataatg gttttgcatt 1560
 gtctgttggc aaatttgtga actgtcatga tacgcttaag gtggaaagtg ttcattgcac 1620
 aatatatttt tactgtcttc tgaatgtaga cggaacagtg tggagcaga aggctttttt 1680
 aactcatcgg tttgccaatc attgcaaca actgaaatgt ggatgtgatt gcctcaataa 1740
 agctcgtccc cattgcttaa gccttcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
 aaaaa 1805

<210> 27
 <211> 2094
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 aaatgaaaga gggagcagga ggcgcccgtc ccagccacct cccaaggtcc ctggctcagc 60
 tctgacaccc cagtccccgc cccaggttga gtggggttgg gtggcggttt aggggaccca 120
 ggggcgtgtg gggacctgtg taagtgtggg gtggggagga tctcaggaga tgtggaggct 180
 ggaggcacag gagccagggg aggagggaga agcctgggtc cgcactccca ccacgctggg 240
 gtaggagggc agggacacct ccgacaaaagg acctgtgag agttatgaaa gcgagatgc 300
 ctctgtacca gccccccacc ctgagagggg tctactgcag taaaaatggt gagagaaatg 360
 gtgggccaag aaaggagtgg tctcgctgcc tctgcccact ccactcctcc catgggcacc 420
 aaattgggtc tagcgtctcg ggttcgaggc tccactcttc ccacagcatc cttgacagct 480
 aagggacccg ctgggttttc gcttccgaaa ccaggcaagt caggggctgg tccagctgat 540
 ctccaaggtc cttcctaaga atctgggatc tggaggatcc cagggctcga cggagacggc 600
 tcagggggtg cggctaaaa gcaaatgggg gatctcccc agcacccatc ggtcccaaag 660
 agaaggtaac ccatagctga gcgtcgctcg ctcccctcgg gccctcccgt ggccctccgt 720
 ttcatactgg tctcatcgtc aaacccgggc ctctcctacc tcacgactca ccctgaagtc 780
 agagaaggtc caaccgaccc caccgccgata ggcttgaag gggcaggggt ccctgacttg 840
 ccccatcccc tgactccccg ccccgctccc ccagcgccat gggggagttg gcttctctgg 900
 gctcgtgctg ggacgctgtg cagctgcaat cgccgctcgt gggccgctc tggctgggtg 960
 tcatgctgat cttccgcctc ctggtgctgg ccacggtggg cggcgccgtg ttcgaggacg 1020
 agcaagagga gttcgtgtgc aacacgctgc agccgggctg tcgccagacc tgctacgacc 1080
 gcgccctccc ggtctcccac tactcctatg gcccttcca catctgctg caactctgct 1140
 ccccggtgct gttcgtcgtc tactccatgc accgggcagg caaggaggcg ggcggcgtg 1200
 aggcggcgcg gcagtgcgc cccggactgc ccgagggcca gtgcgcgcgg tgcgccctgc 1260
 gcgcccgcgg cgcgcgcggc tgctacctgc cctgacctgc gctgcccctg cttgcccagc 1320
 tgaccttctt gggcggccag gcgctgctc acggcttccg cgtggccccg cacttctcgt 1380
 gcgcccgtcc gcctgcccc cacacggtcg actgcttctg gagccggccc accgagaaga 1440
 ccgtctctgt gctctctat ttcgcggtgg ggctgctgt ggcgctgctc agcgtagcgg 1500
 agctgggcca cctgctctgg aagggccgcc gcgcgcggg gggagcgtac aaaccgtgca 1560
 accgtgcaca cgaagaggcg caccttcaag gagagggctc ccctggtagc cccacccca 1620
 tcacttggga agaaaaacaga cgttccgta ggtctgca tttcctgca ggtatggcatt 1680
 agacagagct ggttccgct cttccatggc acgtagtatg tgctcagtaa atatgtgtt gatgagaac 1800
 gctctctccc cttccatggc cccaggccta caccactgct atgcccgaac actatccatg ctatggtggg 1860
 tgaaggtgct cccaggccta cctgtgacag ttctgtgtcc acaaccacga cccctccaca caaaccaga 1920
 caccatctct cctgtgacag ccgctgtttt ccagatgtat tcatcaaca aatatattgt gggatcctac 1980
 tggggctgtg aagatgttca agatcagcat catccgatgg aaatagcata tgagccatgt 2040
 atgtagtctt aagtttttca ttgaccgcat taaaaaagta aaggaaaca aatg 2094

<210> 28
 <211> 840
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 766 549 T3

<400> 28

	atgtgtggca	ggttcctgcg	gcggtgctg	gcgaggaga	gccggcctc	cacccccgtg	60
	gggcgctct	tgcttcccgt	gctcctggga	ttccgccttg	tgctgctggc	tgccagtggg	120
	cctggagtct	atgggtgatga	gcagagtga	ttcgtgtgtc	acaccagca	gccgggctgc	180
5	aaggctgcct	gcttcgatgc	cttccacccc	ctctccccgc	tgctttctg	ggtcttccag	240
	gtcatcttgg	tggtgttacc	cagcgccctc	tatatggggt	tcactctgta	tcacgtgatc	300
	tggaactggg	aattatcagg	aaaggggaag	gaggaggaga	ccctgatcca	gggacgggag	360
	ggcaacacag	atgtcccagg	ggctggaagc	ctcaggctgc	tctgggctta	tggtggctcag	420
	ctgggggctc	ggcttgctct	ggagggggca	gccctggggg	tgcaagtacca	cctgtatggg	480
	ttccagatgc	ccagctcctt	tgcatgtcgc	cgagaacctt	gccttggtag	tataacctgc	540
10	aatctgtccc	gcccctctga	gaagaccatt	ttcctaaaga	ccatgtttgg	agtcagcggg	600
	ttctgtctct	tgtttacttt	tttgagcctt	gtgcttctgg	gtttggggag	atgggtggag	660
	acctggaagc	acaaatcttc	ctcttctaaa	tacttcttaa	cttcagagag	caccagaaga	720
	cacaagaag	caaccgatag	cctcccagtg	gtggaacca	aagagcaatt	tcaagaagca	780
	gttccaggaa	gaagcttagc	ccaggaaaaa	caaagaccag	ttggaccag	agatgcctga	840

15 <210> 29
 <211> 672
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 29

	atgagttgga	tggtcctcag	agatctcctg	agtggagtaa	ataaatactc	cactggggact	60
	ggatggattt	ggctggctgt	cggtgtttgtc	ttccgtttgc	tggtctacat	ggtggcagca	120
	gagcacatgt	ggaaaagatga	gcagaaagag	tttgagtga	acagtagaca	gcccggttgc	180
	aaaaatgtgt	gttttgatga	cttcttcccc	atttcccaag	tcagactttg	ggccttacia	240
25	ctgataatgg	tctccacacc	ttcacttctg	gtggttttac	atgtagccta	tcatgagggt	300
	agagagaaaa	ggcacagaaa	gaaactctat	gtcagcccag	gtacaatgga	tgggggccta	360
	tggtacgctt	atcttatcag	cctcattggt	aaaactgggt	ttgaaattgg	cttccttgtt	420
	ttattttata	agctatatga	tggtcttagt	gttccctacc	ttataaagtg	tgatttgaag	480
	ccttgtccca	acactgtgga	ctgcttcac	tccaaacc	ctgagaagac	gatcttcac	540
	ctcttcttgg	tcacacctc	atgcttctgt	attgtgttga	atttcattga	actgagtttt	600
30	ttggttctca	agtgtcttat	taagtgtctg	ctccaaaaat	atttaaaaaa	acctcaagtc	660
	ctcagtgtgt	ga					672

<210> 30
 <211> 1113
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens

<400> 30

	atggaaggcg	tggacttgct	agggtttctc	atcatcacat	taaactgcaa	ctgaccatg	60
	gtaggaaagc	tctggttcgt	cttcacgatg	ctgctgcgga	tgctgggat	tgtcttggcg	120
40	gggcgacccg	tctaccagga	cgagcaggag	aggtttgc	gcaacacgct	gcagccggga	180
	tgcgccaatg	tttgcctacga	cgcttctcc	cccgtgtctc	acctgcggtt	ctggctgatc	240
	cagggcgtgt	gcgtcctcct	ccccctccgc	gtcttcagcg	tctatgtcct	gcaccgagga	300
	gccacgctcg	ccgcgctggg	ccccgcggc	tgccccgacc	ccccgggagcc	ggcctccggg	360
	cagagacgct	gcccgcggcc	attcggggag	cgcgggggcc	tccaggtgcc	cgacttttcg	420
	gccggctaca	tcacccacct	cctcctccgg	accctgctgg	aggcagcctt	cggggccttg	480
45	cactactttc	tctttggatt	cctggccccg	aagaagtcc	cttgacgcg	ccctccgtgc	540
	acggggcgtg	tggactgcta	cggtgcgctg	cccacagaga	agtccctgct	gatgctgttc	600
	ctctggggcg	tcagcgcgct	gtcttttctg	ctgggcctcg	ccgacctggg	ctgcagcctg	660
	cgggcgcgga	tgcgaggag	gcccgggacc	cccacaagcc	cctccatccg	gaagcagagc	720
	ggagcctcag	gccacgcggg	gggacgcccg	actgacgagg	agggtggcg	ggaggaagag	780
	ggggcaccgg	cgccccggg	tgcaacgcgc	ggaggggagg	gggctggcag	ccccaggcgt	840
50	acatccaggg	tgtaggggca	cacgaagatt	ccggatgagg	atgagagtga	ggtgacatcc	900
	tcccaccagc	aaaagctggg	cagacagccc	cggggcagcg	cccaccgaga	ggcggcccag	960
	gaccccaggg	gctcaggatc	cgaggagcag	ccctcagcag	ccccagcgcg	cctggccgcg	1020
	cccccttctt	gcagcagcct	gcagccccct	gacccgcctg	ccagctccag	tggtgctccc	1080
	cacctgagag	ccaggaagtc	tgagtgggtg	tga			1113

55 <210> 31
 <211> 1632
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60 <400> 31

65

```

atgggggact ggaacttatt ggggtggcatc cttagaggaag ttcactccca ctcaaccata 60
gtggggaaaa tctggctgac catcctcttc atcttccgaa tgctgggtact tctgtgtggct 120
gctgaggatg tctgggatga tgaacagtca gcatttgctt gcaacacccg gcagccaggt 180
tgcaacaata tctgttatga tgatgcattc cctatctctt tgatcagggt ctgggtttta 240
cagatcatct ttgtgtcttc tccttctttg gtctatatgg gccatgcact ttataggctc 300
5 agggcctttg agaaagacag gcagagggaaa aagtcaacac ttagagccca gatggagaat 360
ccagatcttg acttggagga gcagcaaaga atagataggg aactgaggag gttagaggag 420
cagaagagga tccataaagt cctctgaaa ggatgtctgc tgcgtactta tctctacac 480
atcttgacca gatctgtgct ggaagttaga ttcatgatag gccaatatat tctctatggg 540
tttcaaatgc acccccttta caaatgcact caacctcctt gccccaatgc ggtggattgc 600
tttgtatcca ggcccactga gaagacaatt ttcattgctt ttatgcacag cattgcagcc 660
10 atttccttgt tactcaatat actggaaata tttcatctag gcatcagaaa aattatgagg 720
acactttata agaaatccag cagttagggc attgaggatg aaacaggccc tccattccat 780
ttgaagaaat attctgtggc ccagcagtgat atgatttgct cttcattgcc tgaagaatc 840
tctccacttc aagctaacaa tcaacagcaa gtcattcgag ttaatgtgcc aaagtctaaa 900
accatgtggc aaatcccaca gccaagcaca cttgaagtga acccttccaa tgggaaaaag 960
gactggcttg agaaggatca gcatagcggg cagctccatg ttcacagccc gtgtcccctg 1020
15 gctggcagtg ctggaaatca gcacctggga cagcaatcag accattcctc atttggcctg 1080
cagaatacaa gtctcagtc ctggctaggt acaactacgg ctctagaaa ctgtccatcc 1140
tttgcagtag gaacctggga gcagtcccag gaccagaac cctcaggtga gcctctcac 1200
gatcttcata gtcactgcag agacagtgaa ggcagcatga gagagagtgg ggtctggata 1260
gacagatctc gcccaggcag tcgcaaggcc agcttctgtt ccagattgtt gtctgaaaag 1320
cgacatctgc acagtgactc aggaagctct ggttctcggg atagctcctg cttggatttt 1380
20 cctcactggg aaaacagccc ctcacctctg ccttcagtca ctgggcacag aacatcaatg 1440
gtaagacagg cagccctacc gatcatggaa ctatcacaag agctgttcca ttctggatgc 1500
tttcttttcc ctttctttct tcctggggtg tgatgtatg tttgtgttga cagagaggca 1560
gatggagggg gagattatct atggagagat aaaattattc attcgataca ttcagttaaa 1620
ttcaattcat aa 1632

25 <210> 32
    <211> 11
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

30 <220>
    <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina

    <400> 32

35 Phe Glu Val Ala Phe Leu Leu Ile Gln Trp Ile
    1           5           10

    <210> 33
    <211> 11
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

40 <220>
    <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
    <400> 33

45 Leu Leu Ile Gln Trp Tyr Ile Gly Phe Ser Leu
    1           5           10

    <210> 34
    <211> 16
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

50 <220>
    <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
    <400> 34

    Ser Leu Ser Ala Val Tyr Thr Cys Lys Arg Asp Pro Cys Pro His Gln
    1           5           10           15

    <210> 35
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
    <400> 35

```

Val Asp Cys Phe Leu Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
1 5 10

5 <210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 36

Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ile Ile
1 5 10

15 <210> 37
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 37

Leu Gly Thr Ala Val Glu Ser Ala Trp Gly Asp Glu Gln
1 5 10

25 <210> 38
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 38

35 **Gln Ser Ala Phe Arg Cys Asn Thr Gln Gln Pro Gly**
1 5 10

40 <210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 39

Gln Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys Tyr Asp Lys
1 5 10

50 <210> 40
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 40

60 **Val Cys Tyr Asp Lys Ser Phe Pro Ile Ser His Val Arg**
1 5 10

65 <210> 41
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 766 549 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 41

5 Ala Ala Glu Ser Val Trp Gly Asp Glu Ile Lys Ser Ser Phe Ile Cys
 1 5 10 15

Asn Thr Leu Gln Pro Gly Cys Asn Ser Val Cys Tyr Asp His Phe Phe
 20 25 30

10 Pro Ile Ser His Val Arg
 35

<210> 42
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 42

25 Glu Ser Val Trp Gly Asp Glu Lys Ser Ser Phe Ile
 1 5 10

<210> 43
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 43

35 Ile Cys Asn Thr Leu Gln Pro Gly Cys Asn Ser Val
 1 5 10

<210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 44

45 Ser Val Cys Tyr Asp His Phe Phe Pro Ile Ser His
 1 5 10

50 <210> 45
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 45

60 Arg Leu Val Lys Cys Glu Ala Phe Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys
 1 5 10 15

65 Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
 20 25

<210> 46
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 46
 10 Val Lys Cys Glu Ala Phe Pro Cys Pro Asn Thr Val
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 20 <400> 47
 Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
 1 5 10
 <210> 48
 25 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 48
 Val Cys Tyr Asp His Phe Phe Pro Ile Ser His Val Arg
 1 5 10
 35 <210> 49
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 49
 45 Val Trp Gly Asp Glu Lys Ser Ser Phe Ile Cys Asn Thr Leu Gln Pro Gly Tyr
 1 5 10 15
 <210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 50
 55 Asp Glu Lys Ser Ser Phe Ile Cys Asn Thr Leu Gln Pro Gly Tyr
 1 5 10 15
 <210> 51
 <211> 11
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 51

Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Val Phe Thr Val
1 5 10

5 <210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 52

Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
1 5

15 <210> 53
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 53

Val Cys Tyr Asp Lys Ser Phe Pro Ile Ser His Val Arg
1 5 10

25 <210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 54

35 **Ser Arg pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ile Ile**
1 5 10

40 <210> 55
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 45 <400> 55

Ile Cys Asn Thr Leu Gln Pro Gly Cys Asn Ser Val
1 5 10

50 <210> 56
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 55 <400> 56

Phe Leu Asp Thr Leu His Val Cys Arg Arg Ser Pro Cys Pro His Pro
1 5 10 15

60 <210> 57
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina

<400> 57

Ser Leu Ser Ala Val Tyr Thr Cys Lys Arg Asp Pro Cys Pro His Gln
1 **5** **10** **15**

5 <210> 58
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 58

Val Cys Tyr Asp Lys Ser Phe Pro Ile Ser His Val Arg
1 **5** **10**

15 <210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina
 <400> 59

25 **Ser** Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ile Ile
1 **5** **10**

<210> 60
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido conexina/anticonexina

35 <400> 60

Lys Arg Asp Pro Cys His Gln Val Asp Cys Phe Leu Ser Arg Pro Thr Glu Lys
1 **5** **10** **15**

40 <210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del péptido control conexina/anticonexina
 <400> 61

Ser Arg Gly Gly Glu Lys Asn Val Phe Ile Val
1 **5** **10**

50 <210> 62
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> conexina 45

60 <400> 62

65

ES 2 766 549 T3

Met Ser Trp Ser Phe Leu Thr Arg Leu Leu Glu Glu Ile His Asn His
1 5 10 15
5 Ser Thr Phe Val Gly Lys Ile Trp Leu Thr Val Leu Ile Val Phe Arg
20 25 30
Ile Val Leu Thr Ala Val Gly Gly Glu Ser Ile Tyr Tyr Asp Glu Gln
35 40 45
10 Ser Lys Phe Val Cys Asn Thr Glu Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys
50 55 60
15 Tyr Asp Ala Phe Ala Pro Leu Ser His Val Arg Phe Trp Val Phe Gln
65 70 75 80
Ile Ile Leu Val Ala Thr Pro Ser Val Met Tyr Leu Gly Tyr Ala Ile
85 90 95
20 His Lys Ile Ala Lys Met Glu His Gly Glu Ala Asp Lys Lys Ala Ala
100 105 110

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 766 549 T3

Arg Ser Lys Pro Tyr Ala Met Arg Trp Lys Gln His Arg Ala Leu Glu
 115 120 125
 5 Glu Thr Glu Glu Asp Asn Glu Glu Asp Pro Met Met Tyr Pro Glu Met
 130 135 140
 10 Glu Leu Glu Ser Asp Lys Glu Asn Lys Glu Gln Ser Gln Pro Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys His Asp Gly Arg Arg Arg Ile Arg Glu Asp Gly Leu Met Lys Ile
 165 170 175
 15 Tyr Val Leu Gln Leu Leu Ala Arg Thr Val Phe Glu Val Gly Phe Leu
 180 185 190
 Ile Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Gln Val His Pro Phe Tyr Val
 195 200 205
 20 Cys Ser Arg Leu Pro Cys Pro His Lys Ile Asp Cys Phe Ile Ser Arg
 210 215 220
 25 Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Leu Leu Ile Met Tyr Gly Val Thr Gly
 225 230 235 240
 Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ile Trp Glu Met Leu His Leu Gly Phe Gly
 245 250 255
 30 Thr Ile Arg Asp Ser Leu Asn Ser Lys Arg Arg Glu Leu Glu Asp Pro
 260 265 270
 35 Gly Ala Tyr Asn Tyr Pro Phe Thr Trp Asn Thr Pro Ser Ala Pro Pro
 275 280 285
 Gly Tyr Asn Ile Ala Val Lys Pro Asp Gln Ile Gln Tyr Thr Glu Leu
 290 295 300
 40 Ser Asn Ala Lys Ile Ala Tyr Lys Gln Asn Lys Ala Asn Thr Ala Gln
 305 310 315 320
 45 Glu Gln Gln Tyr Gly Ser His Glu Glu Asn Leu Pro Ala Asp Leu Glu
 325 330 335
 Ala Leu Gln Arg Glu Ile Arg Met Ala Gln Glu Arg Leu Asp Leu Ala
 340 345 350
 50 Val Gln Ala Tyr Ser His Gln Asn Asn Pro His Gly Pro Arg Glu Lys
 355 360 365
 Lys Ala Lys Val Gly Ser Lys Ala Gly Ser Asn Lys Ser Thr Ala Ser
 370 375 380
 55 Ser Lys Ser Gly Asp Gly Lys Asn Ser Val Trp Ile
 385 390 395

<210> 63
 <211> 382
 60 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Conexina 43

65 <400> 63

ES 2 766 549 T3

1 Met Gly Asp Trp Ser Ala Leu Gly Lys Leu Leu Asp Lys Val Gln Ala
 5 Tyr Ser Thr Ala Gly Gly Lys Val Trp Leu Ser Val Leu Phe Ile Phe
 10 Arg Ile Leu Leu Leu Gly Thr Ala Val Glu Ser Ala Trp Gly Asp Glu
 15 Cys Tyr Asp Lys Ser Phe Pro Ile Ser His Val Arg Phe Trp Val Leu
 20 Gln Ile Ile Phe Val Ser Val Pro Thr Leu Leu Tyr Leu Ala His Val
 25 Phe Tyr Val Met Arg Lys Glu Glu Lys Leu Asn Lys Lys Glu Glu Glu
 30 Leu Lys Val Ala Gln Thr Asp Gly Val Asn Val Asp Met His Leu Lys
 35 Gln Ile Glu Ile Lys Lys Phe Lys Tyr Gly Ile Glu Glu His Gly Lys
 40 Val Lys Met Arg Gly Gly Leu Leu Arg Thr Tyr Ile Ile Ser Ile Leu
 45 Phe Lys Ser Ile Phe Glu Val Ala Phe Leu Leu Ile Gln Trp Tyr Ile
 50 Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Ala Val Tyr Thr Cys Lys Arg Asp Pro Cys
 55 Pro His Gln Val Asp Cys Phe Leu Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile
 60 Phe Ile Ile Phe Met Leu Val Val Ser Leu Val Ser Leu Ala Leu Asn
 65

ES 2 766 549 T3

Ile Ile Glu Leu Phe Tyr Val Phe Phe Lys Gly Val Lys Asp Arg Val
 225 230 235 240
 5 Lys Gly Lys Ser Asp Pro Tyr His Ala Thr Ser Gly Ala Leu Ser Pro
 245 250 255
 10 Ala Lys Asp Cys Gly Ser Gln Lys Tyr Ala Tyr Phe Asn Gly Cys Ser
 260 265 270
 Ser Pro Thr Ala Pro Leu Ser Pro Met Ser Pro Pro Gly Tyr Lys Leu
 275 280 285
 15 Val Thr Gly Asp Arg Asn Asn Ser Ser Cys Arg Asn Tyr Asn Lys Gln
 290 295 300
 20 Ala Ser Glu Gln Asn Trp Ala Asn Tyr Ser Ala Glu Gln Asn Arg Met
 305 310 315 320
 Gly Gln Ala Gly Ser Thr Ile Ser Asn Ser His Ala Gln Pro Phe Asp
 325 330 335
 25 Phe Pro Asp Asp Asn Gln Asn Ser Lys Lys Leu Ala Ala Gly His Glu
 340 345 350
 30 Leu Gln Pro Leu Ala Ile Val Asp Gln Arg Pro Ser Ser Arg Ala Ser
 355 360 365
 Ser Arg Ala Ser Ser Arg Pro Arg Pro Asp Asp Leu Glu Ile
 370 375 380
 35 <210> 64
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <220>
 <223> Conexina 26
 <400> 64
 45 Met Asp Trp Gly Thr Leu Gln Thr Ile Leu Gly Gly Val Asn Lys His
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Ile Gly Lys Ile Trp Leu Thr Val Leu Phe Ile Phe Arg
 20 25 30
 50 Ile Met Ile Leu Val Val Ala Ala Lys Glu Val Trp Gly Asp Glu Gln
 35 40 45
 55 Ala Asp Phe Val Cys Asn Thr Leu Gln Pro Gly Cys Lys Asn Val Cys
 50 55 60
 60
 65

ES 2 766 549 T3

Tyr Asp His Tyr Phe Pro Ile Ser His Ile Arg Leu Trp Ala Leu Gln
 65 70 75 80
 5 Leu Ile Phe Val Ser Thr Pro Ala Leu Leu Val Ala Met His Val Ala
 85 90
 Tyr Arg Arg His Glu Lys Lys Arg Lys Phe Ile Lys Gly Glu Ile Lys
 100 105 110
 10 Ser Glu Phe Lys Asp Ile Glu Glu Ile Lys Thr Gln Lys Val Arg Ile
 115 120 125
 15 Glu Gly Ser Leu Trp Trp Thr Tyr Thr Ser Ser Ile Phe Phe Arg Val
 130 135 140
 Ile Phe Glu Ala Ala Phe Met Tyr Val Phe Tyr Val Met Tyr Asp Gly
 145 150 155 160
 20 Phe Ser Met Gln Arg Leu Val Lys Cys Asn Ala Trp Pro Cys Pro Asn
 165 170 175
 Thr Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Val Phe Thr
 180 185 190
 25 Val Phe Met Ile Ala Val Ser Gly Ile Cys Ile Leu Leu Asn Val Thr
 195 200 205
 30 Glu Leu Cys Tyr Leu Leu Ile Arg Tyr Cys Ser Gly Lys Ser Lys Lys
 210 215 220
 Pro Val
 225
 35 <210> 65
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <220>
 <223> Conexina 30
 45 <400> 65
 Met Asn Trp Ala Phe Leu Gln Gly Leu Leu Ser Gly Val Asn Lys Tyr
 1 5 10 15
 50 Ser Thr Val Leu Ser Arg Ile Trp Leu Ser Val Val Phe Ile Phe Arg
 20 25 30
 Val Leu Val Tyr Val Val Ala Ala Glu Glu Val Trp Asp Asp Glu Gln
 35 40 45
 55 Lys Asp Phe Val Cys Asn Thr Lys Gln Pro Gly Cys Pro Asn Val Cys
 50 55 60
 60
 65

ES 2 766 549 T3

Tyr Asp Glu Phe Phe Pro Val Ser His Val Arg Leu Trp Ala Leu Gln
 65 70 75 80
 5 Leu Ile Leu Val Thr Cys Pro Ser Leu Leu Val Val Met His Val Ala
 85 90 95
 Tyr Arg Glu Glu Arg Glu Arg Lys His His Leu Lys His Gly Pro Asn
 100 105 110
 10 Ala Pro Ser Leu Tyr Asp Asn Leu Ser Lys Lys Arg Gly Gly Leu Trp
 115 120 125
 15 Trp Thr Tyr Leu Leu Ser Leu Ile Phe Lys Ala Ala Val Asp Ala Gly
 130 135 140
 Phe Leu Tyr Ile Phe His Arg Leu Tyr Lys Asp Tyr Asp Met Pro Arg
 145 150 155 160
 20 Val Val Ala Cys Ser Val Glu Pro Cys Pro His Thr Val Asp Cys Tyr
 165 170 175
 Ile Ser Arg Pro Thr Glu Lys Lys Val Phe Thr Tyr Phe Met Val Thr
 180 185 190
 25 Thr Ala Ala Ile Cys Ile Leu Leu Asn Leu Ser Glu Val Phe Tyr Leu
 195 200 205
 30 Val Gly Lys Arg Cys Met Glu Ile Phe Gly Pro Arg His Arg Arg Pro
 210 215 220
 Arg Cys Arg Glu Cys Leu Pro Asp Thr Cys Pro Pro Tyr Val Leu Ser
 225 230 235 240
 35 Gln Gly Gly His Pro Glu Asp Gly Asn Ser Val Leu Met Lys Ala Gly
 245 250 255
 40 Ser Ala Pro Val Asp Ala Gly Gly Tyr Pro
 260 265
 <210> 66
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <220>
 <223> Conexina 31.1
 50 <400> 66
 Met Asn Trp Ser Ile Phe Glu Gly Leu Leu Ser Gly Val Asn Lys Tyr
 1 5 10 15

55

60

65

ES 2 766 549 T3

Ser Thr Ala Phe Gly Arg Ile Trp Leu Ser Leu Val Phe Ile Phe Arg
 20 25 30
 5 Val Leu Val Tyr Leu Val Thr Ala Glu Arg Val Trp Ser Asp Asp His
 35 40 45
 Lys Asp Phe Asp Cys Asn Thr Arg Gln Pro Gly Cys Ser Asn Val Cys
 50 55 60
 10 Phe Asp Glu Phe Phe Pro Val Ser His Val Arg Leu Trp Ala Leu Gln
 65 70 75 80
 Leu Ile Leu Val Thr Cys Pro Ser Leu Leu Val Val Met His Val Ala
 85 90 95
 15 Tyr Arg Glu Val Gln Glu Lys Arg His Arg Glu Ala His Gly Glu Asn
 100 105 110
 20 Ser Gly Arg Leu Tyr Leu Asn Pro Gly Lys Lys Arg Gly Gly Leu Trp
 115 120 125
 Trp Thr Tyr Val Cys Ser Leu Val Phe Lys Ala Ser Val Asp Ile Ala
 130 135 140
 25 Phe Leu Tyr Val Phe His Ser Phe Tyr Pro Lys Tyr Ile Leu Pro Pro
 145 150 155 160
 30 Val Val Lys Cys His Ala Asp Pro Cys Pro Asn Ile Val Asp Cys Phe
 165 170 175
 Ile Ser Lys Pro Ser Glu Lys Asn Ile Phe Thr Leu Phe Met Val Ala
 180 185 190
 35 Thr Ala Ala Ile Cys Ile Leu Leu Asn Leu Val Glu Leu Ile Tyr Leu
 195 200 205
 Val Ser Lys Arg Cys His Glu Cys Leu Ala Ala Arg Lys Ala Gln Ala
 210 215 220
 40 Met Cys Thr Gly His His Pro His Gly Thr Thr Ser Ser Cys Lys Gln
 225 230 235 240
 45 Asp Asp Leu Leu Ser Gly Asp Leu Ile Phe Leu Gly Ser Asp Ser His
 245 250 255
 Pro Pro Leu Leu Pro Asp Arg Pro Arg Asp His Val Lys Lys Thr Ile
 260 265 270
 50 Leu
 <210> 67
 <211> 333
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> conexina 37
 60 <400> 67
 65

ES 2 766 549 T3

1 Met Gly Asp Trp Gly Phe Leu Glu Lys Leu Leu Asp Gln Val Gln Glu
 5 His Ser Thr Val Val Gly Lys Ile Trp Leu Thr Val Leu Phe Ile Phe
 Arg Ile Leu Ile Leu Gly Leu Ala Gly Glu Ser Val Trp Gly Asp Glu
 10 Gln Ser Asp Phe Glu Cys Asn Thr Ala Gln Pro Gly Cys Thr Asn Val
 15 Cys Tyr Asp Gln Ala Phe Pro Ile Ser His Ile Arg Tyr Trp Val Leu
 Gln Phe Leu Phe Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Tyr Leu Gly His Val
 20 Ile Tyr Leu Ser Arg Arg Glu Glu Arg Leu Arg Gln Lys Glu Gly Glu
 Leu Arg Ala Leu Pro Ala Lys Asp Pro Gln Val Glu Arg Ala Leu Ala
 25 Ala Val Glu Arg Gln Met Ala Lys Ile Ser Val Ala Glu Asp Gly Arg
 30 Leu Arg Ile Arg Gly Ala Leu Met Gly Thr Tyr Val Ala Ser Val Leu
 Cys Lys Ser Val Leu Glu Ala Gly Phe Leu Tyr Gly Gln Trp Arg Leu
 35 Tyr Gly Trp Thr Met Glu Pro Val Phe Val Cys Gln Arg Ala Pro Cys
 40 Pro Tyr Leu Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile
 Phe Ile Ile Phe Met Leu Val Val Gly Leu Ile Ser Leu Val Leu Asn
 45 Leu Leu Glu Leu Val His Leu Leu Cys Arg Cys Leu Ser Arg Gly Met
 Arg Ala Arg Gln Gly Gln Asp Ala Pro Pro Thr Gln Gly Thr Ser Ser
 50 Asp Pro Tyr Thr Asp Gln Val Phe Phe Tyr Leu Pro Val Gly Gln Gly
 Pro Ser Ser Pro Pro Cys Pro Thr Tyr Asn Gly Leu Ser Ser Ser Glu
 55 Gln Asn Trp Ala Asn Leu Thr Thr Glu Glu Arg Leu Ala Ser Ser Arg
 60 Pro Pro Leu Phe Leu Asp Pro Pro Pro Gln Asn Gly Gln Lys Pro Pro
 65 Ser Arg Pro Ser Ser Ser Ala Ser Lys Lys Gln Tyr Val

ES 2 766 549 T3

<210> 68
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 <400> 68
 10 Lys Glu Val Trp Gly Asp Glu Gln Ala Asp Phe Val Cys Asn Thr Leu
 1 5 10 15
 15 Gln Pro Gly Cys Lys Asn Val Cys Tyr Asp His Tyr Phe Pro Ile Ser
 20 25 30
 His Ile Arg
 35
 20 <210> 69
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 <400> 69
 30 Gln Glu Val Trp Gly Asp Glu Gln Glu Asp Phe Val Cys Asn Thr Leu
 1 5 10 15
 35 Gln Pro Gly Cys Lys Asn Val Cys Tyr Asp His Phe Phe Pro Val Ser
 20 25 30
 His Ile Arg
 35
 40 <210> 70
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 <400> 70
 50 Glu Glu Val Trp Asp Asp Glu Gln Lys Asp Phe Val Cys Asn Thr Lys
 1 5 10 15
 55 Gln Pro Gly Cys Pro Asn Val Cys Tyr Asp Glu Phe Phe Pro Val Ser
 20 25 30
 His Val Arg
 35
 60 <210> 71
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina

ES 2 766 549 T3

<400> 71

5 Glu Arg Val Trp Gly Asp Glu Gln Lys Asp Phe Asp Cys Asn Thr Lys
1 5 10 15

Gln Pro Gly Cys Thr Asn Val Cys Tyr Asp Asn Tyr Phe Pro Ile Ser
20 25 30

10 Asn Ile Arg
35

<210> 72

15 <211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina

<400> 72

25 Glu Arg Val Trp Ser Asp Asp His Lys Asp Phe Asp Cys Asn Thr Arg
1 5 10 15

Gln Pro Gly Cys Ser Asn Val Cys Phe Asp Glu Phe Phe Pro Val Ser
20 25 30

30 His Val Arg
35

<210> 73

35 <211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina

<400> 73

45 Glu ser Val Trp Gly Asp Glu Lys Ser Ser Phe Ile Cys Asn Thr Leu
1 5 10 15

Gln Pro Gly Cys Asn Ser Val Cys Tyr Asp Gln Phe Phe Pro Ile Ser
20 25 30

50 His Val Arg
35

<210> 74

55 <211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina

60 <400> 74

ES 2 766 549 T3

1 Glu Ser Val Trp Gly Asp Glu Gln Ser Asp Phe Glu Cys Asn Thr Ala
 5 Gln Pro Gly Cys Thr Asn Val Cys Tyr Asp Gln Ala Phe Pro Ile Ser
 10 His Ile Arg
 <210> 75
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 20 <400> 75
 1 Glu Ser Val Trp Gly Asp Glu Gln Ser Asp Phe Glu Cys Asn Thr Ala
 25 Gln Pro Gly Cys Thr Asn Val Cys Tyr Asp Gln Ala Phe Pro Ile Ser
 His Ile Arg
 30 <210> 76
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 <400> 76
 40 Arg Pro Val Tyr Gln Asp Glu Gln Glu Arg Phe Val Cys Asn Thr Leu
 45 Gln Pro Gly Cys Ala Asn Val Cys Tyr Asp Val Phe Ser Pro Val Ser
 His Leu Arg
 50 <210> 77
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 <400> 77
 60 Glu Ser Ala Trp Gly Asp Glu Gln Ser Ala Phe Arg Cys Asn Thr Gln
 65 Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys Tyr Asp Lys Ser Phe Pro Ile Ser
 His Val Arg

ES 2 766 549 T3

<211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 <400> 78

10 **Glu Asp Val Trp Gly Asp Glu Gln Ser Asp Phe Thr Cys Asn Thr Gln**
 1 5 10 15
 15 **Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys Tyr Asp Arg Ala Phe Pro Ile Ser**
 20 25 30
His Ile Arg
 35

20 <210> 79
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 <400> 79

30 **Glu Ala Ile Tyr Ser Asp Glu Gln Ala Lys Phe Thr Cys Asn Thr Arg**
 1 5 10 15
 35 **Gln Pro Gly Cys Asp Asn Val Cys Tyr Asp Ala Phe Ala Pro Leu Ser**
 20 25 30
His Val Arg
 35

40 <210> 80
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 <400> 80

50 **Glu Ser Ser Trp Gly Asp Glu Gln Ala Asp Phe Arg Cys Asp Thr Ile**
 1 5 10 15
 55 **Gln Pro Gly Cys Gln Asn Val Cys Thr Asp Gln Ala Phe Pro Ile Ser**
 20 25 30
His Ile Arg
 35

60 <210> 81
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina

ES 2 766 549 T3

<400> 81

5 Gly Glu Ser Ile Tyr Tyr Asp Glu Gln Ser Lys Phe Val Cys Asn Thr
 1 5 10 15
 Glu Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys Tyr Asp Ala Phe Ala Pro Leu
 20 25 30
 10 Ser His Val Arg
 35

<210> 82

<211> 39

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina

20

<400> 82

25 Met Tyr Val Phe Tyr Val Met Tyr Asp Gly Phe Ser Met Gln Arg Leu
 1 5 10 15
 Val Lys Cys Asn Ala Trp Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Val
 20 25 30
 30 Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
 35

<210> 83

<211> 39

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina

40

<400> 83

Met Tyr Val Phe Tyr Phe Leu Tyr Asn Gly Tyr His Leu Pro Trp Val
 1 5 10 15

45 Leu Lys Cys Gly Ile Asp Pro Cys Pro Asn Leu Val Asp Cys Phe Ile
 20 25 30
 Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
 35

50 <210> 84

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina

<400> 84

ES 2 766 549 T3

1 Leu Tyr Ile Phe His Arg Leu Tyr Lys Asp Tyr Asp Met Pro Arg Val
 5 Val Ala Cys Ser Val Glu Pro Cys Pro His Thr Val Asp Cys Tyr Ile
 10 Ser Arg Pro Thr Glu Lys Lys
 <210> 85
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 20 <400> 85
 1 Leu Tyr Leu Leu His Thr Leu Trp His Gly Phe Asn Met Pro Arg Leu
 25 Val Gln Cys Ala Asn Val Ala Pro Cys Pro Asn Ile Val Asp Cys Tyr
 30 Ile Ala Arg Pro Thr Glu Lys Lys
 <210> 86
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 40 <400> 86
 1 Leu Tyr Val Phe His Ser Phe Tyr Pro Lys Tyr Ile Leu Pro Pro Val
 45 Val Lys Cys His Ala Asp Pro Cys Pro Asn Ile Val Asp Cys Phe Ile
 Ser Lys Pro Ser Glu Lys Asn
 50 <210> 87
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 60 <400> 87
 1 Met Tyr Val Phe Tyr Leu Leu Tyr Pro Gly Tyr Ala Met Val Arg Leu
 65 Val Lys Cys Asp Val Tyr Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Val
 Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
 35

ES 2 766 549 T3

<210> 88
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 <400> 88
 10
Leu Tyr Gly Trp Thr Met Glu Pro Val Phe Val Cys Gln Arg Ala Pro
1 5 10 15
 15
Cys Pro Tyr Leu Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
20 25 30
 <210> 89
 <211> 32
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 25 <400> 89
Leu Tyr Gly Trp Thr Met Glu Pro Val Phe Val Cys Gln Arg Ala Pro
1 5 10 15
 30
Cys Pro Tyr Leu Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
20 25 30
 <210> 90
 35 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 <400> 90
 45
Gly Ala Leu His Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Leu Ala Pro Lys Lys Phe
1 5 10 15
Pro Cys Thr Arg Pro Pro Cys Thr Gly Val Val Asp Cys Tyr Val Ser
20 25 30
 50
Arg Pro Thr Glu Lys Ser
35
 <210> 91
 55 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 60 <400> 91

ES 2 766 549 T3

1 Leu Leu Ile Gln Trp Tyr Ile Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Ala Val Tyr
 5 Thr Cys Lys Arg Asp Pro Cys Pro His Gln Val Asp Cys Phe Leu Ser
 10 <210> 92
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 <400> 92
 20 Ile Ala Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Glu Leu Lys Pro Leu Tyr
 25 Arg Cys Asp Arg Trp Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Ile Ser
 30 <210> 93
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:dominio extracelular de conexina
 <400> 93
 40 Leu val Gly Gln Tyr Leu Leu Tyr Gly Phe Glu Val Arg Pro Phe Phe
 45 Pro Cys Ser Arg Gln Pro Cys Pro His Val Val Asp Cys Phe Val Ser
 50 <210> 94
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223>Dominio extracelular de conexina
 <400> 94
 60 Ile Val Gly Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Phe Leu Thr Thr Leu His
 65 Val Cys Arg Arg Ser Pro Cys Pro His Pro Val Asn Cys Tyr Val Ser
 Arg Pro Thr Glu Lys Asn

ES 2 766 549 T3

<210> 95
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina
 <400> 95
 10 Leu Ile Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Gln Val His Pro Phe Tyr
 1 5 10 15
 Val Cys Ser Arg Leu Pro Cys His Pro Lys Ile Asp Cys Phe Ile Ser
 15 20 25 30
 Arg Pro Thr Glu Lys Thr
 35
 <210> 96
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina
 <400> 96
 30 Leu Leu Ile Gln Trp Tyr Ile Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Ala Val Tyr
 1 5 10 15
 Thr Cys Lys Arg Asp Pro Cys Pro His Gln Val Asp Cys Phe Leu Ser
 20 25 30
 35 Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ile Ile
 35 40
 <210> 97
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina
 45
 <400> 97
 Met Tyr Val Phe Tyr Val Met Tyr Asp Gly Phe Ser Met Gln Arg Leu
 1 5 10 15
 50 Val Lys Cys Asn Ala Trp Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Val
 20 25 30
 Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Val Phe Thr Val
 55 35 40
 <210> 98
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina
 65 <400> 98

ES 2 766 549 T3

5 Met Tyr Val Phe Tyr Phe Leu Tyr Asn Gly Tyr His Leu Pro Trp Val
 1 5 10 15
 Leu Lys Cys Gly Ile Asp Pro Cys Pro Asn Leu Val Asp Cys Phe Ile
 20 25 30
 10 Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Val Phe Thr Ile
 35 40
 <210> 99
 <211> 43
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina
 20 <400> 99
 Leu Tyr Ile Phe His Arg Leu Tyr Lys Asp Tyr Asp Met Pro Arg Val
 1 5 10 15
 25 Val Ala Cys Ser Val Glu Pro Cys Pro His Thr Val Asp Cys Tyr Ile
 20 25 30
 Ser Arg Pro Thr Glu Lys Lys Val Phe Thr Tyr
 35 40
 30 <210> 100
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina
 <400> 100
 40 Leu Tyr Leu Leu His Thr Leu Trp His Gly Phe Asn Met Pro Arg Leu
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Ala Asn Val Ala Pro Cys Pro Asn Ile Val Asp Cys Tyr
 20 25 30
 45 Ile Ala Arg Pro Thr Glu Lys Lys Ile Phe Thr Tyr
 35 40
 50 <210> 101
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina
 <400> 101
 60 Leu Tyr Val Phe His Ser Phe Tyr Pro Lys Tyr Ile Leu Pro Pro Val
 1 5 10 15
 Val Lys Cys His Ala Asp Pro Cys Pro Asn Ile Val Asp Cys Phe Ile
 20 25 30
 65 Ser Lys Pro Ser Glu Lys Asn Ile Phe Thr Leu
 35 40

ES 2 766 549 T3

<210> 102
 <211> 43
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina
 10
 <400> 102
 Met Tyr Val Phe Tyr Leu Leu Tyr Pro Gly Tyr Ala Met Val Arg Leu
 1 5 10 15
 15 Val Lys Cys Asp Val Tyr Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Val
 20 25 30
 20 Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Val Phe Thr Val
 35 40

 <210> 103
 <211> 36
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina
 30 <400> 103
 Leu Tyr Gly Trp Thr Met Glu Pro Val Phe Val Cys Gln Arg Ala Pro
 1 5 10 15
 35 Cys Pro Tyr Leu Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
 20 25 30

 Ile Phe Ile Ile
 35
 40 <210> 104
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina

 <400> 104
 50 Leu Tyr Gly Trp Thr Met Glu Pro Val Phe Val Cys Gln Arg Ala Pro
 1 5 10 15

 Cys Pro Tyr Leu Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr
 20 25 30
 55 Ile Phe Ile Ile
 35

 <210> 105
 60 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina

ES 2 766 549 T3

<400> 105
 Gly Ala Leu His Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Leu Ala Pro Lys Lys Phe
 1 5 10 15
 5 Pro Cys Thr Arg Pro Pro Cys Thr Gly Val Val Asp Cys Tyr Val Ser
 20 25 30
 Arg Pro Thr Glu Lys Ser Leu Leu Met Leu
 35 40
 10 <210> 106
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina
 20 <400> 106
 Ile Ala Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Glu Leu Lys Pro Leu Tyr
 1 5 10 15
 Arg Cys Asp Arg Trp Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Ile Ser
 20 25 30
 25 Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Ile Ile
 35 40
 30 <210> 107
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina
 40 <400> 107
 Leu Val Gly Gln Tyr Leu Leu Tyr Gly Phe Glu Val Arg Pro Phe Phe
 1 5 10 15
 Pro Cys Ser Arg Gln Pro Cys Pro His Val Val Asp Cys Phe Val Ser
 20 25 30
 45 Arg Pro Thr Glu Lys Thr Val Phe Leu Leu
 35 40
 50 <210> 108
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina
 55 <400> 108
 Ile Val Gly Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Phe Leu Thr Thr Leu His
 1 5 10 15
 60 Val Cys Arg Arg Ser Pro Cys Pro His Pro Val Asn Cys Tyr Val Ser
 20 25 30
 65 Arg Pro Thr Glu Lys Asn Val Phe Ile Val
 35 40

ES 2 766 549 T3

<210> 109
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio extracelular de conexina
 <400> 109
 10 Leu Ile Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Gln Val His Pro Phe Tyr
 1 5 10 15
 Val Cys Ser Arg Leu Pro Cys His Pro Lys Ile Asp Cys Phe Ile Ser
 15 20 25 30
 Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Leu Leu
 35 40
 <210> 110
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 <400> 110
 30 Leu Gly Thr Ala Ala Glu Ser Ser Trp Gly Asp Glu Gln Ala Asp Phe
 1 5 10 15
 Arg Cys Asp Thr Ile Gln Pro Gly Cys Gln Asn Val Cys Thr Asp Gln
 20 25 30
 35 Ala Phe Pro Ile Ser His Ile Arg Phe Trp Val Leu Gln
 35 40 45
 <210> 111
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 45 <400> 111
 Leu Gly Thr Ala Ala Glu Ser Ser Trp Gly Asp Glu Gln Ala
 1 5 10
 <210> 112
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 <400> 112
 60 Asp Glu Gln Ala Asp Phe Arg Cys Asp Thr Ile Gln Pro
 1 5 10
 <210> 113
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 <400> 113
 5 Thr Ile Gln Pro Gly Cys Gln Asn Val Cys Thr Asp Gln
 1 5 10
 210> 114
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 15 <400> 114
 Val Cys Thr Asp Gln Ala Phe Pro Ile Ser His Ile Arg
 1 5 10
 20 <210> 115
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 <400> 115
 30 Ala Phe Pro Ile Ser His Ile Arg Phe Trp Val Leu Gln
 1 5 10
 <210> 116
 <211> 47
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 40 <400> 116
 Met Glu Val Gly Phe Ile Val Gly Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Phe
 1 5 10 15
 45 Leu Thr Thr Leu His Val Cys Arg Arg Ser Pro Cys Pro His Pro Val
 20 25 30
 Asn Cys Tyr Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Asn Val Phe Ile Val
 35 40 45
 50 <210> 117
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 <400> 117
 Met Glu Val Gly Phe Ile Val Gly Gln Tyr Phe
 1 5 10
 60 <210> 118
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

ES 2 766 549 T3

<223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 <400> 118
 5 Ile Val Gly Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Phe Leu
 1 5 10
 <210> 119
 <211> 14
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 15 <400> 119
 Gly Ile Phe Leu Thr Thr Leu His Val Cys Arg Arg Ser Pro
 1 5 10
 20 <210> 120
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 <400> 120
 30 Arg Arg Ser Pro Cys Pro His Pro Val Asn Cys Tyr
 1 5 10
 <210> 121
 <211> 46
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 <400> 121
 40 Leu Thr Ala Val Gly Gly Glu Ser Ile Tyr Tyr Asp Glu Gln Ser Lys
 1 5 10 15
 Phe Val Cys Asn Thr Glu Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys Tyr Asp
 45 20 25 30
 Ala Phe Ala Pro Leu Ser His Val Arg Phe Trp Val Phe Gln
 35 40 45
 50 <210> 122
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 <400> 122
 Leu Thr Ala Val Gly Gly Glu Ser Ile Tyr Tyr Asp Glu Gln Ser
 60 1 5 10 15
 <210> 123
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 <400> 123
 5 Asp Glu Gln Ser Lys Phe Val Cys Asn Thr Glu Gln Pro
 1 5 10
 <210> 124
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 15 <400> 124
 Thr Glu Gln Pro Gly Cys Glu Asn Val Cys Tyr Asp Ala
 1 5 10
 20 <210> 125
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 <400> 125
 30 Val Cys Tyr Asp Ala Phe Ala Pro Leu Ser His Val Arg
 1 5 10
 <210> 126
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 40 <400> 126
 Ala Pro Leu Ser His Val Arg Phe Trp Val Phe Gln
 1 5 10
 <210> 127
 45 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Secuencia artificial: Dominio de conexina
 <400> 127
 55 Phe Glu Val Gly Phe Leu Ile Gly Gln Tyr Phe Leu Tyr Gly Phe Gln
 1 5 10 15
 Val His Pro Phe Tyr Val Cys Ser Arg Leu Pro Cys His Pro Lys Ile
 20 25 30
 60 Asp Cys Phe Ile Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Ile Phe Leu Leu
 35 40 45

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto anticonexina 43 para usar en un método de tratamiento de una herida crónica en un sujeto que comprende administrarle al sujeto de 0,1 µg a 1 gramo del compuesto anticonexina 43.
2. Un compuesto para usar de conformidad con la reivindicación 1 en donde la herida crónica es una úlcera diabética.
3. Un compuesto para usar de conformidad con la reivindicación 1 o 2 en donde dicho compuesto anticonexina 43 es un polinucleótido antisentido.
4. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde el compuesto anticonexina 43 es un oligonucleótido antisentido de entre 15 y 35 bases nucleotídicas de longitud, en donde el compuesto anticonexina 43 es o comprende una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de las SEQ ID NOS: 1-3, o en donde el compuesto anticonexina 43 comprende un polinucleótido antisentido dirigido al menos a 8-12 bases nucleotídicas de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina 43 que tiene una secuencia de bases nucleotídicas de la SEQ ID NO: 12.
5. Un compuesto para usar de conformidad con la reivindicación 4, en donde el compuesto anticonexina 43 es o comprende una secuencia de bases nucleotídicas seleccionada de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.
6. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en donde el compuesto anticonexina 43 es un oligonucleótido antisentido que comprende bases nucleotídicas de origen natural y un enlace internucleósido no modificado, un oligonucleótido antisentido que comprende al menos un enlace fosforotioato, un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido que comprende al menos una porción de azúcar modificada, un oligonucleótido antisentido que comprende un ácido nucleico bloqueado, un oligonucleótido antisentido que comprende un ácido nucleico peptídico, o un compuesto antisentido que comprende un oligonucleótido que comprende al menos una base nucleotídica modificada.
7. Un compuesto para usar de conformidad con la reivindicación 1 o 2 en donde dicho compuesto anticonexina 43 es un péptido mimético.
8. Un compuesto para usar de conformidad con la reivindicación 7, en donde dicho péptido mimético comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a una porción de una región del lazo extracelular o una porción de una región transmembranal de conexina 43.
9. Un compuesto para usar de conformidad con la reivindicación 8, en donde dicho péptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende de 5 a 20, de 8 a 15, o de 11 a 13 aminoácidos contiguos de una región del lazo extracelular o de la región transmembranal de la SEQ ID NO: 63.
10. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en donde el compuesto anticonexina 43 mejora la muerte continua de los vasos.
11. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en donde el compuesto anticonexina 43 inhibe la expresión, formación, o actividad de hemicanal de conexina 43 en células epiteliales o en células endoteliales.
12. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en donde el compuesto anticonexina 43 se formula para la administración tópica.
13. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en donde el compuesto anticonexina 43 se formula para una administración sostenida.
14. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el sujeto es humano.
15. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en donde el sujeto es un animal doméstico, un animal de granja, un animal de zoológico, un animal deportivo o un animal de compañía.
16. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de dicho compuesto anticonexina 43 está entre 1×10^{-10} M a 1×10^{-4} M.
17. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende administrarle al sujeto de 0,1 µg a 1 gramo del compuesto anticonexina 43 por dosis.

ES 2 766 549 T3

18. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el método comprende administrarle al sujeto 0,001 a 100 mg por kg de peso corporal del sujeto por día el compuesto anticonexina 43 en dosis múltiples.
- 5 19. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el compuesto anticonexina 43 se formula con un poloxámero.
20. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde dicho péptido consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 52.
- 10 21. Un compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde dicho péptido consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 35.
- 15 22. Un compuesto para usar de conformidad con la reivindicación 6, en donde el compuesto anticonexina 43 es un oligonucleótido antisentido que comprende un ácido nucleico bloqueado.

Figura 1A

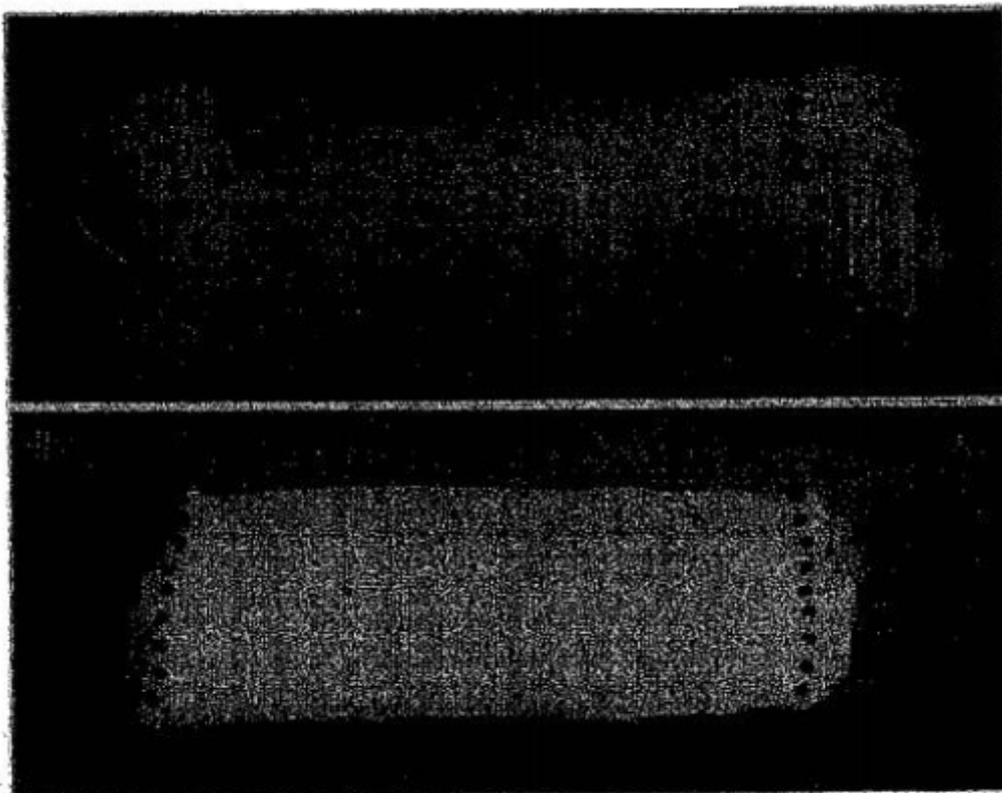


Figura 1B

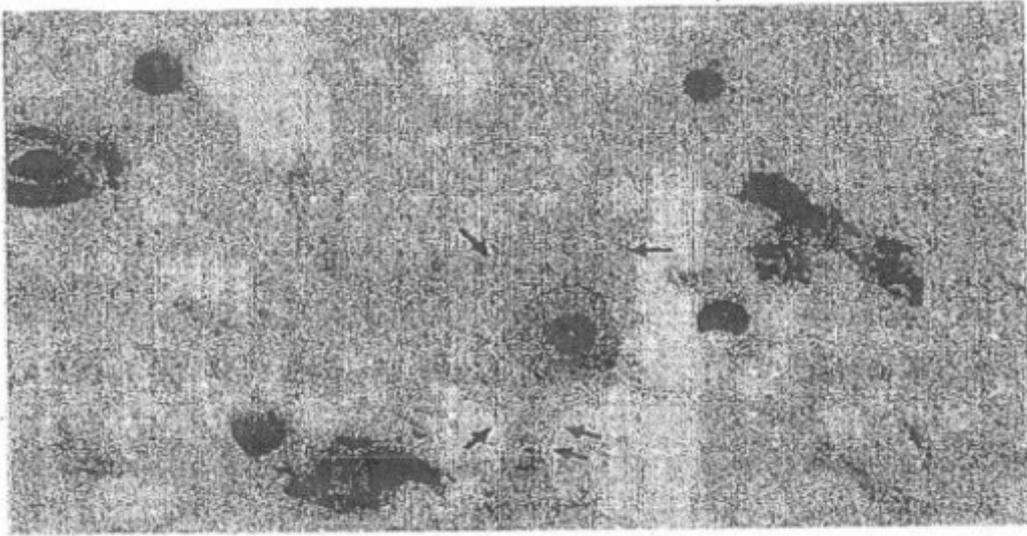


Figura 2

Figura 3A

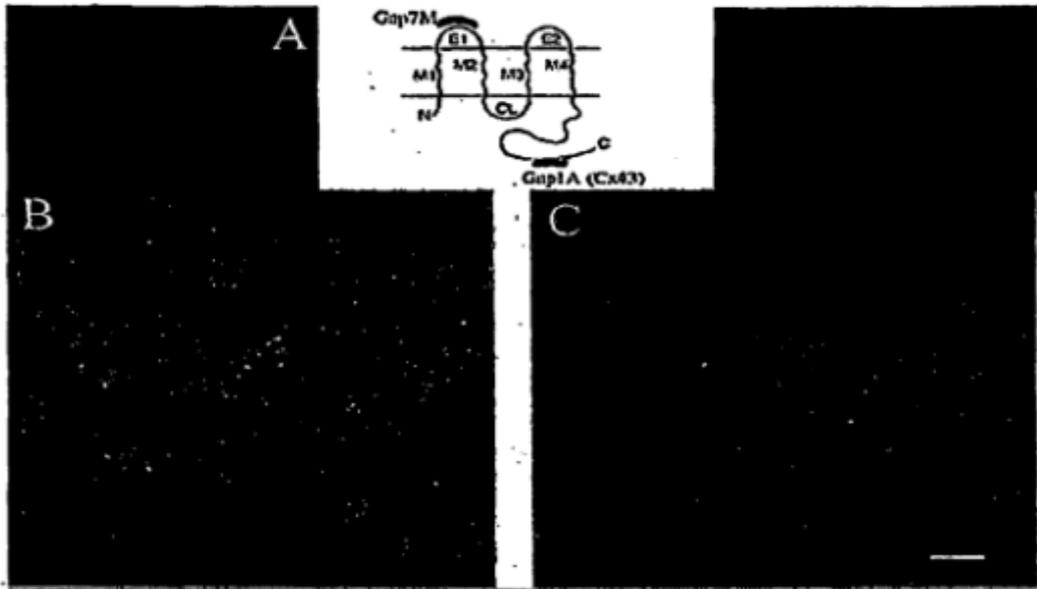


Figura 3B

Figura 3C

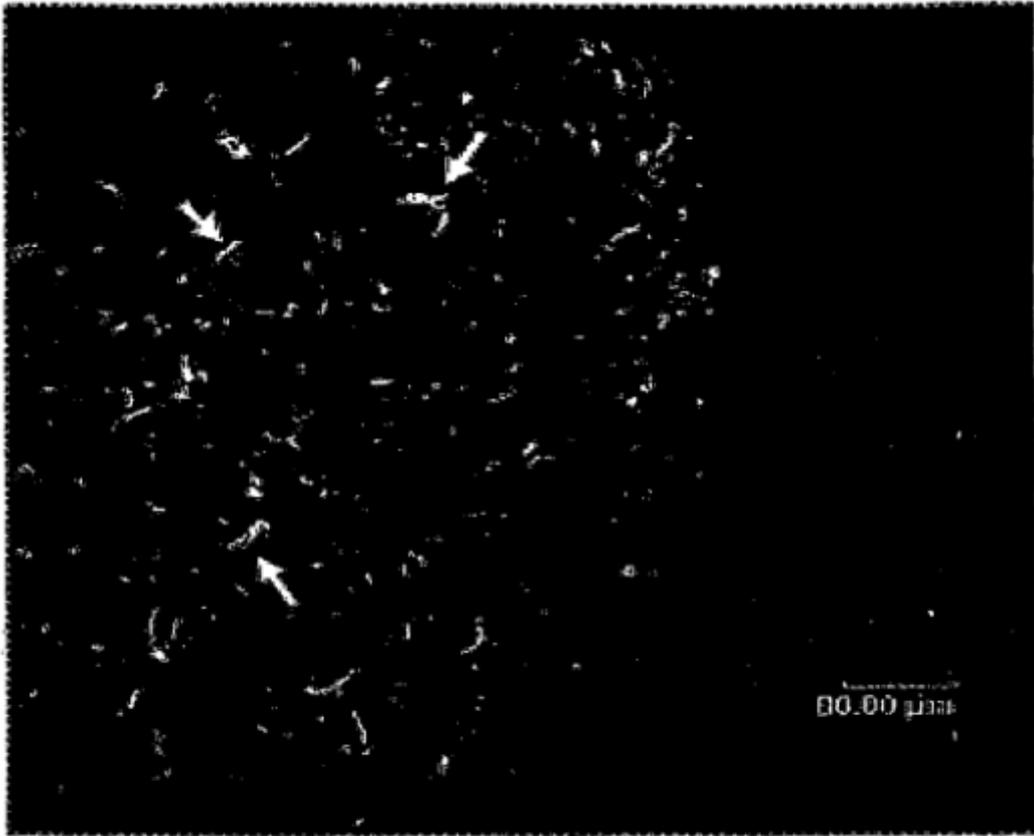
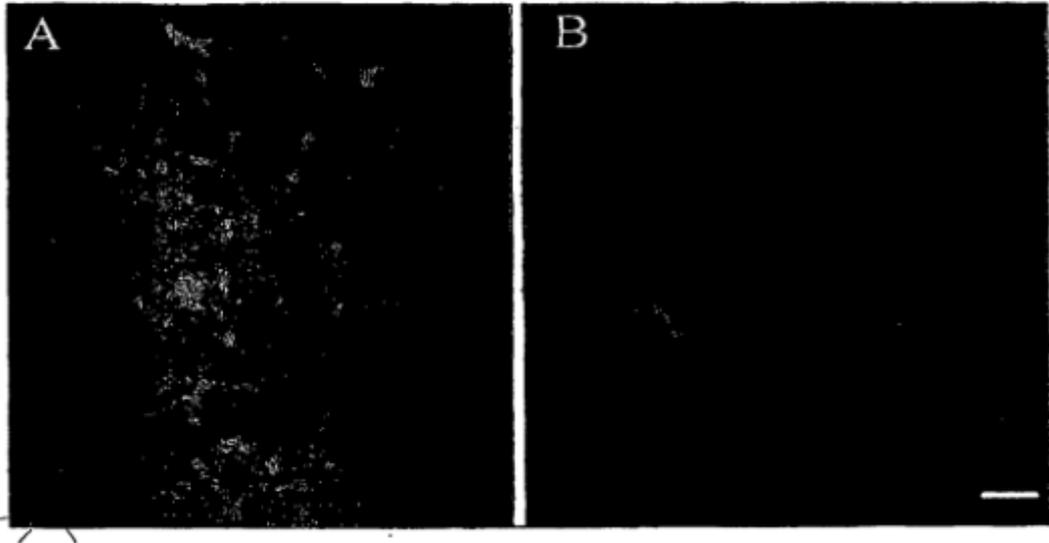


Figura 4

Figura 5A

Figura 5B



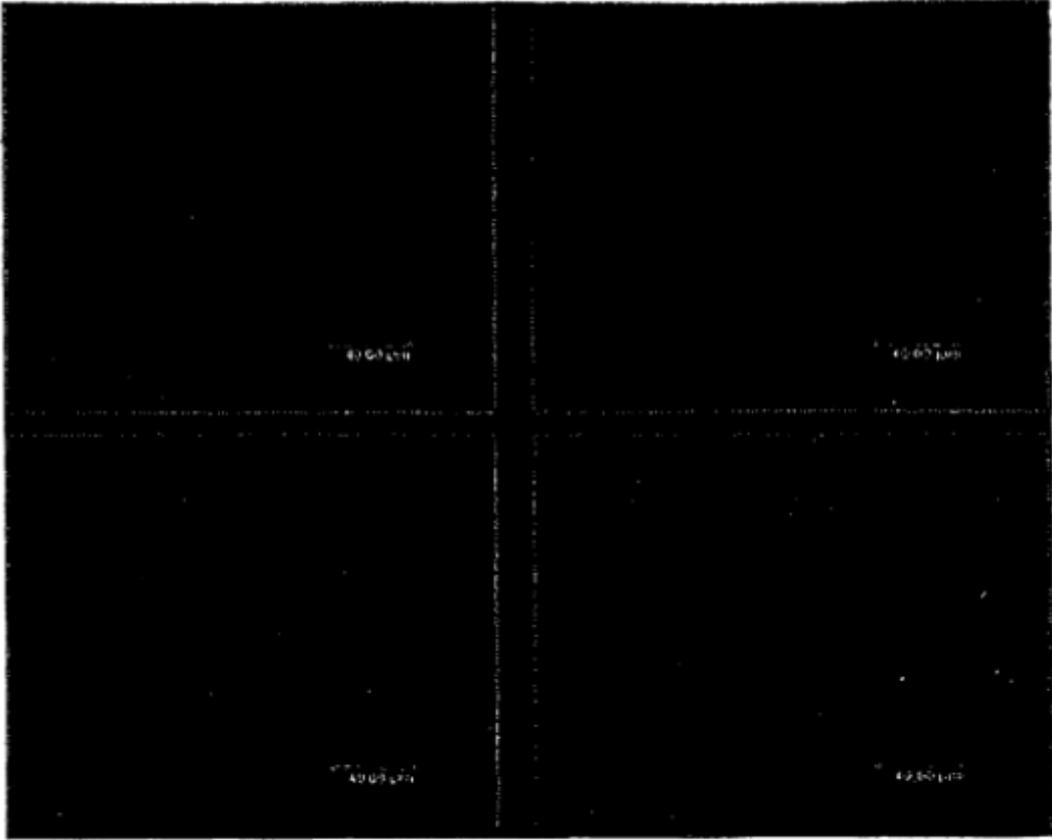


Figura 6A

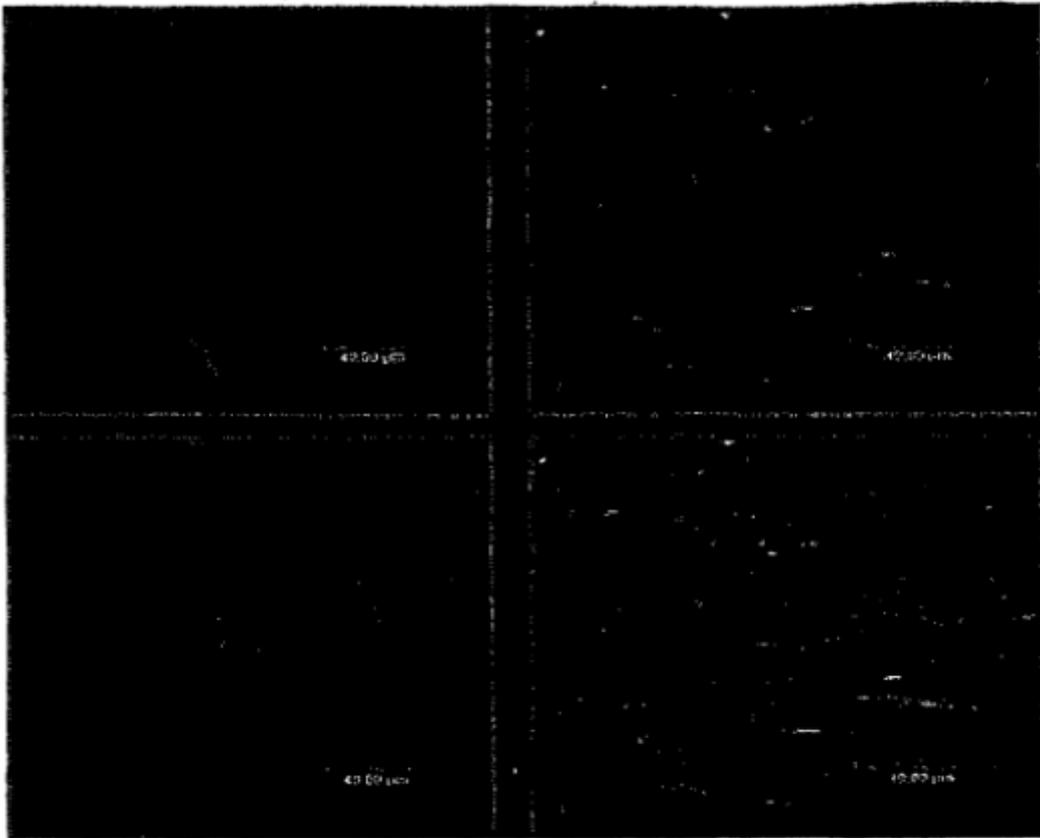


Figura 6B

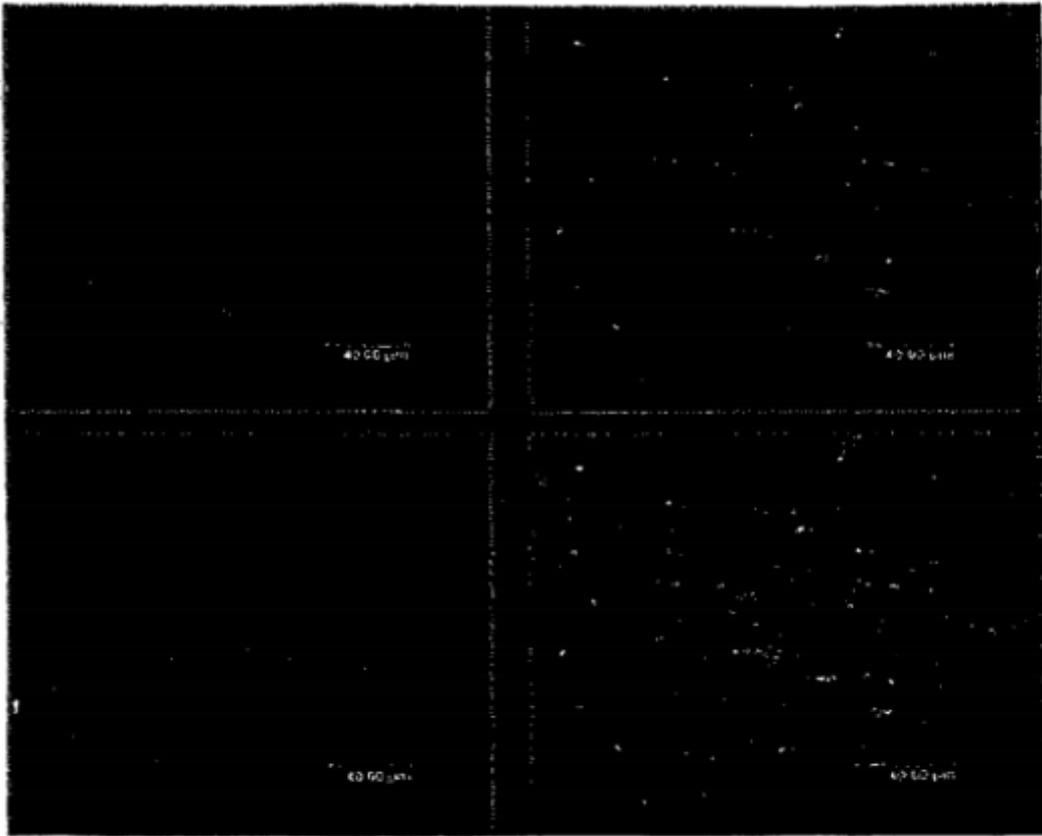
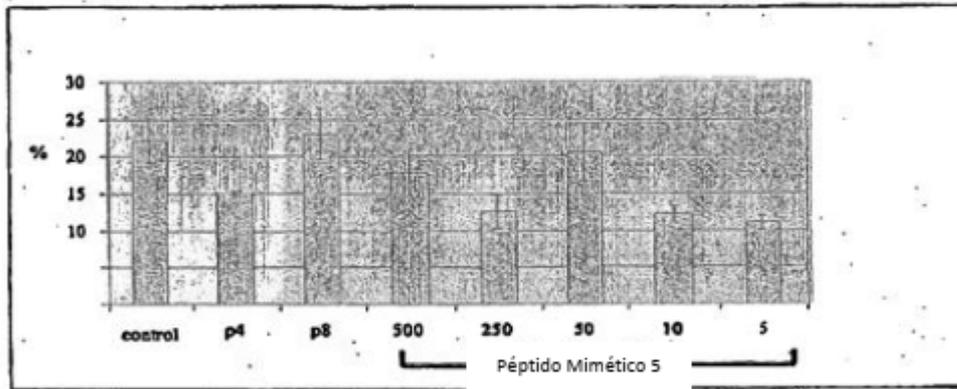


Figura 6C



Figura 7

Figura 8



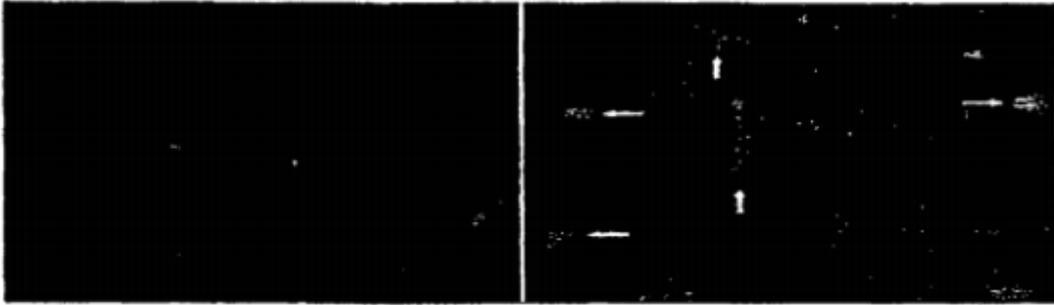


Figura 9

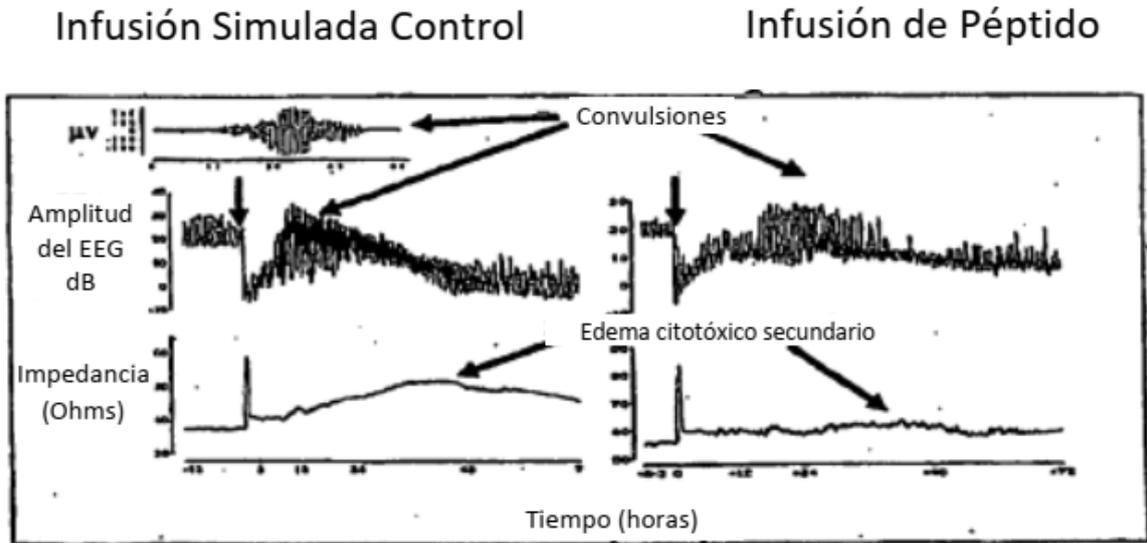


Figura 10

Figura 11A

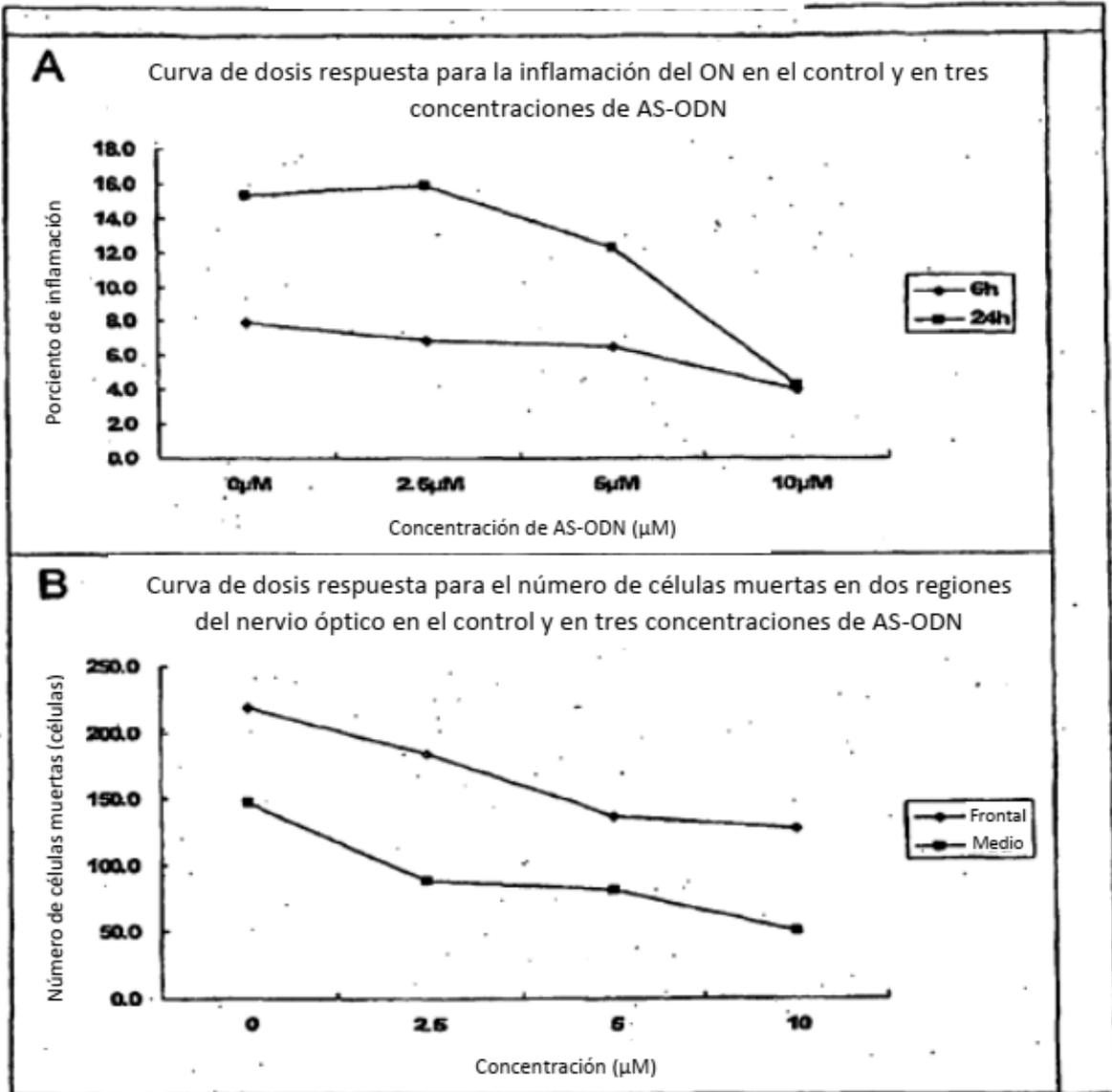


Figura 11B

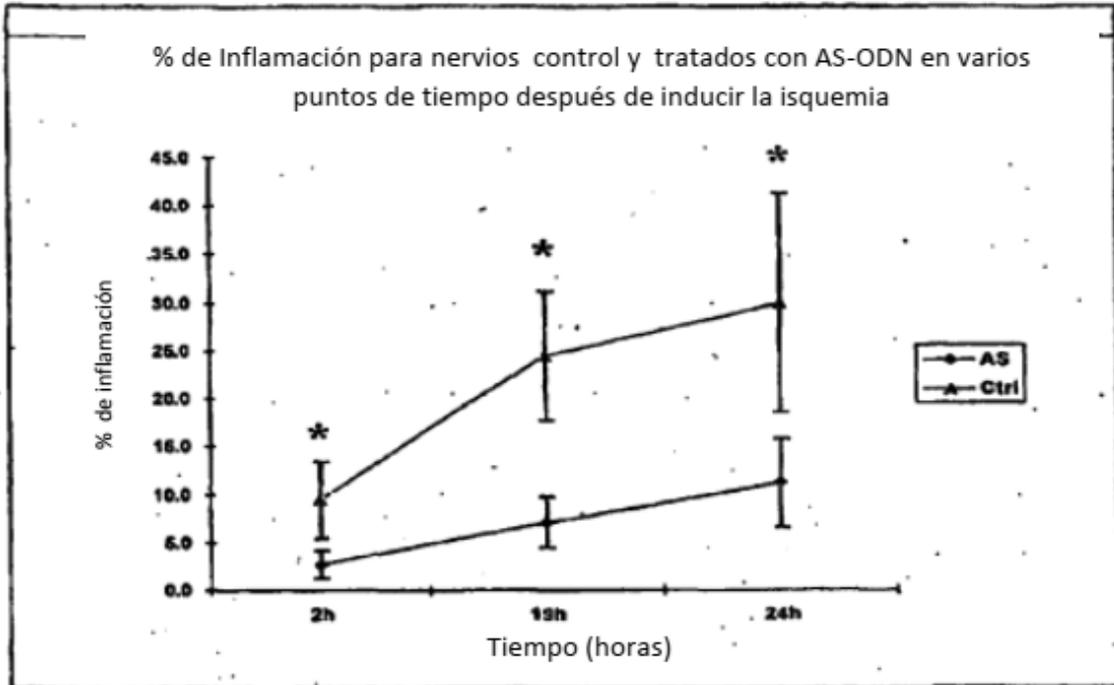


Figura 12

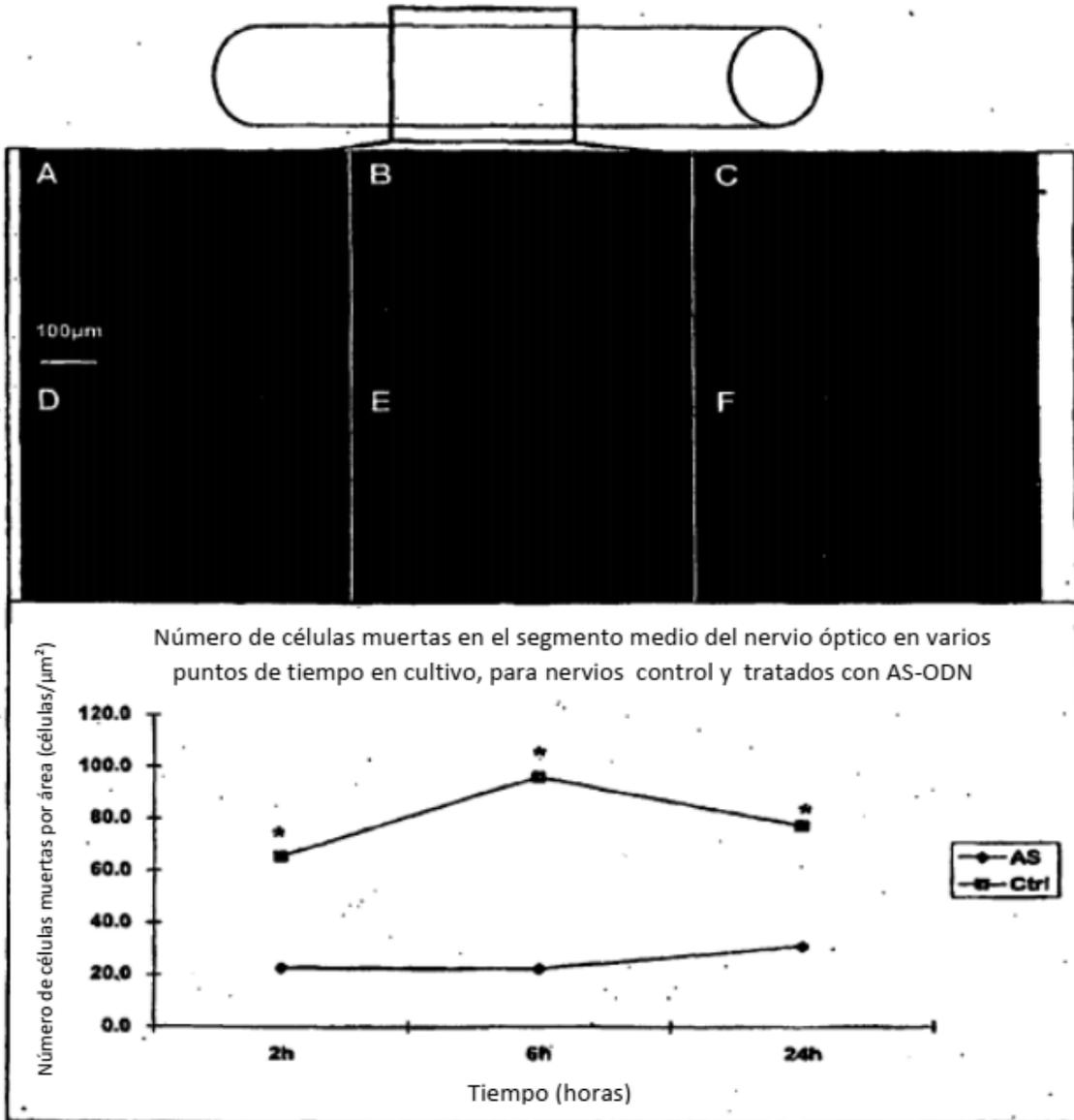


Figura 13

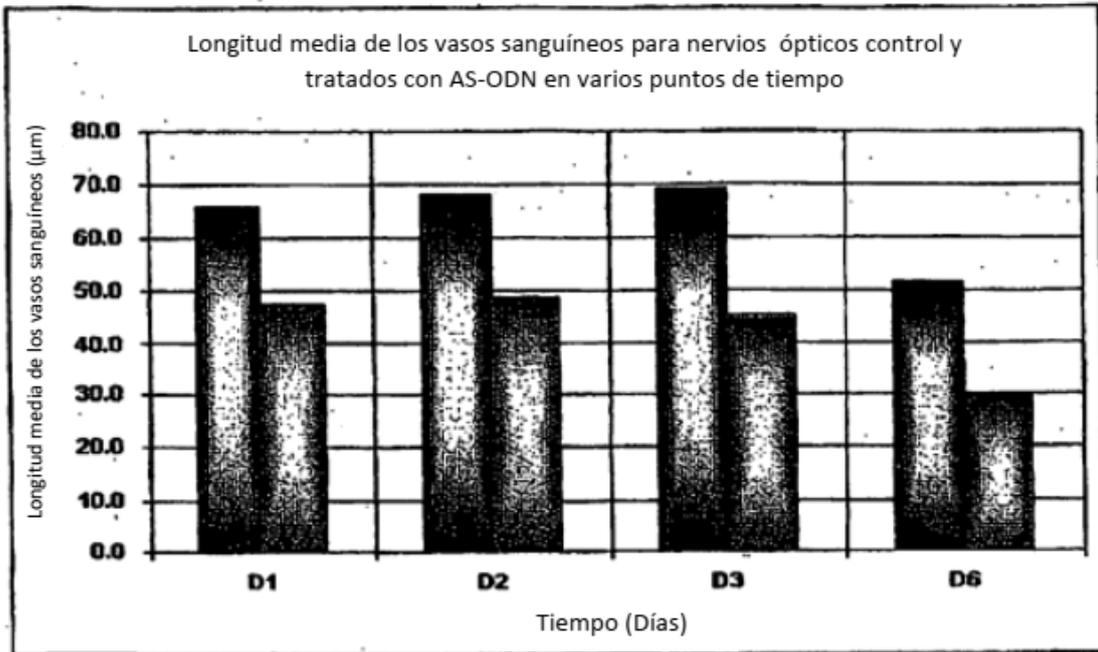


Figura 14