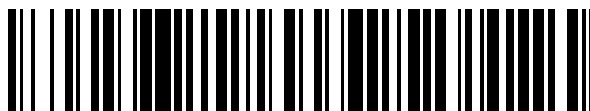


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 374**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/711 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2004 PCT/IB2004/004431**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2005 WO05053600**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2004 E 04817632 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 1699924**

54 Título: **Compuestos inhibitorios dirigidos a conexina 43 y sus métodos de uso en el tratamiento del trauma ocular de la córnea**

30 Prioridad:
03.12.2003 NZ 529936

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2020

73 Titular/es:
**OCUNEXUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
101 West Broadway, Suite 900
San Diego, CA 92101, US**

72 Inventor/es:
**LAUX, WILDA y
GREEN, COLIN, R.**

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 749 374 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 inhibitorios dirigidos a conexina 43 y sus métodos de uso en el tratamiento del trauma ocular de la córnea.

5

Campo

La presente descripción se refiere a un compuesto de inhibición de conexina 43 que inhibe en su totalidad o en parte la expresión o actividad de una conexina 43 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto para un trauma ocular de la córnea.

10

Antecedentes

La insuficiencia de tejidos u órganos debido a enfermedades o lesiones es un problema de salud importante en todo el mundo con pocas opciones para una recuperación total que no sea el trasplante de órganos o tejidos. Sin embargo, los problemas para encontrar un donante adecuado significan que esta opción no está disponible para la mayoría de los pacientes, por lo cual actualmente se investiga como reemplazo la ingeniería o remodelación de tejidos mediante miméticos de tejidos u órganos sintéticos o semisintéticos que se cultiven o que sean totalmente funcionales en una funcionalidad deseada.

15

20

Un área en particular en la que esta tecnología es cada vez más importante se encuentra en la córnea del ojo. El trasplante de córnea es la forma más común de trasplante de órganos sólidos realizados en todo el mundo. Cada año se realizan alrededor de 80,000 solo en Estados Unidos y el Reino Unido. La frecuencia de la cirugía refractiva para la corrección de la miopía tal como la queratectomía fotorrefractiva (PRK) y la queratomileusis in situ asistida por láser (LASIK) ha conducido al déficit de córneas adecuadas para el trasplante para la reconstrucción de tejidos después de los procesos de cirugía o enfermedad y para la manipulación de tejidos in vivo para modificar los cambios. Además, aproximadamente el 5 % de los pacientes que se someten a cirugía asistida por láser experimenta resultados inesperados.

25

La córnea es un tejido transparente que comprende la sexta parte central de la túnica externa del ojo. Su estructura y función unificadas proporcionan al ojo una interfaz refractiva clara, resistencia a la tracción y protección contra factores externos. La córnea se construye a partir de tres capas de células principales diferentes: el epitelio, el estroma y el endotelio (PePOSE, J. S. y otros, "The cornea; Adler's Physiology of the eye: Clinical application", 9^{na} ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1992, 29-47; Spencer, W. H., "The cornea; Ophthalmic Pathology: an atlas and textbook", 4^{ta} ed., Filadelfia: W. B. Saunders Co., 1996, 157-65). Además, la membrana de Descemet, la capa de Bowman y la membrana basal son estructuras que se derivan de alguna manera de una de estas capas celulares principales.

30

35

El epitelio corneal es la capa en contacto directo con el ambiente externo. Es una estructura escamosa estratificada, no queratinizada, con un grosor que varía de 40 a 100 pm, en ratas y en seres humanos, respectivamente. Está compuesta de una zona superficial, formada generalmente por dos a tres capas de células escamosas planas; una zona intermedia, formada por dos o tres capas de células aladas polihédricas; y una zona basal que consiste en una única fila de células columnares. El epitelio corneal estratificado se caracteriza como un sincitio funcional de transporte de iones "apretado" que sirve tanto como barrera protectora a la superficie ocular, así como también una capa secretora de líquidos adjunta que ayuda al endotelio corneal en la regulación de la hidratación del estroma y contribuye de este modo al mantenimiento de la transparencia de la córnea. Se ha demostrado que las cualidades únicas y especializadas ofrecidas por el epitelio corneal son esenciales para el funcionamiento de la córnea como el principal elemento refractivo del ojo. Por lo tanto, es importante mantener su estructura estratificada independientemente de cualquier estrés ambiental.

40

45

El trauma en la superficie de la córnea es muy frecuente; por ejemplo, las raspaduras menores, las infecciones y enfermedades oculares, los accidentes químicos o mecánicos y la práctica quirúrgica pueden dañar la córnea. Una complicación importante en la cicatrización de heridas posterior al trauma corneal es la pérdida de agudeza visual debido a la reorganización tisular. Los pacientes con riesgo de problemas en la curación oftalmológica incluyen aquellos que se han sometido a una cirugía. Los ejemplos de tal cirugía incluyen, pero no se limitan a, extracción de cataratas, con o sin reemplazo de lentes; trasplante de córnea u otros procedimientos penetrantes, tales como la queratoplastia penetrante (PKP); queratectomía fotorrefractiva asistida por láser de excimeros; cirugía de filtración para el glaucoma; queratotomía radial; y otros tipos de cirugía para corregir la refracción o reemplazar una lente.

50

55

La córnea proporciona la superficie externa ópticamente lisa para transmitir luz en el ojo. La cirugía elimina las fuerzas que anclan la córnea en su configuración normal. En los pacientes con cataratas, se realiza una incisión quirúrgica de grosor completo en la región del limbo. La córnea se contrae cuando sana, lo que provoca una distorsión local del tejido y una distorsión concomitante en el campo visual en la región afectada (astigmatismo).

60

Otras heridas quirúrgicas en la córnea pueden iniciar un proceso de cicatrización de heridas que provoca un desplazamiento local predeterminado en la curvatura de la córnea. La técnica más ampliamente conocida es la queratotomía radial (RK), en la cual se producen varias incisiones de grosor parcial para provocar el aplanamiento de la córnea central. Esta técnica, sin embargo, está limitada debido a la falta de resultados pronosticables y fluctuaciones significativas en la visión, las cuales se relacionan con la naturaleza y el alcance de la cicatrización de heridas (Jester)

65

y otros, *Cornea* (1992) 11: 191). Por ejemplo, se ha observado una reducción en el abultamiento periférico del tejido de la córnea con una regresión asociada con la mejora visual inicial en la mayoría de los pacientes con RK (McDonnell y Schanzlin, *Arch. Ophthalmol.* (1988), 106: 212).

5 Las heridas en la córnea también se curan lentamente, y la curación incompleta tiende a asociarse con la inestabilidad de la agudeza visual (con fluctuaciones en la visión de la mañana a la noche, así como también la deriva de la agudeza visual que se produce durante un período de semanas a meses). Esto puede ser la causa de que el 34 % o más de los pacientes a los que se les ha realizado una queratotomía radial se hayan quejado de visión fluctuante un año después de la cirugía (Waring) y otros, *Amer. J. Ophthalmol.* (1991) 111: 133). Además, si una herida corneal no se cura completamente, puede producirse una "apertura" de la herida que conduce a un efecto hiperópico progresivo. Hasta el 30 % de los pacientes que se han sometido al procedimiento de RK se ven afectados con los cambios hiperópicos asociados con la apertura de la herida (Dietz) y otros, *Ophthalmology* (1986) 93: 1284).

15 La regeneración de la córnea después del trauma es compleja y no se entiende bien. Implica la regeneración de tres tejidos: el epitelio, el estroma y el endotelio. Se considera que tres rutas de señalización intercelular principales coordinan la regeneración de tejidos: una mediada por factores de crecimiento (Baldwin, H. C. y Marshall, J., *Acta Ophthalmol. Scand.*, (2002) 80: 238-47), citocinas (Ahmadi, A. J. y Jakobiec, F. A., *Int. Ophthalmol. Climes*, (2002) 42(3): 13 - 22) y quimocinas (Kurpakus-Wheater, M. y otros, *Biotech. Histochem*, (1999) 74: 146-59); otra mediada por interacciones de la matriz celular (Tanaka, T., y otros, *Jpn. J. Ophthalmol.*, (1999) 43: 348-54); y otra mediada por las uniones de tipo hendidura y la familia de conexinas de proteínas formadoras de canales.

25 Las uniones de tipo hendidura son estructuras de membrana celular, que facilitan la comunicación directa entre células. Un canal de uniones de tipo hendidura está formado por dos conexones, cada uno compuesto de seis subunidades de conexina. Cada conexón hexamérico se acopla con un conexón en la membrana opuesta para formar una unión de tipo hendidura única. Los canales de uniones de tipo hendidura pueden encontrarse en todo el cuerpo. Un tejido tal como el epitelio de la córnea, por ejemplo, tiene de seis a ocho capas celulares, pero aún expresa diferentes canales de uniones de tipo hendidura en diferentes capas con conexina 43 en la capa basal y conexina 26 desde las capas de células basales a las aladas intermedias. En general, las conexinas son una familia de proteínas, comúnmente nombradas de acuerdo con su peso molecular o clasificadas sobre una base filogenética en las subclases alfa, beta y gamma. Hasta la fecha, se han identificado 20 isoformas humanas y 19 murinas (Willecke, K. y otros, *Biol. Chem.*, (2002) 383, 725-37) lo que quizás indica que cada proteína conexina diferente puede especializarse funcionalmente. Diferentes tipos de tejidos y células tienen patrones característicos de expresión de la proteína conexina y se ha demostrado que los tejidos tales como la córnea alteran el patrón de expresión de la proteína conexina después de una lesión o trasplante (Qui, C. y otros, (2003) *Current Biology*, 13: 1967 - 1703; Brander y otros, (2004), *J Invest Dermatol.* 122(5): 1310-20).

40 El proceso de regeneración de la córnea después de un trauma puede dar como resultado la pérdida de la claridad de la córnea y, por lo tanto, influir en el resultado de la cirugía refractiva. Los actuales tratamientos para la córnea dañada generalmente incluyen el trasplante de la córnea o los intentos para usar células/tejido de la córnea para la reconstrucción. Sin embargo, el trauma posoperatorio a la córnea y al tejido blando circundante después de los procedimientos quirúrgicos tales como, por ejemplo, la queratectomía fotorrefractiva asistida por láser de excímeros, frecuentemente da como resultado la cicatrización debido a la hiper celularidad asociada con la modificación de la matriz extracelular; que incluye cambios en el patrón de células epiteliales, diferenciación de miofibroblastos, remodelación del estroma e hiperplasia epitelial en el sitio de una lesión inducida por láser.

45 En lesiones graves en la médula espinal, los cambios patológicos que se producen, ya sea por transección, contusión o compresión, comparten algunas similitudes con la formación de cicatrices posoperatorias y la remodelación de tejidos. Dentro de las 24 - 48 horas después de la lesión, el daño se propaga y aumenta significativamente el tamaño del área afectada. Puede estar implicado un efecto espectador mediado por las uniones de tipo hendidura (Lin, J.H. y otros, 1998, *Nature Neurosci.* 1: 431 - 432), mediante el cual los canales de uniones de tipo hendidura propagan neurotoxinas y ondas de calcio desde el sitio de daño al tejido sano de cualquier otra manera. Esto va acompañado de la hinchazón inflamatoria característica. La región de daño en la médula espinal se reemplaza por una cavidad o cicatriz de tejido conectivo, las cuales impiden la regeneración axonal (McDonald, J. W. y otros, (septiembre de 1999) *Scientific American.* 55 - 63; Ramer, M. S. y otros, *Spinal Cord.* (2000) 38: 449 - 472; Schmidt, C. E. y Baier Leach, J.; (2003) *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 5: 293-347). Aunque se han logrado progresos con algunas modalidades terapéuticas actuales, aún permanecen importantes limitaciones para la reparación de la médula espinal, incluida la intervención invasiva en sí misma que puede favorecer la propagación de lesiones y la formación de cicatrices gliales, lo que impide el proceso de reparación y conlleva al riesgo de pérdida adicional de la función neuronal (Raisman, *GJ. Royal Soc. Med.* 96:259 -261).

60 La tecnología antisentido se ha usado para la modulación de la expresión de genes implicados en enfermedades virales, fúngicas y metabólicas. La patente de Estados Unidos núm. 5,166,195, propone inhibidores de oligonucleótidos del HIV. La patente de Estados Unidos núm. 5,004,810 propone oligómeros para hibridar con el ARNm de Vmw65 del virus del herpes simple e inhibir la replicación. Ver además el documento WO00/44409 de Becker y otros, presentado el 27 de enero de 2000, y titulado "Formulations Comprising Antisense Nucleotides to Connexins" que describe el uso de oligodesoxinucleótidos antisentido (AS) para regular negativamente la expresión de conexina para tratar el daño

neuronal local en el cerebro, la médula espinal o el nervio óptico, en la promoción de la cicatrización de heridas y en la reducción de la formación de cicatrices en el tejido de la piel después de una cirugía o quemadura. Sin embargo, quedan muchas dificultades por superar. Este es frecuentemente el caso, por ejemplo, en que la regulación negativa de un producto génico particular en un tipo de célula no diana puede ser perjudicial. Los problemas adicionales que necesitan superarse incluyen la corta vida media de tales ODN (oligómeros de fosfodiéster no modificados) que tienen típicamente una vida media intracelular de solo 20 minutos debido a la degradación por nucleasas intracelulares (Wagner 1994, *supra*) y su suministro consistente y confiable a los tejidos diana.

Por lo tanto, existe una necesidad y existen enormes ventajas potenciales para el desarrollo de compuestos para los problemas descritos anteriormente. Dichos compuestos, composiciones relacionadas y métodos para su uso se describen y reivindican en la presente descripción.

Resumen

Las invenciones descritas y reivindicadas en la presente descripción tienen muchos atributos y modalidades que incluyen, pero no se limitan a, las establecidas o descritas o referidas en este Resumen. Las invenciones descritas y reivindicadas en la presente descripción no están limitadas por las características o modalidades identificadas en este Resumen, que se incluyen solo para propósitos de ilustración y no de limitación.

En la presente descripción se proporciona un compuesto de inhibición de conexina 43 que inhibe en su totalidad o en parte la expresión o actividad de una conexina 43 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto para un trauma ocular de la córnea.

En la presente descripción se describen compuestos útiles para la producción de tejidos, incluidos los compuestos antisentido. Se describen además compuestos antisentido y métodos para reducir el daño tisular asociado con los procedimientos oftálmicos. Los métodos comprenden, por ejemplo, administrar un compuesto antisentido al ojo de un sujeto en una cantidad suficiente para inhibir la expresión de una proteína conexina en el ojo o en células asociadas con el ojo del sujeto. Si bien se prefiere que se inhiba la expresión de la proteína conexina, se prevé que otras proteínas puedan ser dianas para la modulación por los compuestos, incluidos los compuestos antisentido, ya sea solos o en combinación con compuestos antisentido u otros compuestos que inhiben la expresión de conexinas humanas.

En ciertas modalidades, el trauma ocular de la córnea es producto de una cirugía oftálmica, que incluye pero no se limita a una queratectomía fotorrefractiva asistida por láser de excímeros, una extracción de cataratas, un trasplante de córnea, una cirugía para corregir la refracción, una queratotomía radial, una cirugía de filtración para el glaucoma, una queratoplastia, una queratectomía fotorrefractiva asistida por láser de excímeros, un trasplante de córnea, una cirugía para corregir la refracción, una escisión de la neoplasia de superficie ocular, un injerto de membrana conjuntiva o amniótica, una escisión de pterigio y pingeculae, una cirugía plástica ocular, una escisión de un tumor en el párpado, procedimientos reconstructivos del párpado para anomalías congénitas, reparación del ectropión y entropión del párpado, cirugía para el estrabismo (músculo ocular) o cualquier trauma del ojo penetrante.

Generalmente, se conoce al menos una porción de la secuencia de nucleótidos para las conexinas en las que se desea la inhibición de la expresión. Preferentemente, un compuesto antisentido se dirige a uno o más isotipos de conexina específicos. Los isotipos específicos de conexinas que pueden ser diana de los compuestos antisentido incluyen, sin limitación, 43, 37, 31.1 y 26. La invención usa un compuesto de inhibición de conexina 43 que inhibe en su totalidad o en parte la expresión o actividad de una conexina 43. Se prefiere, pero no se requiere, que las conexinas diana sean humanas. Un conexina (*por ejemplo*, humana) puede tener, por ejemplo, una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31.

En ciertos casos, los compuestos antisentido se dirigen a al menos aproximadamente 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina que tiene una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31.

En ciertas modalidades adicionales, un segundo compuesto antisentido se administra al sujeto (por ejemplo, al ojo), en donde uno o más compuestos antisentido se dirigen a al menos aproximadamente 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina (*por ejemplo*, humana) que tiene una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31. Al menos un segundo compuesto antisentido puede dirigirse, por ejemplo, a una conexina diferente que un primer compuesto antisentido.

Los ejemplos de tipos de compuestos antisentido que pueden usarse en diversos aspectos de la invención incluyen oligonucleótidos antisentido, polinucleótidos antisentido, desoxirribosimas, oligonucleótidos morfolino, ARNbc, moléculas de ARNi, moléculas de ARNip, moléculas de PNA, ADNzimas, y ARN nucleares pequeños de U1 mutados en el extremo 5', análogos de los anteriores; también se describe el uso de otros compuestos en la presente descripción o conocidos en la técnica; que incluyen pero no se limitan a, por ejemplo, desacoplantes no específicos tales como octanol, ácidos glicerhetínicos y heptano 1.

En ciertas modalidades, por ejemplo, los compuestos antisentido son oligonucleótidos antisentido que comprenden

- nucleobases de origen natural y un enlace internucleósidos no modificado. En otras modalidades, por ejemplo, los compuestos antisentido son oligonucleótidos antisentido que comprenden al menos un enlace internucleósidos modificado, incluidos los que tienen un enlace fosforotioato. Los compuestos antisentido adecuados también incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden al menos una porción de azúcar modificada. Los compuestos antisentido adecuados también incluyen, a modo de ejemplo, oligonucleótidos que comprenden al menos una nucleobase modificada.
- En ciertas modalidades, los compuestos antisentido para su uso en la invención se administran en combinación con otro compuesto, por ejemplo un compuesto útil para reducir el daño tisular, reducir la inflamación, promover la curación o alguna otra actividad deseada.
- En la presente descripción se describen, además, los métodos de tratamiento de un sujeto (*por ejemplo*, un paciente) mediante la administración de compuestos antisentido al sujeto.
- En ciertas modalidades, los compuestos antisentido para su uso en la invención se administran mediante la administración local o tópica. Los compuestos antisentido para su uso en la invención también pueden administrarse, por ejemplo, por vía sistémica o mediante inyección intraocular.
- Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse a un sujeto en un momento predeterminado, por ejemplo, con relación a la formación de una herida, tal como la que se produce en un procedimiento oftálmico (*por ejemplo*, quirúrgico). Por ejemplo, los compuestos antisentido pueden administrarse antes de un procedimiento oftálmico, durante un procedimiento oftálmico o después de un procedimiento oftálmico. Los compuestos antisentido, por ejemplo, pueden administrarse a un sujeto dentro de minutos u horas antes o después de que se realice un procedimiento oftálmico. En ciertas modalidades, un compuesto antisentido se administra después de que se realice un procedimiento oftálmico, y por ejemplo el compuesto antisentido se administra dentro de aproximadamente 4 horas del procedimiento, dentro de aproximadamente 3 horas del procedimiento, y más típicamente dentro de aproximadamente 2 horas del procedimiento oftálmico o dentro de aproximadamente 1 hora de un procedimiento oftálmico.
- En otro caso descrito, los compuestos antisentido descritos en la presente descripción pueden administrarse en un método para efectuar la producción de tejidos. Por ejemplo, los compuestos antisentido descritos en la presente descripción pueden administrarse junto con un método que aumente el grosor del tejido de la córnea en un sujeto. Tal método puede asociarse, o no, con un procedimiento oftálmico (por ejemplo, cirugía). Como un ejemplo, los compuestos antisentido descritos en la presente descripción pueden administrarse junto con un método que promueva la curación o prevenga el daño tisular en células asociadas con la córnea del sujeto (por ejemplo, células de la córnea).
- En ciertas modalidades, por ejemplo, el compuesto antisentido disminuye la formación de cicatrices. En ciertas modalidades, por ejemplo, el compuesto antisentido reduce la inflamación. En ciertas modalidades, por ejemplo, el compuesto antisentido promueve la cicatrización de heridas.
- En ciertas modalidades preferidas, por ejemplo, el compuesto antisentido se usa en asociación con un procedimiento de implantación quirúrgica.
- En ciertas modalidades, por ejemplo, el compuesto antisentido se dirige a conexina 43 y se administra para regular la división y el crecimiento de células basales epiteliales.
- En ciertos casos, por ejemplo, el compuesto antisentido se dirige a conexina 31.1 y se administra para regular la queratinización de la capa externa.
- El trauma ocular de la córnea puede estar asociado con un procedimiento oftálmico. De acuerdo con ciertas modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es la extracción de cataratas. En otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es un trasplante de córnea. En otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento quirúrgico oftálmico es una cirugía para corregir la refracción. En otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es una queratotomía radial. En otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es una cirugía de filtración para el glaucoma. En aún otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es una queratoplastia. En otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es una escisión de neoplasia de la superficie ocular. En otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es un injerto de membrana de la conjuntiva o amniótica. En otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es una escisión de pterigio y pingeculae. En otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es una cirugía plástica ocular. En otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es una escisión de un tumor en el párpado. En otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es un procedimiento reconstructivo del párpado para anomalías congénitas. En otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es una reparación del ectropión y entropión del párpado. En otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es una cirugía para el estrabismo (músculo ocular). En otras modalidades, por ejemplo, el procedimiento oftálmico es un trauma ocular penetrante.
- En ciertas modalidades adicionales, por ejemplo, se usan compuestos y composiciones para promover la curación o

para prevenir el daño tisular en células asociadas con la córnea, donde las células asociadas con la córnea pueden ser cualquier célula en el ojo, que incluye pero no se limita a las células de la córnea.

5 Los agentes para su uso en la invención, incluidos los compuestos antisentido, pueden aumentar el grosor del tejido de la córnea en un sujeto. En ciertas modalidades, por ejemplo, el compuesto antisentido se usa en combinación con otro compuesto útil para reducir el daño tisular o promover la curación. Por ejemplo, los compuestos antisentido pueden coadministrarse con un factor de crecimiento, citocina o similares.

10 En otro ejemplo, por ejemplo, se describe una composición farmacéutica para reducir el daño tisular asociado con la cirugía oftálmica. La composición farmacéutica se formula adecuadamente, por ejemplo, para la administración tópica o local al ojo de un sujeto que comprende un compuesto antisentido presente en una cantidad suficiente para inhibir la expresión de una proteína conexina humana en células asociadas con el ojo del sujeto. El compuesto antisentido, por ejemplo, se dirige preferentemente a al menos aproximadamente 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina (por ejemplo, humana) que tiene una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31.

15 En ciertas modalidades, por ejemplo, los compuestos antisentido están en la forma de una composición farmacéutica que comprende un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable y el agente o compuesto antisentido está presente en una cantidad eficaz para promover la cicatrización de heridas en un sujeto. En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas pueden estar, por ejemplo, en una forma adecuada para la administración tópica, que incluyen en una forma adecuada para la administración tópica o local al ojo de un sujeto. En ciertas modalidades adicionales, por ejemplo, las composiciones y formulaciones pueden estar en la forma de un gel, una crema o cualquiera de las formas descritas en la presente descripción o conocidas en la técnica, ya sea actualmente o en el futuro.

20 En otros casos, se describen composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido. En un caso, por ejemplo, se describe una composición farmacéutica para reducir el daño tisular asociado con un procedimiento oftálmico (por ejemplo, cirugía), de manera que la composición farmacéutica se formula para la administración tópica o local al ojo de un sujeto y comprende un compuesto antisentido presente en una cantidad suficiente para inhibir la expresión de una proteína conexina humana en células asociadas con el ojo del sujeto.

25 En ciertos casos, por ejemplo, el compuesto antisentido se dirige a al menos aproximadamente 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina (*por ejemplo*, humana) que tiene una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31.

30 En ciertas modalidades, por ejemplo, la composición farmacéutica para su uso en la invención incluye un portador farmacéuticamente aceptable que comprende un ácido o gel plurónico tamponado. Esto incluye en una modalidad, por ejemplo, hasta aproximadamente 30 % de ácido plurónico en solución salina tamponada con fosfato.

35 En otros casos, se describen métodos para diseñar oligonucleótidos antisentido que se dirijan a uno o más conexinas. El método puede incluir la optimización de parámetros seleccionados, tales como la termoestabilidad, la afinidad y la especificidad de un oligonucleótido particular con una diana seleccionada. Este método puede usarse para seleccionar y desarrollar oligonucleótidos antisentido que comprendan una o más secuencias de polinucleótidos deseadas particulares. La prueba de los oligonucleótidos antisentido puede llevarse a cabo junto con el método, por ejemplo, para determinar su capacidad para escindir el ARNm o bloquear la traducción de una proteína conexina.+

40 Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 muestra imágenes de microscopio confocal *in vivo* de córneas 12 horas después de la queratectomía fotorrefractiva en los ojos tratados con control y oligonucleótidos antisentido.

50 La Figura 2 muestra el examen histológico de la remodelación de córnea en córneas de rata tratadas con control (2A, 2B, 2C) y oligodesoxinucleótido antisentido (2D, 2E) 24 horas después de la fotoablación asistida por láser de excímeros.

55 La Figura 3 proporciona imágenes de micrografías que muestran la expresión de la proteína conexina 43 en las córneas tratadas con control (3A, 3B, 3C) y oligodesoxinucleótido antisentido (3D, 3E, 3F) a las 24 horas después de la ablación asistida por láser de excímeros. Los resultados demuestran que los niveles de la proteína conexina 43 se reducen después del tratamiento con los ODN anti-conexina 43 y dan como resultado un menor grado de reclutamiento celular en el estroma.

60 La Figura 4 muestra el marcaje de miofibroblastos 1 semana después de la cirugía mediante el uso de anticuerpos contra actina alfa de músculo liso. Las Figuras 4A, 4B y 4C son controles; y 4D, 4E, y 4F son córneas tratadas antisentido.

65 La Figura 5 muestra el marcaje de laminina-1 de las córneas tratadas con control (5A, 5B) y oligodesoxinucleótidos antisentido para conexina 43 24 horas (5A - 5D) y 48 horas (5E - 5H) después de la queratectomía fotorrefractiva. A

las 24 horas los controles tenían poca y/o regular deposición de laminina en el borde del área ablacionada (5 A) y más centralmente (5B) mientras que las córneas tratadas antisentido mostraron una deposición más regular de laminina en ambas regiones (5C, 5D). A los 48 horas los controles aún no tenían una deposición de laminina continua (5E - borde del área ablacionada; Figura 5F - central) y fue muy irregular (5E). En contraste las córneas tratadas con ODN antisentido tenían una lámina basal continua y relativamente uniforme en el borde de la herida (5G) y centralmente (5H).

La Figura 6 muestra un diagrama esquemático de la cuantificación de irregularidad de la laminina-1.

La Figura 7 muestra el marcaje inmunohistoquímico para las conexinas 26 y 43 en los cultivos de control (7A) y después de tres tratamientos con oligodesoxinucleótidos anti-conexina 43 durante un período de 24 horas (7B) y después del tratamiento antisentido específico para la conexina 31.1 (7C, 7D).

La Figura 8 muestra segmentos de médula espinal de las crías de rata P7 24 horas después de colocarlos en cultivo. El segmento de control (1) se hincha (flechas) con el tejido que sobresale de los extremos cortados. Las líneas punteadas marcan las escisiones originales. El examen histológico muestra que las células son vacuoladas y edematosas. El día 5, estos segmentos habían activado la microglia y pocas neuronas supervivientes. Al contrario, el segmento tratado antisentido (2) ha reducido significativamente la hinchazón en comparación con los controles ($p < 0,001$) con edema y vacuolación celular mínimos. Incluso después de 20 días en cultivo, las neuronas en la materia gris permanecieron viables con microglia activada limitada a los bordes externos.

La Figura 9 muestra neuronas de un segmento tratado de control (9A) y un segmento tratado antisentido para conexina 43 (9B). Las neuronas en un segmento de control son vacuoladas y edematosas y el tejido circundante se interrumpe, pero las neuronas en el segmento tratado parecen sanas y viables.

La Figura 10 ilustra el inmunomarcaje de MAP-2 cerca de los extremos de los segmentos de médula espinal cultivados cinco días después de colocarlos en cultivo. Los segmentos de control tienen pocas neuronas viables y poco marcaje de MAP-2 (el 16 % muestra cualquier marca de MAP-2) (10A) mientras que el 66 % de los segmentos tratados tienen áreas de expresión de MAP-2 en los extremos del corte expuestos al medio y/o adyacentes al material de la materia blanca restante.

La Figura 11 ilustra que las desoxirribosimas escinden selectivamente regiones específicas del ARNm de conexina 43 diana *in vitro*. Un ARNm de conexina 43 de rata de 2,4 kb (11A) y un ARNm de conexina 43 de ratón de 1,2 kb (11B) se transcribieron *in vitro* a partir del plásmido y se incubaron con varias desoxirribosimas durante 1 hora. La región 896-953 del ARNm de rata (11A) no fue concluyente porque no se diseñaron desoxirribosimas para la región correspondiente en el ratón. La escisión por desoxirribosimas de la región 367-466 en el ARNm de ratón (11B), no coincide con los resultados a partir del ARNm de conexina 43 de rata, probablemente debido a la presencia de 200 pares de bases de la región no traducida 5' en el ARNm de ratas. Las desoxirribosimas de control defectuosas con una única mutación puntual, df605 y df783, mostraron que tales escisiones fueron específicas. También se observó en dzl007 y dzl028 de ratón algún cebado incorrecto no específico por las desoxirribosimas contra el ARNm de ratón. En general, las desoxirribosimas que se dirigen a las regiones de bases 526-622, 783-885 y 1007-1076 mostraron escisión significativa en ambas especies de ARNm de rata y ratón.

La Figura 12 ilustra que las desoxirribosimas escinden selectivamente regiones específicas del ARNm de conexina 26 diana *in vitro*. Un ARNm de conexina 43 de 0,7 kb de rata (12A) y ratón (12B) se transcribió *in vitro* a partir del plásmido y se incubó con varias desoxirribosimas durante 1 hora. Los resultados de la escisión demuestran que el ARNm de conexina 26 de roedor tiene al menos dos regiones que son dianas de las desoxirribosimas, en las regiones de bases 318-379 y 493-567. Las desoxirribosimas de control defectuosas con una única mutación puntual, df351 y df379, mostraron que tales escisiones fueron específicas.

La Figura 13 muestra la penetración y estabilidad del oligómero antisentido en las córneas cultivadas durante hasta una hora. Los oligómeros marcados con Cy3 muestran un marcaje nuclear y citoplasmático punteado una hora después del suministro con gel plurónico (13A). La tasa de penetración de Cy3 visible fue de 10-15 μm después de una hora en el epitelio de la córnea (13B). Se usaron sondas oligoméricas marcadas con Taqman para medir la estabilidad de los oligómeros antisentido dentro de las células epiteliales mediante el uso del instrumento de barrido Lambda donde cada panel muestra un espectro de emisión de luz de 5 nm hacia el color rojo (13B). La sonda Taqman intacta muestra la transferencia de energía de resonancia por fluorescencia con la luz de fluorescencia roja de TAMRA representada en la escala de grises (13D) mientras que los productos de descomposición se representan como fluorescencia verde como se esperaba de FAM (también se muestra en la escala de grises (13C)). La concentración eficaz de oligómeros antisentido en las células podría ser menor que la que puede detectarse mediante la técnica de fluorescencia.

La Figura 14 ilustra los efectos de diferentes oligómeros antisentido en la expresión de las proteínas conexina 43 (claro, escala de grises) y conexina 26 (oscuro, escala de grises) demostrados por la escisión del ARNm por desoxirribosimas *in vitro*. La Figura 4A muestra la expresión normal de la proteína conexina 43 (claro, escala de grises) en las células basales y la expresión de la proteína conexina 26 (oscuro, escala de grises) en las células basales a

intermedias de un epitelio corneal tratado con control de gel plurónico. As14 (14B), as769 (14D), as892 (14F) no mostraron escisión por desoxirribosimas (*in vitro*) y los oligómeros de control DB1 con sentido (14H) no afectaron la expresión de ambas conexinas en cultivos *ex vivo*. as605 (14C), as783 (14E) y DB1 (14G) (los tres mostraron escisión positiva por desoxirribosimas *in vitro*) mostraron solo una caída de conexina 43 específica en el epitelio de las córneas tratadas.

La Figura 15 muestra que los oligómeros antisentido para conexina 43 reducen selectivamente la expresión de la proteína conexina 43 en las córneas de ratas. Cada cuadro representa una córnea individual con diferentes tratamientos. Los cuadros sólidos (color negro, DB1, as605, as783, as885, as953 y as1076) mostraron un promedio del 36 % a 85 % de reducción en la expresión de conexina 43 en comparación con los cuadros coloreados en blanco (DB1 con sentido, as14, as769 y as892). Todos los oligómeros antisentido que tenían poco o ningún efecto según lo pronosticado por el ensayo de predicción de bidesoxirribosima terciaria, mostraron un promedio de 85 % a 134 % de la expresión de conexina 43 normal. Todos los experimentos se normalizaron con respecto a la densidad media de conexina 43 tratada con DB1 con sentido y como resultado dos oligómeros negativos (as769 y as892) mostraron mayor densidad de conexina 43 que el tratamiento de control con DB1 con sentido.

La Figura 16 ilustra una comparación de los niveles de ARNm de conexina 43 en la córnea de rata tratada con oligómeros antisentido o con sentido evaluados mediante el uso de PCR en tiempo real. El nivel se expresa como un porcentaje de córnea tratada solo con gel plurónico. Los tres oligodexonucleótidos antisentido que eran funcionales según lo pronosticado por el ensayo *in vitro*, DB1As, As605 y As783 (barras negras), redujeron la expresión de ARNm de conexina 43 al 46,8 %, 44 % y 25 % de los niveles normales (barra abierta para gel solo) respectivamente (** p<0,001). No se observó reducción para el oligómero de control DB1 con sentido (106 %) (barra abierta DB1 con sentido). As769, que no mostró ninguna escisión del ARNc de Cx43 en el ensayo de predicción de desoxirribosima terciaria *in vitro*, sirvió como un control negativo (148 %) (barra abierta As769).

La Figura 17 ilustra una comparación de los niveles de ARNm de conexina 26 en la córnea de rata tratada con oligómeros antisentido o sentido (control) y evaluados mediante el uso de PCR en tiempo real. El nivel se expresa como porcentaje de córnea tratada solo con gel plurónico (barra abierta para gel solo). As330 y As375 redujeron la expresión del ARNm de Cx26 al 33 % y 71 % respectivamente (** p<0,001) (barras negras). No se observó reducción con el oligómero Rv330 con sentido (109 %) (barra abierta Rv330).

Descripción detallada

La práctica de las presentes invenciones puede emplear diversas técnicas convencionales de biología molecular (incluidas las técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, e incluyen pero no se limitan a, solamente a modo de ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook y otros, 1989) y Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001), conjuntamente e individualmente referidos en la presente descripción 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, incluidos 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, y N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow y Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York y Harlow y Lane (1999) Using Antibodies: A5 Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (conjuntamente e individualmente referidos en la presente descripción como Harlow y Lane), Beaucage y otros eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2000); y Agrawal, ed., Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties Humana Press Inc., Nueva Jersey, 1993).

Definiciones

Antes de describir adicionalmente las invenciones en general y en términos de diversas modalidades específicas no limitantes, se exponen ciertos 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. Esos términos que no se definen a continuación ni en otra parte en la descripción deberán tener el significado reconocido en la técnica.

Los "compuestos antisentido" incluyen diferentes tipos de moléculas que actúan para inhibir la expresión, traducción o función génica, incluidas las que actúan mediante el direccionamiento específico de secuencia de los ARNm para aplicaciones terapéuticas.

Por lo tanto, los compuestos antisentido incluyen, por ejemplo, las principales moléculas de silenciamiento génico basadas en ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, los ácidos oligodesoxirribonucleicos (ODN) antisentido

modificados químicamente, ribozimas y ARNip (Scherer, L. J. y Rossi, J. J. *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. y Corey, D. R., *Biochemistry* 41, 4503-4510 (2002)), morfolino fosforodiamidatos (Heasman, J., *Dev. Biol.* 243, 209-214 (2002)), ADNzimas (Schubert, S. y otros, *Nucleic Acids Res.* 31, 5982-5992 (2003). Chakraborti, S. y Banerjee, A. C., *Mol. Ther.* 7, 817-826 (2003), Santoro, S. W. y Joyce, G. F. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 4262M266 (1997), y los ARN nucleares pequeños de U1 mutados en el extremo 5' recientemente desarrollados (Fortes, P. y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 82648269 (2003)).

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, por ejemplo, a una secuencia de ARN. Por lo tanto, las secuencias antisentido incluyen, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos que se unen a un ARNm o porciones de este para bloquear la transcripción del ARNm por los ribosomas. Los métodos antisentido en general son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, la publicación PCT WO94/12633, y Nielsen y otros, 1991, *Science* 254:1497; Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, editado por F. Eckstein, IRL Press en Oxford University Press (1991); Antisense Research and Applications (1993, CRC Press.

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

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

El término "complementario" generalmente se refiere a la unión natural de polinucleótidos bajo condiciones salinas y de temperatura permisivas mediante el apareamiento de bases. 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 existe la complementariedad total entre las moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre las moléculas de ácido nucleico tiene efectos significativos en la eficiencia y resistencia de la hibridación entre ellos. "Hibridable" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad de manera que se produce la unión estable entre el ADN o ARN diana y el oligonucleótido. Se entiende que un oligonucleótido no necesita ser 100 % complementario a su secuencia de ácidos nucleicos diana para hibridarse, y también se entiende que la unión puede ser específica de diana, o puede unirse a otras moléculas que no son diana siempre que la unión no específica no impida de manera significativa o indeseable el objetivo terapéutico u otro objetivo. Un oligonucleótido se usa para interferir con la función normal de la molécula diana para provocar una pérdida o disminución de su actividad, y se prefiere que exista un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica o no deseada del oligonucleótido a secuencias que no son diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico o, en el caso de ensayos *in vitro*, en las condiciones en las que se realizan los ensayos. En el contexto de ciertas modalidades de la invención, no se requiere una complementariedad absoluta. Generalmente se prefieren polinucleótidos que tengan suficiente complementariedad para formar un dúplex con una temperatura de fusión mayor que 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 que incluye las descritas o reivindicadas en la presente descripción. Este incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

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 ácidos nucleicos cuya función debe modularse. Esta puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm producido a partir del gen) cuya expresión se asocia con un estado de enfermedad particular, o un ácido nucleico extraño (ARN o ADN) de un agente infeccioso. El proceso de direccionamiento puede incluir, además, la determinación de un sitio o sitios dentro de la secuencia de ácidos nucleicos para que se produzca la interacción del oligonucleótido de manera que el efecto deseado, es decir, se obtenga la inhibición de la expresión de proteínas, la reducción de la detección de proteínas u otra modulación de la actividad. Una vez que se han identificado un sitio o sitios diana, se eligen compuestos antisentido (por ejemplo, oligonucleótidos) que son complementarios de manera suficiente o conveniente a la diana, es decir, hibridan lo suficiente y con una especificidad adecuada o conveniente de cualquier otra manera, para dar la modulación conveniente. Las dianas descritas en la presente descripción incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican una o más conexinas. El proceso de direccionamiento puede incluir, además, la determinación de un sitio o sitios para que

se produzca la interacción antisentido de manera que se obtenga el efecto deseado. Un sitio intragénico preferido, por ejemplo, es la región que abarca el codón de iniciación o terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) del gen. El codón de iniciación de la traducción es típicamente 5'-AUG (en las moléculas de ARNm transcritas; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), y puede denominarse también como el "codón AUG", el "codón de inicio" o el "codón de inicio AUG". Una minoría de genes tienen 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 que se ha demostrado que funcionan 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 sea típicamente metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). En la técnica también se conoce que los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, cualquiera de los cuales puede utilizarse preferentemente para la iniciación de la traducción en un tipo de célula o tejido particular, o bajo un conjunto particular de condiciones.

El término "oligonucleótido" incluye un oligómero o polímero de monómeros de nucleótidos o nucleósidos que consiste en bases de origen natural, azúcares y enlaces entre azúcares (cadena principal). 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 se prefieren frecuentemente sobre las formas nativas debido a las propiedades tales como, por ejemplo, mejor absorción celular, mayor estabilidad en presencia de nucleasas o mejor afinidad por la diana. Se ha demostrado que varias modificaciones de nucleótidos y nucleósidos producen que el oligonucleótido en el que se incorporan sea más resistente a la digestión por nucleasas que el oligodesoxinucleótido nativo (ODN). La resistencia a las nucleasas se mide rutinariamente mediante la incubación de oligonucleótidos con extractos celulares o soluciones de nucleasas aisladas y midiendo la extensión del oligonucleótido intacto que permanece en el tiempo, usualmente mediante electroforesis en gel. Los oligonucleótidos, que se han modificado para mejorar su resistencia a las nucleasas, pueden sobrevivir intactos durante un tiempo más largo que los oligonucleótidos no modificados. Se ha demostrado, además, que varias modificaciones aumentan la unión (afinidad) del oligonucleótido a su diana. La afinidad de un oligonucleótido por su diana se determina rutinariamente midiendo la T_m (temperatura de fusión) de un par de oligonucleótidos/diana, que es la temperatura a la cual el oligonucleótido y la diana se disocian. La disociación se detecta mediante espectrofotometría. Cuanto mayor sea la T_m , mayor es la afinidad del oligonucleótido por la diana. En algunos casos, las modificaciones de oligonucleótidos que mejoran la afinidad de unión a la diana también son capaces de mejorar la resistencia a las nucleasas.

Un "polinucleótido" significa una pluralidad de nucleótidos. Por lo tanto, todos los términos "secuencia de nucleótidos" o "ácido nucleico" o "polinucleótido" u "oligonucleótido" u "oligodesoxinucleótido" se refieren a un heteropolímero de nucleótidos o la secuencia de estos nucleótidos. Estas frases también se refieren al ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser monocatenario o bicatenario y puede representar la cadena con sentido o antisentido, al ácido nucleico peptídico (PNA) o a cualquier material similar al ADN o similar al ARN.

Un polinucleótido que codifica un conexina, un fragmento de conexina, o una variante de conexina incluye un polinucleótido que codifica: la forma madura de la conexina encontrada en la naturaleza; la forma madura de la conexina encontrada en la naturaleza y la secuencia codificante adicional, por ejemplo, una secuencia líder o señal o una secuencia de proproteína; cualquiera de las anteriores y secuencias no codificantes (por ejemplo, intrones o secuencia no codificante 5' y/o secuencia codificante 3' para la forma madura del polipéptido encontrado en la naturaleza); fragmentos de la forma madura de la conexina encontrada en la naturaleza; y variantes de la forma madura de la conexina encontrada en la naturaleza. Por lo tanto, "polinucleótido que codifica conexina" y similares abarcan los polinucleótidos que incluyen solo una secuencia codificante para una conexina, fragmento o variante deseada, así como también un polinucleótido que incluye secuencias codificantes y/o no codificantes adicionales.

Los términos "peptidomiméticos" y "mimético" se refieren a un compuesto químico sintético que puede tener sustancialmente las mismas características estructurales y funcionales de los polipéptidos antisentido descritos en la presente descripción y que imitan la actividad inhibitoria específica a conexina, al menos en parte y hasta cierto punto. Los análogos peptídicos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos" (Fauchcra, *J. Adv. Drug Res.* 15: 29 (1986); Veber y Freidinger; *TINS*; 392 (1985); y Evans y otros, *J. Med. Chem.* 30: 1229 (1987); Beeley N., *Trends Biotechnol.* Junio de 1994;12(6): 213-6.; Kieber-Emmons T, y otros; *Curr Opin Biotechnol.* Agosto de 1997;8(4): 435-41. Los miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto equivalente o terapéutico o profiláctico mejorado. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (*es decir*, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica), tal como un polinucleótido antisentido, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados 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 por análogos sintéticos, no naturales de aminoácidos o es una molécula química de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos de aminoácidos parcialmente no naturales. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales siempre y cuando tales sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del mimético. Por ejemplo, una composición mimética está dentro del alcance de la invención si es capaz de regular negativamente las actividades biológicas de la conexina 43, tal como, por ejemplo, la comunicación entre

células mediada por las uniones de tipo hendidura.

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

- 5 Los términos "modulador" y "modulación" de la actividad de conexina, como se usa en la presente descripción en sus diversas formas, pretenden abarcar la inhibición en su totalidad o en parte de la expresión o actividad de una conexina. Tales moduladores incluyen agonistas de moléculas pequeñas y antagonistas de la función o expresión de conexina, moléculas antisentido, ribozimas, moléculas triples, y polinucleótidos de ARNi, métodos de terapia génica y otros.
- 10 La frase "por ciento (%) de identidad" se refiere al porcentaje de similitud de secuencias encontrada en una comparación de dos o más secuencias. El por ciento de identidad puede determinarse electrónicamente mediante el uso de cualquier software adecuado. Igualmente, la "similitud" entre dos secuencias (o una o más porciones de cualquiera o ambas de ellas) se determina comparando la secuencia de una secuencia con una segunda secuencia.
- 15 Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende, por ejemplo, un portador, diluyente o excipiente que es compatible con los otros ingredientes de la formulación y es adecuado para la administración a un receptor de este.

En general, el término "proteína" se refiere a cualquier polímero de dos o más aminoácidos individuales (ya sea de origen natural o no) unido a través de enlaces peptídicos, como se produce cuando el átomo de carbono carboxílico del grupo de 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. Estos enlaces peptídicos y los átomos que los comprenden (*es decir*, los átomos de carbono alfa, átomos de carbono carboxílico (y sus átomos de oxígeno sustituyentes) y los átomos de nitrógeno amino (y sus átomos de hidrógeno sustituyentes) forman la "cadena principal polipeptídica" 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 su vez, pueden usarse indistintamente en la presente descripción). De manera similar, puede hacerse referencia en la presente descripción a fragmentos, análogos, derivados y variantes de proteínas como "proteínas", y se considerará que es 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 de todos los residuos de aminoácidos de la proteína. Como se apreciará, un "fragmento" de una proteína puede ser una forma de la proteína truncada en el extremo amino terminal, el extremo carboxilo terminal y/o internamente (tal como mediante corte y empalme natural), y puede ser también una variante y/o derivado. Un "dominio" de una proteína es también un fragmento y comprende los residuos de aminoácidos de la proteína requeridos para conferir la actividad bioquímica correspondiente a la proteína de origen natural. Las moléculas truncadas que son polímeros biológicos lineales tales como moléculas de ácido nucleico o polipéptidos pueden tener una o más de una delección de cualquier extremo terminal de la molécula y/o una o más delecciones de una región no terminal de la molécula, donde tales delecciones pueden ser delecciones de aproximadamente 1-1,500 residuos de nucleótidos o aminoácidos contiguos, preferentemente aproximadamente 1-500 residuos de nucleótidos o aminoácidos contiguos y con mayor preferencia aproximadamente 1-300 residuos de nucleótidos o aminoácidos contiguos, que incluyen delecciones de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31-40, 41-50, 51-74, 75-100, 101-150, 151-200, 201-250 o 251-299 residuos de nucleótidos o aminoácidos contiguos.

El término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones que permiten la hibridación entre polinucleótidos. Las condiciones rigurosas se pueden definir por la concentración salina, la concentración de solvente orgánico (por ejemplo, formamida), la temperatura y otras condiciones bien conocidas en la técnica. La rigurosidad puede aumentarse mediante la reducción de la concentración de sal, el aumento de la concentración de solventes orgánicos (por ejemplo, formamida) o la elevación de la temperatura de hibridación. Por ejemplo, la concentración salina rigurosa será habitualmente menor que aproximadamente 750 nM de NaCl y 75 nM de citrato trisódico, preferentemente menor que aproximadamente 500 nM de NaCl y 50 nM de citrato trisódico, y con la máxima preferencia menor que aproximadamente 250 nM de NaCl y 25 nM de citrato trisódico. La hibridación a baja rigurosidad puede obtenerse en ausencia de solvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que la hibridación a alta rigurosidad puede obtenerse en presencia de un solvente orgánico (por ejemplo, al menos aproximadamente 35 % de formamida, con la máxima preferencia al menos aproximadamente 50 % de formamida). Las condiciones de temperatura rigurosas incluirán habitualmente 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 parámetros adicionales, por ejemplo, el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, el dodecil sulfato de sodio (SDS), y la inclusión o exclusión del ADN portador, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los diversos niveles de rigurosidad se logran combinando estas diversas condiciones según sea necesario y están dentro de la experiencia en la técnica. Las condiciones de hibridación rigurosas también pueden ser definidas por 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. Tal 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 semidisocia en cadenas simples. Los métodos para calcular la T_m de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Berger y Kimmel, 1987, *Methods In Enzymology*, Vol. 152: *Guide To Molecular Cloning Techniques*, San Diego: Academic Press, Inc. y Sambrook y otros, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2da Ed., Volúmenes 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory). Como lo indican las referencias

estándar, puede calcularse una estimación simple del valor de T_m mediante la ecuación: $T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ de G + C})$, cuando un ácido nucleico está en solución acuosa a 1 M de NaCl (ver, por ejemplo, Anderson y 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 ve afectada 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, presente en solución o inmovilizada, y similares), y las concentraciones de sales y otros componentes (por ejemplo, presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol). Los efectos de estos factores son bien conocidos y se analizan en las referencias estándar en la técnica, ver por ejemplo, Sambrook, *más arriba*, y Ausubel, *más arriba*. Típicamente, las condiciones de hibridación rigurosas son las concentraciones salinas menores que aproximadamente 1,0 M de ion de sodio, típicamente aproximadamente 0,01 a 1,0 M de ion de sodio a pH de 7,0 a 8,3, y las temperaturas de al menos aproximadamente 30 °C para las sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60 °C para las sondas largas (por ejemplo, de más de 50 nucleótidos). Como se señaló, las condiciones rigurosas también pueden lograrse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida, en cuyo caso pueden emplearse temperaturas más bajas. En la presente invención, el polinucleótido puede ser un polinucleótido que se hibrida al ARNm de conexina 43 en condiciones de rigurosidad media a alta tal como 0,03 M de cloruro de sodio y 0,03 M de citrato de sodio a de aproximadamente 50 a aproximadamente 60 grados centígrados.

La expresión "cantidad con eficacia terapéutica" significa la cantidad del compuesto objeto que provocará una respuesta conveniente, por ejemplo, una respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que es buscada, por ejemplo, por un investigador, veterinario, médico u otro clínico.

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

El término "vector" se refiere a una amplificación, replicación, y/o vehículo de expresión de moléculas de ácido nucleico en forma de un plásmido, fago, virus u otro sistema (ya sea de origen natural o sintético) para el suministro de ácidos nucleicos a células donde el plásmido, fago o virus puede ser funcional con células bacterianas, de levadura, de invertebrados y/o huésped de mamífero. El vector puede permanecer independiente del ADN genómico de la célula huésped o puede integrarse en su totalidad o en parte con el ADN genómico. En general, el vector no necesitará contener todos los elementos necesarios para que sea 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 una proteína de fusión de dominio de unión, bajo condiciones apropiadas.

Como se describe en la presente descripción, los términos "homología y homólogos" incluyen los polinucleótidos que pueden ser un homólogo de secuencia en el polinucleótido de conexina (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 la secuencia relevante, por ejemplo sobre una región de al menos aproximadamente 15, 20, 30, 40, 50, 100 nucleótidos más contiguos (de la secuencia homóloga).

La homología puede calcularse con base en cualquier método en la técnica. Por ejemplo el Paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo, usado en sus configuraciones predeterminadas) (Devereux y otros (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395). Los algoritmos PILEUP y BLAST pueden usarse para calcular la homología o alinear secuencias (típicamente en sus configuraciones predeterminadas), por ejemplo, como se describe en Altschul S. F. (1993); *J Mol Evol* 36: 290-300; Altschul, S. F. y otros; (1990); *J Mol Biol* 215: 403-10. El software para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/L>). Este algoritmo implica en primer lugar la identificación de un par de secuencias de puntuación alta mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden o satisfacen algunas puntuaciones de umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul y otros, *más arriba*). Estos aciertos iniciales en las palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar las HSP que las contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta que pueda aumentarse la puntuación acumulativa del alineamiento. Las extensiones para los aciertos de palabras en cada dirección se interrumpen cuando: la puntuación acumulativa del alineamiento cae en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa pasa a cero o más abajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, los alineamientos de matriz de puntuación (B) BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; ver por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P (N)), que proporciona una indicación de la probabilidad a la cual se producirá una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos al azar. Por ejemplo, se considera que una

secuencia es similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación con la primera secuencia es menor que aproximadamente 1, preferentemente menor que aproximadamente 0,1, con mayor preferencia menor que aproximadamente 0,01 y con la máxima preferencia menor que aproximadamente 0,001.

5 La secuencia homóloga típicamente difiere de la secuencia relevante en al menos (o en 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 se hibrida de manera selectiva a la secuencia original a un nivel significativamente superior al de fondo. La hibridación selectiva se logra típicamente mediante el uso de condiciones de rigurosidad media a alta (por ejemplo, 0,03 M de cloruro de sodio y 0,03 M de citrato de sodio a de aproximadamente 50 grados C a aproximadamente 60 grados C). Sin embargo, tal hibridación puede llevarse a cabo bajo cualquier condición adecuada conocida en la técnica (ver Sambrook y otros (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*). 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.

15 Una "célula" significa cualquier célula viva adecuada para la aplicación deseada. Las células incluyen células eucariotas y procariotas.

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

25 El término "recombinante" se refiere a un polinucleótido sintetizado o manipulado de cualquier otra manera *in vitro* (por ejemplo, "polinucleótido recombinante"), a métodos para el 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 ya sea 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 implican la intervención humana en la secuencia de nucleótidos, típicamente la selección o producción. Alternativamente, puede ser un polinucleótido producido mediante la generación de una secuencia que comprende una fusión de dos o más fragmentos que no son naturalmente contiguos entre sí. Así, por ejemplo, se abarcan los productos producidos mediante la transformación de células con cualquier vector de origen no natural, como son los polinucleótidos que comprenden la secuencia derivada mediante el uso de cualquier proceso de oligonucleótido sintético. De manera similar, un polipéptido "recombinante" es uno expresado a partir de un polinucleótido recombinante.

35 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.

40 En la presente se describen métodos para el uso de compuestos y composiciones para la modulación específica de sitio de la expresión de proteínas asociadas con uniones de tipo hendidura para la cicatrización de heridas, por ejemplo, así como también, por ejemplo, aplicaciones de cicatrización de heridas y/o de remodelación de tejidos quirúrgicamente relacionadas. Los métodos descritos son útiles, por ejemplo, para corregir defectos visuales junto con cirugía asistida por láser, para producir la córnea *in vitro*, y para los tratamientos oculares directos en los se desea la remodelación de la córnea, incluidos los preformados independientes o alternativamente, junto con un procedimiento (por ejemplo, cirugía) realizado en el ojo. La modulación antisentido de la comunicación directa entre células está mediada preferentemente por moléculas que reducen directa o indirectamente el acoplamiento entre las células en los tejidos. Tales moléculas incluyen polinucleótidos tales como desoxinucleótidos antisentido, nucleótidos morfolino, ARNi y desoxirribosimas dirigidos a isoformas de conexina específicas que dan como resultado una reducción de la traducción de la isoforma de la proteína e interfieren con la función de las uniones de tipo hendidura celulares. La administración de estos compuestos antisentido da como resultado la reducción de la comunicación entre células mediada por las uniones de tipo hendidura en el sitio en el cual la expresión de conexina se regula negativamente.

55 Las conexinas desempeñan funciones importantes en la señalización entre células mediada por las uniones de tipo hendidura. La sobreexpresión de la conexina se asocia con la cicatrización después de la cirugía y la remodelación de tejidos inducida después del trauma. Como se describe en la presente descripción, las conexinas representan dianas útiles para el tratamiento de efectos adversos asociados con el trauma de la córnea y la remodelación de tejidos después de la cirugía; y para enfermedades y trastornos donde es conveniente la dispersión localizada en la comunicación directa entre células. Particularmente, la modulación de la expresión de conexinas puede ser útil para la modulación específica de sitio de la expresión de proteínas asociadas con la unión de tipo hendidura para aplicaciones de remodelación de tejidos/producción de tejidos. Los compuestos antisentido descritos en la presente descripción pueden usarse para la modulación de conexinas en asociación con procedimientos oftálmicos o cirugías tales como, por ejemplo, cirugía de cataratas, cirugía de lentes intraoculares, cirugía de trasplante de córnea y algunos tipos de cirugía para el glaucoma y otros procedimientos descritos en la presente descripción.

65 La modulación de las conexinas puede aplicarse en trastornos oftálmicos que afectan el segmento posterior, incluida la retina y la lente. La modulación de las conexinas puede aplicarse en trastornos oftálmicos que afectan el segmento

anterior, que incluye la córnea, la conjuntiva y la esclerótica. Los trastornos del segmento posterior incluyen agujeros maculares y degeneración, desgarros de la retina, retinopatía diabética, vitreoretinopatía y trastornos diversos. Un trastorno de la lente puede incluir cataratas. Aún en otro aspecto, se contempla que los trastornos de la córnea son trastornos refractivos tales como las secuelas de la queratotomía radial, ojo seco, conjuntivitis viral, conjuntivitis ulcerosa y formación de escaras en la cicatrización de heridas, tales como, por ejemplo, heridas epiteliales de la córnea y las consecuencias del síndrome de Sjögren.

En la presente descripción se describen compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, para su uso en la modulación de la función de moléculas de ácido nucleico que codifican conexinas, lo que en última instancia modula la cantidad de las conexinas producidas. Esto se logra proporcionando oligonucleótidos que se hibriden específicamente con ácidos nucleicos, preferentemente ARNm, que codifican conexinas.

Esta relación entre un compuesto antisentido tal como un oligonucleótido y su ácido nucleico complementario diana, al cual se hibrida, se denomina comúnmente "antisentido". Tal como se describe en la presente descripción, el "direccionamiento" de un oligonucleótido a un ácido nucleico diana elegido es típicamente un proceso de múltiples etapas. El proceso usualmente comienza con la identificación de una secuencia de ácidos nucleicos cuya función debe modularse. Esto puede ser, como un ejemplo, un gen celular (o ARNm producido a partir del gen) cuya expresión se asocia con un estado de enfermedad particular. Las dianas son ácidos nucleicos que codifican conexinas; en otras palabras, un gen que codifica conexina, o ARNm expresado a partir del gen de conexina. El ARNm que codifica la conexina es actualmente una diana preferida. El proceso de direccionamiento también incluye la determinación de un sitio o sitios dentro de la secuencia de ácidos nucleicos para que se produzca la interacción antisentido de manera que dé como resultado la modulación de la expresión génica.

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 también los ribonucleótidos asociados que forman una región conocida por tales personas como la región no traducida 5', la región no traducida 3', la región caperuza 5' y los ribonucleótidos de unión intrón/exón. Por lo tanto, los oligonucleótidos pueden formularse de acuerdo con la presente invención los cuales se dirigen totalmente o en parte a estos ribonucleótidos asociados así como también a los ribonucleótidos informativos. Por lo tanto, el oligonucleótido puede ser específicamente hibridable con una región del sitio de iniciación de la transcripción, una región del codón de iniciación de la traducción, una región caperuza 5', una unión intrón/exón, secuencias codificantes, una región de codón de terminación de la traducción o secuencias en la región no traducida 5' o 3'. Dado que el codón de iniciación de la traducción es típicamente 5'-AUG (en las moléculas de ARNm transcrito; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también se denomina "codón de AUG", el "codón de inicio" o el "codón de inicio AUG." Una minoría de genes tienen un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y se ha demostrado que 5'-AUA, 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 secuencias de codones, incluso aunque el aminoácido iniciador en cada caso sea típicamente metionina (en eucariotas) o formilmetionina (procariotas). En la técnica también se conoce que los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, cualquiera de los cuales puede utilizarse preferentemente para la iniciación 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 in vivo para iniciar la traducción de una molécula de ARNm transcrita a partir de un gen que codifica la conexina, independientemente de la(s) secuencia(s) de tales codones. En la técnica también se conoce que un codón de terminación de la traducción (o "codón de parada") 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 de AUG" y "región de codón de iniciación de la traducción" se refieren a una porción de un ARNm tal o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') de un codón de inicio 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 un ARNm tal 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 de lectura abierto (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, también es una región que puede usarse como diana de manera eficaz. Otras regiones diana preferidas incluyen la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la técnica para referirse a la porción de un ARNm en la dirección 5' a partir del codón de iniciación de la traducción y, por lo tanto, que incluye nucleótidos entre el sitio de la caperuza 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen y la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica para referirse a la porción de un ARNm en la dirección 3' a partir de la región de terminación de la transcripción y, por lo tanto, que incluye nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen. La caperuza 5' de un ARNm comprende un residuo de guanosina N7-metilado unido al residuo más 5' del ARNm a través de un enlace trifosfato 5-5'. Se considera que la región caperuza 5' de un ARNm incluye la propia estructura caperuza 5' así como también los primeros 50 nucleótidos adyacentes a la caperuza. La región caperuza 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 "intrones", que se escinden de un transcripto de pre-ARNm para producir uno o más ARNm maduros. Las regiones restantes (y, por lo tanto, traducidas) se conocen como "exones" y se cortan y empalman juntas para formar una secuencia de ARNm continua. Los sitios de corte y empalme del ARNm, es decir, las uniones exón-exón o intrón-exón, pueden ser también regiones diana preferidas, y son particularmente útiles en situaciones donde el corte y empalme aberrante está implicado en la enfermedad, o donde una sobreproducción de un producto de corte y empalme del ARNm particular está implicada en la enfermedad. Las uniones de fusión aberrantes debido a reordenamientos o eliminaciones también son dianas preferidas. También puede preferirse el direccionamiento de exones particulares en los ARNm con corte y empalme alternativamente. Se ha encontrado además que los intrones también pueden ser regiones diana eficaces y, por lo tanto, preferidas para los compuestos antisentido dirigidos, por ejemplo, al ADN o pre-ARNm.

En el contexto de esta invención, un polinucleótido antisentido puede hibridar, por ejemplo, con la totalidad o parte de un ARNm de conexina 43. Típicamente, el polinucleótido antisentido se hibrida a la región de unión al ribosoma o a 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 parte del ARNm de conexina. El polinucleótido antisentido puede inhibir la transcripción y/o la traducción de la conexina. Preferentemente, el polinucleótido es un inhibidor específico de la transcripción y/o traducción del gen de conexina y no inhibe la transcripción y/o traducción de otros genes. El producto puede unirse al gen o ARNm de conexina ya sea en dirección (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 provocará que se reduzca la expresión del ARNm y/o proteína conexina en una célula. El polinucleótido antisentido generalmente es antisentido al ARNm de conexina. Tal polinucleótido puede ser capaz de hibridarse al ARNm de conexina y puede inhibir la expresión de conexina interfiriendo con uno o más aspectos del metabolismo del ARNm de conexina que incluye la transcripción, procesamiento del ARNm, transporte del ARNm desde el núcleo, traducción o degradación del ARNm. El polinucleótido antisentido típicamente se hibrida al ARNm de conexina para formar un dúplex que puede provocar la inhibición directa de la traducción y/o la desestabilización del ARNm. Tal dúplex puede ser susceptible a la degradación por las nucleasas.

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

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

Una vez que se haya identificado el sitio o los sitios diana, se eligen oligonucleótidos que sean lo suficientemente complementarios a la diana, es decir, se hibridan suficientemente bien y con especificidad suficiente, para proporcionar la modulación deseada. Los ácidos nucleicos antisentido (ADN, ARN, modificados, análogos y similares) pueden producirse mediante el uso de cualquier método adecuado para producir un ácido nucleico. Los oligodesoxinucleótidos dirigidos a otras proteínas 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 etc. Eugene, Oregón, Estados Unidos). El equipo para tal síntesis está disponible a través de varios vendedores que incluyen MacVector y OligoTech (de Oligos etc. Eugene, Oregón, Estados Unidos). Para los métodos generales relacionados con polinucleótidos antisentido, ver *Antisense RNA and DNA*, D. A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988)). Ver también, 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, se conoce al menos una porción de la secuencia de nucleótidos para conexinas en la que se desea la inhibición de la expresión. Preferentemente, un compuesto antisentido se dirige a uno o más isotipos de conexina específicos. Los isotipos específicos de conexinas que pueden ser diana de los compuestos antisentido incluyen, sin limitación, 43, 37, 31.1, 26, y otros descritos en la presente descripción. La invención usa un compuesto de inhibición de conexina 43 que inhibe en su totalidad o en parte la expresión o actividad de una conexina 43. Se prefiere, pero no se requiere, que las conexinas diana sean humanas. Un conexina puede tener, por ejemplo, una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31. En ciertos casos, los compuestos antisentido se dirigen a al menos 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina que tiene una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31.

En ciertas modalidades, un segundo compuesto antisentido se administra al ojo del sujeto, en donde el segundo compuesto antisentido se dirige a al menos aproximadamente 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que

codifica una conexina que tiene una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31, en donde dicho segundo compuesto antisentido se dirige a una conexina diferente a la de un primer compuesto antisentido.

5 Las conexinas diana variarán dependiendo del tipo de tejido que se diseñará o remodelará y la secuencia precisa del polinucleótido antisentido usado dependerá de la proteína conexina diana. La proteína o las proteínas conexina que son dianas de los oligonucleótidos dependerán del sitio al cual se dirija la regulación negativa. Esto refleja la composición no uniforme de la(s) unión(ones) de tipo hendidura en diferentes sitios por todo el cuerpo en términos de la composición de subunidades de conexina. Algunas proteínas conexina son, sin embargo, más ubicuas que otras en términos de distribución en tejido. La conexina 43 asociada a la córnea es una diana en la invención. Los oligonucleótidos solos o en combinación, dirigidos hacia la conexina 43, 26, 37, 30 y/o 31.1 (por ejemplo, ver las SEQ ID. NOS: 1-11) son adecuados para la aplicación de producción o remodelación 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.

15 Se contempla además que los oligonucleótidos dirigidos a las proteínas conexina separadas pueden usarse en combinación (por ejemplo, pueden dirigirse a una, dos, tres, cuatro o más conexinas diferentes). Por ejemplo, los ODN dirigidos a conexina 43, y uno o más miembros adicionales de la familia de conexinas (tales como conexina 26, 30, 31.1, 37 y 43) pueden usarse en combinación. Se contempla además 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 serán secuencias diana en el gen o ARNm de conexina que no se conservan entre conexinas, mientras que los polinucleótidos no específicos se dirigirán a secuencias conservadas. Por lo tanto, en ciertos casos, los compuestos antisentido se dirigen a al menos 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica conexina 26, conexina 30, conexina 31.1, conexina 37 humana, conexina 43, en donde dicho compuesto antisentido inhibe la expresión de una proteína conexina humana en células asociadas con el ojo de dicho paciente.

25 En ciertos casos, las moléculas de ácido nucleico que codifican una conexina tienen una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ. ID NO: 12-31. En ciertas modalidades, las composiciones se dirigen a dos o más proteínas conexina humana e inhiben la expresión de dos o más proteínas conexina humana. En otras ciertas modalidades, los compuestos antisentido son oligonucleótidos antisentido. El oligonucleótido antisentido ilustrativo para conexina 43 seleccionado incluye GTA ATT GCG GCA AGA ATT GTT TCT GTC (SEQ ID NO: 1); GTA ATT GCG GCA 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). El oligonucleótido antisentido ilustrativo para conexina 37 seleccionado incluye 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). El oligonucleótido antisentido ilustrativo para conexina 30 seleccionado incluye 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). El oligonucleótido antisentido ilustrativo para conexina 31.1 seleccionado incluye 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).

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

5' GTA ATT GCG GCA 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)
 45 5'GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT 3' (SEQ ID NO: 3)

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

50 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)
 55 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)

60 Los compuestos antisentido para su uso en la invención generalmente comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 nucleobases (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 nucleósidos enlazados), y más típicamente los que comprenden de aproximadamente 12 a aproximadamente 40 nucleobases e incluso más típicamente aproximadamente 30 nucleobases. Los compuestos antisentido que comprenden polinucleótidos pueden ser 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, 1,000, 2,000 o 3,000 o más nucleótidos de longitud. Los compuestos antisentido adecuados incluyen, por ejemplo, un ODN de 30 mer.

65

En ciertos casos, los compuestos antisentido se dirigen a al menos aproximadamente 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina que tiene una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31. En otros casos, el compuesto antisentido se dirige a al menos 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 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina que tiene una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31.

El tamaño de los compuestos antisentido, incluidos los oligonucleótidos dirigidos a entre al menos aproximadamente 8 y 35 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina humana, puede ser 8 nucleobases de longitud o más largos, entre 8 y 100 nucleobases, entre ocho y 50 nucleobases, entre ocho y 40 nucleobases, entre 10 y 50 nucleobases, entre 12 y 50 nucleobases, entre 14 y 50 nucleobases, entre 16 y 50 nucleobases, entre 18 y 50 nucleobases, entre 20 y 50 nucleobases, entre 25 y 50 nucleobases, entre 15 y 35 nucleobases de longitud y similares. Otros compuestos antisentido pueden ser o más pequeños o más grandes, por ejemplo, con más de 100 nucleobases de longitud.

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

Como se proporciona en la presente descripción, el compuesto antisentido puede incluir el uso de los oligodesoxinucleótidos (ODN). Los ODN generalmente son de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud y actúan mediante la hibridación al 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 modifican de una manera para prevenir la acción de la RNasa H, los ODN pueden inhibir la traducción del ARNm mediante impedimento estérico, o inhibir el corte y empalme de los pre-ARNm. Los ODN y las modificaciones de estos se han usado para dirigir el ADNbc para la inhibición de la transcripción mediante la formación de triple hélices. El ODN puede obtenerse mediante métodos reconocidos en la técnica de síntesis automatizada y es relativamente sencillo obtener los ODN de cualquier secuencia y bloquear la expresión génica a través del apareamiento de bases antisentido.

En determinados aspectos, la cadena principal de fosfodiéster de los ODN puede modificarse para aumentar su eficacia como agentes específicos de diana para bloquear la expresión génica. Estas modificaciones de la cadena principal se desarrollaron para mejorar la estabilidad de los ODN y para aumentar su absorción celular. La modificación más ampliamente usada es una en la que el oxígeno no formador de puentes se reemplaza por un átomo de azufre, generando los ODN fosforotioato. Al menos un ODN fosforotioato ha sido aprobado por la FDA, y varios otros ODN antisentido fosforotioato están en etapas más tempranas de ensayos clínicos para una variedad de cánceres y enfermedades inflamatorias.

Los mecanismos de acción de los ODN con respecto al bloqueo de la función génica varían dependiendo de la cadena principal del ODN (Branch, A. D. *Hepatology* 24, 1517-1529 (1996); Dias, N. y Stein, C. A. *Mol. Cancer Ther.* 1,347-355 (2002); Stein, C.A. y Cohen, J. S., *Cancer Res.* 48, 2659-2668 (1988); Zon, G. *Ann. N.Y. Acad Sci.*, 616, 161-172 (1990). Los ODN cargados negativamente netos, tales como fosfodiésteres y fosforotioatos, provocan la escisión mediada por ARNsa H del ARNm diana. Otras modificaciones de la cadena principal que no reclutan la ARNsa H, debido a su falta de carga o el tipo de hélice formada con el ARN diana, pueden clasificarse como impedimentos estéricos de los ODN. Los miembros usados popularmente de este último grupo incluyen morfolinos, U-O-metilos, 2"-O-alilos, ácidos nucleicos bloqueados y ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Estos ODN pueden bloquear el corte y empalme, la traducción, el transporte y traducción del núcleo al citoplasma, entre otras dianas de inhibición.

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 completa de proteínas. Tienen la actividad catalítica de romper y/o formar enlaces covalentes con especificidad extraordinaria, acelerando de este modo las tasas espontáneas de las reacciones diana en muchos órdenes de magnitud.

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

La capacidad del ARN para servir como un catalizador se demostró primero para el intrón del grupo I de auto corte y

empalme de *Termofila tetrahymena* y la porción ARN de la ARNsa. Después del descubrimiento de estas dos enzimas de ARN, se ha encontrado que la catálisis mediada por ARN está asociada con los intrones del grupo II de auto corte y empalme de mitocondrias (así como también de cloroplastos) de levadura, hongos y plantas, los ARN viroides y virusoides de plantas bicatenarios, virus delta de la hepatitis y un ARN satélite de mitocondria de *Neurospora crassa*. Las ribozimas son de origen natural, pero también 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 enlazado no covalentemente). Se están desarrollando nuevas actividades bioquímicas mediante el uso de protocolos de selección *in vitro* así como también generando nuevos motivos de ribozima que actúen sobre sustratos distintos al ARN.

El intrón del grupo I de *T. termofila* fue la primera ribozima de *escisión en cis* que se convirtió en una forma de *reacción en trans*, a la que se hace referencia como un intrón/ribozima, lo que la hace útil tanto en la investigación genómica y como un posible agente terapéutico. En la reacción de corte y empalme en *trans*, un exón defectuoso de un ARNm diana puede intercambiarse por un exón correcto que se une covalentemente al intrón/ribozima. Esto se produce a través de una reacción de corte y empalme en la que el exón unido al intrón se ubica mediante apareamiento de bases en 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 *cortar y empalmar en trans* secuencias de tipo silvestre en transcritos de globina de células falciformes y transcritos de *p53* mutantes y reemplazar los tripletes expandidos en la 3'-UTR de transcritos de proteínas quinasas en un alelo de distrofia miotónica.

La endorribonucleasa ARNsa P se encuentra en los organismos en toda la naturaleza. Esta enzima tiene ARN y uno o más componentes proteicos dependiendo del organismo del cual se aísla. El componente de ARN de las enzimas de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* puede actuar como un agente de escisión específico de sitio en ausencia de la proteína en ciertas condiciones salinas e iónicas. Los estudios de los requerimientos de sustrato para enzimas humanas y bacterianas han demostrado 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 mediante los ARN antisentido de diseño único, que se aparean con el ARN diana, y sirven como sustratos para la escisión mediada por ARNsa P, específica de sitio tanto en el tubo de ensayo como en las células. Se ha demostrado además que el componente antisentido puede unirse covalentemente al ARN de ARNasa P, y de ese modo dirigir la enzima solamente al ARN diana de interés. Los investigadores han aprovechado esta propiedad en el diseño de los ARN antisentido, que se aparean con los ARNm diana de interés para estimular la escisión específica de sitio de la diana y para la inhibición dirigida tanto del virus del herpes simple como del citomegalovirus en cultivo celular.

Un número de ARN patógenos pequeños de plantas (viroides, ARN satélites y virusoides), un transcrito de un plásmido de ADN mitocondrial de *N. crassa* y el virus delta de la hepatitis animal experimentan una reacción de autoescisión *in vitro* en ausencia de proteína. Las reacciones requieren un pH neutro y Mg^{2+} . La reacción de autoescisión es una parte integral del mecanismo de replicación en círculo rodante *in vivo*. Estos ARN de autoescisión pueden subdividirse en grupos dependiendo de la secuencia y la estructura secundaria formada alrededor del sitio de escisión. Las ribozimas pequeñas se han derivado de un motivo encontrado en los ARN viroides y virusoides monocatenarios de plantas. En base a una estructura secundaria compartida y un conjunto conservado de nucleótidos, el término "cabeza de martillo" se ha proporcionado a un grupo de este dominio de autoescisión. La ribozima de cabeza de martillo está compuesta de 30 nucleótidos. La simplicidad del dominio catalítico cabeza de martillo lo ha hecho una elección popular en el diseño de ribozimas de *acción en trans*. Mediante el uso del apareamiento de las bases de Watson-Crick, la ribozima de cabeza de martillo puede diseñarse para escindir cualquier ARN diana. Los requisitos en el sitio de escisión son relativamente simples, y puede dirigirse virtualmente cualquier motivo de secuencia UH (donde H es U, C o A).

Un segundo motivo de autoescisión derivado de planta, identificado inicialmente en la cadena negativa del ARN satélite de tinción anular de tabaco, se denomina "horquilla" o "clip". Las ribozimas en horquilla escinden los sustratos de ARN en una reacción reversible que genera 2', fosfato cíclico Y y extremo 5'-hidroxil terminal - las versiones modificadas genéticamente de este motivo catalítico también se escinden y se convierten en múltiples copias de una variedad de dianas en *trans*. Los requisitos de sustrato para la horquilla incluyen un GUC, donde la escisión ocurre inmediatamente corriente arriba de la G. La ribozima de horquilla también cataliza una reacción de ligación, aunque se usa con mayor frecuencia para las reacciones de escisión.

Se han usado numerosas aplicaciones tanto de ribozimas de cabeza de martillo como de horquilla en células para regular negativamente las dianas celulares y virales específicas. Haseloff y Gerlach diseñaron un motivo de cabeza de martillo (Haseloff y Gerlach; Nature. 1988 Ago 18; 334(6183):585- 91) que puede transformarse genéticamente para escindir cualquier diana mediante la modificación de los brazos que emparejan sus bases con la diana correcta. Ramemzani y otros demostraron que este motivo de ribozima de cabeza de martillo tuvo aplicaciones terapéuticas potenciales en un estudio en el que hubo una inhibición completa virtual de la expresión génica viral y la replicación mediante el uso de células diseñadas para expresar una ribozima *gag* del virus de la 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 los ADN catalíticos (o ADNzimas). Se han desarrollado ADN pequeños capaces de escindir de manera específica de sitio las dianas de ARN a través de la evolución *in vitro* (ya que no se conocen enzimas de ADN en la naturaleza). Se han identificado dos motivos catalíticos

diferentes, con diferentes especificidades de sitio de escisión. Las 10-20 enzimas más comúnmente usadas se unen a sus sustratos de ARN a través del apareamiento de bases de Watson-Crick y escinden de manera específica de sitio el ARN diana, como lo hacen las ribozimas de cabeza de martillo y de horquilla, lo que da como resultado 2' 3'-fosfato cíclico y 5'-OH terminales. La escisión de los ARNm diana da como resultado su destrucción y las ADNzimas reciclan y escinden múltiples sustratos. Los ADN catalíticos son relativamente baratos de sintetizar y tienen buenas propiedades catalíticas, lo que los hace sustitutos útiles ya sea para ADN antisentido o ribozimas.

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

En otro aspecto de la presente invención, la modulación del gen constitutivo de conexina 43 implica el uso de oligonucleótidos que tienen estructuras de cadena principal morfolino (Summerton, J.E. y Weller, D.D. patente de Estados Unidos 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 celular. Por ejemplo, pueden usarse oligonucleótidos de cadena principal mixtos (MBO) que contienen segmentos de oligodesoxinucleótidos fosforotioato y segmentos colocados adecuadamente de

oligodesoxi u oligorribonucleótidos modificados. Los MBO tienen segmentos de enlaces fosforotioato y otros segmentos de otros oligonucleótidos modificados, tales como metilfosfonatos, fosforamidatos, fosforoditioatos, oligorribonucleótidos N3'P5'-fosforamidatos y fosforotioatos y sus análogos 2'-O- alquilo y 2'-O-metilribonucleótidos metilfosfonatos, que son no iónicos y muy resistentes a nucleasas o 2'-O- alquiloligorribonucleótidos.

Como se conoce en la técnica, un nucleósido es una combinación de azúcares y bases. La porción de base 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 incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para los nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato puede unirse ya sea a la porción hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. En la formación de 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 además para formar una estructura circular, sin embargo, generalmente se prefieren las estructuras lineales abiertas. Dentro de la estructura de oligonucleótidos, se hace referencia comúnmente a los grupos fosfato como formadores de la cadena principal de internucleósidos del oligonucleótido. El enlace o cadena principal normal de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'.

Los compuestos antisentido útiles en esta invención pueden incluir oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces internucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen los que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y los 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 de internucleósidos también pueden considerarse oligonucleósidos.

Los compuestos antisentido con cadenas principales de oligonucleótidos modificadas útiles en esta invención pueden incluir, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilo y otros fosfonatos de alquilo que incluyen 3'-alquilenos fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres y boranofosfonatos que tienen enlaces 3-5', análogos de estos unidos en dirección 2'-5' y los que tienen polaridad invertida en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos se unen en dirección 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. Se incluyen también diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

En un aspecto, se contempla que las cadenas principales de oligonucleótidos modificadas que no incluyen un átomo de fósforo en él tienen cadenas principales que se forman por enlaces internucleósidos de alquilo oricloalquilo de cadena corta, heteroátomo mixto y enlaces internucleósidos alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metilformacetilo y tioformacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de metileneimino y metilhidrazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otros que tienen partes componentes N, O, S y CH₂ mixtas.

En un aspecto, se contempla que los miméticos de oligonucleótidos, tanto el azúcar como el enlace internucleósidos, es decir, la cadena principal de las unidades nucleotídicas se sustituyen con grupos nuevos. Las unidades de bases se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Un compuesto oligomérico tal, un mimético de oligonucleótido que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, se denomina un ácido

nucleico peptídico (PNA). En los compuestos de PNA, la cadena principal del azúcar de un oligonucleótido se reemplaza con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directamente o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la porción de amida de la cadena principal. Las enseñanzas adicionales de los compuestos de PNA pueden encontrarse en Nielsen y otros (Science, 1991, 254, 1497-1500).

En un aspecto, se contemplan los oligonucleótidos con cadenas principales de fosforotioato y oligonucleósidos con cadenas principales de heteroátomos, y en particular $\text{—CH}_2\text{—NH—O—CH}_2\text{—}$, $\text{—CH—}_2\text{N(CH}_3\text{)—O—CH—}_2$ [conocido como un metileno (metilimino) o cadena principal de MMI], $\text{—CH}_2\text{—O—N(CH}_3\text{)—CH}_2\text{—CH}_2\text{—N(CH}_3\text{)—N(CH}_3\text{)—CH}_2\text{—}$ y $\text{—O—N(CH}_3\text{)—CH}_2\text{—CH}_2\text{—}$ [en donde la cadena principal de fosfodiéster nativa se representa como $\text{—O—P—O—CH}_2\text{—}$]. Aún en otro aspecto, también se contemplan los oligonucleótidos que tienen estructuras de la cadena principal morfolino y amida.

En otro aspecto, se contempla que los oligonucleótidos modificados pueden contener además una o más porciones de azúcares sustituidas. Por ejemplo, los oligonucleótidos que comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo, O-alquil-O-alquilo, O-, S-, o N- alqueno, o-, S- o N-alquino, en donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C1 a C10 o alqueno y alquino C2 a C10 sustituido o no sustituido. Particularmente preferidos son $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$, y $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos pueden comprender uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C1 a C10, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH3, OCN, Cl, Br, CN, CF3, 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 tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'—O—CH2 CH2 OCH3 también conocido como 2'—O—(2-metoxietilo) 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 grupo $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, conocido también como 2'-DMAOE, y 2'-dimetilamino-etoxietoxi (2'-DMAEOE), es decir, 2'—O—CH2 — O-CH2 —N(CH2)2.

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

En otro aspecto, se contempla que los oligonucleótidos pueden incluir, además, modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la técnica como "base"). Tal como se usa en la presente descripción, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C o m5c), 5- hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-amincadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de adenina and guanina, 2-propil y otros derivados 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 posición 8, 5-halo en particular 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidas en la posición 5, 7- metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7- deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Las nucleobases adicionales incluyen las descritas en la patente de Estados Unidos núm. 3,687,808, las descritas en Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering 1990, páginas 858-859, Kroschwitz, J. John Wiley & Sons, las descritas por English y otros (Angewandte Chemie, Edición Internacional 1991, 30, 613-722), y las descritas por Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, Antisense Research and Applications 1993, páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B., ed., CRC Press. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos. Estos incluyen pirimidinas sustituidas en posición 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0.6-1.2 °C. (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications 1993, CRC Press, Boca Raton, páginas 276-278) y son sustituciones de bases preferidas en la actualidad, incluso más en particular cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietilo en azúcares.

En otro aspecto, se contempla que la modificación de los oligonucleótidos implica enlazar químicamente al oligonucleótido una o más porciones o conjugados que mejoran la actividad, distribución celular o absorción celular del oligonucleótido. Tales porciones incluyen, pero no se limitan a, porciones de lípidos tales como una porción de colesterol (Letsinger y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan y otros, Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994, 4 1053-1059), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan y otros, N.Y Acad. Sci. 1992, 660, 306-309; Manoharan y otros, Bioorg. Med. Chem. Lett. 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser y otros, Nucl. Acids Res. 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras y otros, EMBO J. 1991, 10, 1111-1118; Kabanov y otros, FEBS Lett. 1990, 259, 327-330; Svinarchuk y

otros, Biochimie 1993, 75, 49-54), 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. 1995, 36, 3651-3654; Shea y otros, Nucl. Acids Res. 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan y otros, Nucleosides & Nucleotides 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano acético (Manoharan y otros, Tetrahedron Lett. 1995, 36, 3651-3654), una porción de palmitilo (Mishra y otros, Biochim. Biophys. Acta 1995, 1264, 229-237), o una porción de octadecilamina o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke y otros, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1996, 277, 923-937).

Se contempla además 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 por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en donde el oligonucleótido se modifica para conferir al oligonucleótido mayor resistencia a la degradación por las nucleasas, mayor absorción celular y/o mayor afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como un sustrato para enzimas capaz de escindir híbridos de ARN:ADN o de ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Por lo tanto, la activación de la RNasa H da como resultado la escisión del ARN diana, lo que mejora en gran medida la eficiencia 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 asociadas de hibridación de ácidos nucleicos conocidas en la técnica. Esta escisión mediada por la RNasa H del ARN diana es diferente al uso de ribozimas para escindir ácidos nucleicos.

Los ejemplos de oligonucleótidos quiméricos incluyen pero no se limitan a "gápmeros", en los cuales están presentes tres regiones diferentes, normalmente con una región central flanqueada por dos regiones que son químicamente equivalentes entre sí pero diferentes de la caída. Un ejemplo preferido de un gápmero es un oligonucleótido en el cual una porción central (la "caída") del oligonucleótido sirve como un 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 que tengan mayor afinidad por la molécula de ARN diana pero no pueden soportar la actividad de nucleasa (por ejemplo, sustituido con flúor o 2'-O-metoxietilo). Los oligonucleótidos quiméricos no se limitan a los que tienen modificaciones en el azúcar, pero también pueden incluir oligonucleósidos u oligonucleótidos con cadenas principales modificadas, por ejemplo, con regiones de enlaces de cadena principal fosfortioato (P = S) y fosfodiéster (P = O) o con regiones de MMI y enlaces de cadena principal y P = S. Otras quimeras incluyen "wíngmeros", también conocidos en la técnica como "hemímeros", es decir, oligonucleótidos con dos regiones diferentes. En un ejemplo preferido de un wíngmero, la porción 5' del oligonucleótido sirve como sustrato para la RNasa H y se compone preferentemente de 2'-desoxinucleótidos, mientras que la porción 3' se modifica para que tenga mayor afinidad por la molécula de ARN diana pero es incapaz de soportar la actividad de nucleasa (por ejemplo, sustituido con 2'-flúor o 2'-O-metoxietilo), o viceversa. En una modalidad, los oligonucleótidos para su uso 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 ha demostrado que esta modificación aumenta tanto la afinidad del oligonucleótido por su diana como la resistencia a las nucleasas del oligonucleótido. De conformidad con la invención, una, una pluralidad, o todas las subunidades de nucleótidos de los oligonucleótidos pueden llevar una modificación de 2'-O-metoxietil (—O—CH₂ CH₂ OCH₃). Los oligonucleótidos que comprenden una pluralidad de subunidades de nucleótidos que tienen una modificación de 2'-O-metoxietilo pueden tener una modificación tal 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, también se contemplan los oligonucleótidos que contienen otras modificaciones que mejoran la eficacia antisentido, potencia o afinidad por la diana.

La presente invención puede usar polinucleótidos (por ejemplo, ADN, ARN, PNA o similares) que se unen a ácidos nucleicos de conexina 43 bicatenarios o dúplex (por ejemplo, en una región plegada del ARN de conexina o en el gen de conexina), que forman un ácido nucleico que contiene triple hélice o "tríplex". La formación de la triple hélice da como resultado la inhibición de la expresión de conexina 43, por ejemplo, mediante la prevención de la transcripción del gen de conexina 43, lo que reduce o elimina así la actividad de conexina 43 en una célula. Sin pretender limitarse por ningún mecanismo particular, se considera que el apareamiento de triple hélice compromete la capacidad de la doble hélice de abrirse lo suficiente para que se produzca la unión de las polimerasas, factores de transcripción o moléculas reguladoras.

Los oligo y polinucleótidos tríplex se construyen mediante el uso de las reglas de apareamiento de bases de la formación de la triple hélice (ver, por ejemplo, Cheng y otros, J. Biol. Chem. 263: 15110 (1988); Ferrin y 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 y/o la secuencia génica de conexina. Típicamente, los oligonucleótidos formadores del tríplex comprenden una secuencia específica de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 nucleótidos o "complementaria" a una secuencia específica en el ARN o gen de conexina (es decir, lo suficientemente grande para formar una triple hélice estable, pero lo suficientemente pequeña, en dependencia del modo de suministro, para administrar *in vivo*, si se desea). En este contexto, "complementaria" significa capaz de formar una triple hélice estable. En una modalidad, los oligonucleótidos se diseñan para que se unan específicamente a las regiones reguladoras del gen de conexina 43 (por ejemplo, la secuencia flanqueada 5', promotores y potenciadores de conexina) o al sitio de iniciación de la transcripción (por ejemplo, entre -10 y +10 desde el sitio de iniciación de la transcripción). Para una revisión de avances terapéuticos recientes mediante el uso de ADN

tríplex, ver Gee y otros, en Huber y Carr, 1994, Molecular and Immunological Approaches, Futura Publishing Co, Mt Kisco NY y Rininsland y otros, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5854.

La presente invención también puede usar ribozimas para la inhibición de la actividad de conexina 43. Las ribozimas se unen y escinden específicamente e inactivan el ARNm de conexina 43. Las ribozimas útiles pueden comprender las secuencias terminales 5' y 3' complementarias al ARNm de conexina 43 y un experto puede diseñarlas sobre la base de la secuencia de ARNm de conexina 43. Se contempla que las ribozimas descritas en la presente descripción incluyen aquellas que tienen las características de las ribozimas intrones del grupo I (Cech, *Biotechnology* 13:323 (1995)) y otras de las ribozimas de 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 que corresponden a la región del gen de conexina diana que contiene el sitio de escisión pueden evaluarse para determinar los rasgos estructurales secundarios que pueden hacer que el oligonucleótido sea más conveniente. La idoneidad de los sitios de escisión también puede evaluarse mediante pruebas de accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios mediante el uso de ensayos de protección de ribonucleasas, o mediante pruebas para determinar la actividad de ribozima *in vitro* de acuerdo con los procedimientos estándares conocidos en la técnica.

Se contemplan además los compuestos antisentido en los que las funciones antisentido y de ribozima pueden combinarse en un oligonucleótido individual. 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.

La presente invención también puede usar polinucleótidos para la inhibición de la actividad de conexina 43 mediante métodos tales como interferencia de ARN (ARNi) esta y otras técnicas de supresión génica son bien conocidos en la técnica. Una revisión de esta técnica se encuentra en *Science* 288:1370-1372 (2000). El ARNi funciona en un nivel postranscripcional y es específico de secuencia. El proceso comprende la introducción del ARN con un carácter parcial o completamente bicatenario, o precursores o capaz de codificar dicho ARN en la célula o en el ambiente extracelular.

Según lo descrito por Fire y otros, patente de Estados Unidos núm. 6,506,559, el ARN puede comprender una o más cadenas de ribonucleótido polimerizado. La estructura bicatenaria puede formarse por una sola cadena de ARN autocomplementaria o dos cadenas de ARN complementarias. El ARN puede incluir modificaciones ya sea a la cadena principal de fosfato-azúcar o a los nucleósidos. La formación de dúplex de ARN puede iniciarse ya sea dentro o fuera de la célula.

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

En un aspecto, la estrategia del silenciamiento postranscripcional específica de gen dependiente de ARN bicatenario (bc) implica el uso de ARN de interferencia pequeños (ARNip). El uso del enfoque de ARNi general se somete a ciertas limitaciones, que incluyen el mecanismo de defensa antiviral no específico en células de mamífero activado en respuesta a moléculas de ARNbc 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 realizado avances en el campo con la demostración de que los dúplex sintéticos de ARN de 21 nucleótidos podrían mediar el ARNi específico de genes en células de mamífero sin invocar los mecanismos genéricos de defensa antiviral (Elbashir S, y otros, "duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells". *Nature* 2001, 411:494-498; Caplen N. y otros, *Proc Natl Acad Sci* 2001, 98:9742-9747). Por lo tanto, los ARNip se reconocen cada vez más como herramientas potentes para la modulación específica de genes.

Como se describe en la presente descripción, ARNi incluye un grupo de mecanismos de silenciamiento génico relacionados que comparten muchos componentes bioquímicos comunes en los que la molécula efectora terminal es por ejemplo, pero no se limita a, un ARN antisentido pequeño de 21-23 nucleótidos. Un mecanismo usa un "activador" de ARNbc relativamente largo que es procesado por la enzima celular Dicer en ARN pequeños, por ejemplo, pero no se limita a, los ARNbc de 21-23 nucleótidos, denominados ARNip. La cadena del ARNip complementaria al ARN diana se incorpora a un complejo de múltiples proteínas denominado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), donde sirve como una guía para la escisión endonucleolítica de la cadena de ARNm dentro del sitio diana. Esto conduce a la degradación de todo el ARNm; el ARNip antisentido entonces puede reciclarse. En organismos inferiores, la ARN polimerasa dependiente de ARN también usa el ARNip guía alineado como un cebador, lo que genera más

ARNbc frente a la diana, que sirve a su vez como un sustrato de Dicer, que genera más ARNip y amplifica la señal de ARNip. Esta vía se usa comúnmente como un mecanismo de defensa viral en plantas.

5 Tal como se describe en la presente descripción, el ARNip puede consistir en dos cadenas simples alineadas separadas de, por ejemplo, pero no se limita a, 21-23 nucleótidos, donde los dos nucleótidos 3' terminales son no apareados (saliente 3"). De manera alternativa, el ARNip puede tener la forma de un tallo-bucle individual, frecuentemente denominado ARN de horquilla pequeño (ARNhp). Típicamente, pero no siempre, la cadena antisentido de ARNhp también es completamente complementaria a la cadena pareja sentido del ARNip/hp.

10 En células de mamífero, los ARNbc grandes (usualmente mayores que 30 nucleótidos de longitud) desencadenan la vía del interferón, activando la proteína quinasa R y 2; 5'-oligoadenilato sintetasa. La activación de la vía de interferón puede conducir a la regulación negativa global de la traducción así como también a la degradación global del ARN. Sin embargo, se ha informado que los ARNip más pequeños introducidos de manera exógena en células de mamífero evitan la vía del interferón.

15 El producto antisentido de ARNip también puede derivarse de microARN endógenos. En células humanas, independientemente de la forma inicial (ARNip y microARN) o la vía de procesamiento, un ARN antisentido maduro final de, por ejemplo, pero sin limitarse a, 21-23 nucleótidos que es completamente homólogo al ARNm dirigirá la escisión de ARNm. En general, el efecto de los errores de apareamiento entre los ARNip y los sitios diana puede variar de casi ninguna a la total anulación de la actividad, por razones que solo se entienden parcialmente; sin embargo, en al menos un caso, la homología parcial da como resultado la inhibición de la traducción del ARNm. En general, el ARNip con errores de apareamiento diseñados para imitar una interacción prototípica entre el microARN y la diana puede mediar grados variables de represión traduccional, en dependencia de la interacción específica y la cantidad de sitios diana en el ARNm. El ARNi puede activarse por el suministro exógeno de los ARNip preformados o a través de la expresión basada en promotores de los ARNip o ARNhp.

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

35 Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta invención pueden producirse de manera conveniente y rutinaria mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para tal síntesis es vendido por varios vendedores conocidos en la técnica. También 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 2'-alcoxi o 2' alcoxialcoxi, que incluyen oligonucleótidos de 2'-O-metoxietilo (Martin, P. *Helv. Chim. Acta* 1995, 78, 486-504). Es bien conocido el uso de técnicas similares y las amiditas modificadas y productos de vidrio de poro controlado (CPG) comercialmente disponibles tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditas modificadas con psoraleno y/o CPG (disponibles de Glen Research, Sterling, Va.) para sintetizar oligonucleótidos marcados con fluorescencia, biotinilados u otros conjugados.

45 Métodos

50 Se describen además métodos para tratar a un sujeto (por ejemplo, paciente) mediante la administración de compuestos antisentido al sujeto. En general, estos métodos incluyen métodos para el diseño de tejidos y métodos para reducir el daño tisular asociado con procedimientos médicos, que incluyen, pero no se limitan a, procedimientos oftálmicos.

55 El método puede comprender, por ejemplo, administrar un compuesto antisentido al ojo de dicho sujeto en una cantidad suficiente para inhibir la expresión de una proteína conexina humana en el ojo o en células asociadas con el ojo del sujeto. Si bien se prefiere que se inhiba la expresión de la proteína conexina humana, se prevé que otras proteínas pueden ser dianas para la modulación por los compuestos antisentido, ya sean solos o en combinación con compuestos antisentido que inhiben la expresión de conexinas humanas.

60 En ciertas modalidades, el procedimiento oftálmico es una cirugía oftálmica, que incluye pero no se limita a una queratectomía fotorrefractiva asistida por láser de excímeros, una extracción de cataratas, un trasplante de córnea, una cirugía para corregir la refracción, una queratotomía radial, una cirugía de filtración para el glaucoma, una queratoplastia, una queratectomía fotorrefractiva asistida por láser de excímeros, un trasplante de córnea, una cirugía para corregir la refracción, una escisión de neoplasia de superficie ocular, un injerto de membrana conjuntiva y amniótica, una escisión de pterigio y pingeculae, una cirugía plástica ocular, una escisión de un tumor en el párpado, procedimientos reconstructivos del párpado para anomalías congénitas, reparación del ectropión y entropión del párpado, cirugía para el estrabismo (músculo ocular), un trauma del ojo penetrante.

En ciertas modalidades, los compuestos antisentido para su uso en la invención se administran mediante la administración local o tópica. Los compuestos antisentido para su uso en la invención también pueden administrarse, por ejemplo, por vía sistémica o mediante inyección intraocular.

5 Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse a un sujeto en un momento predeterminado, por ejemplo, con relación a la formación de una herida, tal como la que se produce en un procedimiento oftálmico (por ejemplo, quirúrgico). Por ejemplo, los compuestos antisentido pueden administrarse antes de un procedimiento oftálmico, durante un procedimiento oftálmico o después de un procedimiento oftálmico. Por ejemplo, los compuestos antisentido pueden administrarse a un sujeto en minutos o horas antes o después de realizar un procedimiento oftálmico.

10 En ciertas modalidades, un compuesto antisentido se administra después de que se realice un procedimiento oftálmico, y por ejemplo el compuesto antisentido se administra dentro de aproximadamente 4 horas del procedimiento, dentro de aproximadamente 3 horas del procedimiento, y más típicamente dentro de aproximadamente 2 horas del procedimiento oftálmico o dentro de aproximadamente 1 hora de un procedimiento oftálmico. Alternativamente, un compuesto antisentido puede administrarse en minutos de un procedimiento oftálmico, por ejemplo dentro de 5, 10, 15, 20, 30, 45, minutos de un procedimiento oftálmico. Los compuestos antisentido también pueden administrarse después de 4 horas de un procedimiento oftálmico.

15 En otro aspecto, los compuestos antisentido pueden administrarse en métodos para efectuar el diseño de tejidos. En estos casos, y algunos otros descritos en la presente descripción, los compuestos antisentido se administran típicamente durante períodos de tiempo más largos, por ejemplo, en el transcurso de días, semanas, meses, o incluso más, y pueden administrarse independientemente de un procedimiento particular realizado en un paciente, tal como uno realizado en un ojo.

20 Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que aumenta el grosor del tejido de la córnea en un sujeto, que incluye en métodos que no se asocian con un procedimiento oftálmico, y en métodos en los que los compuestos antisentido se administran en conjunto con un procedimiento oftálmico (por ejemplo cirugía). Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que promueva la curación o prevenga el daño tisular, por ejemplo en células asociadas con la córnea del sujeto (por ejemplo, células de la córnea). Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que reduce las cicatrices en el ojo de un sujeto.

25 Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que reduce la opacidad en el ojo de un sujeto. Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que modula la hiper celularidad asociada con la diferenciación de miofibroblastos asociada con un sitio de una lesión inducida por láser, preferentemente en las 24 horas a 48 horas después del periodo de cirugía. Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que modula la remodelación del estroma y reduce la opacidad asociada con un sitio de una lesión inducida por láser, preferentemente en las 24 horas a las 72 horas después del periodo de cirugía. Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que aumenta el movimiento de las células epiteliales en el ojo de un sujeto. Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que da como resultado un aumento en el movimiento de las células epiteliales dentro de las 12 horas de la administración de un compuesto antisentido al ojo del sujeto. Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que da como resultado un aumento en el movimiento de las células epiteliales dentro de las 24 horas de la administración del compuesto antisentido al ojo del sujeto. Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que previene un aumento en la densidad celular del estroma. Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que inhibe el edema del estroma asociado con un sitio de una lesión inducida por láser en las 24 horas a las 72 horas después del periodo de cirugía. Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que reduce la hiperplasia epitelial en las 24 horas a las 72 horas después de la cirugía. Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que reduce la activación de miofibroblastos hasta 1 semana después de la cirugía. Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que modula la diferenciación celular que modifica la matriz extracelular. Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse junto con un método que reduce la proliferación celular.

30 En ciertas modalidades, el compuesto antisentido disminuye la formación de cicatrices. En ciertas modalidades, el compuesto antisentido reduce la inflamación. En ciertas modalidades, el compuesto antisentido promueve la cicatrización de heridas. En ciertas modalidades preferidas, el compuesto antisentido se usa en asociación con un procedimiento de implantación quirúrgica. En ciertas modalidades preferidas, el compuesto antisentido se dirige a la conexina 43 y se administra para regular la división y el crecimiento de células basales epiteliales. En ciertos casos, el compuesto antisentido se dirige a la conexina 31.1 y se administra para regular la queratinización de la capa externa.

35 En otras modalidades, la invención promueve la curación o evita el daño tisular en células asociadas con la córnea del sujeto. De acuerdo con ciertas modalidades, se usan compuestos antisentido que aumentan el grosor del tejido de la córnea en un sujeto, o en un método que da como resultado la reducción del daño tisular en las células de la córnea

de un sujeto, o en un método que da como resultado la reducción del daño tisular en las células asociadas con la córnea de un sujeto, o en un método en asociación con un procedimiento de queratectomía fotorrefractiva asistida por láser de excímeros en un sujeto, o en un método que modula la hiper celularidad asociada con la diferenciación de miofibroblastos asociada con una lesión inducida por láser, preferentemente en las 24 horas a las 48 horas después del periodo de cirugía, o en un método que modula la remodelación del estroma y reduce la opacidad asociada con un sitio de una lesión inducida por láser, preferentemente en las 24 horas a las 72 horas después del periodo de cirugía, o en un método que inhibe el edema del estroma asociado con un sitio de una lesión inducida por láser en las 24 horas a las 72 horas después del periodo de cirugía, o en un método que reduce la hiperplasia epitelial, preferentemente en las 24 horas a las 72 horas después de la cirugía, o en un método que reduce la activación de miofibroblastos hasta 1 semana después de la cirugía, o en un método que modula la diferenciación celular que modifica la matriz extracelular o en un método que reduce la proliferación celular.

En ciertas modalidades, el procedimiento oftálmico es la extracción de cataratas. En otras modalidades, el procedimiento oftálmico es un trasplante de la córnea. En otras modalidades, el procedimiento quirúrgico oftálmico es la cirugía para corregir la refracción. En otras modalidades, el procedimiento oftálmico es la queratomía radial. En otras modalidades, el procedimiento oftálmico es la cirugía de filtración para el glaucoma. En aún otras modalidades, el procedimiento oftálmico es queratoplastia.

En ciertas modalidades, el compuesto o composición antisentido se administra mediante administración local o tópica. En ciertas modalidades, el compuesto o composición antisentido se administra mediante aplicación directa en la herida quirúrgica. En ciertas modalidades, el compuesto o composición antisentido se administra mediante inyección intraocular. En ciertas modalidades, el compuesto o composición antisentido se administra antes de que se realice el procedimiento quirúrgico. En ciertas modalidades, el compuesto o composición antisentido se administra durante el procedimiento quirúrgico. En ciertas modalidades no limitantes, el compuesto o composición antisentido se administra en aproximadamente 15 minutos antes de realizar un procedimiento oftálmico o hasta aproximadamente 2 horas después de que se realiza un procedimiento oftálmico. En ciertas modalidades adicionales, los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden administrarse durante días o incluso meses.

En ciertas modalidades, compuestos y composiciones adicionales se usan para promover la curación o para prevenir el daño tisular en células asociadas con la córnea, donde las células asociadas con la córnea pueden ser cualquier célula en el ojo, que incluye pero no se limita a las células de la córnea. Los agentes para su uso en la invención, incluidos los compuestos antisentido, pueden aumentar el grosor del tejido de la córnea en un sujeto. En ciertas modalidades, el compuesto antisentido se usa en combinación con otro compuesto útil para reducir el daño tisular o promover la curación. Por ejemplo, los compuestos antisentido pueden coadministrarse con un factor de crecimiento, citocina o similares, que incluyen pero no se limita a FGF, NGF, NT3, PDGF, TGF, VEGF, BDGF, EGF, KGF, integrinas, interleucinas, plasmina y semaforinas.

En otro aspecto, se describe una composición farmacéutica para reducir el daño tisular asociado con la cirugía oftálmica. La composición farmacéutica se formula adecuadamente para la administración tópica o local al ojo de un sujeto que comprende un compuesto antisentido presente en una cantidad suficiente para inhibir la expresión de una proteína conexina humana en células asociadas con el ojo del sujeto. El compuesto antisentido se dirige preferentemente a al menos aproximadamente 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina que tiene una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31. En ciertas modalidades, los compuestos antisentido están en forma de una composición farmacéutica que comprende un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable y el agente o compuesto antisentido está presente en una cantidad eficaz para promover la cicatrización de heridas en un sujeto. En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas pueden estar, por ejemplo, en una forma adecuada para la administración tópica, que incluyen en una forma adecuada para la administración tópica o local al ojo de un sujeto. En ciertas modalidades adicionales, las composiciones y formulaciones pueden estar en forma de gel, crema o cualquiera de las formas descritas en la presente descripción.

En otro aspecto, se describen métodos para tratar una lesión al sistema nervioso central. El método descrito comprende administrar un compuesto antisentido a un sitio proximal a una herida preexistente del sistema nervioso central en asociación con un procedimiento quirúrgico realizado en un paciente para tratar dicha lesión al sistema nervioso central, en donde dicho compuesto antisentido se dirige a al menos aproximadamente 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina que tiene una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31. En ciertos casos del método, el compuesto antisentido se administra para reducir la pérdida neuronal debido a un trauma físico a la médula espinal. En ciertos casos del método, el compuesto antisentido se administra a un sitio adyacente a una herida que es el resultado de un trauma. En ciertos casos del método, el compuesto antisentido se administra a un sitio adyacente a una herida que es el resultado de una cirugía. En ciertos casos del método, el compuesto antisentido se administra a un sitio adyacente a una lesión en la médula espinal. En ciertos casos del método, el compuesto antisentido se dirige a la conexina 43 y se administra para regular la división y el crecimiento de las células basales epiteliales. En ciertos casos del método, el compuesto antisentido promueve la cicatrización de heridas. En ciertos casos del método, el compuesto antisentido reduce la inflamación. En ciertos casos del método, el compuesto antisentido disminuye la formación de cicatrices. En ciertos casos del método, la lesión al sistema nervioso central es una lesión en la médula espinal. En ciertos casos del método, el compuesto antisentido se administra a un paciente al menos aproximadamente 24 horas después de un trauma físico a la médula espinal.

En ciertos casos del método, el compuesto antisentido se usa en asociación con un procedimiento de implantación quirúrgica. En ciertos casos adicionales del método, el procedimiento de implantación quirúrgica se asocia con un implante tratado previamente con compuesto antisentido para promover la cicatrización de heridas. En otro aspecto, se describen compuestos antisentido capaces de promover la regeneración de neuronas en asociación con un procedimiento para el tratamiento de una herida preexistente en un paciente caracterizado por la pérdida neuronal. En ciertos casos, los agentes son compuestos antisentido de hasta 40 nucleobases de longitud que se dirigen a al menos aproximadamente 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina humana y el compuesto antisentido inhibe la expresión de uno o más conexinas humanas en asociación con un procedimiento para promover la regeneración de neuronas para el tratamiento de una herida preexistente en un paciente. La herida incluye las caracterizadas por la pérdida neuronal. Las conexinas que pueden ser diana incluyen las conexinas que tienen una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31. En estos casos, los compuestos antisentido pueden administrarse a un paciente al menos 24 horas después de un trauma físico a la médula espinal de dicho paciente que dio como resultado una pérdida neuronal. Los compuestos antisentido pueden administrarse a un paciente en más de 24 horas después de un trauma físico a la médula espinal durante períodos de tiempo de semanas, meses o años después del trauma físico que dio como resultado una pérdida neuronal.

En ciertos casos descritos de composiciones y métodos farmacéuticos, el compuesto antisentido se dirige a al menos aproximadamente 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica conexina 30 humana o conexina 37 humana. Preferentemente, el compuesto antisentido inhibe la expresión de una proteína conexina humana 30 o 37 en células asociadas con el ojo de un paciente. Otras composiciones farmacéuticas comprenden un compuesto antisentido dirigido a al menos aproximadamente 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina (por ejemplo, humana) que tiene una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 12-31, y preferentemente el compuesto antisentido inhibe la expresión de una conexina humana en asociación con un procedimiento para promover la regeneración de neuronas para el tratamiento de una herida preexistente en un paciente que se caracteriza por la pérdida neuronal.

Composiciones farmacéuticas

Se describen además composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido. En un caso, se describe una composición farmacéutica para reducir el daño tisular asociado con un procedimiento oftálmico (por ejemplo, cirugía), de manera que la composición farmacéutica se formula para la administración tópica o local al ojo de un sujeto y comprende un compuesto antisentido presente en una cantidad suficiente para inhibir la expresión de una proteína conexina humana en células asociadas con el ojo del sujeto. En ciertos casos, el compuesto antisentido se dirige a al menos aproximadamente 8 nucleobases de un ácido nucleico que codifica una conexina (por ejemplo, humana) que tiene una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 1231. En ciertas modalidades, la composición farmacéutica para su uso en la invención incluye un portador farmacéuticamente aceptable que comprende un gel o ácido plurónico tamponado, por ejemplo hasta aproximadamente 30 % de ácido plurónico en solución salina tamponada con fosfato. La composición antisentido puede comprender diferentes cantidades de ácido o gel plurónico, incluyendo, sin limitación, cantidades de hasta aproximadamente 5 % de ácido plurónico en solución salina tamponada con fosfato, hasta aproximadamente 10 % de ácido plurónico en solución salina tamponada con fosfato, hasta aproximadamente 15 % de ácido plurónico en solución salina tamponada con fosfato, hasta aproximadamente 20 % de ácido plurónico en solución salina tamponada con fosfato, hasta aproximadamente 25 % de ácido plurónico en solución salina tamponada con fosfato y hasta aproximadamente 30 % de ácido plurónico en solución salina tamponada con fosfato.

Los compuestos antisentido para su uso en la invención pueden incluir, además, compuestos bioequivalentes, que incluyen sales y profármacos farmacéuticamente aceptables. Esto pretende abarcar cualquiera de sales, ésteres o sales de tales ésteres farmacéuticamente aceptables, 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 de este biológicamente activo. En consecuencia, por ejemplo, la descripción se refiere, además, a las sales farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos y profármacos de tales ácidos nucleicos. Las "sales farmacéuticamente aceptables" son sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos descritos en la presente descripción: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto progenitor y no imparten efectos toxicológicos no deseados a estos (ver, por ejemplo, Berge y otros, J. of Pharma Sci. 1977, 66, 1-19).

Para los oligonucleótidos, los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc.; (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 de aniones elementales tales como cloruro, bromuro y yoduro.

Los oligonucleótidos para el uso en la invención pueden prepararse adicionalmente o alternativamente para administrarse en una 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 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 antisentido pueden formularse en una composición farmacéutica, que puede incluir portadores, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes activos de superficie, lípidos neutros o catiónicos, complejos de lípidos, liposomas, mejoradores de la penetración, compuestos portadores farmacéuticamente aceptables y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables 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 la administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, liposomas, diluyentes y otros aditivos adecuados. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los oligonucleótidos para su uso en la invención pueden incluir mejoradores de la penetración para mejorar el suministro alimentario de los oligonucleótidos. Los mejoradores 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* 1991, 8, 91-192; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1990, 7, 1-33). Pueden incluirse uno o más mejoradores de la penetración de una o más de estas categorías amplias.

Diversos ácidos grasos y sus derivados que actúan como mejoradores 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 (alias 1- monooleoil-rac-glicerol), dilaurin, ácido caprílico, ácido araquidónico, gliceril 1-monocaprato, 1- dodecilazaciloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, mono y diglicéridos y sales fisiológicamente aceptables de estos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.). Lee y otros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1990, 7, 1; El-Hariri y otros, *J. Pharm. Pharmacol.* 1992 44,651-654).

Las funciones fisiológicas de la bilis incluyen la facilitación de la dispersión y la absorción de lípidos y vitaminas solubles en grasa (Brunton, Capítulo 38 en: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9na Ed., Hardman y otros McGraw-Hill, Nueva York, N. Y., 1996, páginas 934-935). Diversas sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan como mejoradores 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 mejoradores de la penetración. Por ejemplo, las sales biliares pueden usarse en combinación con ácidos grasos para realizar formulaciones complejas. Los agentes quelantes incluyen, pero no se limitan a, etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5- metoxisalicilato y homovanilato), derivados N-acilo de colágeno, derivados laureth-9 y N-aminoacilo de beta-dicetonas (enaminas) [Lee y otros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1990, 7, 1-33; Buur y otros, *J. Control Rel.* 1990, 14, 43-51). Los agentes quelantes tienen la ventaja añadida de que también sirven como inhibidores de la DNasa.

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

Como se usa en la presente descripción, "compuesto portador" se refiere a un ácido nucleico, o análogo de este, que es inerte (es decir, no tiene actividad biológica por sí) pero se reconoce como un ácido nucleico mediante 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 portador, típicamente con un exceso de la última sustancia, puede dar como resultado 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 portador y el ácido nucleico por un receptor común. A diferencia de un compuesto portador, un "portador farmacéuticamente aceptable" (excipiente) es un solvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser líquido o sólido y se selecciona con la manera de administración planificada para proporcionar el volumen, consistencia, etc. deseados, cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Los portadores farmacéuticamente aceptables típicos incluyen,

pero no se limitan a, agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); rellenos (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etil celulosa, poliácridatos o hidrógeno fosfato de calcio, etc); lubricantes (estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato sódico, acetato sódico, etc.); desintegrantes (por ejemplo, almidón, glicolato de almidón sódico, etc.); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio, etc.).

Las composiciones para su uso en la invención pueden contener adicionalmente otros componentes adyuvantes encontrados 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 compatibles adicionales 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 para su uso en la presente invención, tales como tintes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizadores. Sin embargo, cuando se añaden, tales materiales no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones descritas en la presente descripción.

Independientemente del método mediante el cual se introducen los oligonucleótidos en un paciente, los sistemas de dispersión coloidal pueden usarse como vehículos de suministro para mejorar la estabilidad in vivo de los oligonucleótidos y/o para dirigir los oligonucleótidos a un tipo de órgano, tejido o célula particular. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen, pero no se limitan a, complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, liposomas y complejos de lípidos:oligonucleótidos 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 exteriores compuestas de lípidos dispuestos en una configuración bicapa (ver, en general, Chonn y otros, Current Op. Biotech. 1995,6,698-708).

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

Los polinucleótidos antisentido pueden administrarse tópicamente (en el sitio a tratar). Preferentemente, los polinucleótidos antisentido se combinan con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica. Los portadores y diluyentes adecuados incluyen soluciones salina isotónicas, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. La composición puede formularse para la administración parenteral, intramuscular, intracerebral, intravenosa, subcutánea o transdérmica. La absorción de ácidos nucleicos por las células de mamífero se mejora mediante varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo, las que usan agentes de transfección. La formulación que se administra puede contener tales agentes. El ejemplo de estos agentes incluye agentes catiónicos (por ejemplo, fosfato cálcico y DEAE- dextrano) y lipofectantes (por ejemplo, lipofectamTM y transfectamTM).

En un aspecto, los oligonucleótidos pueden requerir un suministro específico de sitio. También requieren el suministro durante un período de tiempo prolongado. Aunque claramente el periodo de suministro dependerá tanto del sitio en el cual se va a inducir la regulación negativa y del efecto terapéutico que se desea, frecuentemente se requerirá un suministro continuo durante 24 horas o más. En un aspecto de la presente invención, esto se logra mediante la inclusión de los compuestos antisentido en una formulación junto con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable, particularmente en forma de una formulación para la administración tópica. En particular, las formulaciones tópicas tales como cremas, gotas, y otros descritos en la presente descripción pueden emplearse para regular la división y el crecimiento de células basal epiteliales (mediante el uso de compuestos antisentido dirigidos a conexina 43) y la queratinización de la capa externa (mediante el uso de compuestos antisentido dirigidos a la conexina 31.1).

Las formulaciones para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, atomizadores, líquidos y polvos. Los portadores farmacéuticos convencionales, acuosos, polvos o bases aceitosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o convenientes. También pueden ser útiles condones recubiertos, guantes y similares. Las composiciones para la administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sobres o tabletas. Pueden ser convenientes los espesantes, agentes saborizantes, diluyentes, emulsionantes, auxiliares dispersantes o aglutinantes. Las composiciones para la administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. En algunos casos puede ser más eficaz 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.

Se considera que la formulación de las composiciones terapéuticas y su administración posterior están dentro de la

experiencia en la técnica. La dosificación es dependiente de la gravedad y capacidad de respuesta del estado de la enfermedad a tratar, con el transcurso del tratamiento que durará desde varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución del estado de la enfermedad. Los programas de dosificación óptimos pueden calcularse a partir de las mediciones de acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden estimarse basado en la EC50 que se encuentra que es eficaz *in vitro* y en modelos animales *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 mg/kg a 100 mg por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la técnica pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para la dosificación con base en los tiempos de permanencia medidos y las concentraciones del fármaco en los líquidos o tejidos corporales. Después del tratamiento exitoso, puede ser conveniente someter al paciente a una terapia de mantenimiento para evitar la recurrencia del estado de la enfermedad, en donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que varía de 0, 01 mg/kg a 100 mg por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, hasta una vez cada 20 años. En el tratamiento o prevención de las condiciones que requieren la modulación de conexina, un nivel de dosificación apropiado será generalmente de aproximadamente 0,001 a 100 mg por kg de peso corporal del paciente por día que puede administrarse en dosis únicas o múltiples. Preferentemente, el nivel de dosificación será de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 mg/kg por día.

Los oligonucleótidos descritos en la presente descripción pueden usarse en diagnósticos, terapias, profilaxis y como reactivos de investigación y en kits. Ya que los oligonucleótidos se hibridan a ácidos nucleicos que codifican conexina, los ensayos de sándwich, calorimétricos y otros ensayos pueden construirse fácilmente para explotar este hecho. La provisión de medios para detectar la hibridación de oligonucleótidos con los genes o ARNm de conexina puede lograrse rutinariamente. Tal provisión puede incluir conjugación enzimática, radiomarcaje o cualquier otro sistema de detección adecuado. También pueden prepararse kits para detectar la presencia o ausencia de conexina.

Los oligonucleótidos de esta invención también pueden usarse para propósitos de investigación. Por lo tanto, la hibridación específica exhibida por los oligonucleótidos puede usarse para ensayos, purificaciones, preparaciones de productos celulares y en otras metodologías que pueden ser apreciadas por los expertos en la técnica.

La conexina 43 que puede ser diana en ciertas modalidades de la invención puede ser, pero no se limita a lo siguiente.

Cx 43 humana, $\alpha 1$ (SEQ ID NO: 12)

LOCUS NM 000165 ARNm lineal de 3088 pb PRI26-OCT-2004 DEFINICIÓN Proteína de unión de tipo hendidura de Homo sapiens, alfa 1, 43 kDa (conexina 43) (GJA1), ARNm.

```

1 acaaaaaagc tttacgagg tatcagcact tttcttcat taggggaag gcgtaggaa
5 61 agtaccaaac agcagcggag tttaaactt taaatagaca ggctgagtg cctgaactg
121 ccttttcat ttactcatc ctccaaggag tcaatcact tggcgtgact tcactactt
181 taagcaaaag agtgggtgcc aggaacatg ggtgactgga ggccttagg caaactcct
241 gacaaggtc aagcctact aactgctgga gggaagggtg ggctgctagt actttcatt
301 ttccgaatcc tgctgtggg gacagcgggt gagtcagcct ggggagatga gcagtctgcc
45 361 tttcgttga acactcagca acctggtgt gaaaatgtct gctatgaca gtcttccca
421 atctctcatg tgcgctctg ggtcctcag atcatattg tctctgacc cacactctg
481 tacctggctc atgtgttcta tgtgatgca aaggaagaga aactgaaca gaaagaggaa
541 gaactcaagg ttgcccaca tgatgggtc aatgtggaca tgacttgaa gcagattgag
601 ataaagaagt tcaagtacg tattgaagag catggaagg tgaatgacg aggggggtg
50 661 ctgcaaacct acatcatcag tctctctc aagtctatc ttgaggtgc cttctgtctg
721 atccagtggt acatcatggt atcagcttg agtgctgtt acactgcaa aagagatccc
781 tgccacatc aggtgactg tttctctct cgtccacgg agaaaacct ctctcatc
841 tcatgctgg tgggtcctt ggtgcctg gcctgaata tcattgaact ctctatgtt
901 ttctcaagg gcgtaagga tggggttaa ggaaagagc accctacca tgcgaccagt
55 961 ggtgcctga gccctgcaa agactgtggg tctcaaaaat atgcttatt caatggctg
1021 tctcaccia ccgctcccct ctgcctatg tctctctg ggtacaagct ggttactgg
1081 gacagaaca attcttctg ccgcaattc acaagcaag caagtgagca aaactgggt
1141 aattacagt cagaacaaaa tcgaatggg caggcggaa gcaccatct taactccat
1201 gcacagcct ttgattccc cgtatgata cagaattcta aaaaactagc tgctggacat
60 1261 gaattacagc cactagccat tgggaccag cgacctca gcagagccag cagtctgccc
1321 agcagcagac ctggcctga tgacctggag atctagatac aggttgaaa gcatcaagat
1381 tccactcaat tgggagaag aaaaagggt ctgtagaag tgcaccagg gttaattttg
1441 atccggtgga ggtgtactc aacagccta tcatgaggc ttagaaaaca caagacatt
1501 agaataccta ggtcactgg ggtgtatgg ggtagatggg tggagagga ggggataaga
65 1561 gaggtgatg ttggtatta aagtatgga tcaagaac ttagattata aataagatt
1621 ccattaggtg atacatgat aagggtttt tctcccgcga aacacccta agaattggtc
    
```

ES 2 749 374 T3

1681 tgtgtatgtg aatgagcggg tggaattgt ggctaaatat tttgtttta ccaagaaact
 1741 gaaataaact tggccaggaa taaatacttc ctgaacatct taggtcttt caacaagaaa
 1801 aagacagagg atgtcccta agtccctgct aaaacattcc atgttaaaa ttgcacttt
 1861 gaaggaagc ttttaggcc tgaccctcca ggtgtcaatg gactgtgct actataat
 5 1921 tttattctg gtaacagttt aaaattcaga caaggccac agaataagat ttccatgca
 1981 ttgcaaata cgtatattct tttccatcc actgcaaca taccattacc atcactttt
 2041 catcattct cagctactac tcacattcat ttaattggtt ctgtaaacat tttaagaca
 2101 gttgggtgt cacttaacat tttttttt tgagctaaag tcagggaatc aagccatgct
 2161 taataatkaa caatcactta tatgtgtgic gaagagtgtg tttgtttgt catgtattg
 10 2221 tacaagcaga tacagtataa actcacaac acagattga aaataatgca catatgggt
 2281 tcaaattga accttctca tggattttg tgggtgggc caataggtg ttacattat
 2341 ataattcctg ctgtggcaag taaagcacac tttttttt tcctaaaatg ttttccctg
 2401 tgtatcctat tatggatact ggtttgtta attatgattc tttatttct ctcttttt
 2461 taggatatag cagtaatgct attactgaaa tgaatttct tttctgaaa tgaatcatt
 15 2521 gatgctgaa tgatagaatt ttactactgt aaacaggctt tagtcattaa tggagagac
 2581 ttgaaaaaaa tgcctagagt ggactatkaa atgtgcctaa atgaatttg cagtaactg
 2641 tattctggg ttttctact taatacacag taattcagaa ctgtattct attatgagt
 2701 tagcagtct tggagtgac cagcaacttt gatgtttgca ctaagatttt atttgaatg
 2761 caagagaggt tgaagagga ttcatagta cacatacaac taattattt gaactatg
 20 2821 ttgaagacat ctaccagtt ctcaaagtc ctttttaaa actcatcaca gaagattgt
 2881 gaaaatgctg agtatgacac ttttctct gcattgatgt cagctacata aacagtttg
 2941 tacaatgaaa attactaatt tgtttgacat tccatgtaa actacggta tttcagct
 3001 cattgatgt aatgtagacc tagtccatca gatcatgtt tctggagagt gttctttt
 3061 caataaagt ttaatttagt ataaacat

25 //
 Los ejemplos de conexas descritos en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a los siguientes.
 Cx 46 humana, $\alpha 3$ (SEQ ID NO: 13)

30 LOCUS NM 021954 ARNm lineal de 1308 pb PRI27-OCT-2004 DEFINICIÓN Proteína de unión de tipo
 hendidura de Homo sapiens, alfa 3, 46 kDa (conexina 46)
 (GJA3), ARNm.

1 atggcgact ggagcttct ggaagactc ttgaaaatg cacaggagca ctccacggtc
 61 atcggcaagg tttggctgac cgtgctgttc atctccgca tcttgggtct gggggccg
 35 121 gcggaggacg tgggggcca tgagcagta gacttccct gcaacacca gcagccggc
 181 tgcgagaacg tctgctcga caggccctc cccatctcc acatccgctt ctggcgctg
 241 cagatcatct tctgtccac gccaccctc atctacctg gccacgtgct gcacatgct
 301 cgcattgaa agaagaaga agagaggag gaggaggag agctgaagag agagagccc
 361 agcccaagg agccaccgca ggacaatcc tctgctcgg acgaccgag cagggtgag
 40 421 atggccggg cgctgctgc gacctacgc ttcaacatc tctcaagac gctgtcag
 481 gtggcctca tgcggcca gtacttctg tacggctcg agctgaagcc gctctaccg
 541 tgcgaccgt ggccctgcc caacacggg gactgctca tctccaggcc cagggaga
 601 accatctca tcatctcat gctggcggg gcctgctgct cctgctgct caaatgctg
 661 gagatcacc acctgggctg gaagaagctc aagcagggc tgaccagcc cctcggccc
 45 721 gacgctccg agcccccgt ggggacagc gatccccg cctgcccc cagctcccg
 781 cggcccgcc tggcatcgg gtcccacc tactatgag acaccgctg gccctggga
 841 caggccgag ccgtgggcta cccggggcc ccgcccag ccgaggact caaactgta
 901 gccctgacc aggcgagc aaaggccag tccccaagc tctacaacg ccaccacc
 961 ctgctgatga ctgagcaga ctggccaac caggcggcc agcggcagc cccggcgt
 50 1021 aaggcttacc cggcagcgc cagcctgca gccccagc ccgtcggcag cagctccc
 1081 cactcgcgc acgaggtga ggcgggccc gcgcccctg tctgtgatg gagcggcag
 1141 agtctggag ggagcgcct ggcagggacc cccaggagg aggagcagg cgtgaccac
 1201 cggcccaga tgaccagcc gccctgcc ctggagacc caggctggc cagcaaggcc
 1261 agcaggcca gcagcgggc gccagacc gaggacttg ccatctag

55 //
 Cx 37 humana, $\alpha 4$ (SEQ ID NO: 14)

60 LOCUS NM 002060 ARNm lineal de 1601 pb PRI26-OCT-2004 DEFINICIÓN Proteína de unión de tipo
 hendidura de Homo sapiens, alfa 4, 37 kDa (conexina 37)
 (GJA4), ARNm.

1 ctccggcct cgtcccacc tccacctgg ccgcccgca ggcagcggc ggagccggg
 61 agccatggg gactgggct tctgggaga gttgctggc caggctccg agcactcag
 121 cgtgtgggt aagatctgc tgacgtgct ctcatctc cgtatctca tctgggct
 65 181 gcccggcag tcagtgtgg gtgacgagc gtcagattc gagtgaaca cggccagcc
 241 aggtgcacc aacgtctgt atgaccagg ctcccctc tccacatcc gctactggg

ES 2 749 374 T3

301 gctgcagttc ctctctgca gcaacccac cctggctac ctggccatg tcatttacct
 361 gtctcggcga gaagagcggc tggcgcagaa ggagggggag ctgcgggcac tgccggccaa
 421 ggaccacag gtggagcggg cgctggccgg catagagctt cagatggcca agatctcgg
 481 ggagaagat ggtcgcctgc gcattccgcg agcactgatg ggcacctatg tcgccagtgt
 5 541 gctctgcaag agtgtgctag aggcaggctt cctctatggc cagtggcgc tgacggctg
 601 gaccatggag cccgtgttg tgtccagcg agcaccctgc ccctacctcg tggactgctt
 661 tgtctctgc cccacggaga agaccatctt catcatcttc atgttggtg tggactcat
 721 ctccctggtg ctaaacctgc tggagtggg gcacctgctg tgtcgtgcc tcagccgggg
 781 gatgagggca cggcaaggcc aagacgcacc cccgaccag ggcacctct cagaccctta
 10 841 cacggaccag ggtctcttc tacctcccc tggccagggg ccctcatccc caccatgccc
 901 caccataat gggctctcat ccagttagca gaactggcc aacctgacca cagaggagag
 961 gctggcgtct tcaggcccc ctctctct ggaccaccc cctcagaatg gccaaaaacc
 1021 cccaagtgt cccagcagct ctgctctaa gaagcagat gtagagggc ctgtggctta
 1081 gtcacccaa cagagggctc ctgagaagtc tggctgctg ggatgcccc tgccccctc
 15 1141 tgaaggctc tgacagatg actgggctgg ggaagcagat gcttgctggc catggagcct
 1201 cattgcaagt tgtcttgaa cacctgaggc ctctctggtg cccaccaggc actacggctt
 1261 cctctccaga tgtgcttgc ctgagcacag acagtcagca tggatgctc ttggccaagg
 1321 gtactggggc cctctggcct ttgacagctg atccagagga acccagagcc aacttcccc
 1381 aacctcacc tatggaacag tcacctgtgc gcagggtgct ctaaacct ctctcacag
 20 1441 gaaaaggcgg atgaggctg ctgggtcagc ctgatgcga cagacagagc ttgtccgga
 1501 ttggccctg tcaaggggac tggctgctg tttcatcac tcttctag ttctactgt
 1561 caagctctg aaataaacag gacttgatca caaaaaaaaa a

//

Cx 40 humana, α5 (SEQ ID NO: 15)

25 LOCUS NM 005266 ARNm lineal de 2574 pb PRI27-OCT-2004 DEFINICIÓN proteína de unión de tipo hendidura de Homo sapiens, alfa 5, 40 kDa (conexina 40) (GJA5), variante de transcripción A, ARNm.

1 gcaaaaagcg tgggcagtg gagaagaagc agccagagtg tgaagaagcc cacggaagga
 30 61 aagtcaggagg aggaggaaaa gaagcagaag tttggcatc tgtccctgg ctgtgccaag
 121 atgggagatt ggagcttct gggaaatttc ctggaggaag tacacaagca ctgcacctg
 181 gtaggcaagg tctggctcac tgcctcttc atattccgta tgcctgctt gggcacagct
 241 gctgagctt cctgggggga tgagcaggct gatttccggt gtgatacgt tcagcctggc
 301 tgccagaatg tctgtacga ccaggcttc cccatctccc acattcgcta ctgggtgctg
 35 361 cagatcatct tctctccac gccctctctg gtgtacatgg gccacgcat gcactgtg
 421 cgcagtcagg agaagcgcaa gctacgggag gccgagaggg ccaaagaggt cgggggctc
 481 ggctctacg agtaaccggt gcagagaaag gcagaactgt cctgtggga ggaagggat
 541 ggaaggattg cctccaggg cactctgctc aacacctatg tgtcagcat cctgatccg
 601 accacatgg aggtgggctt cattgtggc cagtactca tctacggaat ctctgacc
 40 661 accctgatg tctgcccag gactccctgt cccaccggg tcaactgta cgatccgg
 721 cccacagaga agaattgctt cattgtctt atgctgctg tggctgact gtcccctc
 781 cttagcctgg ctgaactta ccacctggg tggagaaga tcagacagcg atttgcaaa
 841 ccgcgagc acatgctaa gtccagctt tctggcccct ctgtgggcat agtccagagc
 901 tgcaaccac cccccgact taatcagtc ctggagaatg gccctggggg aaaattctc
 45 961 aatccctca gcaataatat ggctcccaa caaacacag acaacctgt caccgagcaa
 1021 gtacgaggc aggagcagac tctggggaa ggttcatcc aggttcgta tggcagaag
 1081 cctgaggtc ccaatggagt ctaccaggt caccgcttc cccatggcta tcatgtgac
 1141 aagcagctc ttagtaaggc cagcagcaag gcaaggctag atgacctat agtggacc
 1201 tccttatgg gaggatcagg accagggtgg acaaaggag gtcagagaa gaagacgtg
 50 1261 tccctctga actgatgct tctactgac atcactgct ggctccttg agccccggg
 1321 ctcaatgacg ttgctcatta attctagaaa ctataaccag ggctctggga tagtaagaga
 1381 ggtgacaacc caccagact gcagttccct cccaccctc taccagat acgaagcct
 1441 tcagattact catgaacag gtagagggg aagaagggaa gcatggcaaa agctggcctg
 1501 gaagggatag ccagagggat agaatgact tctctaca taccagcagc ataccaatg
 55 1561 cgttctctaa gttctacct cctgacctg atcaccctc ctctccaag gaagagctca
 1621 aagtcccag ccaatagaca gcatgaatca aggaactgc attatgtg ctctgaatc
 1681 tgtgtctcc atggaccatt cctcggagta gtggtgagat ggcttgggt tgccctggc
 1741 ttctctccc tctactcag cttaaaaagg gcttctgga acttaccag cagcctcagc
 1801 tttaaaaatg ccttggatg tacctctggc aaatgcccc ccttggatg gttgcaacct
 60 1861 ttctctctg tagggtgtac acctagcctg tgcaggtgc agccctgcta gggagtact
 1921 gtacacaaa acttactggt aattctgct aacatctgc accctgagc tctttacag
 1981 ttcaatccaa tgatagaac catccctcc ctttctctt tggctgtca cccagccatt
 2041 ccctgaaggc cttaccaaa ggaatatcca agaagctgt gtcccctc gaacctgac
 2101 cagatcatca gccactgag ccagtggat tccccaggc ctgttaaaa caaagaaagc
 65 2161 atgtacctc tcagattccc ctgtggaaa aaaaaattc gctgtgaaga tgaataaaa
 2221 aatggagaga aaactgga aaactatct cccctctat ttactctt tctgactgc

ES 2 749 374 T3

2281 caacttagtg ccaagaggag gtgtgatgac agctatggag gccccagat ctctctccc
 2341 tggaggcctt agcaggggca aggaaatagt aggggaatct ccagctctct tggcagggcc
 2401 tttatftaaa gagcgcagag attcctatgt ctccctagtg cccctaata gactgccaag
 2461 tgggggctgt agaaaagcct tgcttcccc agggattggc ctggtctctg taitcactgg
 5 2521 atccataatg ggttgctgtt gttttggatg aaggtaaacy atgcttggaa ttgg
 //
 Cx 45 humana, $\alpha 7$ (SEQ ID NO: 16)

10 LOCUS NM 005497 ARNm lineal de 1191 pb PRI23-DEC-2003 DEFINICIÓN proteína de unión de tipo
 hendidura de Homo sapiens, alfa 7, 45 kDa (conexina 45) (GJA7), ARNm.

1 atgagttgga gctttctgac tgcctgcta gaggagattc acaaccattc cacattttg
 61 gggagatct ggctcactgt tctgattgc ttccggatcg tccttacagc tgtaggagga
 121 gaatccatct attacgatga gcaaagcaaa ttgtgtgca acacagaaca gccgggctgt
 15 181 gagaatgtct gttatgatgc gtttgacact ctctccatg tacgcttctg ggtgtccag
 241 atcatcctgg tggcaactcc ctctgtgatg tacctgggct atgctatcca caagattgcc
 301 aaaatggagc acggtgaagc agacaagaag gcagctcgga gcaagcccta tgcaatgcgc
 361 tggaaaacaac accgggctct ggaagaaacg gaggaggaca acgaagagga tcctatgatg
 421 tatccagaga tggagttaga aagtataag gaaaataaag agcagagcca acccaaact
 20 481 aagcatgatg gccgacgacg gattcgggaa gatgggctca tgaaaatcta tgtgctgac
 541 ttgctggcaa ggaccgtgtt tgaggtgggt ttctgatag ggcagtattt tctgtatggc
 601 ttccaagtcc acccgtttta tgtgtgcagc agacttctt gtcctcataa gatagactgc
 661 tttatttcta gaccactga aaagaccatc ttctcttga taatgatgg tttacaggc
 721 ctttgcctct tgcttaacat ttgggagatg ctccatttag ggtttgggac cattcgagac
 25 781 tactaaaca gtaaaaggag ggaactgag gatccgggtg ctataatta tccttact
 841 tggatacac catctgtcc cctggctat aacattgctg tcaaacaga tcaaatccag
 901 tacaccgaac tgcctaatgc taagatcgcc tacaagcaaa acaaggccaa cacagcccag
 961 gaacagcagt atggcagcca tgaggagaac ctcccagctg acctggaggc tctgcagcgg
 1021 gagatcagga tggctcagga acgcttggat ctggcagttc aggcctacag tcacaaaac
 30 1081 aaccctcatg gtccccggga gaagaaggcc aaagtgggtt ccaagctgg gtccaacaaa
 1141 agcactgcca gttagcaaatc aggggatggg aagaactctg tctggattta a
 //
 Cx 50 humana, $\alpha 8$ (SEQ ID NO: 17)

35 LOCUS NM 005267 ARNm lineal de 1362 pb PRI 26-OCT-2004 DEFINICIÓN proteína de unión de tipo
 hendidura de Homo sapiens, alfa 8, 50 kDa (conexina 50) (GJA8), ARNm.

1 agcgccaaga gagaaagagc acatatttct ccgtgggaca ctcttctat tgggtgggtga
 61 gaaatgggag actggagttt cctggggaac atcttgagg aggtgaatga gactccacc
 40 121 gtcacggca gagtctgct caccgtgctt tcatcttcc ggatcctcat ccttggcagc
 181 gccgcagagt tctgtgggg ggatgagcaa tccgactcg tgtgcaacac ccagcagcct
 241 ggctcagaga acgtctgcta cgacgaggcc ttcccatct cccacattcg cctctgggtg
 301 ctgcagatca tcttctctc caccctgccc ctgatgtacg tgggcaagc ggtgcactac
 361 gtccgatgg aggagaagcg caaaagccgc gacgaggagc tggccagca ggcggggact
 45 421 aacggcggcc cggaccaggc cagcgtcaag aagagcagcg gcagcaagg cactaagaag
 481 ttccggctgg aggggacct gctgaggacc tacatctgcc acatcatct caagaccctc
 541 tttgaagtgg gctcatctg ggccactac ttctgtacg ggttccgat cctgcctctg
 601 taccgctgca gccggtggcc ctgcccacat gtggtggact gctctgtgc ccggcccagc
 661 gagaaaacca tctcatctt gttcatgtt tctgtggcct ctgtgtccct attctcaac
 50 721 gtgatggagt tgagccact gggcctgaag gggatccgt ctgcctgaa gaggcctgta
 781 gagcagccc tgggggagat tctgagaaa tccctccat ccattgctgt ctctccatc
 841 cagaaagcca agggctatca gcttctaga gaagagaaaa tctttcca ctattcccc
 901 ttgaccgagg ttgggatgtt ggagaccagc cactgcctg ccaagcctt caatcagttc
 961 gaggagaaga tcagcacag acccctggg gactgtccc ggggctacca agagacactg
 55 1021 ccttctacg ctacggtggg ggcacaagaa gtggaggcgc aggggcccgc tgcagaggag
 1081 ggagccgaac ccgaggtgg agagaagaag gaggaagcag agaggctgac cacggaggag
 1141 caggagaagg tggcgtgccc agagggggag aaagtagaga cccccgagt ggataaggag
 1201 ggtgaaaaag aagagccgca gtcgagaag gctgcaaac aagggctgcc agctgagaag
 1261 acaccttacc tctgtccaga gctgacaaca gatgatgcca gaccctgag caggctaagc
 60 1321 aaagccagca gccgagccag gtcagacgat ctaaccgtat ga
 //
 Cx 36 humana, $\alpha 9$, $\gamma 1$ (SEQ ID NO: 18)

65 LOCUS NM 020660 ARNm lineal de 966 pb PRI03-SEP-2004 DEFINICIÓN conexina 36 de Homo sapiens
 (CX36), ARNm.

ES 2 749 374 T3

1 atgggggaaat ggaccatctt ggagaggctg ctagaagccg cgggtcagca gactccact
 61 atgatcgga ggtactctgt gactgtggtg gtgatctcc ggatcctcat tgtggccatt
 121 gtgggggaga cgggtgacga tgatgagcag accatgtttg tgtgcaacac cctgcagccc
 181 ggctgaacc aggcctgcta tgaccgggcc tccccatct cccacatacg ttactgggtc
 5 241 ttccagatca taatggtgtg taccocccagt ctttgcctca tcactactc tgtgcaccag
 301 tccgccaagc agcgagaacg ccgctactct acagtctcc tagccctgga cagagacccc
 361 cctgagtcca taggaggtcc tggaggaact ggggggtggg gcagtgtgtg gggcaaacga
 421 gaagataaga agttgcaaaa tgcattgtg aatggggtgc tgcagaacac agagaacacc
 481 agtaaggaga cagagccaga ttgttagag gtaaggagc tgactccaca cccatcaggt
 10 541 ctacgcactg catcaaaatc caagctcaga aggcaggaag gcatctccc cttctacatt
 601 atccaagtg tgtccgaaa tggcctggaa atgggttcc tgggtggcca atattttctc
 661 tatggcttta gtgtcccagg gttgtatgag tgaaccgct acccctgcat caaggaggtg
 721 gaatgtatg tgtcccggcc aactgagaag actgtcttc tagtgttcat gtttgcgtg
 781 agtggcatct gtgtgtgtc caactggct gaactcaacc acctgggatg gcgcaagatc
 15 841 agctggctg tggagggggc tcaggccaag agaaagtcaa tctatgatg tcgtaacaag
 901 gacctgcaa gggctaggt tcccaatit gccaggactc agtccagtg cctgcctat
 961 gtgtga
 //

//

Cx 59/58 humana, α 10 (SEQ ID NO: 19)

20 LOCUS NM 030772 ARNm lineal de 1901 pb PRI 27-OCT-2004 DEFINICIÓN proteína de unión de tipo
 hendidura de Homo sapiens, alfa 10, 59 kDa (GJA10), ARNm. 1 caggagtggtg tgggtgcaac actgtactcc agcctgggca
 acagaggag actctgtctc

25 61 aacaacaaa caaacaaaga aaaaaccca cagctatcta gggaaaaagt aaagcaacca
 121 gcatatagaa gtgacatatt gttatattt caccataggt ttgcttaag aaatagtgct
 181 ccctcagaa tgaagaatc tatctgcctc ttattgatg tggatcagag ctaagatggc
 241 tgactaaaata aacatggggg actggaatct ccttgagat actctggagg aagtccacat
 301 ccactccacc atgattgaa agatctggct caccatcctg tcatattc gaatgctgt
 30 361 tctgggtgta gcagctgaag atgtctgaa tgatgagcag tctggctca tctgcaatac
 421 agaacaacca ggctgcagaa atgtatgta cgaccaggcc ttctctatc cctcattag
 481 atactgggtt ctgcaggtga tattgtgtc tccacctc ctggtctaca tggccatgc
 541 atgtaccga ctgagagtic tggaggaaga gaggcaagg atgaaagctc agttaaagat
 601 agaactggag gaggtagagt ttgaaatgcc tagggatcgg aggagattgg agcaagagct
 35 661 ttgtcagctg gagaaaagga aactaaataa agtccactc agaggaacct tgccttgac
 721 ttatgtgata cacatttca ctgcctctg ggtgaaagt ggattcatga ttggacagta
 781 ccttttatat ggatttact tagagccgtc attaaagtgc catggccacc cgtgtccaaa
 841 tataatcgac tgtttgtct caagaccaac agaaaagaca atattcctat tatttatgca
 901 atctatagcc actatttcac tttcttaaa cattctgaa atttccacc taggtttta
 40 961 aaagattaaa agagggcttt ggggaaaata caagttgaag aaggaacata atgaattcca
 1021 tgcaaacaa gcaaaaacaa atgtagcaa ataccagagc acatctgcaa attcactgaa
 1081 gcgactccct tctgcccctg attataatc gttagtggaa aagcaaacac aactgcagt
 1141 gtaccctagt taaattcat cttctgtatt ccagccaaat cctgacaac atagtgtaaa
 1201 tgatgagaaa tgcattttg atgaacagga aactgtact tctaagaga ttccacact
 45 1261 tagtactagt ttagtcatc ttcaacacat cagttcaaac aatacaaaag aactcataa
 1321 aatatttga aaagaactta atgtaacca gttaatgaa aaaagagaaa ctgaaggcaa
 1381 agacagcaaa aggaactact actctagagg tcaccgttct atccaggtg ttgctataga
 1441 tggagagaac aacatgaggc agtcaccca aacagtttc tcttgccag ctaactgcca
 1501 ttgaaaccg cgggtgctta gagctacatg gggctcctc acagaacatg aaaaccggg
 50 1561 gtcacctc aaagtaacc tcaaggcca gttcagaaag ggcacagtca gaaccttcc
 1621 tcttcacaa ggagatttct aatcactga cattccaaac actgctgatt cttgggagg
 1681 gctgtcctt gagccagggt tggtcagaac ctgtaataat cctgtttgtc ctccaaatca
 1741 cgtagtctc ctaacgaaca atctcattg taggcgggtt cccacagatc ttcagatcta
 1801 aacagcgggt ggcttttga cattatata atatcagag aagtagccta gtgtctgtg
 55 1861 ggcacagaaa aaatagatag gggcagctc aaagaccagc t
 //

//

Cx 46.6/47 humana, α 12 (SEQ ID NO: 20)

60 LOCUS AY285161 ARNm lineal de 1311 pb PRI 19-MAY-2003 DEFINICIÓN conexina 47 de Homo sapiens,
 cds completos.

1 atgagctgga gcttctgac gggctgctg gaggagatcc acaaccactc caccttctg
 61 ggcaagggtg gctcaccgt gctggtgct tccgcatcg tctgacggc tgtggcgcc
 121 gaggcatct actcgacga gcaggccaag ttcacttgca acacgggca gccaggctg
 65 181 gacaacgtc gctatgacg ctctcgccc ctgtcgacg tgcgcttct ggtctccag
 241 attgtgtca tctccaccgc ctggtcatg tacctggct acgccgtgca ccgctggcc

ES 2 749 374 T3

301 cgtgcgtctg agcaggagcg gcgcccgcgc ctcccgcgc gcccgggcc acgcccgcgc
 361 ccccagagcg acctgccc cccgcacgccc ggctggcctg agcccgcga cctgggagag
 421 gaggagccca tgctgggctt gggcaggag gaggaggag aggagacggg ggcagccgag
 481 ggcgcccggc aggaagcgga ggaggcaggc gcggaggag cgtgcactaa ggcggtcggc
 5 541 gctgacggca aggcggcagg gacccccggc cgcaccgggc aacacgatgg gcggaggcgc
 601 atccagcggg agggcctgat gcgctgtac gtggcccagc tggggccag ggcagcttc
 661 gaggtggcct tctggtggg ccagtacctg ctgtacggct tcgagtgcg accgttctt
 721 cctgcagcc gccagccctg cccgcacgtg gtggactgct tcgtgtcgc ccctactgaa
 781 aagacggctt tctgtgtgt tatgtacgtg gtcagctgcc tgtcctgct gctcaacct
 10 841 tgtgagatgg cccacctggg ctggggcagc gcgcaggacg cggctgcggc ccgcccggc
 901 cccccggct cgcgccccc ccccgcgcc cgcgccccc cctgcgctt cctgcggcg
 961 gccgtggct tggcctgccc gccgactac agcctggtg tgcggggcggc cgagcgcct
 1021 cgggcatg accagaacct ggcaaacctg gccctgagg cgtgcgca cggggcagc
 1081 gctgggacc gcgaccggga cagttcggc tgcctggcc tcctgcgc ctcccgggg
 15 1141 cccccagag ccagccctg cgcgtcccgc acgggcagtg ctacctcgc gggcactgtc
 1201 ggggagcagg gccggcccgc caccacgag cggccaggag ccaagcccag ggctggctcc
 1261 gagaagggca gtgccagcag caggacggg aagaccaccg tgtgatctg a
 //

Cx 32 humana, β1 (SEQ ID NO: 21)

20 LOCUS BC039198-BC ARNm lineal de 1588 pb PRI 07-OCT-2003 DEFINICIÓN Proteína de unión de tipo hendidura de Homo sapiens, beta 1, 32 kDa (conexina 32, neuropatía de Charcot-Marie-Tooth, ligado a X), ARNm (clon de ADNc MGC:22506 IMAGE:4710239), cds completo.

25 1 agacattctc tgggaaaggc cagcagcagc caggtgtggc agtgacaggg aggtgtgat
 61 gaggcaggat gaactggaca gttttgaca cttgtctcag tggcgtgaac cggcattcta
 121 ctgccattgg ccgagtatgg ctctcggtca tcttcatct cagaatcatg gtgctgtgg
 181 tggctgcaga gagtgtgtgg ggtgatgaga aatcttctt catctgcaac aactccagc
 241 ctggctgcaa cagcgtttgc tatgaccaat tcttccccat ctcccatgtg cggctgtgtg
 30 301 cctgcagct catcctagt tccaccccag ctctcctcgt ggccatgcac tgggtcacc
 361 agcaacacat agagaagaaa atgctacggc ttgagggcca tggggacccc ctacacctg
 421 aggaggtgaa gaggcacaag gtccacatct cagggacact gtggtggacc tatgcatca
 481 gcgtgtgtt ccggctgtt ttgaggccg tcttcatgta tcttcttct ctgctctacc
 541 ctggctatgc catggtgccc ctggtcaagt gcgacgtcta cccctgccc aacacagtgg
 35 601 actgctctg gtcccggccc accgagaaaa ccgtcttcc cgtcttcatg ctgctgctt
 661 ctggcatctg catcatctc aatgtggccc aggtgtgtga cctcatcatc cggcctgtg
 721 cccgcccagc ccagcggccc tccaatccac ctcccgcaa gggctcggc ttcggcccac
 781 gcctctcacc tgaatacaag cagaatgaga tcaacaagct gctgagttag caggatggct
 841 cctgaaaga catactgccc cgcagccctg gcaccggggc tgggtgtgct gaaaagagcg
 40 901 accgctgctc ggctgtctga tggcacatac caggcaacct ccatccccc ccccgaccct
 961 gccctggggc agcccctct tctcccctg cggtgacacg gcctctgct gctggggatt
 1021 actgatcaaa aaccttctt cctggctac tcttctct cccggggcct tcttttgg
 1081 gactgtgagg ggtggggagc tagaggccac ctatgcccag gctcaagggt actgggagtg
 1141 tggctgccc ttgtgctc cacccttccc tcttctct cctctctct gggaccactg
 45 1201 ggtacaagag atgggatgct ccgacagcgt ctccaattat gaaactaat ttaacctgt
 1261 gctgtcagat accctgttct tggagtcaca tcagttagga gggatgtgg taagaggagc
 1321 agagggcagg ggtgtgtg acatgtgggt ggagaaggga gggtgccag cactagtaaa
 1381 ggaggaatag tctgtctg ccacaaggaa aaggaggagg tcttggggg gaggagtta
 1441 gggagagaga agcaggcaga taagtggag caggggttg tcaaggccac ctctgctct
 50 1501 agtcccaag gcctctct gcctgaaatg ttacacatta aacaggattt tacagcaaaa
 1561 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa
 //

Cx 26 humana, β2 (SEQ ID NO: 22)

55 LOCUS NM 004004 ARNm lineal de 2263 pb PRI28-OCT-2004 DEFINICIÓN proteína de unión de tipo hendidura de Homo sapiens, beta 2, 26 kDa (conexina 26) (GJB2), ARNm.

1 cggagcccct cggcggcgc cggcccagga cccgcctagg agcgcaggag ccccagcga
 61 gagaccccaa cgcgagacc cccgcccgg ccccggcgc ctctctccc acgcagagca
 60 121 aaccgcccag agtagaagat ggattggggc acgctgcaga cgatcctggg ggggtggaac
 181 aaacactcca ccagcattgg aaagatctg ctcaccgtcc tcttcttct tcgcattatg
 241 atcctcgtt tggctgcaaa ggaggtgtgg ggagatgagc agcccgactt tgtctgcaac
 301 accctgcagc caggctgcaa gaacgtgtg tacgatcact acttccccat ctccacatc
 361 cggctatgg cctgcagct gatctctgt tccacggcag cgtcctagt ggccatgac
 65 421 gtggcctacc gcagacatga gaagaagagg aagttcatca agggggagat aaagagtga
 481 ttaaggaca tgaggagat caaaaccag aaggtccgca tcgaaggctc cctgtgtgtg

541 acctacacaa gcagcatctt ctccggggtc atctcgaag ccgccttcat gtacgttctc
 601 tatgtcatgt acgacggctt ctccatgcag cggctgggtga agtgcaacgc ctggcctgt
 661 cccaacactg tggactgctt tgtgtcccg cccacggaga agactgtctt cacagtgttc
 721 atgattgcag tgtctggaat ttgcatcctg ctgaatgtca ctgaattgtg ttatttgcta
 5 781 attagatatt gttctgggaa gtcaaaaaag ccagttaac gcattgcccc gttgttagat
 841 taagaaatag acagcatgag agggatgagg caacccgtgc tcagctgtca aggctcagtc
 901 gccagcattt cccaacacaa agattctgac cttaaatac accattgaa acccctgtag
 961 gcctcagggt aaactccaga tgccacaatg gagctctgct cccctaaagc ctcaaaacaa
 1021 aggcctaatt ctatgctgt cttaatttc ttacttaaa gttagtcca ctgagacccc
 10 1081 aggctgttag ggggtattgg tgtaaggtag ttcatattt taaacagagg atacggcat
 1141 ttgttctt ctctgaggac aagagaaaaa agccagggtc cacagaggac acagagaagg
 1201 ttgggtgtc ctctgggggt tcttttggc aacttcccc acgttaaagg tgaacattgg
 1261 ttcttcat ttgttgaa gtttaact ctaacagtgg acaaagtac cagtgcctta
 1321 aactctgta cacittttg aagtgaaac ttgtagat gataggttat ttgatgtaa
 15 1381 agatgtctg gataccatta tatgtcccc ctgttcaga ggctcagatt gtaatagta
 1441 aatggatgt cctcgtctac tatgattaa ttgaaatat ggtctttgg ttatgaatac
 1501 ttgacgac agctgagagg ctgtctgtt tattcattgt ggtcatagca cctaacaaca
 1561 ttgtagcct aatcagtgta gacagactag aagttcctag tgatggctta tgatagcaaa
 1621 tggcctcatg tcaaatattt agatgtaatt ttgtgaaga aatacagact ggatgtacca
 20 1681 ccaactacta cctgtaata caggcctgtc caacacatct ccttttcca tgactgtgtt
 1741 agccagcatc ggaagaacg ctgatttaa gaggctgctt ggaatttta tgacacagt
 1801 accattaat ggggagaca aaatgggca ggggaggag aagtttctg cgttaaaaaac
 1861 agatttgaa agactggact ctaaattctg ttgattaaag atgagcttg tctactcaa
 1921 aagttgtt gcttaccct tcagcctcca atttttaag tgaaaatata actaataaca
 25 1981 tggaaaaaga atagaagcta agtttagat aatattgag cagatctata ggaagattga
 2041 acctgaatat tgccattatg ctgacatgg ttccaaaaa atggtactcc acatactca
 2101 gtgagggtaa gtatttctt gttgtcaaga atagcattgt aaaagcattt tgtaataata
 2161 aagaatagct ttaatgatat gcttgaact aaaaataatt tgtaatgat caaatacatt
 2221 taaaacatta aataataatc tctataataa aaaaaaaaaaaa aaa

30 //
 Cx 31 humana, β3 (SEQ ID NO: 23)

LOCUS NM 024009 ARNm lineal de 2220 pb PRI28-OCT-2004 DEFINICIÓN proteína de unión de tipo
 hendidura de Homo sapiens, beta 3, 31 kDa (conexina 31) (GJB3), variante de transcripción 1, ARNm.

35 1 gaactcttt cctggcacag gactcactgt gcccttccc gctgtgggta caaggctctc
 61 cccccacccc agctctccaa agcccaccgg cctcccctga gcccagggtc gacggcccgt
 121 cgcaccggga gggggggctc ccaggggtgc cccacgcacg gtcaagggtc cgcgccaagc
 181 ggggaccggg ctgggccgga agcgggcacg gtactcggc caaactagcg tggcgagtc
 40 241 ctgattgcag tcggacctgc cgcgcggca cttaacagt ttccgcccc
 301 tgatctcat ggagcctcg gacagcccag cccatggcca ccatgcccc catttcacg
 361 ctgaggaagc ggaggctcag acgggccacc agcccctccg gaggctggcc cgggagcgc
 421 tggcagcgc gggctagga gccggtccc tctgtctcc tctccgcg cgcccgggt
 481 gtgcccgcg tctgtgtgca ccaactgtga gccacgtcc ggcgcccctg cctctgctg
 45 541 gggccccggg gacgcgggt caggccaccg cgttgccag gccgctgag gtaggcacgg
 601 cccccaccag gcgcatgga ctggaagaca ctccaggccc tactgagcgg tgaacaag
 661 tactccacag cgttcggcg catctggctg tccgtgtgt tcttctcc ggtgctgta
 721 tacgtggtg ctgcagagcg cgtgtgggg gatgagcaga aggacttga ctgcaacac
 781 aagcagccc gctgcacaa cgtctgtac gacaactact tccccatc caacatccg
 50 841 ctctggccc tcagctcat ctctgcaca tgcccctgc tctgtgtcat cctgcagtg
 901 gcctaccgtg aggacggga gcgcccgcac gccagaaaac acggggacca gtgcgccaag
 961 ctgtacgaca acgacggca gaagcacgga ggctgtgtt ggacctacct gttcagcctc
 1021 atctcaagc tcatattga gttcctctc ctctactgc tgcacactct ctggcatggc
 1081 ttcaatagc cgcgctgtt gcagtgtcc aactgtggcc cctgcccac catctggac
 55 1141 tgctacatt cccgacctac cgagaagaaa atctcact acttcatgtt gggcgcctc
 1201 gccgtctga tctactcac catctgtgag ctctgtacc tcatctgcca cagggtctg
 1261 cgaggcctg acaaggaca gccctgagg ggttcagcc cctctctc cgccagccc
 1321 cctccacct ccgctgcca ccaagctg gttggagtg gggagtgga tccagacca
 1381 ggcaataaca agctcaggc ttcagcacc aacctgacc ccatctgacc acagggcagg
 60 1441 ggtggggcaa catcgggct gccaatggga catgcaggc ggtgtggcag gttgagaggt
 1501 cctacaggg ctgagtacc ccactctgag tctaactat tatgcaact tcttttggc
 1561 agatatttt tgacactgg aactgggtg tctagccgg tagagtaac ccacagccc
 1621 agtgccagcc ctcaaggac atagacttt aaacaagca attactatc tacgtgcct
 1681 gcaagggcc acttaggca ctgctagcag ggctcaacc aggaaggat caaccagga
 65 1741 agggatgac aggagagct tccctagga cataatgtt aagagaggtg agaagtgtc
 1801 ccaagcagac acaacagcag cacagaggtc tggaggccc aaaaaagt atgtctgccc

ES 2 749 374 T3

1861 tgggctagcc tcagcagacc taaggcatct ctactccctc cagaggagcc gccagattc
 1921 ctgcagtgga gaggaggtct tccagcagca gcaggtctgg agggctgaga atgaacctga
 1981 ctagaggttc tgagataacc cagaggtccc ccaggtcacc acttggtca gtggaagccc
 2041 tcttcccca aatctactc cctcagcctc aggcagtggt gctcccatct tctccccc
 5 2101 aactgtgctc aggtgtgtc cagccttca gaccctgctc ccagggactt ggggtgatgc
 2161 gctgatagaa catcctaag acagtttct tgaatcaat aaatactgtg tttataaaa
 //
 Cx30.3 humana, β4 (SEQ ID NO: 24)

10 LOCUS NM_153212 ARNm lineal de 1243 pb PRI27-OCT-2004 DEFINICIÓN proteína de unión de tipo hendidura de Homo sapiens, beta 4 (conexina 30.3) (GJB4), ARNm.

1 caaggctccc aaggcctgag tgggcaggta gcaccaggt atagacctc cacgtgcagc
 61 acccaggaca cagccagcat gaactggca tttctgcagg gctctgtgag tggcgtgac
 15 121 aagtactcca cagtgtgag ccgcatctgg ctgtctgagg tttcatctt tcgtgtgctg
 181 gtgtactgag tggcagcggg ggaggtgtgg gacgatgagc agaaggactt tctctgcaac
 241 accaagcagc ccggtctccc caacgtctgc tatgacgagt tcttccccgt gtcccacgtg
 301 cgctctggg ccctacagct catcctggtc acgtgccctc cactgctctg ggtcatgcac
 361 gtggcctacc gcgaggaacg cgagcgcaag caccacctga aacacgggcc caatgccccg
 20 421 tccctgtacg acaacctgag caagaagcgg ggcggactgt ggtggacgta ctgctgagc
 481 ctcatctca aggcggcctt gtagctggc tctctata tctccaccg cctctacaag
 541 gattatgaca tgccccgctt ggtggcctgc tccgtggagc ctgccccca cactgtggac
 601 tttacatct cccggcccac ggagaagaag gtcttcacct acttcatggt gaccacagct
 661 gccatctgca tctgtctcaa cctcagtga gttcttacc tgggtggca gaggtgcctg
 25 721 gagatctcg gccccaggca ccggcggcct cgggtccggg aatgcctacc cgatacgtgc
 781 ccaccatagc tctctcccga gggaggcacc cctgaggatg ggaactctgt cctaatgaag
 841 gctgggtcgg ccccagtgga tgcaggtggg tatccataac ctgcgagatc agcagataag
 901 atcaacaggt cccccccaca tgaggccacc caggaaaaaa ggcaggggca gtggcatcct
 961 tggcgtgaca ggggtgtgag gagggtggct gtgggggctc aggaagctcg cccaggggcc
 30 1021 aatgtgggag gttgggggta gtttggctcc tgggtcctga gcctcagggg agggaggtg
 1081 atagctactg gggatttgt atatggcaac agtatatgct aaacctcta ttaaatatga
 1141 ttttccagc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
 1201 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa
 //
 35 Cx31.1 humana, β5 (SEQ ID NO: 25)

LOCUS NM_005268 ARNm lineal de 1299 pb PRI 23-AUG-2004 DEFINICIÓN proteína de unión de tipo hendidura de Homo sapiens, beta 5 (conexina 31.1) (GJB5), ARNm.

1 atgaaattca agctgcttgc tgagtcctat tgccggctgc tgggagccag gagagccctg
 61 aggagtagtc actcagtagc agctgacgcg tgggtccacc atgaactgga gtatcttga
 121 gggactcctg agtgggttca acaagtactc cacagccttt gggcgcactc ggctgtctct
 181 ggtcttcatc tccgcgtgc tgggtacct ggtgacggcc gagcgtgtgt ggagtgatga
 241 ccacaaggac ttcgactgca atactcgcca gcccggtctc tccaacgtct gctttgatga
 45 301 gttcttccct gtgtcccatg tgcgcctctg ggcctgacg ctatctctgg tgacatgccc
 361 ctactgctc gtggatcagc acgtggccta ccgggaggtt caggagaaga ggcaccgaga
 421 agcccatggg gagaacagtg ggcgcctcta cctgaacccc ggcaagaagc ggggtgggt
 481 ctggtggaca tatgtctgca gcctagtgtt caaggcagc gtggacatcg ccttctcta
 541 tgtgtccac tcattctacc ccaaatatat cctccctctc gtgtcaagt gccacgcaga
 50 601 tccatgccc aatatagtg actgcttcat ctccaagccc tcagagaaga acattttcac
 661 cctcttcatg gtggccacag ctgcatctg catcctgctc aacctgtg agctcatcta
 721 cctgtgagc aagagatgac acgagtgctt ggcagcaagg aaagctcaag ccatgtgcac
 781 aggtcatcac ccccaggtt ccacctctc ctgcaaaaa gacgacctcc tttcgggtga
 841 cctcatctt ctgggctcag acagtcatc tctctctta ccagaccgcc cccgagacca
 55 901 tgtgaagaaa accatctgt gaggggctgc ctggactggt ctggcaggtt gggcctggat
 961 ggggaggctc tagcatctct cataggtgca acctgagagt gggggagcta agccatgagg
 1021 tagggcagg caagagagag gattcagacg ctctgggagc cagtctctag tctcaactc
 1081 cagccacctg ccccagctcg acggcactg gccagttccc cctctgctc gcagctcgg
 1141 tctctttct agaattgaaa tagtgagggc caatgccag ggttgagggg agggggcct
 60 1201 tcatagaaga acacacatgc gggcacctc atcgtgtgtg gccactgctc agaactta
 1261 aaaagcaac tcatttctg gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
 //
 Cx 30 humana, β6 (SEQ ID NO: 26)

LOCUS BC038934 ARNm lineal de 1805 pb PRI30-JUN-2004 DEFINICIÓN proteína de unión de tipo hendidura de Homo sapiens, beta 6 (conexina 30), ARNm (clon de ADNc MGC:45195 IMAGE :5196769), cds completo.

1 ctgggaagac gctggctcagt tcacctgccc cactgggtgt ttttaaacaa aattctgata
 61 caggcgacat cctcactgac cgagcaaaga ttgacattcg tatcatcact gtgcaccatt
 121 ggctctagg cactccagtg gggtaggaga aggaggtctg aaacctcgc agagggatct
 181 tgccctcatt cttgggtct gaaacactgg cagctgttg aaacaggact cagggataaa
 5 241 ccagcgcaat ggattggggg acgctgcaca ctttcatcgg ggggtgcaac aaacactcca
 301 ccagcatcgg gaaggtgtg atcacagtca tctttatit cagagtcag atcctcgtgg
 361 tggctgcca ggaagtgtg ggtgacgagc aagaggact cgtctgcaac acactgcaac
 421 cgggatgcaa aaatgtgtg tatgaccact tttcccggt gtccacatc cggctgtgg
 481 cctccagct gatctctgc tccaccccag cgctgctggt ggccatgcat gtggcctact
 10 541 acaggcacga aacctcgc aagttcaggc gaggagagaa gaggatgat ttaaagaca
 601 tagaggacat taaaagcag aaggttcgga tagaggggtc gctgtgtgg acgtacacca
 661 gcagcatct tttccgaatc atcttgaag cagccttat gtatgtgtt tactcctt
 721 acaatggga ccacctgccc tgggtgtga aatgtggat tgacctcgc cccaacctg
 781 ttgactgct tatttctagg ccaacagaga agacctgtt taccatttt atgattctg
 15 841 cgtctgtgatt ttcatcgtg ctaacgtgg cagagttgtg ctacctctg ctgaaagtgt
 901 gtttaggag atcaaagaga gcacagagc aaaaaatca cccaatcat gccctaaagg
 961 agagtaagca gaatgaaatg aatgagctga ttcagatag tggtaaaat gcaatcacag
 1021 gtttccaag ctaaacttt caaggtaaaa ttagctgctg ctaaggag acttctgtct
 1081 tctccaag gcaatacaca cctgaaagt cctctgtag cctgaagagt ttgtaaatga
 20 1141 cttcataat aaatagacac ttgagttac tttttagg atactgtct cttcataca
 1201 caacgtaac aaatagtgg tcatctctg aaaacaagag actgctgac aaaggagcat
 1261 tgcagctact ttgacaggtt cctttaagt ggactctctg acaagtggt tactttctga
 1321 aaatttata aactgtgtt gataaggaac atttatccag gaattgatac tttttagg
 1381 aaaagatatt ttataggct tggatgttt tagttctgac ttgaattta tataaagtat
 25 1441 tttataatg actggtcttc cttacctga aaaacatgct atgttagtt tagaattaca
 1501 ccacaagtat ctaaatggg aactacaaa gggctatct tgaatatt gtttgcat
 1561 gtctgtggc aaattgtga actgtcatga tacgcttaag gtgaaagtgt ttactgtc
 1621 aataatitt tactgtcttc tgaatgaga cgaacagtg tgaagcaga aggcctttt
 1681 aactcatcc tttccaatc attgcaaca actgaaatgt ggatgtgatt gctcaataa
 30 1741 agctcgtccc cattgcttaa gcctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
 1801 aaaaa
 //
 Cx31.9 humana, c1 (SEQ ID NO: 27)

35 LOCUS NM 152219 ARNm lineal de 2094 pb PRI23-AUG-2004 DEFINICIÓN proteína de unión de tipo
 hendidura de Homo sapiens, chi 1, 31,9 kDa (conexina 31.9) (GJC1), ARNm.

1 aaatgaaaga gggagcagga ggcgcccgtc ccagccacct ccaagggtcc ctggctcagc
 61 tctgacacc cagtcaccgc cccaggtgta gtggggtgg gtggcggtt aggggacca
 40 121 gggcgctgt gggacctgt taagtgtgg gtggggagga tctcaggaga tgggaggct
 181 ggaggcacag gaggccaggg aggagggaga agcctggtgc cgcactccca ccacgctggg
 241 gtaggagggc agggcacctc ccgacaaagg accctgtgag agttatgaaa gcgaggttc
 301 ctctgtacca gccccacc ctgagaggag ttcactgac taaaaatgt gagagaaatg
 361 gtggccaag aaaggagtg tctcgtgccc tctgccact ccaactctcc catgggcacc
 45 421 aaattgggtc tagcgtctc ggttcgaggc tccactctc ccacagcatc cttgacagct
 481 aagggcaccg ctgggttcc gctccgaaa ccaggcaagt caggggtggt tccagctgat
 541 ctccaaggtc cttcctaaga atctgggatc tggaggatcc cagggctgaa cggagacggc
 601 tcagggggtg cggctaaaat gcaaatgggg gatcctccc agcaccatc ggtcccaag
 661 agaaggtaac ccatagctga gcgtgcctg ctcccctgg gccctccgt ggcctccgt
 50 721 ttatactgg tctatcgtc aaaccgggc ctctctacc tcactactca cctgaagtc
 781 agagaaggtc caacggacc cccccgata ggcttgaag gggcaggggt cctgacttg
 841 cccatcccc tgaactccc ccccgctcc ccagcgccat gggggagtgg gcgttctgg
 901 gctcgtctg ggacgctgt cagctgcagt cgcgctctg gggccgctc tggctgtgg
 961 tcatgctgat cttccgcatc ctggtgctg ccacgggtgg cggcgctgt ttcgaggacg
 55 1021 agcaagagga gttcgtgtc aacacgctc agccgggtg tgcagagacc tgcacgacc
 1081 gcgcttccc ggtctcccac taccgcttct ggctctcca catctgctg ctctggcgc
 1141 ccccggtgt gttcgtctc tactccatgc accgggcagg caaggaggcg ggcggcgtg
 1201 aggcggcggc gcagtgcgccc cccggactgc ccgaggcca gtgcgcccgt tgcgcccgtc
 1261 gcgcccggc gcgcgcccgc tctactctg tgagcgtggc gctgcgctg ctggccgagc
 60 1321 tgacctctc gggcgccag gcgctctct acggctccg cgtggcccc cacttgcgt
 1381 gcgcccgtc gccctgccc cacacggtc actgctctg gagccggccc accgagaaga
 1441 ccgtctctg gctcttct ttcgggtg ggctgctg ggcgctgct agcgtagccg
 1501 agctggcca cctgctctg aaggccgccc cgcgcccgg ggagcgtgac aaccgtgca
 1561 accgtgaca cgaagaggc cagaagctg tcccgccc gccgcccga cctattgtg
 65 1621 tcaactggga agaaaacaga cacctcaag gagagggtc cctgtgtg cccacccca
 1681 agacagagct gtagtcccct cgcttccgta gggaaagcac ttctctgca gtaggtcatt

ES 2 749 374 T3

1741 gctctctccc cttccatggc acgtagtatg tgctcagtaa atatgtgttg gatgagaaac
1801 tgaagggtgc cccaggccta caccactgcc atgcccgaac actatccatg ctatggtggg
1861 caccatctct ctgatgacag ttctgtgtcc acaaccaga cccctccaca caaaccaga
1921 tggggctgtg ccgctgtttt ccagatgat tcaitcaaca aatattgta ggttacctac
5 1981 tgtgtgtcag aagatgttca agatcagcat catccgatgg aatagcata tgagccatgt
2041 atgtagtttc aagttttca tttagccgat taaaaagta aaaggaaca aatg
//
Cx 29/31.3 humana, e1 (SEQ ID NO: 28)

10 LOCUS AF503615 ARNm lineal de 840 pb PRI07-AUG-2002 DEFINICIÓN ARNm de conexina 31.3 de Homo sapiens, cds completo.

1 atgtgtggca ggttctgcg gcggtgtgt gcggaggaga gccggcgctc caccctcgtg
61 gggcgctct tgctcccggt gctctggga ttccgccttg tgctgtggc tgccagtggg
15 121 cctggagtct atggtgatga gcagagtga ttctgtgtgc acaccagca gccgggtgc
181 aagggtgctt gctcgtatgc ctccaccctc ctctcccgcg tgcgtttctg ggtctccag
241 gtcacttggg tggctgtacc cagcgcctc tatatgggtt tcaactctga tcactgtatc
301 tggcactggg aattatcagg aaaggggaag gaggaggaga cctgatcca gggacgggag
361 ggcaacacag atgtcccagg ggctggaagc ctcaggctgc tctgggctta tgtggtcag
20 421 ctgggggctc ggctgtctt ggagggggca gccctgggtt tgcagtacca cctgtatggg
481 ttccagatgc ccagctcctt tgcagtctgc cgagaacctt gccttgtag tataacctgc
541 aatctgtccc gccctctgga gaagaccatt ttctaaaga ccatgtttgg agtcagcggg
601 ttctgtctct tgttacttt ttggagctt gtgcttctgg gttggggag atgggtggag
661 acctggaagc acaaatcttc ctctctaaa tacttctaa ctccagagag caccagaaga
25 721 cacaagaag caaccgatag cctcccagtg gtgaaacca aagagcaatt tcaagaagca
781 gttccaggaa gaagcttagc ccaggaaaaa caaagaccag ttggaccag agatgcctga
//
Cx 25 humana (SEQ ID NO: 29)

30 LOCUS HSA414563 ADN lineal de 672 pb de PRI 30-NOV-2001 DEFINICIÓN gen de CK25 de Homo sapiens para conexina 25.

1 atgagttgga tgttctcag agatctcctg agtggagtaa ataaatactc cactgggact
61 ggatggattt ggctggctgt cgtgtttgtc ttccgtttgc tggctacat ggtggcagca
121 gagcacatgt ggaaagatga gcagaaagag ttgagtga acagtagaca gcccggttg
181 aaaaatgtgt gttttgatga ctcttcccc atttccaag tcagactttg ggccttaca
35 241 ctgataatgg tctccacacc ttacttctg tgggtttac atgtagccta tcatgaggt
301 agagagaaaa ggcacagaaa gaaactctat gtcagcccag gtacaatgga tgggggccta
361 tggtagcctt atcttatcag cctcattgtt aaaactggtt ttgaaattgg ctccctgtt
421 ttatttata agctatatga tggctttagt gttccctacc ttataaagtg tgattgaag
481 cctgtccca acactgtgga ctgcttcatc tccaaacca ctgagaagac gatcttcatc
40 541 ctctcttgg tcatcacctc atgcttgtgt attgtgttga atttcatga actgagttt
601 ttggttcca agtgctttat taagtgtgt ctccaaaaat atttaaaaaa acctcaagtc
661 ctcatgtgt ga
//
Cx40.1 humana (SEQ ID NO: 30)

45 LOCUS HSA414564 ARNm lineal de 1113 pb PRI 30-NOV-2001 DEFINICIÓN ARNm de Homo sapiens para conexina 40.1 (gen de CX40.1).

1 atggaaggcg tggactgtct agggtttctc atcatcacat taaactgca cgtgaccatg
50 61 gtaggaaagc tctggtctgt cctcacgatg ctgctgcgga tgctggtgat tctctggcg
121 gggcgaccgc tctaccagga cgagcaggag aggtttgtct gcaacacgct gcagccggga
181 tgcgccaatg tttgctacga cgtcttctcc cccgtgtctc acctgcggtt ctggctgatc
241 cagggcgtgt gcgtctctct cccctccgcc gtcttcagcg tctatgtct gcaccgagga
301 gccacgctcg ccgctgtggg cccccggcgc tgccccgacc cccgggagcc ggcctccggg
55 361 cagagacgct gcccgcgcc attcggggag cgcggcgcc tccaggtgcc cgacttttcg
421 gccggctaca tcatccacct cctctccgg accctgtctg aggcagcctt cggggccttg
481 cactacttct tctttgatt cctggccccg aagaagtcc ctgcaacgc cctccgctgc
541 acgggctgtg tggactgcta cgtgtcgcgg cccacagaga agtccctgtct gatgctgtt
601 ctctggcgcg tcagcgcgct gcttttctg ctgggcctcg ccgacctggt ctgacgcctg
60 661 cggcgcggga tgcgaggag gccgggacc cccacaagcc cctccatccg gaagcagagc
721 ggagcctcag gccacgcgga gggacgcgg actgacgagg aggggtggcg ggaggaagag
781 ggggcaccgg cgccccggg tgcacgcgcc ggaggggagg gggctggcag cccagcgct
841 acatccaggg tgtcaggga cacgaagatt ccggtatgag atgagagtga ggtgacatc
901 tccgcccagc aaaagctggg cagacagccc cggggcaggc cccaccgaga ggccgcccag
65 961 gaccccagg gctcaggatc cgaggagcag cctcagcag ccccagccg cctggccgcg
1021 ccccttctc gcagcagcct gcagccccct gaccgctctg ccagctccag tgggtctccc 1081 cacctgagag ccaggaagtc tgagtgggtg

tga

//

Cx 62 humana (SEQ ID NO: 31)

5 LOCUS HSA414565 ADN lineal de 1632 pb PRI30-NOV-2001 DEFINICIÓN gen de CX62 de Homo sapiens para conexina 62.

1 atgggggact ggaacttatt gggtggcatc ctgaggaag ttactccca ctcaaccata
 61 gtggggaaaa tctggctgac catcctcttc atctccgaa tgctggact tcgtgtggct
 10 121 gctgaggatg tctgggatga tgaacagtca gcattgcct gcaacacccg gcagccaggt
 181 tgcaacaata tctgttatga tgaatgattc cctatctctt tgatcagggt ctgggtttta
 241 cagatcatct ttgtgtcttc tcttctttg gtctatatgg gccatgcact ttataggctc
 301 agggcctttg agaaagacag gcagaggaaa aagtcacacc ttagagccca gatggagaat
 361 ccagatcttg acttgaggga gcagcaaaaga atagataggg aactgaggag gtagaggag
 15 421 cagaagagga tccataaagt cctctgaaa ggaagtctgc tgcgtactta tgccttacac
 481 atcttgacca gatctgtgct ggaagttaga ttcatgatag gccaatata tctctatggg
 541 tttcaaatgc accccttta caaatgact caacctcctt gcccaaatgc ggtggattgc
 601 ttgtatcca ggcccactga gaagacaatt ttcatgcttt ttatgcacag cattgcagcc
 661 atttctgtg tactcaatat actggaata ttcatctag gcatcagaaa aattatgagg
 20 721 acactttata agaattccag cagtgagggc attgaggatg aaacaggccc tccattccat
 781 ttgaagaaat attctgtgac ccagcaggtg atgatttctt ctctattgcc tgaagaatc
 841 tctccacttc aagctaaca tcaacagcaa gtcattcgag ttaatgtgcc aaagtcaaaa
 901 accatgtggc aaatcccaca gccaaaggcaa cttgaagtag acccttcaa tgggaaaaag
 961 gactggctg agaaggatca gcatagcgga cagctccatg ttacagccc gtgtccctgg
 25 1021 gctggcagtg ctgaaatca gcacctggga cagcaatcag accattcctc atttggcctg
 1081 cagaatacaa tgcctcagtc ctggctaggt acaactacgg ctctagaaa ctgtccatcc
 1141 ttgacagtag gaacctggga gcagtcccag gaccagaac cctcaggtga gccttcaca
 1201 gatctcata gtcactgac agacagtga ggcagcatga gagagagtgg ggtctggata
 1261 gacagatct gccaggcag tcgcaaggcc agcttctgt ccagattggt gtctgaaaag
 30 1321 cgacatctc acagtgact aggaagctct ggttctcgga atagctcctg cttggatttt
 1381 cctcactggg aaaacagccc ctacactctg cctcagtc ctgggcacag aacatcaatg
 1441 gtaagacagg cagccctacc gatcatgaa ctatcacaag agctgttcca ttctggatgc
 1501 tttcttttc ctttctttc tcctgggggt gtaagtatg ttgtgttga cagagaggca
 1561 gatggagggg gagattatt atggagagat aaaattattc attgatata ttcatgtaa
 35 1621 ttcaattcat aa
 //

Ahora se describirán diversos aspectos de la invención con referencia a la siguiente sección experimental que se entenderá que se proporciona solo a modo de ilustración y no constituye una limitación en el alcance de la invención.

40 Los siguientes Ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplo 1: análisis in vivo

Materiales y Métodos

45 Tratamiento con láser

Se criaron ratas Wistar hembra (d32-34) en condiciones consistentes con la Resolución de ARVO sobre el Uso de Animales en la Investigación. Los animales se anestesiaron mediante la administración de una mezcla 1:1 de Hypnorm™ (10 mg/ml, Jansen Pharmaceutica, Bélgica) e Hypnovel® (5 mg/ml, Roche products Ltd, Nueva Zelanda) a una dosis de 0, 083 ml/100 g de peso corporal en el peritoneo del animal.

55 El tratamiento con láser de excimeros se realizó a través del epitelio intacto mediante el uso de un láser de excimeros 217 Z de Technolas (Bausch & Lomb Surgical, Estados Unidos). El ojo se centró en el medio de la pupila y la ablación se realizó con los siguientes parámetros: el área de tratamiento tenía un diámetro de 2,5 mm y una profundidad de 70 µm. Esto dio como resultado la eliminación de un pequeño grosor del estroma anterior y del epitelio completo. El tratamiento con láser de excimeros se usó preferentemente para producir lesiones reproducibles e investigar los efectos de los ODN AS de conexina 43 COMO ODN en la remodelación y el diseño de la córnea después del trauma.

60 Después de la cirugía, todos los animales se colocaron en jaulas individuales y se monitorearon estrechamente para detectar cualquier molestia. La evaluación posquirúrgica in vivo se logró mediante el uso de un biomicroscopio lámpara de hendidura y/o un microscopio confocal in vivo de barrido en hendidura.

Microscopía confocal in vivo de barrido en hendidura

65 Antes y después del tratamiento con láser de la córnea, cada animal se observó clínicamente mediante el uso de un

microscopio confocal in vivo de barrido en hendidura Confoscan 2 (Fortune Technologies America, Estados Unidos). Confoscan 2 es una variante de la tecnología de barrido en hendidura con la ventaja distinta de la digitalización directa de las imágenes en el momento de la adquisición. Los animales se anestesiaron y cada uno de ellos se colocó sobre una plataforma especialmente diseñada que se ajustó al nivel de la lente del objetivo del microscopio confocal in vivo frente a la adquisición de cabezal.

El microscopio confocal in vivo de barrido en hendidura permite la disección óptica de la córnea viva a diferentes niveles a través de todo el grosor de la córnea. El examen comienza desde el endotelio y el número de las secciones antero-posteriores depende de las configuraciones personalizadas. La tecnología de barrido en hendidura utiliza una lente del objetivo que se mueve hacia atrás y hacia adelante a lo largo del eje perpendicular al área examinada. En resumen, el hardware consiste en una lámpara de halógeno (100 W/12 V), dos hendiduras, dos lentes de tubo, una lente de objetivo frontal y una cámara digital altamente sensible (CCD). Antes del barrido, se coloca una gota de Viscotears (CIBAVision Ophthalmics) en la punta de la lente del objetivo como una sustancia de inmersión. Durante el barrido, el ojo del animal se mantiene abierto y orientado de manera que el plano de la córnea siempre sea perpendicular al eje óptico de la lente de aumento (40x, N.A 0,75). El tiempo de adquisición de la imagen es de aproximadamente 14 segundos. El gel, no la lente del objetivo entra en contacto con el ojo en todo momento. Para la córnea de rata, se obtuvieron por examen hasta 250 imágenes digitales secuenciales y se guardaron directamente en una unidad de disco duro. Los parámetros de adquisición se ajustaron durante los experimentos preliminares y se mantuvieron constantes para todos los experimentos posteriores. Fueron los siguientes: la intensidad de la luz se disminuyó a la mitad de la intensidad generalmente usada para los pacientes humanos, se usaron cuatro pasadas (un pase se considera que es un movimiento completo hacia atrás y hacia adelante) y se seleccionó una distancia de trabajo de 400 μm . Para la córnea de rata, el centrado se facilita mediante la visualización clara de la pupila, que proporciona una repetibilidad topográfica muy buena.

Imágenes confocales in vivo

Todas las imágenes adquiridas con el microscopio confocal in vivo de barrido en hendidura se almacenaron en el disco duro y posteriormente se analizaron mediante el software propiedad de NAVIS (Confoscan 2, Nidek Co Ltd).

Las dinámicas del estroma se evaluaron siguiendo los principios estereológicos. Los recuentos celulares se registraron en las posiciones del estroma anterior y posterior. El componente estereológico principal fue proporcionado por el microscopio confocal in vivo a medida que funcionó como un disector óptico (una sonda que muestrea con partículas de igual probabilidad en el espacio). De hecho, el microscopio confocal in vivo proporciona cortes ópticos delgados de volumen especificado, donde cada uno es una muestra de tejido diseccionado. Como resultado, el recuento de las células estromales consiste en elegir un par de cuadros (imágenes consecutivas registradas por el microscopio confocal in vivo), un cuadro que tiene partículas (células estromales) enfocadas y el marco conjunto que muestra una imagen desenfocada pero reconocible de las mismas partículas (sombras ópticas). El número de células (n) se registra desde el cuadro más claro en un área definida A (μm^2). También se registra la distancia d (μm) entre los dos cuadros. El número de células por unidad de volumen (V) por lo tanto es igual a: $V = \text{Número de células } (n) / d (\mu\text{m}) \times A (\mu\text{m}^2)$

Imágenes confocales ex vivo

Las secciones apropiadas de la córnea se tiñeron inmunohistoquímicamente con diferentes marcadores para diferentes propósitos. La tinción con la tinción nuclear Hoechst 33 258 se usó para estimar la cantidad de células epiteliales y estromales en la córnea central o periférica. Para este propósito, mediante el uso del software AnalySIS@ 3. 2 (Soft Imaging System, Estados Unidos), el área de interés en primer lugar se estiró a mano alzada en la imagen de archivo TIFF de la región apropiada de la córnea y el valor del área fue proporcionada automáticamente por el software. Mediante el uso de la opción de recuento manual, las células se contaron después dentro de esa área y se expresaron por unidad de área.

Aplicación de compuesto antisentido

Se usó gel de ácido plurónico al 30 % (BASF Corp) en solución salina tamponada con fosfato (agua de grado molecular) para suministrar los ODN antisentido específicos para la conexina $\alpha 1$ no modificada (conexina 43) a la subconjuntiva de ratas anestesiadas después de la queratectomía fotorrefractiva. En un ensayo previo que usa una etiqueta FITC, se demostró que esta formulación permanece en la cámara anterior del ojo por hasta 24 horas (no se muestra).

La molécula antisentido usada en estos experimentos fue DB1 ((GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC) (SEQ ID NO: 65). La adición de una etiqueta FITC a ODN DB1, observada mediante el uso de la microscopía confocal de barrido láser, demostró penetración intracelular de la sonda.

El ODN se aplicó a una concentración final de 2 μM .

Monitoreo de los efectos de diseño o remodelación de tejidos

Después de la aplicación antisentido, las córneas se examinaron mediante el uso de un microscopio confocal in vivo de barrido en hendidura a las 2 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 1 semana y 2 semanas después de la cirugía con láser. Las ratas control recibieron solamente cirugía asistida con láser.

5 La Tabla 1 resume el número de córneas investigadas en cada punto de tiempo.

Tabla 1. Número de córneas tratadas con control (C) y AS (ODN) usadas para el seguimiento in vivo mediante el uso de la microscopía confocal in vivo de barrido en hendidura.

10 ODN= como ojos tratados con ODN AS (administración única después de la cirugía asistida con láser)

	En 2 horas de cirugía	12 horas después de la cirugía	24 horas después de la cirugía	48 horas después de la cirugía	72 horas después de la cirugía	1 semana después de la cirugía	2 semanas después de la cirugía
15							
20	Número de ojos (n)	18C 18 ODN	10C 10 ODN	18C 18 ODN	10C 6 ODN	6C 4 ODN	5 C 5 ODN

Se analizó cada capa celular de la córnea y el tipo, número y apariencia celular se compararon entre los grupos tratados con control y con ODN.

25 Reepitalización:

El tratamiento con los ODN anti-conexina 43 promovió la recuperación epitelial. En el 90 % de las córneas tratadas con ODN AS, se observaron células epiteliales deslizantes en las 12 horas después de la cirugía con láser PRK, en comparación con ninguno en los controles (Figura 1B). En esta etapa, sólo las células endoteliales estáticas estaban presentes en el 30 % de las córneas de control (Figura 1 A). A las 24 horas las células epiteliales se observaron en todos los controles y las córneas tratadas antisentido pero el 72 % de los tratados frente al 61 % de los controles mostraron células con deslizamiento activo. Esto indica que la reepitelización avanza más rápido en las córneas tratadas con ODN AS específico de conexina 43 que en los controles.

35 Densidades de las células estromales:

Mediante el uso de una prueba de t de pares de muestras con mediciones repetidas para comparar las densidades celulares en el estroma anterior y posterior dentro de cada grupo como una función del tiempo y una prueba estadística no paramétrica de Mann Whitney para comparar los recuentos de células estromales entre las córneas tratadas con el control y con ODN en los puntos de tiempo seleccionados, solamente se encontraron resultados estadísticamente significativos a las 24 horas después de la cirugía con láser (Tabla 2). En este punto de tiempo, en los grupos de control y en los grupos tratados con ODN la densidad de células estromales en el estroma anterior ha aumentado considerablemente en comparación con los valores previos a la cirugía (valor de $p < 0,05$). En el estroma posterior de las córneas de control, la densidad de células estromales también aumentó en comparación con el valor previo a la cirugía (valor de $p < 0,05$) mientras que en el estroma posterior de las córneas tratadas con ODN, la densidad de células estromales no es estadísticamente diferente del valor previo a la cirugía (valor de $p > 0,05$). Cuando se compara la densidad de células estromales entre los dos grupos en el estroma anterior y posterior, las córneas tratadas con ODN siempre mostraron menores densidades de células estromales que las córneas de control (valor $p < 0,05$). Esto apoya la idea de que un menor número de células están implicadas en la remodelación o diseño del estroma en las córneas tratadas con ODN en comparación con las córneas de control. Este es el primer informe que muestra que la aplicación de los ODN anti- conexina 43 reduce la hiper celularidad en el sitio de la cirugía. El análisis histoquímico ex vivo (Ejemplo II) muestra que esta hiper celularidad se asocia con miofibroblastos que inducen la remodelación y cicatrización de la matriz del estroma no deseada.

55 Tabla 2. Recuentos de células estromales en las córneas de control y tratadas con ODN AS antes y 24 horas después de la queratectomía fotorrefractiva. Las densidades celulares se proporcionan como medias seguido de las desviaciones estándar.

60

65

Tratamiento	Puntos de tiempo	Recuento de células del estroma anterior (#células/mm ³)	Recuento de células del estroma posterior (#células/mm ³)
Control	Antes de la cirugía	36469±11122(n=17)	33909 ± 8753 (n=17)
ODN	Antes de la cirugía	36769±10932(n=17)	34382± 8667(n=14)
Control	24 horas después de la cirugía	144643±60989(n=17)	46901 ±26964 (n=17)
ODN	24 horas después de la cirugía	93468±53548(n=17)	33510±11350(n=14)

Ejemplo II - análisis ex vivo

Materiales y Métodos

Histología: Recolección y fijación de tejidos

Los números apropiados de animales (ratas Wistar) se terminaron en puntos de tiempo seleccionados después de la queratectomía fotorrefractiva y los ODN anti-conexina 43 DB1 se administraron a ratas anestesiadas como se describe en el experimento 1 anterior y las secciones de córneas se prepararon para el análisis histológico. Las ratas de control solo habían recibido cirugía asistida con láser. Los ojos completos y los tejidos de control se enjuagaron en PBS Oxoid antes de embeberlos en OCT Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Estados Unidos) y congelarlos en nitrógeno líquido. Cuando sea necesario (para el uso de algunos anticuerpos), los tejidos congelados se fijaron posteriormente en frío (-20 °C) durante 5 min después de ser criocortados.

Corte de tejidos

El procedimiento para la criosección fue el siguiente: los bloques congelados de tejido no fijado se retiraron del almacenamiento de -80 °C y se colocaron en el criostato Leica CM 3050S durante aproximadamente 20 min hasta equilibrarse a la misma temperatura que en el criostato (es decir, -20 °C). Cuando se logró el equilibrio del tejido, el espécimen se montó sobre un disco de especímenes con OCT Tissue Tek®. Las secciones de 12 µm (para tinción con H/E) o 25 µm de grosor (para inmunomarcaje) se cortaron y se colocaron en portaobjetos Superfrost®Plus (Menzel-Gleser, Alemania). Inmediatamente después del criocorte, los bloques de tejidos se colocaron nuevamente a -80 °C y los portaobjetos que soportaban la criosección se usaron inmediatamente o se almacenaron a -80 °C. El seccionamiento se produjo paralelo al eje óptico del ojo. Tinción con Hematoxilina/Eosina (H/E) y tinción nuclear.

Los portaobjetos se colocaron en rejillas de vidrio para facilitar la inmersión en una serie de diferentes reactivos de tinción. Las rejillas se agitaron cuando se colocaron en reactivos para romper la tensión superficial y drenarlas entre cada cambio de solución. Antes de la tinción con Hematoxilina de Gill II/Eosina, los portaobjetos que se almacenaron a -80 °C se calentaron primero hasta temperatura ambiente durante 1-2 min, después se fijaron primero en acetona fría y/o se hidrataron inmediatamente con una rápida inmersión en agua corriente. Los portaobjetos se tiñeron en hematoxilina de Gill II durante 2 min, después de lo cual la tinción en exceso se enjuagó en agua corriente. La diferenciación de la tinción se logró sumergiendo en el sustituto del agua corriente de Scott (STWS) durante 4 seg. Después se realizó un enjuague en agua corriente durante 1 min antes de teñir en eosina al 1 % durante 30 inmersiones consecutivas. Finalmente, las secciones se enjuagaron rápidamente en agua corriente, se deshidrataron a través de EtOH al 95 %, 100 %, se aclararon en xileno, y se montaron con medio de montaje DPX (Sigma). Para la tinción de recuento nuclear (en paralelo con H/E o análisis inmunohistoquímico) se usó Hoechst 33 258 (Sigma). La medición del grosor de la córnea se llevó a cabo en secciones teñidas con H/E.

Inmunohistoquímica

Las secciones se inmunomarcaron para conexina 43 mediante el uso de un anticuerpo monoclonal específico de sitio, para los miofibroblastos mediante el uso de un anticuerpo que reconocía la actina alfa de músculo liso, para la deposición de la lámina basal con un anticuerpo anti-laminina-1. Además, se usaron anticuerpos anti-vimentina para diferenciar los queratocitos estromales de los miofibroblastos y se usó un anticuerpo Ki-67 para mostrar la proliferación celular.

Análisis histológico ex vivo

Los resultados mostraron que las lesiones producidas mediante la fotoablación del excímero se habían cerrado 24 horas después de la cirugía (Figura 2). La invasión típica del estroma por las células mononucleadas/multinucleadas y/o redondas, ovoides en la periferia y en el centro de la córnea se observó en ambos grupos, más pronunciada 24 horas después de la cirugía, pero donde el grupo tratado con ODN antisentido muestra un número significativamente menor de estas células que el grupo control (Figura 2A,B,C). Esto es paralelo a los hallazgos de las fotomicrografías confocales in vivo que se muestran en el Ejemplo 1. El grosor del epitelio fue variable en las córneas de control como se observa en la Figura 2 en el sitio de la lesión inducida por láser (Figura A, B), y en el estroma debajo del área extirpada (Figura A,B) y en el estroma periférico (Figura C) hubo una invasión extensa por las células redondas (hipercelularidad) en las córneas de control. También se observó un edema del estroma pronunciado en la Figura B y la Figura C. En las córneas tratadas con ODN antisentido el epitelio fue de grosor uniforme (Figura D,E) y en la región central (Figura D) y en el estroma periférico (Figura E) hubo pocos signos de edema del estroma. Además, en el estroma hubo pocas células redondas presentes. Las barras de escalas en la Figura 2 representan 20 micras.

Los cambios en el grosor del estroma después del tratamiento con los ODN de conexina 43 después del tratamiento con láser se muestran en la Tabla 3, que compara cambios en el grosor del estroma entre las córneas tratadas con el control y con ODN. Los grosores del estroma se midieron a partir de las secciones teñidas histológicas apropiadas. El análisis estadístico de los datos obtenidos para el grupo tratado con ODN mediante el uso de una prueba t de pares de muestras mostró que en los tres puntos de tiempo investigados (24 h, 48 horas y 72 horas después de la cirugía) el grosor del estroma central es más delgado de manera estadísticamente significativa que el valor previo a la cirugía (valores de $p < 0,05$) y el grosor del estroma periférico no es significativamente diferente de los valores previos a la cirugía. Por el contrario, las córneas de control muestran una hinchazón significativa del estroma (edema) (Figura 2 A, B, C) tanto en la córnea central como periférica (donde el estroma se duplica en grosor en comparación con los valores previos a la cirugía).

Tabla 3. Cambios en el grosor del estroma después de la cirugía asistida por láser de excímeros en las córneas de control y tratadas con AS.

La córnea que no se sometió a cirugía tuvo un grosor del estroma central de 250 μm , pero se usó cirugía asistida por láser de excímeros para retirar 70 μm de tejido de la córnea (que incluye el epitelio y parte del estroma). El epitelio de la córnea normal es de 50 μm de grosor (en promedio) y por lo tanto 20 μm de tejido estromal se eliminó mediante cirugía asistida con láser. Por lo tanto, para comparar estadísticamente el grosor del estroma central a las 24 horas, 48 horas y 72 horas después de la herida al grosor del estroma central previo a la cirugía, se usó una pérdida de grosor ajustada y un grosor del estroma central previo a la cirugía de $250 - 20 = 230 \mu\text{m}$.

Tratamiento	Puntos de tiempo	grosor medio del estromal central (μm)	grosor medio del estromal periférico (μm)
Normal (sin cirugía)	Antes de la cirugía	250 (n=6)*	110(n=10)
Control Tratado con ODN	24 horas después de la cirugía	318 (n=6) 190 (n=5)	290 (n=6) 132 (n=5)
Control Tratado con ODN	48 horas después de la cirugía	307 (n=6) 158 (n=5)	206 (n=5) 105 (n=5)
Control Tratado con ODN	72 horas después de la cirugía	292 (n=6) 142 (n=5)	201 (n=6) 99 (n=5)

La reducción en la expresión de conexina 43 se asocia con la reducción de la invasión estroma y la reducción de la hiperplasia epitelial

Las observaciones microscópicas mostraron una reducción del nivel de conexina 43 presente en las córneas tratadas con ODN en comparación con las córneas de control. La Figura 3 muestra imágenes micrográficas combinadas. La fila superior muestra las córneas de control, la fila inferior muestra las córneas tratadas con ODN antisentido. La invasión típica del estroma por las células redondas se observó en ambos grupos dentro de 24 horas en las áreas limbal, periférica y central. Sin embargo, se exhibió una menor densidad de células redondas en las córneas tratadas con ODN. En el limbo en ambos grupos anti-conexina 43 se distribuyó uniformemente por todo el estroma (3A,D) pero los grupos tratados tenían menos etiqueta en la periferia (3E) en comparación con los controles (3B). En esta etapa los niveles de conexina 43 habían regresado a normal en el epitelio de ambos grupos pero los grupos de control

mostraron un estroma similar a cicatriz (3C) o hiperplasia (ver la figura 4 más abajo) mientras que en las córneas tratadas antisentido se observó un epitelio normal con niveles normales de conexina 43 (3F). Las barras de escala A, D, E, F representan 10 micras; B y C representan 20 micras. En estas figuras la conexina 43 aparece como una marca blanca punteada con los núcleos celulares que aparecen grises. Los resultados mostrados en la Figura 3 sugieren que los niveles de proteína conexina 43 se reducen después del tratamiento con los ODN anti-conexina 43 y dan como resultado un menor grado de reclutamiento celular en el estroma. Además, sólo el 7 % de las córneas tratadas con ODN (0 % a las 24 horas después de la cirugía, 0 % a las 48 horas después de la cirugía, 20 % a las 72 horas después de la cirugía) muestran signos de hiperplasia epitelial en comparación con el 31 % de las córneas de control (25 % a las 24 horas después de la cirugía, 67 % a las 48 horas después de la cirugía, 0 % a las 72 horas después de la cirugía). Esto se evaluó en secciones teñidas con H/E y marcadas con Ki-67.

Marcaje de miofibroblastos

El marcaje con los anticuerpos contra vimentina indicó que el aumento de los números de células en el estroma de las córneas de control en comparación con las córneas tratadas con ODN AS no era de origen de queratocito no diferenciado y el marcaje se llevó a cabo por lo tanto con anticuerpos contra actina alfa de músculo liso. Este marcaje mostró que las córneas de control tenían un mayor número de miofibroblastos debajo del sitio de cirugía, pero también en el estroma periférico circundante. Este aumento en los números de miofibroblastos y el área afectada fue evidente a las 24 horas y persistía durante 48 y 72 horas hasta al menos una semana después de la cirugía (Tabla 4). La Figura 4 muestra el marcaje de miofibroblastos (anti-actina alfa de músculo liso) a la semana 1 después de la cirugía con láser. Las Figuras 4 A, B y C son controles; y las Figuras 4 D, E y F son córneas tratadas antisentido. Una semana después de la herida, en las córneas de control, están presentes números bajos a moderados de miofibroblastos en la mitad anterior del estroma periférico (4A), niveles de moderados a densos están presentes en las regiones del estroma medio periférico (4 B) y se observan niveles moderados en la mitad anterior del estroma en las regiones centrales (4C). Por el contrario, en las córneas tratadas, los números muy bajos de miofibroblastos están presentes en el estroma periférico (4D) o periférico medio (4E) y los números moderados a bajos en el estroma central (4F). En algunos casos en el estroma central, los miofibroblastos se concentran en el área justo debajo del epitelio (no se muestra). Por lo tanto, el aumento de los números de células observado en el Ejemplo 1 (hipercelularidad) y la Figura 2 anterior parece deberse a la diferenciación e invasión de miofibroblastos. Se conoce que los miofibroblastos son responsables de la deposición de tejido cicatricial en el estroma, con reducción de la deposición cristalina y aumento de la secreción de colágeno III de la herida (Ahmadi A. J. y Jakobiec F.A.; 2002; Int Ophthalmol Clin. Summer; 42(3): 13-22.).

Tabla 4: Resumen del marcaje de actina alfa de músculo liso para miofibroblastos en córneas de control y tratadas con ODN antisentido.

Tiempo	Ubicaciones	Córneas de control	Córneas tratadas AS
24 horas después de la cirugía	Periferia	80 % D en todo el estroma 20 % M en todo el estroma	100 % M en 1/3 anterior del estroma
	Periferia media	100 % D en todo el estroma	100 % M en 1/3 anterior del estroma
	Centro	100 % B en el estroma anterior	80 % B en 1/3 anterior del estroma 20 % B por debajo del epitelio
48 horas después de la cirugía	Periferia	83 % M en todo el estroma 17 % B en todo el estroma	40 % M en la mitad anterior del estroma 60 % B en la mitad anterior del estroma
	Periferia media	50 % D en todo el estroma 50 % M en todo el estroma	100 % D en la mitad anterior del estroma
	Centro	17 % B bajo el epitelio (hiperplasia) 50 % D en todo el estroma 33 % M en todo el estroma	20 % ausente 80 % M en el estroma anterior
72 horas después de la cirugía	Periferia	33 % B en la mitad anterior del estroma 67 % M en la mitad anterior del estroma	40 % B en la mitad anterior del estroma 60 % M en la mitad anterior del estroma
	Periferia media	33 % B en todo el estroma 67 % D en todo el estroma	20 % B en la mitad anterior del estroma 80 % M en la mitad anterior del estroma

5		Centro	17 % ausente 50 % D en todo el estroma 33 % M en todo el estroma	20 % ausente 40 % B en la mitad anterior del estroma 40 % M en el estroma anterior
10	1 semana después de la cirugía	Periferia	60 % M en la mitad anterior del estroma 40 % B en la mitad anterior del estroma	100 % B en 1/3 anterior del estroma
15		Periferia media	60 % D en todo el estroma 40 % M en todo el estroma	100 % B en la mitad anterior del estroma
20		Centro	60 % M en la mitad anterior del estroma 40 % B en la mitad anterior del estroma	60 % M en la mitad anterior del estroma 20 % B en la mitad anterior del estroma 20 % M bajo el epitelio

25 Los números de miofibroblastos se cuantifican como densos (D), moderados (M), bajos (B) o ausentes. Los porcentajes se refieren a las proporciones de animales afectados en los niveles específicos, st = estroma, epi = epitelio. Las diferencias significativas entre las córneas de control y tratadas antisentido se resaltan en negritas.

30 Deposición de la lámina basal

Después de la queratectomía fotorrefractiva la lámina basal se reforma junto con el epitelio en crecimiento. El marcaje con anticuerpos contra laminina-1 muestra que la lámina basal en reformación es discontinua y con una unión irregular entre el epitelio y el estroma (Figura 5). A las 24 horas los controles tenían poca y/o irregular deposición de laminina en el borde del área extirpada (Figura 5A) y más centralmente (Figura 5B) mientras que las córneas tratadas antisentido mostraron una deposición de laminina más regular en ambas regiones (Figura 5C, Figura 5D). A las 48 horas, los controles aún no tenían una deposición de laminina continua (Figura 5E - borde del área extirpada; Figura 5F - central) y era muy irregular (Figura 5E). Por el contrario, las córneas tratadas con ODN antisentido tenían una lámina basal continua e incluso uniforme en el borde de la herida (Figura 5G) y centralmente (Figura 5H). Todas las barras de escala en la Figura 5 representan 20 micras. Las córneas tratadas antisentido contra conexina 43 formaron una lámina basal densa, más continua en 24 horas con menos irregularidad.

La irregularidad de la laminina se cuantificó como se muestra en la Figura 6. La línea sólida negra en la Figura 6 representa la deposición de laminina-1. Para cada región la varianza se midió como la diferencia entre la parte superior de una colina y la parte inferior de un valle (Figura 6 A, B, C, D). Las córneas de control tenían una varianza media de 6,98 micras en comparación con 4,74 micras en las córneas tratadas con ODN antisentido. La diferencia entre los dos grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$).

Ejemplo III - diseño de tejidos ex vivo

50 Las córneas se colocaron en un modelo de cultivo de órganos ex vivo y se moduló la conexina específica mediante el uso de los ODN antisentido. Dos conexinas fueron dianas en estos experimentos, la conexina 43 y conexina 31.1. La regulación negativa de la conexina 43 se usa para demostrar que las conexinas pueden regularse in vitro, y la conexina 31.1 fue una diana porque esta conexina se expresa en las capas epiteliales externas de la córnea en células que están a punto de ser eliminadas de la córnea. El objetivo era diseñar un engrosamiento de tejido epitelial mediante la reducción de la expresión de conexina 31.1.

Materiales y Métodos

60 Las ratas Wistar de 30-34 días de edad se sacrificaron con Nembutal o dióxido de carbono y se diseccionaron los ojos completos de las ratas. La superficie ocular se diseccionó, se desinfectó con 0,1 mg/ml de penicilina -estreptomicina durante 5 minutos y se enjuagó en PBS estéril. El ojo completo se transfirió después a un soporte estéril en un plato de cultivo de 60 mm con la córnea orientada hacia arriba. Los ojos se montaron con el epitelio corneal expuesto en la interfaz aire-medio y se cultivaron a 34 °C en una incubadora de CO2 humedecida al 5 % en medio libre de suero (Opti-MEM, Invitrogen) durante hasta 48 horas. Se añadió 100 µl de medio gota a gota a la superficie cada ocho a doce horas para humedecer el epitelio. Los niveles medios se mantuvieron al nivel de la conjuntiva limbal.

Los oligómeros antisentido se mezclaron con gel plurónico F127 (Sigma) al 30 % (p/p) en hielo a una concentración final de 2 µm y se aplicó 10 µl sobre las córneas. Cada tratamiento tenía un tamaño de muestra de 3 a 4 córneas por experimento. Los experimentos preliminares mostraron que los tratamientos dobles del control positivo, DB1, durante 8 horas tuvieron poco efecto en la expresión de la proteína conexina 43 en el cultivo de las córneas. Las córneas se cultivaron por lo tanto durante 24 horas y se aplicaron oligómeros específicos para conexina cada 8 horas.

El marcaje inmunohistoquímico se llevó a cabo como en el Experimento 2 anterior mediante el uso de anticuerpos contra las conexinas 43, 26 (control) y 31.1. El tejido también se tiñó con H/E como anteriormente. Los núcleos se contratiñeron con yoduro de propidio a 0,2 µM. Se recolectaron imágenes en un microscopio confocal de barrido asistido por láser TCS 4D o TCS SP2 de Leica con configuraciones de tensión y compensación mantenidas dentro de los grupos experimentales para permitir la cuantificación de los niveles de conexina. Para la cuantificación, se procesaron cuatro cortes ópticos a través de 3 micras en una única imagen óptica de enfoque extendido mediante el uso de la opción de proyección topográfica de masa en el TCS 4D. La etiqueta de conexina se cuantificó mediante el uso de NIH Image (Scion Corp. USA) después del umbral a una intensidad de 90 - 100 píxeles en la imagen en escala de grises 256.

En las córneas que no se han sometido a cirugía, las tasas de renovación de conexina in vitro fueron relativamente bajas en comparación con los procesos de remodelación de tejidos en las córneas extirpadas con láser de excímeros descritas en los Ejemplos 1 y 2 anteriormente. No obstante, después de tres tratamientos con los ODN antisentido los niveles de conexina se redujeron en más del 50 % en comparación con los controles (Figura 7 A, B muestra la reducción de conexina 43 en las córneas tratadas con ODN AS en comparación con los controles). Los niveles de conexina 26 permanecieron constantes cuando se aplicaron los ODN antisentido específicos para conexina 43 (lo que indica que la reducción de los niveles de conexina fue específica, no un efecto secundario del tratamiento. En estas imágenes la conexina 43 aparece como puntos más pesados en las dos capas basales del epitelio, la conexina 26 como un marcaje punteado más fino predominantemente en las capas 2-6. Los ODN antisentido para conexina 31.1 redujeron los niveles de conexina 31.1 pero los resultados preliminares también mostraron que el grosor epitelial (número de capas) aumentó en 24 horas (Figura 7 C, D). Este aumento en el grosor se observó mediante el uso de la tinción con H/E (Figura 7D) y en las secciones marcadas inmunohistoquímicamente (Figura 7C).

Los resultados descritos en este trabajo forman una base para el uso de los ODN antisentido específicos para conexina en el diseño de tejidos, incluso específicamente después de la cirugía asistida por láser de excímeros de la córnea, o para el cultivo de órganos in vitro para el diseño y el trasplante de tejidos. Los resultados experimentales proporcionados en la presente descripción demuestran que un tratamiento individual con los ODN antisentido específicos para conexina 43 después de la queratectomía fotorrefractiva asistida por láser de excímeros tiene muchos usos beneficiosos, algunos de los cuales se describen a continuación en la presente descripción.

La administración de los ODN antisentido específicos para conexina promueve el movimiento de las células epiteliales. A las 12 horas después de la cirugía el 90 % de las córneas tratadas antisentido pero las córneas de control muestran la presencia de células epiteliales deslizantes en el sitio de una lesión inducida por láser. Las células epiteliales estaban presentes en el 30 % de las córneas de control pero eran estáticas/no deslizantes. La regulación de la comunicación directa entre células por las conexinas puede usarse, por lo tanto, para modificar diseñar cambios en el patrón de las células epiteliales.

La administración de los ODN antisentido específicos para conexina promueve la hiper celularidad de los controles asociada con la diferenciación de miofibroblastos en el sitio de una lesión inducida por láser en el período de 24 horas a 48 horas después de la cirugía. Durante este período, más córneas de control (63 %) que córneas tratadas con ODN antisentido (39 %) muestran hiper celularidad intensa en todo el estroma. La regulación de la comunicación directa entre células puede usarse, por lo tanto, para modular la diferenciación celular que conduce a la modificación de la matriz extracelular.

La administración de los ODN antisentido específicos para conexina controla la remodelación del estroma que reduce la opacidad en el sitio de una lesión inducida por láser en las 24 horas a las 72 horas después de la cirugía. En este período, más córneas de control (64 %) que las córneas tratadas con antisentido (39 %) muestran una opacidad intensa en todo el estroma.

La administración de los ODN antisentido específicos para conexina inhibe el edema estromal durante las etapas tempranas de remodelación. La regulación de la comunicación directa entre células mejora por lo tanto los resultados de la cirugía asistida con láser.

La administración de los ODN antisentido específicos para conexina reduce la proliferación celular en las etapas tempranas de remodelación. Por lo tanto, la regulación de la comunicación directa entre células puede usarse para regular la proliferación celular durante la remodelación de tejidos.

La administración de los ODN antisentido específicos para conexina reduce la hiperplasia epitelial en un 78 % (evaluado desde las 24 horas a las 72 horas después de la cirugía) lo que permite el diseño de un epitelio uniforme.

La administración de los ODN antisentido específicos para conexina reduce la activación de miofibroblastos hasta 1 semana después de la cirugía (y la pérdida temprana de queratocitos). La regulación de la comunicación directa entre células permite un control más preciso del daño tisular durante la remodelación quirúrgica, lo que proporciona un mejor pronóstico del resultado y menos defectos visuales.

5 La administración de los ODN antisentido específicos para conexina da como resultado una matriz de adhesión epitelial-estromal más regular y más densa durante la remodelación de tejidos. Por lo tanto, la regulación de la comunicación directa entre células puede usarse para diseñar la lámina basal tisular.

10 Además, el modelo de cultivo de la córnea ex vivo usado en la presente descripción indica que la regulación de la comunicación directa entre células puede usarse para diseñar el tejido in vitro, por ejemplo aumentando el grosor epitelial mediante el uso de los ODN antisentido para conexina 31.1. Este tratamiento también tiene implicaciones in vivo, por ejemplo, en el diseño de una córnea más gruesa para el alivio de enfermedades corneales tales como queratocono (un adelgazamiento del epitelio).

15 Los resultados muestran que las moléculas activas que interfieren con la comunicación entre células pueden usarse en la ingeniería y remodelación de tejidos. Específicamente, se muestra que los desoxinucleótidos antisentido dirigidos a proteínas conexina pueden usarse en la remodelación de la córnea especialmente después de la cirugía correctiva asistida con láser, así como también para la ingeniería de tejidos in vivo e in vitro.

20 Por lo tanto, los compuestos antisentido y los métodos descritos en la presente descripción tienen un potencial significativo para mejorar el resultado de las intervenciones quirúrgicas y mejorar los procesos de enfermedad en el ojo y para el diseño de tejidos.

25 Ejemplo IV

Modelo de cultivo ex vivo

30 La aplicación de oligodesoxinucleótidos antisentido específicos para la proteína de unión de tipo hendidura Conexina 43 después de la lesión en el cerebro o la médula espinal en modelos animales adultos bloquea la propagación de las lesiones y reduce la respuesta inflamatoria y la formación de cicatrices posterior. Se ha llevado el enfoque antisentido aún más lejos y se desarrolló un modelo de cultivo *ex vivo* para segmentos de médula espinal y médulas intactas para elaborar estrategias de reparación para lesiones establecidas

35 Las médulas espinales se escinden de las crías de rata P7 - P14 y se dividen en los segmentos caudal, torácico y rostral. Los oligodesoxinucleótidos antisentido se aplicaron en un gel plurónico a los extremos cortados de los segmentos de la médula espinal durante la colocación en el cultivo, esto da como resultado una reducción de los niveles de proteína de Conexina 43 durante 24-48 horas, lo que mejora significativamente la viabilidad del tejido. La observación más inmediata y notable es que no se produce hinchazón (Figura 8 A-B, que muestra los segmentos de médula 24 horas después de colocarlos en cultivo). Este tratamiento bloquea la propagación de los extremos de los cortes de la médula espinal. El aumento de la supervivencia de neuronas en la materia gris de las muestras tratadas es claramente evidente en las secciones de resina teñidas con azul de toluidina (Figura 9A). En un contraste agudo, el edema y la vacuolación de las neuronas se observa en todo el tejido de control (sin tratar, solo gel o gel con oligodesoxinucleótidos aleatorios) en la Figura 9B.

45 El marcaje y los estudios inmunohistoquímicos posteriores hasta el día 20 muestran que las neuronas en los segmentos de cordón tratados (marcaje Neuronal-N) sobreviven durante este período mientras que pocos permanecen viables después de tan solo 3 días en los segmentos de control. El marcaje con isolectina-B4 muestra una amplia invasión microglial activada (fenotipo macrofágico) de segmentos de control a los cinco días en cultivo. En las muestras tratadas, las células microgliales activadas se restringen a los bordes externos (donde los tractos axónicos de la materia blanca estaban previamente y en los extremos muy cortados). Notablemente, el marcaje de MAP-2, un marcador de los procesos neuronales, indica un potencial significativo para el recrecimiento en segmentos de médula tratados en comparación con los segmentos de control, que no muestran ningún marcaje de MAP-2 en absoluto (Figura 10A-B).

55 Ejemplo V

Injerto de nervios periféricos a través de lesiones de la médula espinal

60 Para el injerto de nervios periféricos, se volverá a tratar el tejido con oligodesoxinucleótidos antisentido específicos para Conexina 43 en el momento del injerto para prevenir la propagación de lesiones del sitio de injerto y la activación microglial que conduce al aislamiento del injerto de la población neuronal del tejido huésped, lo que restringe la reparación neuronal.

65 Injertos de nervios periféricos:

Los segmentos de la médula espinal se colocan sobre insertos de cultivo (Millipore Millicell) en platos de 35 mm y el nivel del medio de cultivo se eleva hasta que se forme un minisco sobre los segmentos. Los oligodesoxinucleótidos antisentido específicos para conexina 43 (30 mers, concentración de 1 μ M) en un gel plurónico al 30 % se colocan inmediatamente sobre el tejido medular. El gel se fija a temperaturas fisiológicas y proporciona la liberación sostenida de los oligómeros antisentido. Este tratamiento reducirá los niveles de proteína conexina 43 durante entre 24 y 48 horas, con reducción máxima a las 6-8 horas después del tratamiento. Tales segmentos de médula, estabilizados en cultivo, y después de ser reexpuestos al trauma de incisión, muestran los mismos síntomas que la intervención quirúrgica *in vivo*, incluyendo la expansión de lesiones e hinchazón tisular en el área de corte. Este efecto puede evitarse mediante el tratamiento con oligómeros antisentido específicos para Conexina 43 en el momento de la incisión; y en consecuencia, los bordes de corte permanecen bien definidos sin signos evidentes de edema o hinchazón tisular.

Los segmentos se colocan de extremo a extremo pero se separan por un espacio de 1 - 5 mm. Después de un período de estabilización de uno a tres días en cultivo, se coloca un injerto de un nervio ciático de una cría de rata P7 - P14 a través de la separación. Estudios anteriores han indicado que tanto el injerto del nervio ciático (o su rama safena)(Yick, L. W. y otros, 1999, *Exp. Neurol.* 159: 131-138; Aguayo, A. J. y otros, 1981, *J. Exp. Biol.* 95: 231-240) o del nervio intercostal (Cheng, H., y otros, 1996, *Science*, 273: 510-513) tiene un potencial considerable para inducir la elongación axonal y la supervivencia de las neuronas.

Inmediatamente después del injerto, el retratamiento comenzará con los oligómeros antisentido de Conexina 43 acompañado de la evaluación de conductas neuronales en los días posteriores. Dado que el período de cultivo después del injerto es relativamente corto (hasta 15 días) en comparación con los estudios *in vivo* (15 días a 7 meses después de la cirugía) se usan una variedad de marcadores para evaluar la respuesta de reparación como se detalla más adelante (Resultados de medición). Los experimentos se realizan con y sin la adición de factores de crecimiento exógenos (tales como FGF o NGF ácido) que podrían desempeñar una función en la inducción de la proliferación y/o migración neuronal.

Ejemplo VI

Inserción de implantes sembrados con células de Schwann entre segmentos colocados de extremo a extremo

Para los implantes entre segmentos tratados, se han seleccionado las células de Schwann ya que se ha demostrado que son promotores fuertes de la regeneración axonal (Xu, X. M. y otros, 1999, *J. Neurosci.* 11: 1723-1740; Keirstead, H. S. y otros, 1999, *Exp. Neurol.* 159: 225 - 236).

Las células implantadas pueden proporcionar un entorno permisivo para la regeneración axonal del sistema nervioso central y han demostrado ser eficaces para inducir el recrecimiento de los axones. Para esta aplicación deben usarse implantes de minicanales sembrados con células de Schwann o matrigel colocados entre segmentos de médulas colocados de extremo a extremo. El principio aquí es que para las intervenciones para reparación espinal, sería conveniente extirpar el tejido cicatricial y llenar el espacio con material de implante. Los métodos usados se describen por Morrissey y otros y Xu y otros (Morrissey, T. K. y otros, 1991, *J. Neurosci.* 11: 2433 - 2442; Xu, X. M. y otros, 1995, *J. Comp. Neurol.* 351: 145-160). Esencialmente, los nervios ciáticos se obtienen de ratas adultas, el epineurio y el tejido conectivo se eliminan después y se colocan los explantes de 1 mm de largo en cultivo con Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM- Gibco, Estados Unidos). El crecimiento de las células migratorias son predominantemente fibroblastos y los explantes se mueven a un nuevo plato a medida que estos alcanzan la confluencia. Esto se repite durante tres a cinco pasajes hasta que las células que emergen son principalmente células de Schwann. Estas se disocian y se cultivan para sembrarlas en canales de guías de copolímero o matrigel (Schmidt, C. E. y Baier Leach, J., 2003, *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 5: 293-347). Una vez que se prepara el material de implante, los segmentos cultivados tendrán sus extremos recortados para imitar la escisión cicatricial, y se colocarán de extremo a extremo con material de implante encajado entre ellos. Inmediatamente después del injerto, las muestras se vuelven a tratar con los oligómeros antisentido para Conexina 43 y se monitorea el comportamiento neuronal durante los días posteriores.

Resultados de medición

Se llevan a cabo experimentos en el tiempo tanto para los injertos como los implantes periféricos para establecer si existe una respuesta inmediata, tardía o continua a los tejidos del injerto. Se usan varios marcadores para evaluar la respuesta neuronal y el potencial de reparación. Estos incluyen: Marcadores neuronales (anticuerpos contra Neuronal-N), de neurofilamento (anticuerpos contra MAP-2 y SMI-31) y citoplasmáticos (CMFDA) y colorantes de membrana (Di-I o Axon grease-Molecular Probes, Oregón, Estados Unidos). Se monitorean específicamente el aumento de la brotación neural, el aumento de la distancia de migración de los axones (relación de longitud de puente con respecto a la distancia migrada) y el aumento del número de axones que crecen hacia o a través del injerto. Marcadores específicos celulares (GFAP para astrocitos, Isolectina-B4 para células microgliales y S-100 para células de Schwann). Se evalúan la distribución y la densidad de las células gliales, y los niveles de mielinización. El anti-CGRP (un marcador de nervios periféricos) se usa para distinguir entre los axones de origen de nervio periférico en oposición a los que se regeneran de los segmentos de médula. Los anticuerpos contra GAP-43 (proteína asociada con crecimiento) se usan

para identificar conos de crecimiento neuronal. Las secciones semidelgadas teñidas con azul de toluidina y la microscopía electrónica de las secciones transversales de injerto se usan para el análisis morfológico.

Los anticuerpos secundarios se conjugan con colorante Alexa. Para el marcaje doble o triple, se usan sondas Zenon (Molecular Probes, Oregón, Estados Unidos) cuando sea apropiado. Todas los marcadores de anticuerpos y colorantes se analizan mediante el uso de los microscopios confocales de barrido asistido por láser Leica TCS 4D y SP2 de la Unidad de Investigación de Imágenes Biomédicas de la Universidad de Auckland. La microscopía electrónica se realiza en un microscopio electrónico Hitachi H-7000. Los programas de análisis de imágenes (AnalySIS o NIH Image J) se usan para cuantificar las diferencias entre los injertos de control y tratados.

Ejemplo 7 - diseño de oligodesoxinucleótidos antisentido

Materiales

Los materiales usados en la presente descripción incluyen anticuerpos y plásmidos reconocidos en la técnica; tales como, por ejemplo, plásmidos para conexina 43 (T7291,) y conexina 26 de rata; plásmidos para conexina 43 y conexina 26 de ratón (Invivogen, Estados Unidos), conexina 43 anti-rata de ratón y conexina 26 anti-rata de conejo de Zymed (51-2800); y anticuerpos secundarios anti Alexa 488 de ratón de carnero y anti Alexa 568 de conejo de carnero de Molecular Probes, Eugene OR. Los núcleos se tiñeron mediante el uso de colorante Hoechst 33258 (Sigma). Todas las desoxirribosimas y oligodesoxinucleótidos se adquirieron de Sigma Genosys, Australia, como oligómeros desalados. Los oligómeros marcados con TaqMan se adquirieron de Applied Biosystems, Estados Unidos. Todos los oligodesoxinucleótidos se adquirieron como oligodesoxinucleótidos de fosfodiéster no modificados.

Diseño de desoxirribosimas

El diseño y la prueba de desoxirribosimas fueron similares a los descritos en estudios anteriores (Santoro, S. W. y Joyce, G. F. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (1997), 94, 4262-4266 y Cairns, M. J. y otros, (1999) *Nat. Biotech* 17, 480-486). En resumen, todos los sitios AU y GU en la secuencia de ARNm de la conexina diana se seleccionaron con 8 o 9 nucleótidos en cada lado de la A o G. Las desoxirribosimas son el complemento de esta secuencia codificante con sentido con la "A" o "G" reemplazada con la "ggctagctacaacga" del núcleo catalítico "10-23". Las desoxirribosimas de control tenían un núcleo catalítico defectuoso de "ggctaActacaacga" con una mutación puntual única (g—A) Santoro, S. W. y Joyce, G. F. *Biochem* 37, 13330-13342). También se diseñaron desoxirribosimas específicas para GC y AC para cubrir las interrupciones dejadas por las desoxirribosimas AU y GU que no cumplían con los tres requisitos siguientes. Cada desoxirribosima se nombró de acuerdo con la posición de los nucleótidos "A" o "G" del codón de iniciación ATG. Esas desoxirribosimas seleccionadas para el ensayo *in vitro* tenían que cumplir con tres requisitos:

Estabilidad térmica: las desoxirribosimas elegidas no deben formar estructuras secundarias estables, ya sea bucle en horquilla u homodímeros. Se descartó cualquier desoxirribosima con una temperatura de fusión de horquilla u homodímero mayor que 37 °C por ser presumiblemente incapaz de unirse a la secuencia diana a temperaturas fisiológicas.

Afinidad: Los valores totales de AG de ambos brazos de unión no deben ser mayores que -30 Kcal. Cada brazo de unión individual está entre -10 a -15 kcal. Esto es un compromiso entre la especificidad de la unión/cebado incorrecto (debido al mayor contenido de CG) y un requisito de tasa de unión/recambio eficaz para desoxirribosimas. La longitud del brazo de unión a cada lado del sitio de escisión se ajusta para encontrar el valor de AG ideal y la etapa (1) se repite para verificar. (3) Especificidad: Todas las secuencias de unión dianas se buscaron en BLASTn con Gene Bank para verificar la especificidad (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Se descartaron desoxirribosimas con homología a otros genes de conexina u otros genes de roedor conocidos.

Pruebas in vitro de desoxirribosimas

Los ADNc de conexina 43 y conexina 26 de ratón se escindieron del vector pORF (Invivogen) con NcoI y NheI y se subclonaron en pGEM-T (Promega) antes de la transcripción *in vitro*. Se usaron el ADNc de conexina 43 de rata de 2,4 kb de longitud completa y el ADNc de conexina 43 de rata de 1,4 kb de codificación completa que incluían 200 nucleótidos de regiones no traducidas 5' para la transcripción *in vitro*. El ARNm de longitud completa se transcribió a partir de ADN de plásmido linealizado mediante el uso de un kit Promega Riboprobe. El ARNm resultante se purificó con una columna de centrifugación para PCR (Qiagen). La concentración se determinó mediante la lectura en espectrofotómetro de la DO a 260 nm. Después, las desoxirribosimas (40 µM de concentración final) y el ARNm (0,01 a 0,05 µg/ µl de ARNm total) se equilibraron previamente por separado con un tampón de escisión 2x (100 mM de Tris 7.5; 20 mM de MgCl₂; 300 mM de NaCl; SDS al 0,02 %) durante 5-10 minutos a 37 °C. Después, se incubaron la mezcla de ARNm y desoxirribosima durante una hora a 37 °C, después de lo cual, se añadió IOx Bluejuice (Invitrogen) para detener la reacción de escisión y la mezcla se mantuvo en hielo. Después la mezcla de reacción se cargó en un gel de poli(acrilamida) al 4 % precorrido (relación acril: bis 19:1, BioRad) en tampón IxTBE y 7 M de Urea y se corrieron hasta 2 horas. Los geles se tiñeron con una dilución de 1:10 000 de SYBR green II (Mol Probes, Estados Unidos) en tampón TBE y se obtuvieron imágenes mediante el uso de un sistema BioRad Chemi Doc.

Diseño de oligómeros antisentido

Las secuencias antisentido se eligieron con base en las secuencias de veinte nucleótidos de los brazos de unión a desoxirribosimas que tuvieron éxito en la escisión del ARNm *in vitro*. Las secuencias seleccionadas se eligieron para su uso en el diseño de oligos de 30 mer (Brysch, W. (1999). *Antisense Technology in the Ventral Nervous System*, ed. H. A. Robertson; Oxford University Press 2141) y (Walton S., y otros, (2002) *Biophysical Journal* 82, 366-377). En resumen, se evitaron los motivos GGGG y CpG que provocan los efectos secundarios relacionados con la secuencia tales como la homología parcial de una secuencia de 8-10 bases CG apareadas a genes no relacionados. Las secuencias antisentido con el extremo 3' que terminan con una Timidina o más de tres C o G en los cinco últimos nucleótidos también se evitan si es posible para evitar un cebado incorrecto. Los oligómeros que forman estructuras secundarias estables tales como homodímeros, motivos de palíndromos o estructuras de horquilla secundarias impiden que los oligómeros se unan al ARNm diana. Los oligómeros de control, incluidos los oligómeros con sentido, revueltos, inversos y no coincidentes también se diseñaron para evaluar posibles efectos secundarios relacionados con la química debido a la hibridación cruzada, la unión a proteínas no específicas y la toxicidad.

Cultivo de órganos corneales y tratamiento con oligonucleótidos antisentido

Las ratas Wistar de 30-34 días de edad se sacrificaron con dióxido de carbono y se diseccionaron los ojos completos de las ratas. La superficie ocular se diseccionó, se desinfectó con 0,1 mg/ml de penicilina - estreptomycin durante 5 minutos y se enjuagó en PBS estéril. El ojo completo se transfirió después a un soporte estéril en un plato de cultivo de 60 mm con la córnea orientada hacia arriba. Los ojos se montaron con el epitelio de la córnea expuesto en la interfaz de aire-medio y se cultivaron a 34 °C en una incubadora de CO₂ al 5 % humidificada en medio libre de suero (Opti-MEM, Invitrogen) durante hasta 48 horas. Se añadió 100 µl de medio gota a gota a la superficie cada ocho a doce horas para humedecer el epitelio. Los niveles medios se mantuvieron al nivel de la conjuntiva limbal.

Los oligómeros antisentido se mezclaron con gel F127 Plurónico (Sigma) al 30 % (p/p) en hielo a una concentración final de 2 µM y se aplicaron 10 µl sobre las córneas como se describió anteriormente. (Ver Becker, D.L., y otros; (1999b) *Dev. Genet.* 24:33-42; Green, C.R., y otros; (2001), *Methods Mol Biol* 154, 175-185). Cada tratamiento tenía un tamaño de muestra de 3 a 4 córneas por experimento. Los experimentos preliminares mostraron que los tratamientos dobles del control positivo, DB1, durante 8 horas tuvieron poco efecto en la expresión de la proteína conexina 43 en el cultivo de las córneas. Por lo tanto, las córneas se cultivaron durante 24 horas y se aplicaron los oligómeros específicos para conexina 43 cada 8 horas. Sin embargo, se encontró que la expresión de conexina 26 endógena se ve afectada si el cultivo se mantenía durante 24 horas. Por lo tanto, se redujo el período de cultivo para las córneas tratadas con oligómeros específicos para conexina 26 a las 12 horas, con la aplicación de oligómeros antisentido cada 4 horas. El medio se cambió diez minutos antes de cada aplicación repetida de los oligómeros antisentido o de control. En momentos definidos, las córneas se enjuagaron con PBS, se sumergieron en OCT (Tissue Tek, Japón) y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Las criosecciones de 25 µm se cortaron posteriormente con un criostato Leica (CM3050s) y se montaron en portaobjetos SuperFrost Plus (Menzel, Alemania). Para el análisis del ARNm de Cx43 y Cx26 se recolectaron las córneas 8 horas después de un tratamiento antisentido único.

Aislamiento de ARN y PCR en tiempo real

El ARN total se extrajo de las córneas de ratas aisladas mediante el uso de reactivo TRIzol (GIBCO, Invitrogen, Estados Unidos) de acuerdo con los protocolos del fabricante. La calidad de las muestras de ARN se evaluó mediante electroforesis a través de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y las bandas de ARNr 18S y 28S se visualizaron bajo iluminación UV. El rendimiento de la extracción se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm. Para la PCR en tiempo real, el ADNc se preparó a partir de 5 µg de ARN total mediante el uso de oligo dT y superscript II Rnasa H- transcriptasa inversa (Life Technologies, Invitrogen, Estados Unidos) en un volumen de reacción final de 20 µl. La reacción de PCR cuantitativa se llevó a cabo en placas de reacción óptica de 96 pocillos mediante el uso de un equivalente de ADNc de 100 ng de ARN total para cada muestra en un volumen de 50 µl mediante el uso de la Mezcla Maestra de PCR Universal TaqMan (Applied Biosystems, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR se desarrolló en el instrumento del sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Estados Unidos). Las condiciones de los ciclos térmicos comprendieron una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos y 50 ciclos de PCR de dos etapas, que incluyen 15 segundos de desnaturalización a 95 °C y 1 minuto de apareamiento-elongación a 60 °C, mediante el uso del protocolo estándar del fabricante. Todos los experimentos se repitieron por triplicado. El monitoreo del control negativo para cada diana mostró ausencia de arrastre.

La amplificación de ARNr 18S se realizó como una referencia interna contra la cual otros valores de ARN pueden normalizarse. Si las eficiencias de las amplificaciones del ARNr diana y 18S eran aproximadamente iguales, entonces se usó la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para calcular los niveles relativos de ARNm sin la necesidad de una curva estándar. Si la eficacia de amplificación del ARNr diana y 18S fue significativamente diferente, se usó un método de curva estándar relativo para calcular las cantidades absolutas de ARNm y ARNr 18S para cada experimento a partir del Ct medido, y después los niveles relativos de ARNm del gen diana en comparación con el control cuantificado después de la normalización con respecto al ARNr 18S.

Todos los cálculos se realizaron mediante el uso del software PRISM 3.02 (GraphPad, San Diego). La diferencia estadística entre los grupos se determinó mediante el uso de la prueba t de Student. Las comparaciones entre varios grupos se realizaron mediante una ANOVA, y la significación se calculó mediante el uso de la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

5 Evaluación de la eficiencia de los oligómeros antisentido en la traducción de bloqueo

Se usaron oligómeros marcados con Cy3 y TaqMan (Fam, Tamra) para evaluar la penetración y la estabilidad. Los oligómeros marcados con Cy3 (Sigma Genosys) y los oligómeros marcados con TaqMan (FAM, TAMRA) (Applied Biosystems) se aplicaron con gel Plurónico para medir tanto la estabilidad como la penetración de oligómeros en el epitelio corneal. Las córneas tratadas se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos, se montaron en agar al 1 % y se visualizaron bajo una lente de inmersión en agua de 40x como montura completa. La profundidad de la penetración del oligómero se midió mediante el uso de la opción de barrido Z en un microscopio confocal Leica SP2 y se midieron las gráficas de intensidad contra la distancia z. La descomposición de los oligómeros TaqMan se midió mediante el uso de la opción de barrido Lambda en el confocal. La transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (o FRET) entre la molécula FAM (donante) y la TAMRA (receptora) se produce en oligómeros intactos de 30 mer. Cuando el oligómero se descompone, FAM y TAMRA ya no están en estrecha proximidad y el FRET ya no se produce.

20 Marcaje inmunofluorescente

El inmunomarcaje de conexinas en las secciones de la córnea se realizó como se describió anteriormente. En resumen, las secciones se bloquearon en suero de carnero al 10 % y se incubaron con anticuerpo primario a 1:250 (anti conexina 43 de rata de ratón) o 1:500 (anti conexina 26 de rata de conejo) a 4 °C durante toda la noche. Las secciones se lavaron después con PBS, se incubaron con dilución 1:400 de anticuerpo secundario marcado con Alexa 488 a temperatura ambiente durante 2 horas y después se fijaron en paraformaldehído al 4 % y se contratiñeron con yoduro de propidio 0,2 µM o una dilución 1:50 de Hoechst 33258 durante 10 min. Las secciones se montaron en medio de anti desvanecimiento Citifluor (Agarscientific Reino Unido). Todas las imágenes se recolectaron mediante el uso de un microscopio confocal de barrido asistido por láser Leica TCS-4D o Leica SP2 y se almacenaron como archivos TIF. Todas las imágenes se recolectaron mediante el uso de configuraciones de voltaje constante (520-540 V) y de compensación (-2). El voltaje y la compensación se configuraron mediante el uso de la opción de visualización de ajuste de brillo para maximizar la escala de grises de las imágenes del tejido de control. Las mismas configuraciones se usaron después para todas las muestras dentro del mismo experimento.

35 Para la cuantificación, se procesaron cuatro cortes ópticos a través de tres micrómetros en una única imagen óptica de enfoque extendido mediante el uso de la opción de proyección topográfica del centro de masa en el TCS-4D. Las manchas del marcador de conexina se contaron mediante el uso de NIH image (Scion Corp.) después del umbral a una intensidad de 90 a 100 píxeles en la imagen en escala de grises 256. Se midió además el área del epitelio de la córnea y se calculó una densidad de conexina por unidad de área. Se usó un promedio de cuatro imágenes de enfoque extendido para calcular la densidad de conexina absoluta de cada córnea. Este número se normalizó después con respecto a la densidad de conexina media de las córneas tratadas con el control con sentido o tratadas con gel. Se han representado los datos como porcentaje de caída cuando se comparan diferentes tratamientos.

45 Las desoxirribosimas escinden selectivamente el ARNm *in vitro*

Se diseñaron sesenta y seis desoxirribosimas específicamente contra el ARNm de conexina 43 de roedor (Tabla 5). Veinte de estas desoxirribosimas se diseñaron para reconocer tanto el ARNm de conexina 43 de ratón como de rata. También se adquirieron dos desoxirribosimas defectuosas con una única mutación puntual en el núcleo catalítico "10-23" como controles negativos. Los resultados de la escisión por desoxirribosimas fueron similares para el ARNm de conexina 43 de rata de 1,1 Kb de longitud (no se muestra) y el ARNm de conexina 43 de rata de 2,4 Kb de longitud (Figura 11 A). Tanto el ARNm de conexina 43 de rata (Figura 11A) como de ratón (Figura 11B) parecen tener regiones similares accesibles para las desoxirribosimas. Los resultados indican cuatro regiones en el ARNm de conexina 43 de roedor que se exponen y están disponibles para la escisión por las desoxirribosimas. Estas regiones son de alrededor de 367-466, 526-622, 783-885, y 10071076 bases desde el codón de iniciación ATG. Las dos desoxirribosimas defectuosas, aldf605 y aldf783, no mostraron escisión del ARNm de conexina 43 de roedor. Las desoxirribosimas diseñadas contra la región no traducida 5' de 200 pares de bases del ARNm de conexina 43 de rata tampoco mostraron ninguna actividad de escisión.

60 Tabla 5. Resumen de las secuencias de desoxirribosimas (dz) y oligodesoxinucleótidos antisentido (as) que muestran varios grados de actividad *in vitro* e *in vivo* contra conexina 43 de rata.

65

ES 2 749 374 T3

	Nombre	Secuencia de ODN en dirección 5' a 3'	in vitro	proteína in vivo	ARNm In vivo
5	SEQ ID NO: 32	r43dzl4 CCAAGGCA ggctagctacaacga TCCAGTCA	-		
	SEQ ID NO: 33	aldz605 CCGTGGGA ggctagctacaacga GTGAGAGG	+		
	SEQ ID NO: 34	aldf605 CCGTGGGA ggctaActacaacga GTGAGAGG	-		
10	SEQ ID NO: 35	r43dz769 AGTCTTTTG ggctagctacaacga TGGGCTCA	-		
	SEQ ID NO: 36	aldz783 TTTGGAGA ggctagctacaacga CCGCAGTC	++		
	SEQ ID NO: 37	aldf783 TTTGGAGA ggctaActacaacga CCGCAGTC	-		
15	SEQ ID NO: 38	r43dz885DBI ACGAGGAA ggctagctacaacga TGTTTCTG	+++		
	SEQ ID NO: 39	r43dz892 TTGCGGC ggctagctacaacga CGAGGAAT	-		
20	SEQ ID NO: 40	r43dz953 CCATGCGA ggctagctacaacga TTTGCTCT	+++		
	SEQ ID NO: 41	r43dzl076 TTGGTCCA ggctagctacaacga GATGGCTA	+++		
25	SEQ ID NO: 42	DB1 GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC		+	++
	SEQ ID NO: 43	DBIs GACAGAAACAATTCCTCCTGCCGCAATTAC		-	-
	SEQ ID NO: 44	r43asl4 CCAAGGCACTCCAGTCAC		-	
30	SEQ ID NO: 45	alas605 TCCGTGGGACGTGAGAGGA		++	++
	SEQ ID NO: 46	r43as769 AGTCTTTTGATGGGCTCA		arriba	arriba
	SEQ ID NO: 47	alas783 TTTTGGAGATCCGCAGTCT		+	++
	SEQ ID NO: 48	r43as885 CACGAGGAATTGTTTCTGT		+	
35	SEQ ID NO: 49	r43as892 TTTGCGGCACGAGGAATT		-	
	SEQ ID NO: 50	alas953 CCCATGCGATTTTGCTCTG		+	
	SEQ ID NO: 51	alas1076 GTTGGTCCACGATGGCTAA		+	

40 La Tabla 5 muestra las secuencias de ribozima y antisentido seleccionadas sobre la base de estudios de escisión por ribozimas in vitro para el análisis in vivo (niveles de ARNm y/o proteína) o cuando los controles defectuosos de ribozima (SEQ ID NO:56 y SEQ ID NO:59) se comparan con las ribozimas normales.

45 Los nombres de los oligómeros tienen el prefijo r43 cuando son específicos solamente para la conexina 43 de rata; el prefijo a1 denota especificidad tanto contra el ratón como la rata. Todas las secuencias de los oligómeros son oligodesoxinucleótidos de fosfodiéster no modificados. "ggctagctacaacga" representa el núcleo catalítico "10-23" de las desoxirribozimas y "ggctaActacaacga" es el control de mutantes defectuosos. DB1 es una versión de 30 mer de as885 (marcada en minúsculas) y DB1s es el control con sentido de la secuencia de DB1. Los efectos in vitro se midieron como el porcentaje de escisión de ARNm por las desoxirribozimas individuales. Los efectos in vivo se midieron mediante el inmunomarcado de conexina 43 en secciones de la córnea (en referencia a la Figura 15) o la evaluación por PCR en tiempo real de los niveles de ARNm supervivientes (en referencia a la Figura 16). +++ significa >75 %, ++ significa entre el 50 % al 75 %, + significa entre el 25 % al 50 %, y - significa entre el 0 % al 25 % de escisión in vitro de ARNm o reducción in vivo de proteína y expresiones ARNm, arriba significa un aumento en la expresión de la proteína conexina 43 cuando se compara con DB1 con sentido y el tratamiento de control solamente con gel.

55 También se analizaron cuarenta y cuatro desoxirribozimas diseñadas específicamente contra el ARNm de conexina 26 de roedor (Tabla 6), de las cuales 17 desoxirribozimas coincidían tanto con el ARNm de conexina 26 de ratón como de rata. El ARNm de conexina 26 de rata apareció como una doble banda en el gel debido a la presencia de dos promotores de ARN polimerasa T7 en el plásmido de clonación. Los resultados de escisión muestran que el ARNm de conexina 26 tiene al menos dos regiones accesibles para las desoxirribozimas, en las regiones base 318-379 y 493-567 (Figura 12A, 12B). Estas figuras muestran que la desoxirribozima de escisión más consistente es la cx26dz330, que escinde ambas especies de ARNm en una hora. Las dos desoxirribozimas defectuosas (b2df351 y b2df379) no mostraron escisión del ARNm de conexina 26 de roedor. Las desoxirribozimas cx26dz341, dz351, dz375, dz379 escinden consistentemente el ARNm de conexina 26 de rata a una tasa mayor en comparación con el ARNm de conexina 26 de ratón. Por otra parte, mcx26dz153 y dz567 parecen ser desoxirribozimas superiores de conexina 26 en el ratón cuando se compara con la rata.

Tabla 6. Secuencias de desoxirribosimas (dz) y oligodesoxinucleótidos antisentido (as) que muestran diversos grados de actividad *in vitro* e *in vivo* contra conexina 26 de roedor.

	Nombre	Secuencia de ODN en dirección 5' a 3'	<i>in vitro</i>	proteína <i>in vivo</i>	ARNm <i>in vivo</i>
5					
	SEQ ID NO: 52	m26dz153 GTTGCAGA ggctagctacaacga AAAATCGG	+++		
	SEQ ID NO: 53	b2dz330 GTTCTTTA ggctagctacaacga CTCTCCCT	+++		
10	SEQ ID NO: 54	b2dz341 GTCCTTAAA ggctagctacaacga TCGTTCTTT	+++		
	SEQ ID NO: 55	b2dz351 TCTCTTCGA ggctagctacaacga GTCCTTAAA	+++		
	SEQ ID NO: 56	b2df351 TCTCTTCGA ggctaActacaacga GTCCTTAAA	-		
15	SEQ ID NO: 57	b2dz375 GATACGGA ggctagctacaacga CTTCTGGG	+++		
	SEQ ID NO: 58	b2dz379 CTTGATA ggctagctacaacga GGACCTTC	+++		
	SEQ ID NO: 59	b2df379 CTTGATA ggctaActacaacga GGACCTTC	-		
20	SEQ ID NO: 60	m26dz567 GGTGAAGA ggctagctacaacga AGTCTTTTCT	+++		
	SEQ ID NO: 61	b2as330n CCTTAAACTCGTTCTTTATCTCTCCCTTCA		-	++
	SEQ ID NO: 62	b2rv330n ACTTCCCTCTCTATTTCTTGCTCAAATTCC		-	-
25	SEQ ID NO: 63	r26as375n TACGGACCTTCTGGGTTTTGATCTCTTCGA		-	+
	SEQ ID NO: 64	r26rv375n AGCTTCTCTAGTTTTGGGTCTTCCAGGCAT		-	

30 La Tabla 6 muestra las secuencias de ribozima y antisentido que escindieron consistentemente el ARNm *in vitro*, se seleccionaron sobre la base de los estudios de escisión por ribozima *in vitro* para el análisis *in vivo* (niveles de ARNm y/o proteína) o cuando se usaron como controles de ribozima defectuosos. Los nombres de los oligómeros tienen el prefijo m26 o r26 donde son específicos solamente para el ARNm de conexina 26 de ratón o rata respectivamente, y el prefijo b2 denota especificidad contra ambas especies. Todas las secuencias de los oligómeros son oligodesoxinucleótidos de fosfodiéster no modificados. "ggctagctacaacga" representa el núcleo catalítico "10-23" de las desoxirribosimas y "ggctaActacaacga" es el control de mutantes defectuosos. También se usó un control inverso (rv) para controlar cualquiera de los efectos no específicos de los oligómeros antisentido. Los efectos *in vivo* se midieron mediante el inmunomarcaje de conexina 26 en las secciones de las córneas y la PCR en tiempo real de la expresión de ARNm diana (en referencia a la Figura 17). +++ significa >75 %, ++ significa entre 50 % al 75 %, + significa entre el 25 % al 50 %, y - significa entre el 0 % al 25 % de la escisión de ARNm *in vitro* o la reducción de las expresiones de ARNm y proteína *in vivo*.

45 El ODN marcado fluorescentemente en gel plurónico puede penetrar en el epitelio corneal

Las córneas de rata mantienen la expresión tanto de conexina 43 como de conexina 26 en cultivo de órganos y son fácilmente accesibles para el suministro de oligómeros antisentido en el gel F-127 plurónico al 30 %. Por lo tanto, el cultivo de órganos de córnea de ratas se seleccionó como el sistema modelo para probar la eficacia de los diseños de oligodesoxinucleótidos antisentido derivados del modelo *in vitro*. Se cultivaron las córneas de rata durante 24 horas y se descubrió que el endotelio permanece intacto. Sin embargo, los tiempos de cultivo de más de 48 horas parecieron afectar la opacidad de las córneas y por lo tanto no se usaron. Los oligómeros marcados con Cy3 se usaron para determinar el grado de penetración del oligómero en la córnea cultivada. Los cortes ópticas confocales hacia abajo a través de la córnea intacta muestran que la señal fluorescente está presente con los oligómeros marcados con CY3 en la Figura 13A muestra la señal fluorescente de 10 µm de profundidad en la córnea cultivada 1 hora después del tratamiento inicial. Las sondas TaqMan conjugadas a oligodesoxinucleótidos se usaron para medir y demostrar el suministro de oligodesoxinucleótidos intactos con gel plurónico al 30 % en el epitelio corneal. Una proporción significativa de oligómero permaneció intacta una hora después del tratamiento (Figura 13B, 13C). La señal punteada de los oligómeros intactos (FRET que se produce en la Figura 13C) puede observarse como la longitud de onda roja (representada en escala de grises) mientras que la señal de los oligómeros degradados (sin FRET) aparece en el espectro verde (representado en la escala de grises) (Figura 13B).

El ensayo de desoxirribosimas predice los ODN que pueden provocar la caída de la proteína conexina 43 en el epitelio corneal.

65 En un experimento preliminar, se trataron las córneas de rata con una única aplicación del control positivo, DB1, y no se encontraron cambios significativos en la expresión de la proteína conexina 43 después de 8 horas. La caída

evidente de proteínas a las 24 horas se observó después de tres aplicaciones en ocho intervalos por hora. Con base, en parte, en los resultados del ensayo de escisión por desoxirribosimas se analizaron ciertos oligómeros antisentido *in vivo* (DB1, r43as605, r43as783, r43as885, r43as953 y r43as1076), así como también los oligómeros antisentido pronosticados como no funcionales (r43as14, r43as769 y r43as892) y un control negativo (DB1 con sentido). Se encontró la caída de los niveles de proteína conexina 43 después de 24 horas de tratamiento en comparación con los controles (Figura 14A) con todos los oligómeros antisentido que se había determinado que deberían ser positivos (Figura 14C, 14E, 14G). Los tres de los pronosticados como negativos, y el oligómero de control negativo, no afectaron la expresión de la conexina 43 (Figura 14B, 14D, 4F, 4H). DB1, una versión de 30 mer de as885, mostró una caída porcentual similar al as885 más pequeño (justo bajo una caída del 50 %). Uno de los oligómeros antisentido mejor identificados en este experimento parecía ser as605 con una reducción del 64 % en el nivel de proteínas. Un resumen de estos resultados cuantificados se presenta en la Figura 15.

Para probar la técnica para otros conexinas, se diseñaron oligodesoxinucleótidos adicionales y se probaron para la conexina 26. Dos oligodesoxinucleótidos antisentido de 30 mer designados como r26as330N y 375N, junto con sus oligodesoxinucleótidos de control inverso adecuados se diseñaron contra conexina 26 con base en las regiones dentro de las áreas de escisión de b2dz330 y b2dz375. Se encontró que estos oligodesoxinucleótidos antisentido (as330N y as375N) no condujeron, sin embargo, a una diferencia significativa en los niveles de expresión de proteínas dentro del período de tiempo de 12 horas para estos experimentos cuando los cultivos tratados con oligómeros antisentido se compararon con las córneas tratadas con control inverso.

Los ODN antisentido conducen a la reducción del ARNm de conexina 43 y conexina 26

La PCR en tiempo real se usó para determinar el efecto de los oligodesoxinucleótidos antisentido en los niveles de ARNm. Se confirmó que los oligodesoxinucleótidos antisentido que desactivan la expresión de la proteína conexina 43 (as605, as885, DB1) también tienen menores niveles de ARNm de conexina 43 en comparación con las córneas de control dentro de las 8 horas después del tratamiento (Figura 16). La reducción porcentual en los niveles relativos de ARNm de conexina 43 se correlaciona bien con el nivel de reducción de la proteína conexina 43. El oligómero antisentido negativo (as769) y los 10 controles negativos (DB1 con sentido, solo gel) presentaron niveles de ARNm de conexina 43 sin cambios en comparación con las córneas de control.

La expresión de ARNm de conexina 26 también se redujo significativamente por as330N y as375N en 8 horas de tratamiento antisentido (Figura 17). El control de secuencia inversa para as330N y un control solo de gel no exhibieron efecto sobre los niveles de ARNm.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CODA THERAPEUTICS LTD.

<120> COMPUESTOS ANTISENTIDO DIRIGIDOS A CONEXINAS Y MÉTODOS DE USO DE ESTOS

<130> 50462.000002

<140>

<141>

<150> NZ 529936

<151> 2003-12-03

<160> 65

<170> PatentIn ver. 3.2

<210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

gtaattgcgg caagaagaat tgtttctgtc 30

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 749 374 T3

<400> 2
 gtaattgcgg caggaggaat tgtttctgtc 30

5 <210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 3
 ggcaagagac accaaagaca ctaccagcat 30

15 <210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 4
 tcctgagcaa tacctaacga acaaata 27

25 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 5
 catctccttg gtgctcaacc 20

35 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 6
 ctgaagtcga cttggcttgg 20

45 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 7
 ctcagatagt ggccagaatg c 21

55 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60 <400> 8
 ttgtccaggt gactccaagg 20

65 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

70 <400> 9
 cgtccgagcc cagaaagatg aggtc 25

75 <210> 10

ES 2 749 374 T3

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

5 <400> 10
 agaggcgcac gtgagacac 19

10 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 11
 tgaagacaat gaagatgtt 19

20 <210> 12
 <211> 3088
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 12

25	acaaaaaagc	ttttacgagg	tatcagcact	tttctttcat	tagggggaag	gcgtgaggaa	60
	agtaccaaac	agcagcggag	ttttaaactt	taaatagaca	ggtctgagtg	cctgaacttg	120
	ccttttcatt	ttacttcatc	ctccaaggag	ttcaatcact	tggcgtgact	tcactacttt	180
	taagcaaaag	agtggtgccc	aggcaacatg	ggtgactgga	gcgccttagg	caaactcctt	240
	gacaaggttc	aagcctactc	aactgctgga	gggaagggtg	ggctgtcagt	acttttcatt	300
30	ttccgaatcc	tgctgctggg	gacagcgggt	gagtcagcct	ggggagatga	gcagtctgcc	360
	tttcgttgta	acactcagca	acctggttgt	gaaaatgtct	gctatgacaa	gtctttccca	420
	atctctcatg	tgcgcttctg	ggtcctgcag	atcataattg	tgtctgtacc	cacactcttg	480
	tacctggctc	atgtgttcta	tgtgatgcga	aaggaagaga	aactgaacaa	gaaagaggaa	540
	gaactcaagg	ttgcccaaac	tgatggtgtc	aatgtggaca	tgcaactgaa	gcagattgag	600
35	ataaagaagt	tcaagtacgg	tattgaagag	catggtaagg	tgaaaatgcg	aggggggttg	660
	ctgcgaacct	acatcatcag	tatcctcttc	aagtctatct	ttgaggtggc	cttcttgctg	720
	atccagtggt	acatctatgg	attcagcttg	agtgctgttt	acacttgcaa	aagagatccc	780
	tgcccacatc	aggtggactg	tttcctctct	cgccccacgg	agaaaacat	cttcatcatc	840

40

45

50

55

60

65

5 ttcatgctgg tgggtgtcctt ggtgtccctg gccttgaata tcattgaact cttctatgtt 900
 ttcttcaagg gCGTTAAGGA tcgggttaag ggaaagagcg acccttacca tgCGaccagt 960
 ggtgCGctga gCCctgCCaa agactgtggg tctcaaaaat atgcttattt caatggctgc 1020
 tcctcaccia cGctccctt ctcgcctatg tctcctcctg ggtacaagct ggttactggc 1080
 gacagaaaca attcttcttg ccgcaattac aacaagcaag caagtgagca aaactgggct 1140
 aattacagtg cagaacaaaa tcgaatgggg caggCGggaa gcaccatctc taactcccat 1200
 gcacagcctt ttgatttccc cgatgataac cagaattcta aaaaactagc tgctggacat 1260
 10 gaattacagc cactagccat tgtggaccag cgaccttcaa gcagagccag cagtcgtgcc 1320
 agcagcagac ctCGgcctga tgacctggag atctagatac aggcttgaag gcatcaagat 1380
 tccattcaat tgtggagaag aaaaaagggt ctgtagaag tgcaccaggt gtaattttg 1440
 atccggtgga ggtggtaact aacagccita ttcatgaggc ttagaaaaca caaagacatt 1500
 agaataccta ggttcactgg gggtgtatgg ggtagatggg tggagagggg ggggataaga 1560
 15 gaggtgcatg ttggtattta aagtagtgga ttcaaagaac ttagattata aataagagtt 1620
 ccattaggtg atacatagat aagggtcttt tctccccgca aacacccta agaatggttc 1680
 tgtgtatgtg aatgagcggg tggttaattgt ggctaaatat ttttgtttta ccaagaaact 1740
 gaaataattc tggccaggaa taaatacttc ctgaacatct taggtctttt caacaagaaa 1800
 aagacagagg attgtcctta agtccctgct aaaacattcc attgttaaaa tttgactttt 1860
 20 gaaggtaagc tttctaggcc tgaccctcca ggtgtcaatg gacttgtgct actatatttt 1920
 tttattcttg gtatcagttt aaaattcaga caaggccac agaataagat tttccatgca 1980
 tttgcaata cgtataattc ttttccatcc attgcacaa tatcattacc tttacttttt 2040
 catcattcct cagctactac tcacattcat ttaatgggtt ctgtaaacat ttttaagaca 2100
 gttgggatgt cacttaacat tttttttttt tgagctaaag tcaggggaatc aagccatgct 2160
 25 taatatttaa caatcactta tatgtgtgtc gaagagtttg ttttgtttgt catgtattgg 2220
 tacaagcaga tacagtataa actcacaac acagatttga aaataatgca catatgggtg 2280
 tcaaatttga acctttctca tggatttttg tgggtgtggg caatatgggtg tttacattat 2340
 ataattcctg ctgtggcaag taaagcacac tttttttttc tcctaaaatg tttttcctg 2400
 30 tgtatcctat tatggatact ggtttttgta attatgattc tttattttct ctcctttttt 2460
 taggatatag cagtaatgct attactgaaa tgaatttcct ttttctgaaa tgtaatcatt 2520
 gatgcttgaa tgatagaatt ttagtactgt aaacaggctt tagtcattaa tgtgagagac 2580
 ttagaaaaaa tgcttagagt ggactattaa atgtgcctaa atgaattttg cagtaactgg 2640
 tattcttggg ttttcctact taatacacag taattcagaa cttgatttct attatgagtt 2700
 35 tagcagtctt ttggagtgac cagcaacttt gatgtttgca ctaagatfff atftggaatg 2760
 caagagaggt tgaagagga ttcagtagta cacatacaac taatttattt gaactatatg 2820
 ttgaagacat ctaccagttt ctccaaatgc cttttttaaa actcatcaca gaagattggg 2880
 gaaaatgctg agtatgacac ttttcttctt gcatgcatgt cagctacata aacagttttg 2940
 40 tacaatgaaa attactaatt tgtttgacat tccatgttaa actacgggtc tgttcagctt 3000
 cattgcatgt aatgtagacc tagtccatca gatcatgtgt tctggagagt gttctttatt 3060
 caataaagtt ttaatttagt ataaacat 3088

45 <210> 13
 <211> 1308
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 13

55

60

65

ES 2 749 374 T3

5 atgggcgact ggagctttct ggaagactc ttagaaaatg cacaggagca ctccacggtc 60
 atcggcaagg tttggctgac cgtgctgttc atcttccgca tcttggtgct gggggccgcg 120
 gcgaggagcg tgtggggcga tgagcagtc gacttcacct gcaacaccca gcagccgggc 180
 tgcgagaacg tctgctacga cagggccttc cccatctccc acatccgctt ctgggcgctg 240
 cagatcatct tctgtgccac gccaccctc atctacctgg gccacgtgct gcacatcgtg 300
 cgcatggaag agaagaagaa agagagggag gaggaggagc agctgaagag agagagcccc 360
 agccccaagg agccaccgca ggacaatccc tcgtcgcggg acgaccgcgg cagggtgcgc 420
 10 atggccgggg cgctgctgcg gacctacgtc ttcaacatca tcttcaagac gctgttcgag 480
 gtgggcttca tgcgccggcca gtactttctg tacggcttcg agctgaagcc gctctaccgc 540
 tgcgaccgct ggccctgccc caacacggtg gactgcttca tctccaggcc cacggagaag 600
 accatcttca tcatcttcat gctggcggtg gcctgcgctt cctgctgct caacatgctg 660
 gagatctacc acctgggctg gaagaagctc aagcagggcg tgaccagccg cctcggcccg 720
 15 gacgcctccg aggcccccgt ggggacagcc gatccccgc cctgcccccc cagctcccgg 780
 ccgcccggcg ttgccatcgg gttcccacc tactatgctg acaccgctgc gccctggga 840
 cagcccggcg cctgggcta cccggggcc ccgccaccag ccgcgactt caaactgcta 900
 gccctgaccg aggcgcgagg aaagggccag tccgccaagc tctacaacgg ccaccaccac 960
 20 ctgctgatga ctgagcagaa ctgggccaac caggcggccg agcggcagcc cccggcgctc 1020
 aaggcttacc cggcagcgtc cacgcctgca gccccagcc ccgtcggcag cagctccccg 1080
 ccactcgcgc acgaggctga ggcgggcgcg gcgcccctgc tgctggatgg gagcggcagc 1140
 agtctggagg ggagcgcctt ggcagggacc cccgaggagg aggagcaggc cgtgaccacc 1200
 gcgggcccaga tgcaccagcc gcccttgccc ctcgagacc caggtcgggc cagcaaggcc 1260
 25 agcagggcca gcagcgggcy ggccagaccg gaggacttgg ccatctag 1308

<210> 14
 <211> 1601
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 14

35 ctccggccat cgtccccacc tccacctggg ccgcccgcga ggcagcggac ggaggccggg 60
 agccatgggt gactggggct tcctggagaa gttgctggac cagggtccgag agcactcgac 120
 cgtggtgggt aagatctggc tgacggtgct cttcatcttc cgcatectca tcctgggcct 180
 ggccggcagc tcagtgtggg gtgacgagca gtcagatttc gagtgtaaaca cggcccagcc 240
 40 aggtgacacc aacgtctgct atgaccaggc cttccccatc tcccacatcc gctactgggt 300
 gctgcagttc ctcttcgtca gcacaccac cctggtctac ctgggcatatg tcattttacct 360
 gtctcggcga gaagagcggc tggcgcagaa ggagggggag ctgccccgac tgcccccaa 420
 ggaccacagc gtggagcggg cgctggcccg catagagctt cagatggcca agatctcggg 480
 ggcagaagat ggtcgcctgc gcattccgcg agcactgatg ggcacctatg tcgccagtgt 540
 45 gctctgcaag agtgtgctag aggcaggctt cctctatggc cagtggcggc tgtacggctg 600
 gaccatggag cccgtgtttg tgtgccagcg agcaccctgc ccctacctcg tggactgctt 660
 tgtctctcgc cccacggaga agaccatctt catcatcttc atgttgggtg tggactcat 720
 ctccctgggt cttaacctgc tggagttggt gcacctgctg tgctcgtgcc tcagccgggg 780
 gatgagggca cggcaaggcc aagacgcacc cccgaccagc ggcacctcct cagaccctta 840
 50 cacggaccag ggtcttctt cactccccg tggccagggg ccctcatccc caccatgccc 900
 cacctacaat gggctctcat ccagttagca gaactgggcc aacctgacca cagaggagag 960
 gctggcgtct tccaggcccc ctctcttctt ggaccaccc cctcagaatg gccaaaaacc 1020
 cccaagtcgt cccagcagct ctgcttctaa gaagcagtat gtatagaggc ctgtggctta 1080
 tgtcacccaa cagaggggtc ctgagaagtc tggctgcctg ggatgcccc tgccccctcc 1140
 55 tggaaaggctc tgcagagatg actgggctgg ggaagcagat gcttgctggc catggagcct 1200
 cattgcaagt tgttcttgaa cacctgaggc cttctgtgg cccaccaggc actacggctt 1260
 cctctccaga tgtgctttgc ctgagcacag acagtcagca tggaatgctc ttggccaagg 1320
 gtactggggc cctctggcct tttgcagctg atccagagga acccagagcc aacttaccct 1380
 aacctacccc tatggaacag tcacctgtgc gcaggttgc ctcaaaccct ctctcacag 1440
 60 gaaaaggcgg attgaggctg ctgggtcagc cttgatcgca cagacagagc ttgtgccgga 1500
 tttggccctg tcaaggggac tgggtgcctt ttttcatcac tcttctctag ttctactgtt 1560
 caagcttctg aaataaacag gacttgatca caaaaaaaaa a 1601

65

ES 2 749 374 T3

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

<400> 15

10	gcaaaaagcg	tgggcagttg	gagaagaagc	agccagagtg	tgaagaagcc	cacggaagga	60
	aagtccaggg	aggaggaaaa	gaagcagaag	ttttggcatc	tgttccctgg	ctgtgcccaag	120
	atgggcgatt	ggagcttcct	gggaaatttc	ctggaggaag	tacacaagca	ctcgaccctg	180
	gtaggcaagg	tctggctcac	tgctcctctc	atattccgta	tgctcgtgct	gggcacagct	240
15	gctgagtctt	cctgggggga	tgagcaggct	gatttccggt	gtgatacgat	tcagcctggc	300
	tgccagaatg	tctgctacga	ccaggctttc	cccattctcc	acattcgcta	ctgggtgctg	360
	cagatcatct	tcgtctccac	gccctctctg	gtgtacatgg	gccacgccat	gcacactgtg	420
	cgcatgcagg	agaagcgcaa	gctacgggag	gccgagaggg	caaagaggt	ccggggctct	480
	ggctcttacg	agtacccggt	ggcagagaag	gcagaactgt	cctgctggga	ggaagggat	540
20	ggaaggattg	ccctccaggg	cactctgctc	aacacctatg	tgtgcagcat	cctgatccgc	600
	accaccatgg	aggtgggctt	cattgtgggc	cagtacttca	tctacggaat	cttctgacc	660
	accctgcatg	tctgccgcag	gagtccctgt	ccccaccgg	tcaactgtta	cgtatcccgg	720
	cccacagaga	agaatgtctt	cattgtcttt	atgctggctg	tggtgcact	gtccctcctc	780
	cttagcctgg	ctgaactcta	ccacctgggc	tggaagaaga	tcagacagcg	atttgtcaaa	840
25	ccgcggcagc	acatggctaa	gtgccagctt	tctggccctt	ctgtgggcat	agtccagagc	900
	tgcacaccac	ccccgactt	taatcagtgc	ctggagaatg	gccctggggg	aaaattcttc	960
	aatcccttca	gcaataatat	ggcctcccaa	caaaacacag	acaacctggt	caccgagcaa	1020
	gtacgaggtc	aggagcagac	tcctggggaa	ggtttcatcc	aggttcgttt	tgcccagaag	1080
	cctgaggtgc	ccaatggagt	ctcaccagg	caccgccttc	cccatggcta	tcatagtgc	1140
30	aagcgacgtc	ttagtaaggc	cagcagcaag	gcaaggtcag	atgacctatc	agtgtgacct	1200
	tcctttatgg	gaggatcagg	accagggtgg	aacaaaggag	gctcagagaa	gaaagacgtg	1260
	tcccttctga	actgatgctt	tctcactgtc	atcactgctt	ggctcctttg	agccccgggt	1320
	ctcaatgacg	ttgctcatta	attctagaaa	ctataaccag	ggctctggga	tagtaagaga	1380
	ggtgacaacc	caccagact	gcagttccct	ccccaccctc	taccagat	acgaagcctt	1440
35	tcagattact	ctgaaacag	ggtagaggga	aagaagggaa	gcatggcaaa	agctggcaat	1500
	gaagggatag	ccagagggat	agaatgactc	tctctctaca	taccagcagc	ataccaaatg	1560
	cgttctctaa	gttcctacct	ccttgacctg	atcacctcc	ctcctccaag	gaagagctca	1620
40	aagttcccag	ccaatagaca	gcatgaatca	aggaacttgc	attatatgtg	ctcttgaatc	1680
	tgttgtctcc	atggaccatt	cctcggagta	gtgggtgagat	ggccttgggt	tgcccttggc	1740
	ttctcctccc	tctactcagc	cttaaaaagg	gcttcttggg	actttaccag	cagcctcagc	1800
	tttacaatag	ccttgggtatg	tacctctggc	aatgccccca	ccttgggtgat	gttgcaacct	1860
45	ttccttctgc	taggggtgtac	acctagcctg	tgcaggtgtc	agccctgcta	gggagtcact	1920
	gtacacacaa	actctactgg	aattcctgcc	aacatctgtc	accctgcagc	tcctttacag	1980
	ttcaatccaa	tgatagaaac	catcccticc	ctttctccct	tggtgtttca	cccagccatt	2040
	ccctgaaggc	cttaccaaca	ggaatatcca	agaagctggt	gtcccctctc	gaaccctgac	2100
	cagatcatca	gccactgagg	ccagtggat	ttccccaggc	cttgttaaaa	caaagaaagc	2160
50	attgtacctc	tcagattccc	cttgtggaaa	aaaaaattct	gctgtgaaga	tgaaaataaa	2220
	aatggagaga	aaacactgga	aaactatfff	cccctcctat	ttacttcctt	tgctgactgc	2280
	caacttagtg	ccaagaggag	gtgtgatgac	agctatggag	gccccagat	ctctctctcc	2340
	tgagggtctt	agcaggggca	aggaatatag	aggggaatct	ccagctctct	tggcagggcc	2400
	tttatttaaa	gagcgcagag	attcctatgt	ctccctagtg	cccctaata	gactgccaa	2460
55	tgggggctgt	agaaaagcct	tgcttcccc	agggttggc	ctggtctctg	tattcactgg	2520
	atccataatg	ggttgctggt	gttttggatg	aaggtaaacg	atgcttggaa	ttgg	2574

60

65

ES 2 749 374 T3

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

5
 <400> 16

10	atgagttgga	gctttctgac	tgcgctgcta	gaggagattc	acaaccattc	cacatttgtg	60
	gggaagatct	ggctcactgt	tctgattgtc	ttccggatcg	tccttacagc	tgtaggagga	120
	gaatccatct	attacgatga	gcaaagcaaa	tttgtgtgca	acacagaaca	gccgggctgt	180
	gagaatgtct	gttatgatgc	gtttgacact	ctctcccatg	tacgcttctg	ggtgttccag	240
	atcatcctgg	tggcaactcc	ctctgtgatg	tacctgggct	atgctatcca	caagattgcc	300
	aaaatggagc	acgggtgaagc	agacaagaag	gcagctcgga	gcaagcccta	tgcaatgcmc	360
15	tggaaacaac	accgggctct	ggaagaaacg	gaggaggaca	acgaagagga	tcctatgatg	420
	tatccagaga	tggagttaga	aagtgataag	gaaaataaag	agcagagcca	acccaaacct	480
	aagcatgatg	gccgacgacg	gattcgggaa	gatgggctca	tgaaaatcta	tgtgctgcag	540
	ttgctggcaa	ggaccgtggt	tgagggtgggt	tttctgatag	ggcagtattt	tctgtatggc	600
	ttccaagtcc	accggtttta	tgtgtgcagc	agacttcctt	gtcctcataa	gatagactgc	660
20	tttatttcta	gaccactga	aaagaccatc	ttccttctga	taatgtatgg	tgttacaggc	720
	ctttgcctct	tgcttaacat	ttgggagatg	cttcatttag	ggtttgggac	cattcgagac	780
	tcactaaaca	gtaaaaggag	ggaacttgag	gatccgggtg	cttataatta	tcctttcact	840
	tggaatacac	catctgctcc	ccctggctat	aacattgctg	tcaaaccaga	tcaaatccag	900
	tacaccgaac	tgtccaatgc	taagatcgcc	tacaagcaaa	acaaggccaa	cacagcccag	960
25	gaacagcagt	atggcagcca	tgaggagaac	ctcccagctg	acctggaggc	tctgcagcgg	1020
	gagatcagga	tggctcagga	acgcttggat	ctggcagttc	aggcctacag	tcaccaaaaac	1080
	aaccctcatg	gtccccggga	gaagaaggcc	aaagtggggt	ccaagctgg	gtccaacaaa	1140
	agcactgcga	gtagcaaatc	aggggatggg	aagaactctg	tctggattta	a	1191

30
 <210> 17
 <211> 1362
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

35
 <400> 17

40	agcgccaaga	gagaaagagc	acatatttct	ccgtgggaca	ctccttgtat	tggtgggtga	60
	gaaatgggcg	actggagttt	cctggggaac	atcttggagg	aggtgaatga	gcactccacc	120
	gtcatcggca	gagtctggct	caccgtgctt	ttcatcttcc	ggatcctcat	ccttggcagc	180
	gccgcagagt	tcgtgtgggg	ggatgagcaa	tccgacttcc	tgtgcaacac	ccagcagcct	240
	ggctgcgaga	acgtctgcta	cgacgaggcc	tttcccatct	cccacattcg	cctctgggtg	300
	ctgcagatca	tcttcgtctc	caccccgctc	ctgatgtacg	tggggcacgc	ggtgcactac	360
45	gtccgcatgg	aggagaagcg	caaaagccgc	gacgaggagc	tgggccaagc	ggcggggact	420
	aacggcggcc	cggaccaggg	cagcgtcaag	aagagcagcg	gcagcaaagg	cactaagaag	480
	ttccggctgg	aggggaccct	gctgaggacc	tacatctgcc	acatcatctt	caagaccctc	540
	tttgaagtgg	gcttcatcgt	gggcccactac	ttcctgtacg	ggttccggat	cctgcctctg	600
	taccgctgca	gccggtggcc	ctgccccaat	gtgggtggact	gcttcgtgtc	ccggcccacg	660
50	gagaaaacca	tcttcatcct	gttcatgttg	tctgtggcct	ctgtgtccct	attcctcaac	720
	gtgatggagt	tgagccacct	gggcctgaag	gggatccggg	ctgccttgaa	gaggcctgta	780
	gagcagcccc	tgggggagat	tcctgagaaa	tccctccact	ccattgctgt	ctcctccatc	840
	cagaaagcca	agggctatca	gcttctagaa	gaagagaaaa	tcgtttccca	ctatttcccc	900
	ttgaccgagg	ttgggatggg	ggagaccagc	ccactgcctg	ccaagccttt	caatcagttc	960
55	gaggagaaga	tcagcacagg	acccttgggg	gacttgtccc	ggggctacca	agagacactg	1020
60	ccttcctacg	ctcaggtggg	ggcacaagaa	gtggagggcg	aggggcccgc	tgagaggag	1080
	ggagccgaac	ccgaggtggg	agagaagaag	gaggaagcag	agaggctgac	cacggaggag	1140
	caggagaagg	tggccgtgcc	agagggggag	aaagtagaga	ccccgggagt	ggataaggag	1200
	ggtgaaaaag	aagagccgca	gtcggagaag	gtgtcaaagc	aagggctgcc	agctgagaag	1260
	acacctcac	tctgtccaga	gctgacaaca	gatgatgcc	gacccctgag	caggctaagc	1320
	aaagccagca	gccgagccag	gtcagacgat	ctaaccgtat	ga		1362

65

ES 2 749 374 T3

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

5
 <400> 18

10	atgggggaat	ggaccatctt	ggagaggctg	ctagaagccg	cggtgcagca	gcactccact	60
	atgatcggaa	ggatcctggt	gactgtggtg	gtgatcttcc	ggatcctcat	tgtggccatt	120
	gtgggggaga	cggtgtacga	tgatgagcag	accatgtttg	tgtgcaacac	cctgcagccc	180
	ggctgtaacc	aggcctgcta	tgaccgggcc	ttccccatct	cccacatacg	ttactgggtc	240
	ttccagatca	taatggtgtg	tacccccagt	ctttgcttca	tcacctactc	tgtgcaccag	300
	tccgccaagc	agcgagaacg	ccgctactct	acagtcttcc	tagccctgga	cagagacccc	360
15	cctgagtcca	taggaggtcc	tggaggaact	gggggtgggg	gcagtgggtg	gggcaaacga	420
	gaagataaga	agttgcaaaa	tgctattgtg	aatgggggtg	tgcagaacac	agagaacacc	480
	agtaaggaga	cagagccaga	ttgttttagag	gttaaggagc	tgactccaca	cccatcaggt	540
	ctacgcactg	catcaaaaatc	caagctcaga	aggcaggaag	gcatctcccg	cttctacatt	600
	atccaagtgg	tgttccgaaa	tgccctggaa	attgggttcc	tggttgcca	atatcttctc	660
20	tatggcttta	gtgtcccagg	gttgtatgag	tgtaaccgct	accctgcct	caaggaggtg	720
	gaatgttatg	tgtcccggcc	aactgagaag	actgtcttcc	tagtgttcat	gtttgctgta	780
	agtggcatct	gtgtttgtgct	caacctggct	gaactcaacc	acctgggatg	gcgcaagatc	840
	aagctggctg	tgcgaggggc	tcaggccaag	agaaagtcaa	tctatgagat	tcgtaacaag	900
25	gacctgcca	gggtcagtgt	tcccaatttt	ggcaggactc	agtccagtga	ctctgcctat	960
	gtgtga						966

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

30
 <400> 19

35	cagggagttg	tggttgcaac	actgtactcc	agcctgggca	acagagggag	actctgtctc	60
	aacaacaaca	caacaacaaga	aaaaacccca	cagctatcta	gggaaaaagt	aaagcaacca	120
	gcataataga	gtgacatatt	gttatatttt	caccataggt	ttgctttaag	aaatagtgtc	180
	cccttcagaa	tggaagaatt	tatctgcctc	ttatgtgatg	tggatcagag	ctaagatggc	240
40	tgactaaata	aacatggggg	actggaatct	ccttggagat	actctggagg	aagttcacat	300
	ccactccacc	atgattggaa	agatctggct	caccatcctg	ttcatatttc	gaatgcttgt	360
	tctgggtgta	gcagctgaag	atgtctggaa	tgatgagcag	tctggcttca	tctgcaatac	420
	agaacaacca	ggctgcagaa	atgtatgcta	cgaccaggcc	tttcctatct	ccctcattag	480
	atactgggtt	ctgcaggtga	tatttgtgtc	ttcaccatcc	ctggtctaca	tgggccatgc	540
45	attgtaccga	ctgagagttc	ttgaggaaga	gaggcaaaag	atgaaagctc	agttaagagt	600
	agaactggag	gaggtagagt	ttgaaatgcc	tagggatcgg	aggagattgg	agcaagagct	660
	ttgtcagctg	gagaaaagga	aactaaataa	agctccactc	agaggaacct	tgctttgcac	720
	ttatgtgata	cacattttca	ctcgctctgt	ggttgaagt	ggattcatga	ttggacagta	780
	ccttttatat	ggatttctact	tagagccgct	atttaagtgc	catggccacc	cggtgtccaaa	840
50	tataatcgac	tgttttgtct	caagaccaac	agaaaagaca	atattcctat	tatttatgca	900
	atctatagcc	actatttcac	ttttcttaaa	cattcttgaa	attttccacc	taggttttaa	960
	aaagattaaa	agagggcttt	ggggaaaata	caagttgaag	aaggaacata	atgaattcca	1020
	tgcaaaacaag	gcaaaacaaa	atgtagccaa	ataccagagc	acatctgcaa	attcactgaa	1080
	gcgactccct	tctgcccctg	attataatct	gttagtggaa	aagcaaacac	acactgcagt	1140
55	gtaccctagt	ttaaattcat	cttctgtatt	ccagccaaat	cctgacaatc	atagtgtaaa	1200
	tgatgagaaa	tgcattttgg	atgaacagga	aactgtactt	tctaatagaga	tttccacact	1260
	tagtactagt	tgtagtcatt	ttcaacacat	cagttcaaac	aataacaaag	acactcataa	1320
	aatatttggg	aaagaactta	atggtaacca	gttaatggaa	aaaagagaaa	ctgaaggcaa	1380
	agacagcaaa	aggaactact	actctagagg	tcaccgttct	attccaggtg	ttgctataga	1440
60	tggagagaac	aacatgaggc	agtcacccca	aacagttttc	tccttgccag	ctaactgcga	1500
	ttggaaaccg	cggtggctta	gagctacatg	gggttcctct	acagaacatg	aaaaccgggg	1560
	gtcacctcct	aaaggttaacc	tcaagggcca	gttcagaaag	ggcacagtca	gaacccttcc	1620
	tccttcacaa	ggagattctc	aatcacttga	cattccaaaac	actgtgtgatt	ctttgggag	1680
	gctgtccttt	gagccaggtg	tggtcagaac	ctgtaataat	cctgtttgtc	ctccaaatca	1740
65	cgtagtgtcc	ctaacgaaca	atctcattgg	taggcgggtt	cccacagatc	ttcagatcta	1800

ES 2 749 374 T3

aacagcgggtt ggcttttaga cattatatat attatcagag aagtagccta gtggtcgtgg 1860
 ggcacagaaa aaatagatag gggcagctct aaagaccagc t 1901

5 <210> 20
 <211> 1311
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 20

atgagctgga gcttcctgac gcggctgctg gaggagatcc acaaccactc caccttcgtg 60
 ggcaagggtg ggctcacggg gctggtgggc ttccgcatcg tgctgacggc tgtgggcggc 120
 15 gaggccatct actcggacga gcaggccaag ttcacttgca acacgcggca gccaggctgc 180
 gacaacgtct gctatgacgc cttcgcgccc ctgtcgcacg tgcgcttctg ggtcttccag 240
 attgtgggtca tctccacgcc ctccggatcatg tacctgggct acgccgtgca ccgcctggcc 300
 cgtgctgctg agcaggagcg gcgcccgcgc ctccgcccgc gcccggggccc acgccgcgcg 360
 ccccgagcgc acctgccgcc cccgcacgcc ggctggcctg agcccgccga cctgggcgag 420
 20 gaggagccca tgcctgggcct gggcgaggag gaggaggagg aggagacggg ggcagccgag 480
 ggcgcccggcg aggaagcggg ggaggcaggc gcggaggagg cgtgactaa ggcggtcggc 540
 gctgacggca aggcggcagg gaccccgggc cgcaccgggc aacacgatgg gcggaggcgc 600
 atccagcggg agggcctgat gcgctgttac gtggcccagc tgggtggccag ggcagctttc 660
 gaggtggcct tcctggtggg ccagtacctg ctgtacgget tgcaggtgcg accgttcttt 720
 25 ccctgcagcc gccagccctg cccgcacgtg gtggactgct tgcgtgcgcg ccctactgaa 780
 aagacggtct tcctgctggt tatgtacgtg gtcagctgcc tgtgcctgct gctcaacctc 840
 tgtgagatgg cccacctggg cttgggcagc gcgcaggacg cggtgcgcgg ccgcccgggc 900
 cccccggcct ccgccccgc ccccgcgccc cggccccgc cctgcgcctt ccctgcggcg 960
 gccgctggct tggcctgccc gcccgactac agcctggtgg tgcgggcggc cgagcgcgct 1020
 30 cgggcgcatg accagaacct ggcaaacctg gccctgcagg cgtgcgca cgggcagcg 1080
 gctggggacc ggcaccggga cagttcggc tgcgtcggc tccctgcggc ctcccggggg 1140
 cccccagag caggcgcgcc gcgctcccgg acgggcagtg ctacctctgc gggcactgtc 1200
 ggggagcagg gccggcccgg caccacagag cggccaggag ccaagcccag ggctggctcc 1260
 35 gagaagggca gtgccagcag cagggacggg aagaccaccg tgtggatctg a 1311

40 <210> 21
 <211> 1588
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 21

45

50

55

60

65

ES 2 749 374 T3

5 agacattctc tgggaaaggg cagcagcagc caggtgtggc agtgacaggg aggtgtgaat 60
gaggcaggat gaactggaca ggtttgtaca ccttgctcag tggcgtgaac cggcattcta 120
ctgccattgg ccgagtatgg ctctcgggtca tcttcatctt cagaatcatg gtgctggtgg 180
tggctgcaga gagtgtgtgg ggtgatgaga aatcttcctt catctgcaac aactccagc 240
ctggctgcaa cagcgtttgc tatgaccaat tcttccccat ctcccatgtg cggctgtggt 300
ccctgcagct catcctagtt tccaccccag ctctcctcgt ggccatgcac gtggctcacc 360
agcaacacat agagaagaaa atgctacggc ttgagggcca tggggacccc ctacacctgg 420
aggaggtgaa gaggcacaag gtccacatct cagggacact gtggtggacc tatgtcatca 480
10 gcgtggtggt ccggctgttg tttgaggccg tcttcatgta tgtcttttat ctgctctacc 540
ctggctatgc catgggtgcg ctgggtcaagt gcgacgtcta cccctgcccc aacacagtgg 600
actgcttcgt gtcccgcctc accgagaaaa ccgtcttcac cgtcttcatg ctactgcct 660
ctggcatctg catcatcctc aatgtggccg aggtggtgta cctcatcatc cgggcctgtg 720
cccgccgagc ccagcgcctc tccaatccac cttcccgcaa gggctcgggc ttcggccacc 780
15 gcctctcacc tgaatacaag cagaatgaga tcaacaagct gctgagttag caggatggct 840
ccctgaaaga cactactgagc cgcagccctg gcaccggggc tgggctggct gaaaagagcg 900
accgctgctc ggctgtctga tgccacatac caggcaacct cccatcccac ccccaccct 960
gccctggggc agcccctcct tctcccctgc cggtgcacag gcctctgcct gctggggatt 1020
actcgatcaa aaccttcctt ccctggctac ttcccttctt cccggggcct tccttttgag 1080
20 gagctggagg ggtggggagc tagaggccac ctatgccagt gctcaagggt actgggagtg 1140
tgggctgccc ttgttgcctg cacccttccc tcttccctct cctctctctt gggaccactg 1200
ggtacaagag atgggatgct ccgacagcgt ctccaattat gaaactaatc ttaaccctgt 1260
gctgtcagat accctgtttc tggagtcaca tcagttagga gggatgtggg taagaggagc 1320
agagggcagg ggtgctgtgg acatgtgggt ggagaagggg gggtgccag cactagtaaa 1380
25 ggaggaatag tgcttgctgg ccacaaggaa aaggaggagg tgtctggggg gagggagtta 1440
gggagagaga agcaggcaga taagttggag caggggttgg tcaaggccac ctctgcctct 1500
agtccccaag gcctctctct gcctgaaatg ttacacatta aacaggattt tacagcaaaa 1560
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 1588

30 <210> 22
<211> 2263
<212> ADN
<213> Homo sapiens

35 <400> 22

40

45

50

55

60

65

ES 2 749 374 T3

5
10
15
20
25
30
35
40

```

cggagcccct cggcggcgcc cggcccagga cccgcctagg agcgcaggag ccccagcgca 60
gagaccccaa cgccgagacc cccgccccgg ccccgcgcg cttcctcccg acgcagagca 120
aaaccgcccag agtagaagat ggattggggc acgctgcaga cgatcctggg ggggtgtgaa 180
aaacactcca ccagcattgg aaagatctgg ctaccgctcc tcttcatttt tcgcattatg 240
atcctcgttg tggctgcaaa ggaggtgtgg ggagatgagc aggccgactt tgtctgcaac 300
accctgcagc caggctgcaa gaacgtgtgc tacgatcact acttccccat ctccacatc 360
cggctatggg ccctgcagct gatcttcgtg tccacgccag cgctcctagt ggccatgcac 420
gtggcctacc ggagacatga gaagaagagg aagttcatca agggggagat aaagagtga 480
ttaaggaca tcgaggagat caaaaccag aagggtccgca tcgaaggctc cctgtggtgg 540
acctacacaa gcagcatctt cttccggggtc atcttcgaag ccgccttcat gtacgtcttc 600
tatgtcatgt acgacggcct ctccatgcag cggctggtga agtgcaacgc ctggccttgt 660
ccaacactg tggactgctt tgtgtcccgg cccacggaga agactgtctt cacagtgttc 720
atgattgcag tgtctggaat ttgcatcctg ctgaattgca ctgaattgtg ttatttgta 780
attagatatt gttctgggaa gtcaaaaag ccagtttaac gcattgcca gttgttagat 840
taagaaatag acagcatgag agggatgagg caaccctgctc tcagctgtca aggctcagtc 900
gccagcattt cccaacacaa agattctgac cttaaatgca accatttgaa acccctgtag 960
gcctcaggtg aaactccaga tgccacaatg gagctctgct cccctaaagc ctcaaaaaca 1020
aggcctaatt ctatgcctgt cttaattttc tttcacttaa gttagttcca ctgagacccc 1080
aggctgttag gggttattgg tgtaaggtag tttcatatth taaacagagg atatcggcat 1140
ttgtttcttt ctctgaggac aagagaaaaa agccaggctc cacagaggac acagagaagg 1200
tttggtgtc ctccctggggt tctttttgcc aactttcccc acgttaaagg tgaacattgg 1260
ttctttcatt tgccttggaa gttttaactc ctaacagtgg acaaagttac cagtgcctta 1320
aactctgtta cactttttgg aagtgaaaac tttgtagtat gataggttat tttgatgtaa 1380
agatgttctg gatacatta tatgttcccc ctgtttcaga ggctcagatt gtaatatgta 1440
aatggatgtt cattcgctac tatgatttaa tttgaaatat ggtctttttg ttatgaatac 1500
tttgacgac agctgagagg ctgtctgttg tattcattgt ggtcatagca cctaacaaca 1560
ttgtagcctc aatcgagtga gacagactag aagttcctag tgatggctta tgatagcaaa 1620
tggcctcatg tcaaatatth agatgtaatt ttgtgtaaga aatacagact ggatgtacca 1680
ccaactacta cctgtaatga caggcctgtc caacacatct cccttttcca tgactgtggt 1740
agccagcatc ggaaagaacg ctgatttaa gaggtcgctt gggaaattta ttgacacagt 1800
accatttaat ggggaggaca aaatggggca ggggaggag aagtttctgt cgttaaaaaa 1860
agatttggaa agactggact ctaaattctg ttgattaaag atgagctttg tctacttcaa 1920
aagtttgttt gcttaccctc tcagcctcca attttttaag tgaaaatata actaataaca 1980
tgtgaaaaga atagaagcta aggttttagat aaatattgag cagatctata ggaagattga 2040
acctgaatat tgccattatg cttgacatgg tttccaaaaa atggtactcc acatacttca 2100
gtgagggtaa gtattttcct gttgtcaaga atagcattgt aaaagcattt tgtaataata 2160
aagaatagct ttaatgatat gcttghtaact aaaataattt tgtaatgtat caatacatt 2220
taaaacatta aatatataatc tctataataa aaaaaaaaaa aaa 2263

```

<210> 23
<211> 2220
<212> ADN
45 <213> Homo sapiens

50
55
60
65

```

gaacttcttt cctggcacag gactcactgt gcccttccc gctgtgggta caaggtctgc 60
ccccacccc agctctccaa agcccaccgg cctccctgga ggccgaggtc gacggcccgt 120
cgcaccggga gggggggctc ccaggggtgc cccacgcacg gtcaagggtc cgcgccaagc 180
ggggaccggg ctgggcccga agcgggcacg gtactcgcgg caaactagcg tgggcgagtc 240
ctgattgcag tcggacctgc cgccgcccga cttaacagtt tgcagagtg cttcccggccc 300
tgatctcatt ggagccttcg gacagcccag ccatggcca ccgatgcccc catttcacgc 360
ctgaggaagc ggaggctcag acgggccacc agcccctccg gaggctggcc cgggagcgc 420
tggcagcgtc gggcttagga gccggctccc tctgctccc tcctccgcgc cgcccggggt 480
gtgcccgcg tctgtgtgca ccactgctga gccagctcc ggcgccctcg cctctgctgt 540
gggccccggg gacgcggggt caggccaccg cgttggccag gccgctgag gtaggcacgg 600
ccccaccag gcgccatgga ctggaagaca ctccaggccc tactgagcgg tgtgaacaag 660
tactccacag cgttcgggcg catctggctg tccgtggtgt tcgtcttccg ggtgctggta 720
tacgtggtgg ctgcagagcg cgtgtggggg gatgagcaga aggactttga ctgcaacacc 780
aagcagcccg gctgcaccaa cgtctgctac gacaactact tccccatctc caacatccgc 840
ctctgggccc tgcagctcat cttcgtcaca tgcccctcgc tgctggtcat cctgcacgtg 900
gcctaccgtg aggagcggga gcgcccggac cgccagaaac acggggacca gtgcgccaag 960
ctgtacgaca acgcaggcaa gaagcacgga ggctgtggt ggacctacct gttcagcctc 1020

```


5
10
15
20

atcttcaagc	tcatcattga	gttcctcttc	ctctacctgc	tgcacactct	ctggcatggc	1080
ttcaatatgc	cgcgccctgg	gcagtggtg	aacgtggccc	cctgccccaa	catcgtggac	1140
tgctacattg	cccgacctac	cgagaagaaa	atcttcacct	acttcatggg	gggcgctcc	1200
gccgtctgca	tcgtactcac	catctgtgag	ctctgctacc	tcatctgcca	cagggctctg	1260
cgaggcctgc	acaaggacaa	gcctcgaggg	ggttgcagcc	cctcgtcctc	cgccagccga	1320
gcttccacct	gccgctgcca	ccacaagctg	gtggaggctg	gggagggtgga	tccagaccca	1380
ggcaataaca	agctgcaggc	ttcagcacc	aacctgacc	ccatctgacc	acagggcagg	1440
ggtggggcaa	catgctgggt	gccaatggga	catgcagggc	ggtgtggcag	gtggagaggt	1500
cctacagggg	ctgagtgacc	ccactctgag	ttcactaagt	tatgcaactt	tcgttttggc	1560
agatattttt	tgacactggg	aactgggctg	tctagccggg	tataggtaac	ccacaggccc	1620
agtgccagcc	ctcaaaggac	atagactttg	aaacaagcga	attaactatc	tacgtctgct	1680
gcaagggggc	acttagggca	ctgctagcag	ggcttcaacc	aggaagggat	caaccagcga	1740
agggatgata	aggagaggct	tccctgagga	cataatgtgt	aagagagggtg	agaagtgtct	1800
ccaagcagac	acaacagcag	cacagaggtc	tggaggccac	acaaaaagtg	atgctcgccc	1860
tgggctagcc	tcagcagacc	taaggcatct	ctactccctc	cagaggagcc	gccagattc	1920
ctgcagtgga	gaggaggtct	tccagcagca	gcaggtctgg	agggctgaga	atgaacctga	1980
ctagagggtc	tggagatacc	cagaggtccc	ccaggtcatc	acttggctca	gtggaagccc	2040
tctttcccca	aatcctactc	cctcagcctc	aggcagtggt	gctcccatct	tcttccccac	2100
aactgtgctc	aggctgggtg	cagcctttca	gaccctgctc	ccagggactt	gggtggatgc	2160
gctgatagaa	catcctcaag	acagtttctt	tgaaatcaat	aaatactgtg	ttttataaaa	2220

<400> 24

25
30
35
40
45

caaggctccc	aaggcctgag	tgggcaggta	gcaccaggt	atagaccttc	cacgtgcagc	60
accaggaca	cagccagcat	gaactgggca	tttctgcagg	gcctgctgag	tggcgtgaac	120
aagtaactca	cagtgtctgag	ccgcatctgg	ctgtctgtgg	tgttcatctt	tcgtgtgctg	180
gtgtacgtgg	tggcagcggg	ggagggtgtg	gacgatgagc	agaaggactt	tgtctgcaac	240
accaagcagc	ccggctgccc	caacgtctgc	tatgacgagt	tcttccccgt	gtcccacgtg	300
cgctcttggg	ccctacagct	catcctggtc	acgtgcccct	cactgctcgt	ggtcatgcac	360
gtggcctacc	gcgaggaacg	cgagcgaag	caccacctga	aacacggggc	caatgccccg	420
tccctgtacg	acaacctgag	caagaagcgg	ggcggactgt	ggtggacgta	cttgtgagc	480
ctcatcttca	aggccgcccgt	ggatgtggc	ttcctctata	tcttccaccg	cctctacaag	540
gattatgaca	tgccccgcgt	ggtggcctgc	tccgtggagc	cttgccccc	cactgtggac	600
tgttacatct	cccggcccac	ggagaagaag	gtcttcacct	acttcatggg	gaccacagct	660
gccatctgca	tcttctcaa	cctcagtga	gtcttctacc	tgggtgggcaa	gaggtgcatg	720
gagatcttctg	gccccaggca	ccggcggcct	cggtgccggg	aatgcctacc	cgatacgtgc	780
ccaccatattg	tcttctcca	gggagggcac	cctgaggatg	ggaactctgt	cctaataag	840
gctgggtcgg	ccccagtgga	tgcaggtggg	tatccataac	ctgcgagatc	agcagataag	900
atcaacaggt	cccccccaca	tgaggccacc	caggaaaaaa	ggcaggggca	gtggcatcct	960
tgccgtagca	gggtggtgag	gaggtggct	gtgggggctc	aggaagctcg	cccagggggc	1020
aatgtgggag	gttgggggta	gtttggtccc	tgggtcctga	gcctcagggg	aggaggttg	1080
atagctactg	gggattttgt	atatggcaac	agtatatgtc	aaaccttta	ttaaatatga	1140
ttttcccagt	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1200
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaa		1243

<210> 25

<211> 1299

50 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 25

55

60

65

5 atgaaattca agctgcttgc tgagtcctat tgccggctgc tgggagccag gagagccctg 60
 aggagtagtc actcagtagc agctgacgcg tgggtccacc atgaaactgga gtatctttga 120
 gggactcctg agtgggggtca acaagtactc cacagccttt gggcgcctct ggctgtctct 180
 ggtcttcatc ttccgcgtgc tgggtgtacct ggtgacggcc gagcgtgtgt ggagtgatga 240
 ccacaaggac ttcgactgca atactcgcca gcccggtgc tccaacgtct gctttgatga 300
 gttcttccct gtgtcccattg tgcgcctctg ggccctgcag ctatcctctg tgacatgcc 360
 ctactgctc gtggatcatgc acgtggccta ccgggaggtt caggagaaga ggcaccgaga 420
 agcccatggg gagaacagtg ggcgcctcta cctgaacccc ggcaagaagc ggggtgggct 480
 ctgggtggaca tatgtctgca gcctagtgtt caaggcgagc gtggacatcg cctttctcta 540
 10 tgtgttccac tcattctacc ccaaatatat cctccctctt gtggtcaagt gccacgcaga 600
 tccatgtccc aatatagttg actgcttcat ctccaagccc tcagagaaga acatcttcac 660
 cctcttcatg gtggccacag ctgccatctg catcctgctc aacctcgtgg agctcatcta 720

15 cctgggtgagc aagagatgcc acgagtgcct ggcagcaagg aaagctcaag ccatgtgcac 780
 aggtcatcac ccccacggta ccacctcttc ctgcaacaa gacgacctcc tttcgggtga 840
 cctcatcttt ctgggctcag acagtcattc tcctctctta ccagaccgcc cccgagacca 900
 20 tgtgaagaaa accatcttgt gaggggctgc ctggactggt ctggcaggtt gggcctggat 960
 ggggagctc taagatctct cataggtgca acctgagagt gggggagcta agccatgagg 1020
 taggggcagg caagagagag gattcagacg ctctgggagc cagttcctag tcctcaactc 1080
 cagccacctg ccccagctcg acggcactgg gccagttccc cctctgctct gcagctcggg 1140
 ttcttttctc agaatggaaa tagtgagggc caatgcccag ggttggaggg aggagggcgt 1200
 tcatagaaga acacacatgc gggcaccttc atcgtgtgtg gccactgtc agaacttaat 1260
 25 aaaagtcaac tcatttgctg gaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa ccatgtgcac 1299

<210> 26
 <211> 1805
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 26

35 ctgggaagac gctggtcagt tcacctgccc cactggttgt tttttaaaca aattctgata 60
 caggcgacat cctcactgac cgagcaaaga ttgacattcg tatcatcact gtgcaccatt 120
 ggcttctagg cactccagtg gggtaggaga aggaggtctg aaaccctcgc agagggatct 180
 tgccctcatt ctttgggtct gaaacactgg cagtcgttgg aaacaggact cagggataaa 240
 ccagcgcaat ggattggggg acgctgcaca ctttcatcgg ggggtgcaac aaacactcca 300
 40 ccagcatcgg gaaggtgtgg atcacagtca tctttatttt ccgagtcatt atcctcgtgg 360
 tggctgccc ggaagtgtgg ggtgacgagc aagagactt cgtctgcaac cactcgcagc 420
 cgggatgcaa aaatgtgtgc tatgacctt ttttcccggt gtcccacatc cggctgtggg 480
 cctccagct gatcttcgtc tccaccccag cgctgctggt ggccatgcat gtggcctact 540
 acaggcacga aaccactcgc aagttcaggc gaggagagaa gaggaatgat ttcaaagaca 600
 45 tagaggacat taaaaagcag aaggttcgga tagaggggtc gctgtgggtg acgtacacca 660
 gcagcatctt tttccgaatc atctttgaag cagcctttat gtagtgtgtt tacttcttt 720
 acaatgggta ccacctgccc tgggtgttga aatgtgggat tgaccctgc cccaacctg 780
 ttgactgctt tatttctagg ccaacagaga agaccgtgtt taccattttt atgatttctg 840
 cgtctgtgat ttgcatgctg cttaacgtgg cacagttgtg ctacctgtc ctgaaagtgt 900
 50 gttttaggag atcaaagaga gcacagacgc aaaaaaatca cccaatcat gccctaaagg 960
 agagtaagca gaatgaaatg aatgagctga tttcagatag tgggtcaaat gcaatcacag 1020
 gtttcccaag ctaaacattt caaggtaaaa tgtagctgcg tcataaggag acttctgtct 1080
 tctccagaag gcaataccaa cctgaaagtt ctttctgtag cctgaagagt ttgtaaata 1140
 ctttcataat aaatagacac ttgagttaac tttttgtagg atacttgctc cattcataca 1200
 55 caacgtaatc aaatatgtgg tccatctctg aaaacaagag actgcttgac aaaggagcat 1260
 tgcagtcact ttgacaggtt ctttttaagt ggactctctg acaaagtggg tactttctga 1320
 aaatttataa aactgtttgt gataaggaac atttatccag gaattgatac ttttatttag 1380
 aaaagataat tttataggct tggatgtttt tagttctgac tttgaattta tataaagtat 1440
 60 ttttataatg actagctctc ctacctgga aaaacatcgc aaacatctt atgttagttt tagaattaca 1500
 ccacaagtat ctaaatgttg aacttacaaa gggctctatc tgtaaataat gttttgcatt 1560
 gtctgttggc aaatttgtga actgtcatga tacgcttaag gtggaaagtg ttcatgacac 1620
 aatatatctt tactgctttc tgaatgtaga cggaacagtg tggaaagcaga aggctttttt 1680
 aactcatccg tttgccaatc attgcaaca actgaaatgt ggatgtgatt gcctcaataa 1740
 65 agctcgtccc cattgcttaa gccttcaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1800
 aaaaa 1805

ES 2 749 374 T3

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

5

<400> 27

10 aatgaaaga gggagcagga ggcgcccgtc ccagccacct cccaaggtcc ctggctcagc 60
 tctgacaccc cagtcccggc cccaggggtga gtgggggttg gtggcggttt aggggcacca 120
 ggggctgtg gggacctgtg taagtgtggg gtggggagga tctcaggaga tgtggaggct 180
 ggaggcacag gaggccaggg aggagggaga agcctgggag cgcactcca ccacgctggg 240
 gtaggagggc agggacacct ccgacaaagg accctgtgag agttatgaaa gcgagattgc 300
 ctctgtacca gccccccacc ctgagaggag ttcactgcag taaaaatggt gagagaaatg 360
 15 gtgggccaag aaaggagtgg tctcgtgcc tctgccactc ccactcctcc catgggcacc 420
 aaattgggtc tagcgtctcg ggttcgaggc tccactcttc ccacagcatc cttgacagct 480
 aagggcaccg ctgggtttcc gcttccgaaa ccaggcaagt caggggctgg tccagctgat 540
 ctccaaggtc cttcctaaga atctgggatc tggaggatcc cagggctcga cggagacggc 600
 20 tcagggggtg cggctaaaat gcaaattggg gatcctcccc agcaccatc ggtcccaaag 660
 agaaggtaac ccatagctga gcgtcgcctg ctcccctcgg gccctcccgt ggccctccgt 720

25 ttcatactgg tctcatcgct aaaccggggc ctctcctacc tcacgactca ccctgaagtc 780
 agagaaggtc caacggaccc caccgccgata ggcttggaaag gggcaggggt ccctgacttg 840
 ccccatcccc tgactccccg ccccgctcc ccagcgccat gggggagtgg gcgttcctgg 900
 gctcgtctgct ggacgcccgt cagctgcagt cgccgctcgt gggccgcctc tggctgggtg 960
 tcatgctgat cttccgcatc ctgggtgctgg ccacgggtggg cggcgcctg ttcgaggacg 1020
 agcaagagga gtctcgtgtg aacacgctgc agccgggctg tcgccagacc tgctacgacc 1080
 30 gcgcttccc ggtctcccac taccgcttct ggctcttcca catcctgctg ctctcggcgc 1140
 ccccggtcgt gttcgtcgtc tactccatgc accgggcagg caaggaggcg ggcggcgtg 1200
 aggcggcggc gcagtgccgc cccggactgc ccgagccca gtgcgcgccg tgcgcctgc 1260
 gcgcccgcg gcgcgccgc tgctacctgc tgagcgtggc gctgcgcctg ctggccgagc 1320
 tgaccttctt gggcgccag gcgctgctct acggcttccg cgtggccccg cacttcgctg 1380
 35 gcgcccgtcc gccctgcccg cacacggtcg actgcttctg gagccggccc accgagaaga 1440
 ccgtcttctg gctcttctat ttcgcggtgg ggctgctgtc ggcgctgctc agcgtagccg 1500
 agctgggcca cctgctctgg aagggccgcc cgcgccggg ggagcgtgac aaccgctgca 1560
 accgtgcaca cgaagaggcg cagaagctgc tcccgcgcc gccgcgccca cctattgttg 1620
 tcaattggga agaaaacaga caccttcaag gagagggctc ccctggtagc cccaccca 1680
 40 agacagagct ggatgcccct cgcttccgta gggaaagcac ttctcctgca ggatggcatt 1740
 gctctctccc cttccatggc acgtagtat tgctcagtaa atatgtgttg gatgagaac 1800
 tgaagggtgc cccaggccta caccactgcc atgcccgaac actatccatg ctatgggtgg 1860
 caccatctct ctgatgacag ttctgtgtcc acaaccaga cccctccaca caaacccaga 1920
 tggggctgtg ccgctgtttt ccagatgtat tcattcaaca aatatttgta gggtacctac 1980
 45 tgtgtgtcag aagatgttca agatcagcat catccgatgg aaatagcata tgagccatgt 2040
 atgtagtctt aagtttttca tttagccgat taaaaaagta aaaggaaca aatg 2094

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

50

<400> 28

55

60

65

ES 2 749 374 T3

5 atgtgtggca ggttcctgcg gcggtctgctg gcgaggagaga gccggcgctc cacccccgtg 60
 gggcgccctct tgcttcccgt gctcctggga ttccgccttg tgctgctggc tgccagtggg 120
 cctggagtct atggtgatga gcagagtga ttcgtgtgtc acaccagca gccgggctgc 180
 aaggctgcct gcttcgatgc cttccacccc ctctccccgc tgcgtttctg ggtcttccag 240
 gtcactcttg tggtctgacc cagcgcctc tataatgggt tcaactctgta tcactgtatc 300
 tggcactggg aattatcagg aaaggggaag gaggaggaga ccctgatcca gggacgggag 360
 ggcaacacag atgtcccagg ggctggaagc ctgaggctgc tctgggctta tgtggctcag 420
 ctgggggctc ggcttgtcct ggagggggca gccctggggg tgcaagtacca cctgtatggg 480
 10 ttccagatgc ccagctcctt tgcatgtcgc cgagaacctt gccttggtag tataacctgc 540
 aatctgtccc gccctctga gaagaccatt ttcctaaaga ccatgtttgg agtcagcggg 600
 ttctgtctct tgtttacttt tttggagctt gtgcttctgg gtttggggag atgggtggag 660
 acctggaagc acaaactctc ctcttctaaa tacttcttaa cttcagagag cacaagaaga 720
 cacaagaaag caaccgatg cctcccagtg gtggaacca aagagcaatt tcaagaagca 780
 15 gttccaggaa gaagcttagc ccaggaaaaa caaagaccag ttggaccag agatgcctga 840

<210> 29
 <211> 672
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens

<400> 29

25 atgagttgga tgttcctcag agatctcctg agtggagtaa ataaatactc cactgggact 60
 ggatggattt ggctggctgt cgtgtttgtc ttccgtttgc tgggtctacat ggtggcagca 120
 gagcacatgt ggaaagatga gcagaaagag tttgagtgca acagtagaca gcccggttgc 180
 aaaaatgtgt gttttgatga cttcttcccc atttccaag tcagactttg gcccttacia 240
 ctgataatgg tctccacacc ttcacttctg gtgggttttac atgtagccta tcatgagggt 300
 30 agagagaaaa ggcacagaaa gaaactctat gtcagcccag gtacaatgga tgggggccta 360
 tggtagcctt atcttatcag cctcattggt aaaactgggt ttgaaattgg cttccttgtt 420
 ttattttata agctatatga tggctttagt gttccctacc ttataaagtg tgatttgaag 480
 ctttgtccca acactgtgga ctgcttcac tccaaacca ctgagaagac gatcttcatc 540
 ctcttcttgg tcatcacctc atgcttgtgt attgtgttga atttcatgta actgagtttt 600
 35 ttggttctca agtgctttat taagtgtgt ctccaaaaat atttaaaaaa acctcaagtc 660
 ctcagtgctg ga

<210> 30
 <211> 1113
 40 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 30

45 atggaaggcg tggacttgct agggtttctc atcatcacat taaactgcaa cgtgaccatg 60
 gtaggaaagc tctggttcgt cctcacgatg ctgctgcgga tgctgggtgat tgtcttggcg 120
 gggcgacccg tctaccagga cgagcaggag aggtttgtct gcaacacgct gcagccggga 180
 tgcgccaatg tttgctacga cgtcttctcc cccgtgtctc acctgcggtt ctggctgatc 240
 50 cagggcggtg gcgtcctcct cccctccgcc gtcttcagcg tctatgtcct gcaccgagga 300
 gccacgctcg ccgctgctgg cccccgccc tgccccgacc cccgggagcc ggcctccggg 360
 cagagacgct gcccgcgcc attcggggag cgcgggcgcc tccaggtgcc cgacttttctg 420
 gccggctaca tcatccacct cctcctccgg accctgtctg aggcagcctt cggggccttg 480
 cactactttc tctttggatt cctggccccg aagaagtcc cttgcacgcy cctcctctgc 540
 55 acgggctggt tggactgcta cgtgtcgcgg ccacagaga agtccctgct gatgctgttc 600
 ctctggggcg tcagcgcgct gtcttttctg ctgggctctg ccgacctggt ctgcagcctg 660
 cggcgggcgg tgcgcaggag gccgggacc cccacaagcc cctccatccg gaagcagagc 720
 ggagcctcag gccacgcgga gggacgccc actgacgagg aggggtggcg ggaggaagag 780
 ggggcaccgg cggccccggg tgcacgcgcc ggaggggagg gggctggcag ccccaggcgt 840
 60 acatccaggg tgctcaggca cacgaagatt ccggatgagg atgagagtga ggtgacatcc 900
 tccgccagcg aaaagctggg cagacagccc cggggcagcc cccaccgaga ggccgcccag 960
 gacccaggg gctcaggatc cgaggagcag ccctcagcag cccccagccg cctggcccgcg 1020
 ccccttctc gcagcagcct gcagccccct gacccgcctg ccagctccag tgggtgctcc 1080
 65 cacctgagag ccaggaagtc tgagtgggtg tga 1113

ES 2 749 374 T3

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

5

<400> 31

	atgggggact	ggaacttatt	gggtggcatc	ctagaggaag	ttcactccca	ctcaaccata	60
	gtggggaaaa	tctggctgac	catcctcttc	atcttccgaa	tgctgggtact	tcgtgtggct	120
10	gctgaggatg	tctgggatga	tgaacagtca	gcatttgctt	gcaacacccg	gcagccaggt	180
	tgcaacaata	tctgttatga	tgatgcattc	cctatctctt	tgatcagggt	ctgggtttta	240
	cagatcatct	ttgtgtcttc	tccttctttg	gtctatatgg	gccatgctct	ttataggctc	300
	agggcctttg	agaaagacag	gcagaggaaa	aagtacacacc	ttagagccca	gatggagaat	360
	ccagatcttg	acttgaggga	gcagcaaaga	atagataggg	aactgaggag	gttagaggag	420
15	cagaagagga	tccataaagt	ccctctgaaa	ggatgtctgc	tgcgtactta	tgtcttacac	480
	atcttgacca	gatctgtgct	ggaagtagga	ttcatgatag	gccaatatat	tctctatggg	540
	tttcaaatgc	acccccctta	caaatgcact	caacctctct	gccccaatgc	ggtggattgc	600
	tttgtatcca	ggcccactga	gaagacaatt	ttcatgcttt	ttatgcacag	cattgcagcc	660
	atctcttgt	tactcaatat	actggaaata	tttcatctag	gcatcagaaa	aattatgagg	720
20	acactttata	agaaatccag	cagtgagggc	attgaggatg	aaacaggccc	tccattccat	780
	ttgaagaaat	attctgtggc	ccagcagtg	atgatttgct	cttcattgcc	tgaagaatc	840
	tctccacttc	aagctaacaa	tcaacagcaa	gtcattcgag	ttaatgtgcc	aaagtctaaa	900
	accatgtggc	aaatcccaca	gccaaaggcaa	cttgaagtag	acccttccaa	tgggaaaaag	960
	gactgggtctg	agaaggatca	gcatagcgga	cagctccatg	ttcacagccc	gtgtccctgg	1020
25	gctggcagtg	ctggaaatca	gcacctggga	cagcaatcag	accattcctc	atctggcctg	1080
	cagaatacaa	tgtctcagtc	ctggctaggt	acaactacgg	ctcctagaaa	ctgtccatcc	1140
	tttgcagtag	gaacctggga	gcagtcccag	gaccacagaac	cctcagggtga	gcctctcaca	1200
	gatcttcata	gtcactgcag	agacagtgaa	ggcagcatga	gagagagtgg	ggtctggata	1260
	gacagatctc	gcccaggcag	tcgcaaggcc	agctttctgt	ccagattggt	gtctgaaaag	1320
30	cgacatctgc	acagtgactc	aggaagctct	ggttctcgga	atagctcctg	cttggatttt	1380
	cctcactggg	aaaacagccc	ctcacctctg	ccttcagtca	ctggggcacag	aacatcaatg	1440
	gtaagacagg	cagccctacc	gatcatggaa	ctatcacaag	agctgttcca	ttctggatgc	1500
	tttctttttc	ctttctttct	tcctgggggtg	tgtatgtatg	tttgtgttga	cagagaggca	1560
35	gatggagggg	gagattattt	atggagagat	aaaattattc	attcgataca	ttcagttaaa	1620
	ttcaattcat	aa					1632

<210> 32
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 < 223 > Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

45

<400> 32
 ccaaggcagg ctgctacaa cgatccagtc a 31

<210> 33
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

55

<400> 33
 ccgtggagg ctgctacaa cgagtgagag g 31

<210> 34
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

65

<400> 34
 ccgtgggagg ctaactacaa cgagtggag g 31

5 <210> 35
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 35
 agtcttttgg gctagctaca acgatgggct ca 32

15 <210> 36
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 36
 tttggagagg ctactacaa cgaccgcagt c31

25 <210> 37
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 37
 tttggagagg ctaactacaa cgaccgcagt c31

35 <210> 38
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

45 <400> 38
 acgaggaagg ctactacaa cgatgtttct g 31

<210> 39
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

55 <400> 39
 ttgcggcggc tagctacaac gacgaggaat 30

60 <210> 40
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

- <400> 40
ccatgcgagg ctagctacaa cgattgctc t 31
- 5 <210> 41
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético
- <400> 41
ttgtccagg ctagctacaa cgatggct a 31
- 15 <210> 42
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético
- <400> 42
gtaattgcgg caggaggaat tgtttctgct 30
- 25 <210> 43
<211> 30
<212> ADN
- 30 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético
- 35 <400> 43
gacagaaaca attcctcctg ccgcaattac 30
- 40 <210> 44
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético
- 45 <400> 44
ccaaggcact ccagtcac 18
- 50 <210> 45
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético
- <400> 45
tccgtgggac gtgagagga 19
- 60 <210> 46
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 46
 agtcttttga tgggctca 18

5 <210> 47
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 47
 ttttgagat cgcgactct 19

15 <210> 48
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN

<400> 48
 cacgaggaat tgtttctgt 19

25 <210> 49
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 49
 tttgcggcac gaggaatt 18

35 <210> 50
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

45 <400> 50
 cccatgcat tttgctctg 19

<210> 51
 <211> 19

50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

55 <400> 51
 gttgtccac gatggctaa 19

<210> 52
 <211> 31

60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

65

<400> 52
 gttgcagagg cttagctacaa cgaaaaatcg g 31

5 <210> 53
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 53
 gttcttagg cttagctacaa cgactctccc t 31

15 <210> 54
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 54
 gtccttaaag gcttagctaca acgatcgttc ttt 33

25 <210> 55
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 55
 35 tctctcgag gcttagctaca acgagtcctt aaa 33

<210> 56
 <211> 33
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

45 <400> 56
 tctctcgag gctaactaca acgagtcctt aaa 33

<210> 57 .
 <211> 31
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

55 <400> 57
 gatacggagg cttagctacaa cgactctgg g 31

60 <210> 58
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 65 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 58
 cttcgatagg ctactataa cgaggacctt c 31

5 <210> 59
 <211> 31

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 59
 cttcgatagg ctaactataa cgaggacctt c 31

15 <210> 60
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 60
 25 ggtgaagagg ctactataa cgaagtctt tct 33

<210> 61
 <211> 30
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 61
 35 ccttaaactc gttcttatc tctccctca 30

<210> 62
 <211> 30
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 62
 45 actccctct ctattcttg ctcaaattcc 30

<210> 63
 <211> 30
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 63
 tacggacctt ctgggtttg atctcttcca 30

<210> 64
 <211> 30
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 64

agcttctcta gtttggggtc tccagggcat 30

5

<210> 65

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: oligo ODN sintético

<400> 65

15 gtaattgcgg caggaggaat tgtttctgtc 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto de inhibición de conexina 43 que inhibe, en su totalidad o en parte, la expresión o actividad de una conexina 43 para su uso en un método para tratar un sujeto para un trauma ocular de la córnea, en donde dicho compuesto de inhibición de conexina 43 se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótidos antisentido, polinucleótidos antisentido, desoxirribozimas (ADNzimas), oligonucleótidos morfolino, moléculas de ARNi, moléculas de ARNip, moléculas de PNA, ARN nucleares pequeños U1 mutados en el extremo 5' y un peptidomimético.
- 10 2. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el trauma ocular de la córnea es un trauma penetrante ocular de la córnea.
- 15 3. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el trauma ocular resulta de infecciones y enfermedades oculares, accidentes químicos o mecánicos y prácticas quirúrgicas.
- 20 4. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el trauma ocular resulta de infecciones oculares.
- 25 5. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el trauma ocular es un trauma químico.
- 30 6. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el trauma ocular es un trauma mecánico.
- 35 7. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el trauma ocular es de un láser.
- 40 8. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 en donde el trauma ocular de un láser da como resultado la hiperplasia epitelial.
- 45 9. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el trauma ocular es de un procedimiento quirúrgico.
- 50 10. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en donde el trauma ocular da como resultado el daño epitelial de la córnea.
- 55 11. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en donde el compuesto regula la división y el crecimiento de células basales epiteliales.
- 60 12. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en donde el sujeto que se trata tiene un injerto de membrana amniótica ocular.
- 65 13. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en donde dicho compuesto de inhibición de conexina 43 se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótidos antisentido, polinucleótidos antisentido, desoxirribozimas (ADNzimas), oligonucleótidos morfolino, moléculas de ARNi, moléculas de ARNip, moléculas de PNA y ARN nucleares pequeños U1 mutado en el extremo 5'.
14. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en donde dicho compuesto de inhibición de conexina 43 es un peptidomimético.
15. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en donde dicho compuesto de inhibición de conexina 43 es un compuesto antisentido.
16. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 15 en donde dicho compuesto de inhibición antisentido comprende una secuencia de nucleobases seleccionada de la SEQ ID NO: 1-3.
17. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 15 en donde dicho compuesto de inhibición antisentido se dirige a al menos aproximadamente 8 nucleobases de una molécula de ácido nucleico que codifica una conexina con la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 12.
18. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde dicho compuesto de inhibición antisentido es un oligonucleótido antisentido entre 15 y 35 nucleobases de longitud.
19. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 18 en donde dicho compuesto antisentido es (a) un oligonucleótido antisentido que comprende nucleobases de origen natural y un enlace internucleósidos no modificado; o (b) un oligonucleótido antisentido que comprende al menos un enlace internucleósidos modificado, al menos una porción de azúcar modificado o al menos una nucleobase modificada.

ES 2 749 374 T3

20. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 19 en donde tal enlace internucleósidos modificado es un enlace fosforotioato.
- 5 21. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 -20 en donde dicho compuesto está en una forma adecuada para la administración tópica.
22. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 en donde dicho compuesto está en una forma adecuada para la administración local.
- 10 23. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 en donde dicho compuesto está en una forma adecuada para la inyección intraocular.
- 15 24. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 en donde dicho compuesto está en la forma de un gel.
25. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 en donde dicho compuesto está en la forma de gotas.
- 20 26. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 24 en donde el compuesto está en una formulación que comprende un gel plurónico.
27. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el gel plurónico comprende un F127 plurónico.
- 25 28. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el compuesto está en una forma adecuada para una administración única.
- 30 29. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el compuesto está en una forma adecuada para múltiples administraciones.
- 30 30. Un compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el sujeto es un ser humano.
- 35 31. Uso de un compuesto antisentido para conexina 43 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto para un trauma ocular de la córnea.

Figura 1

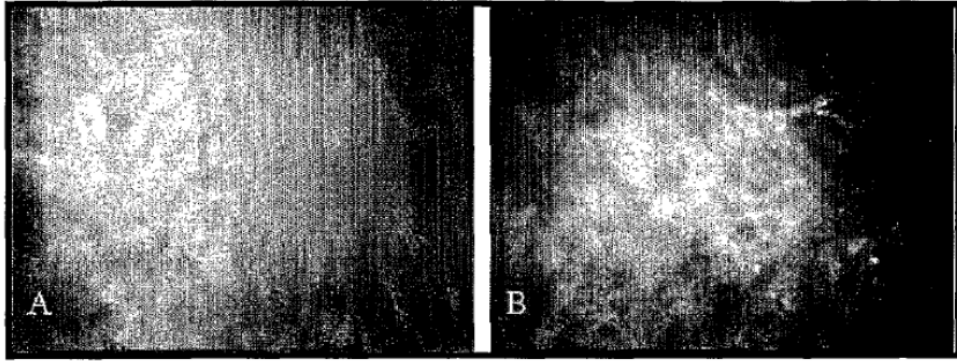


Figura 2

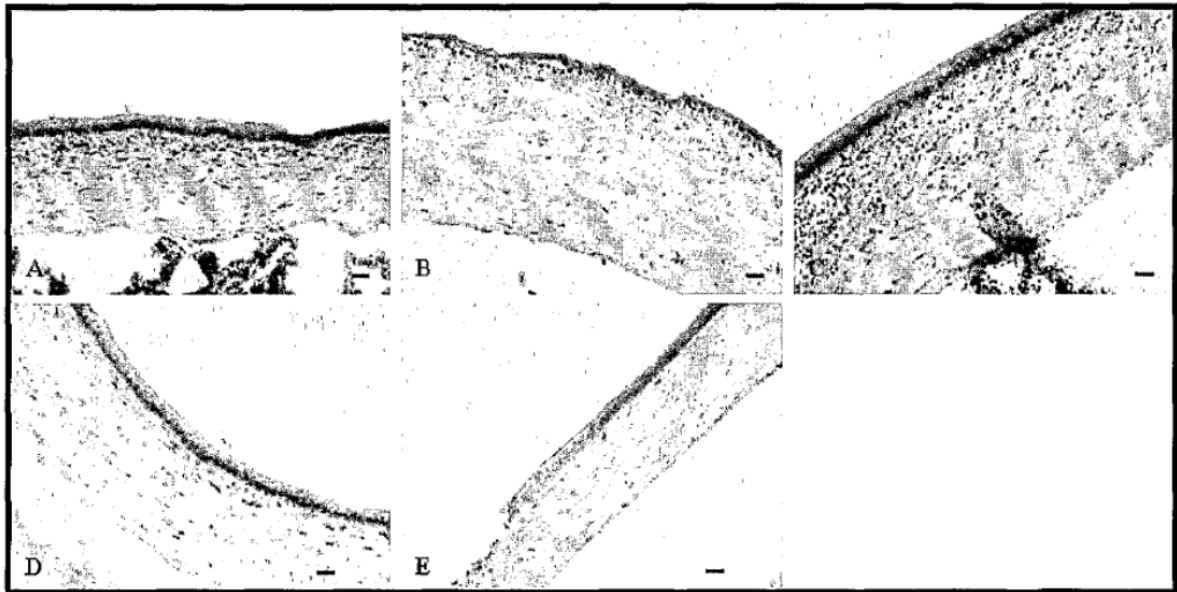


Figura 3

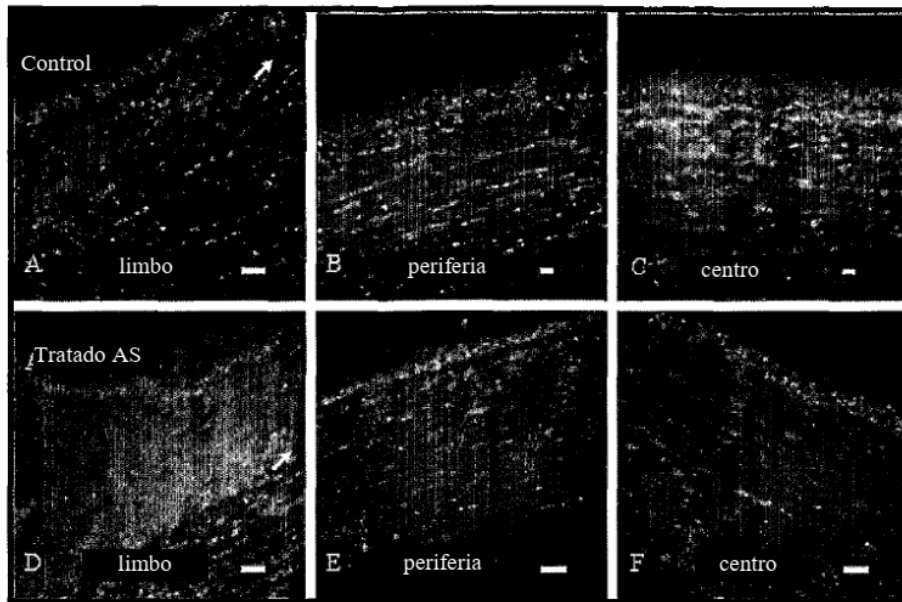


Figura 4

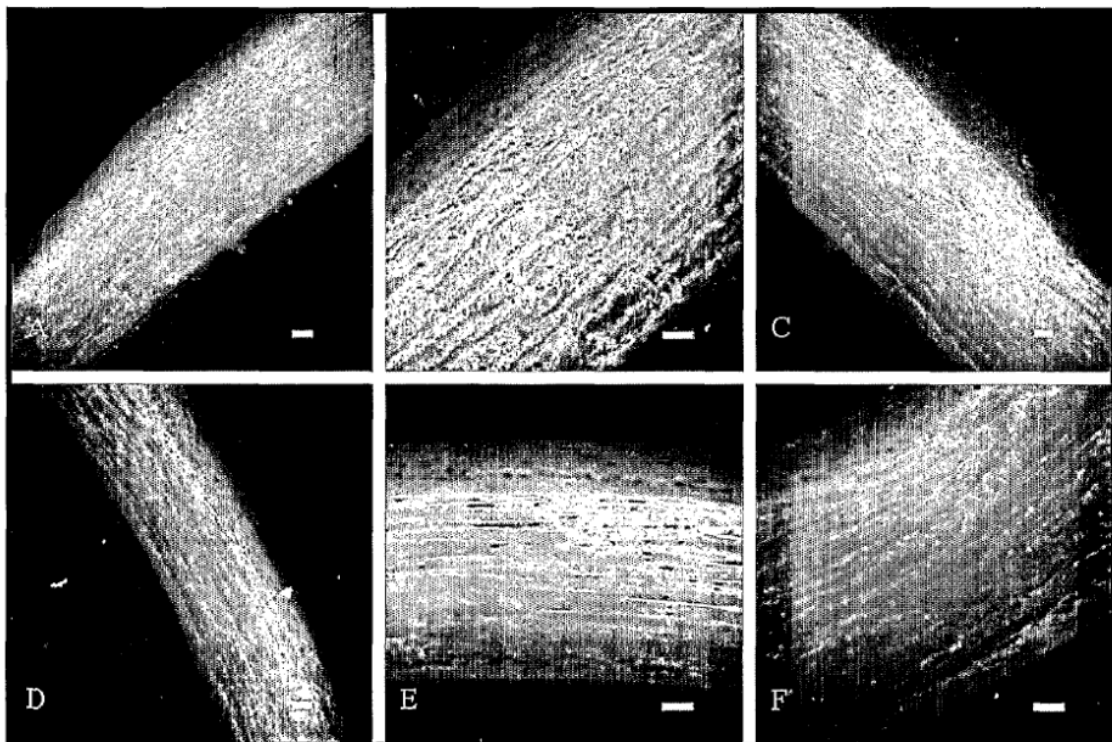


Figura 5

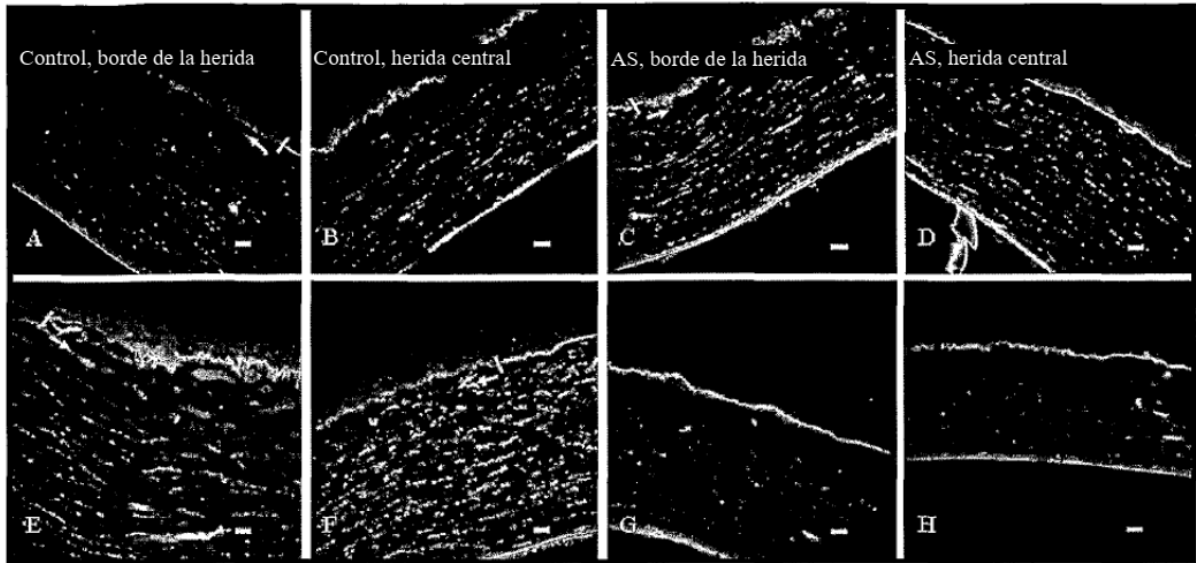


Figura 6

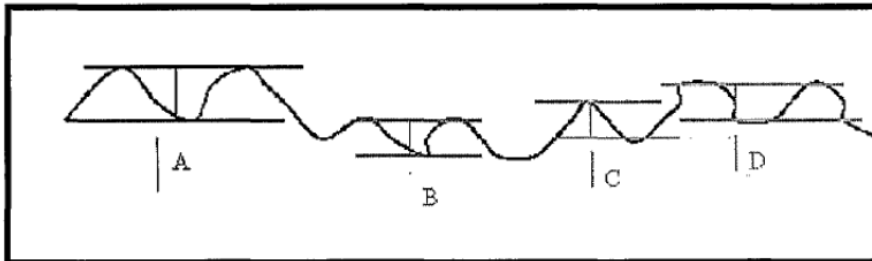
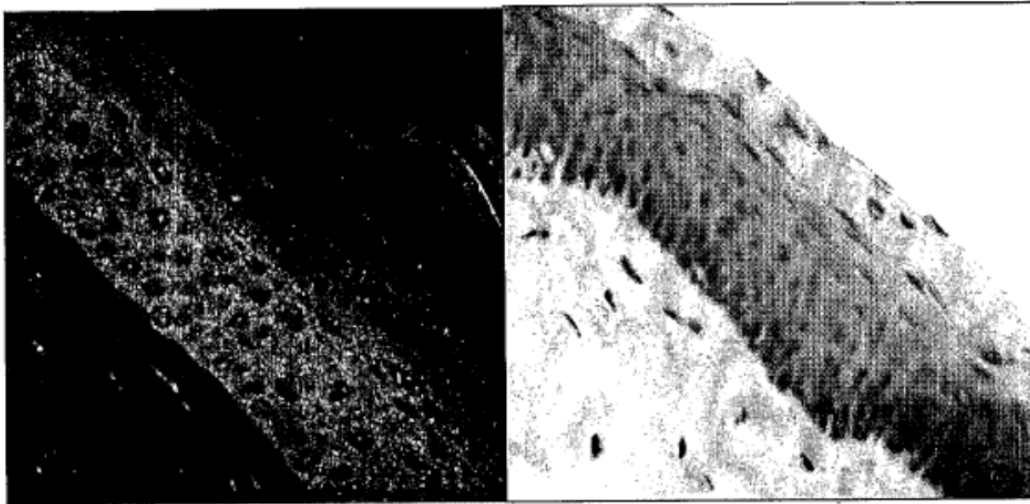


Figura 7



C

D

Figura 8

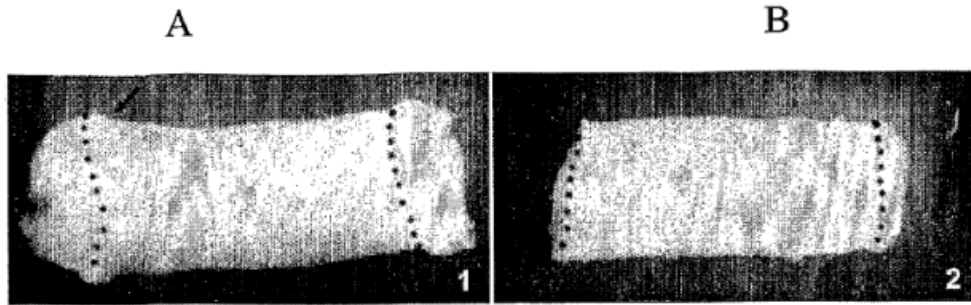


Figura 9

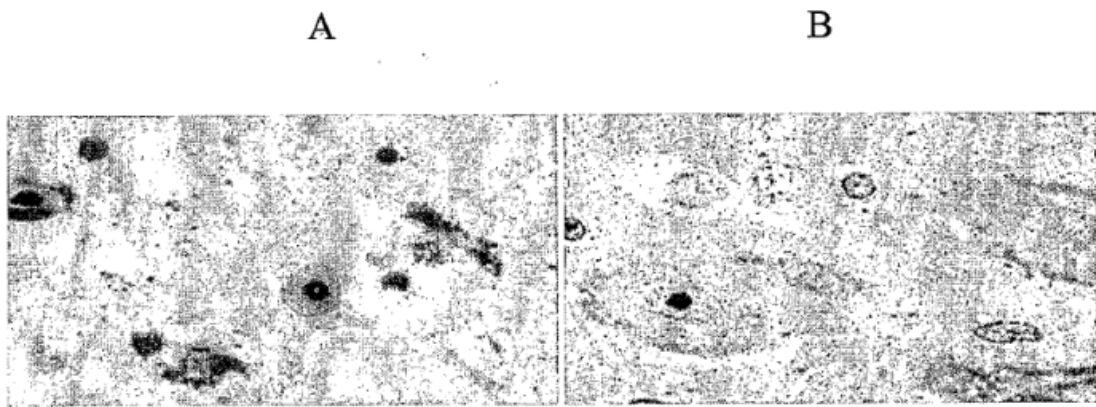


Figura 10

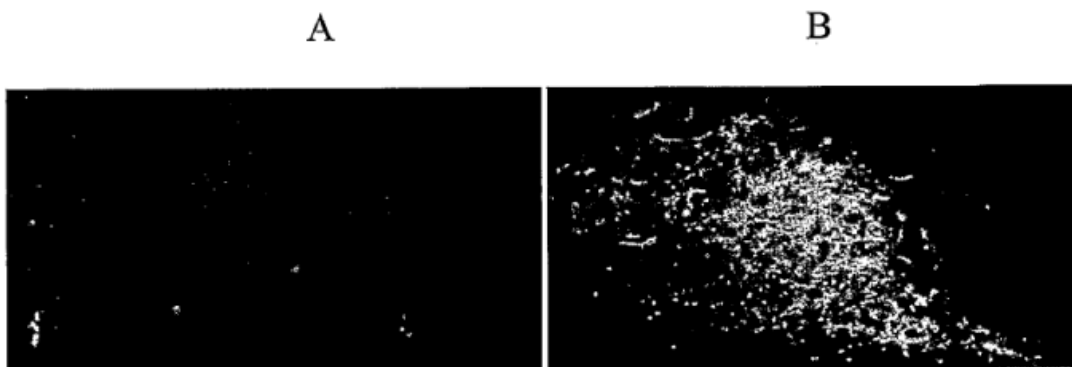


Figura 11

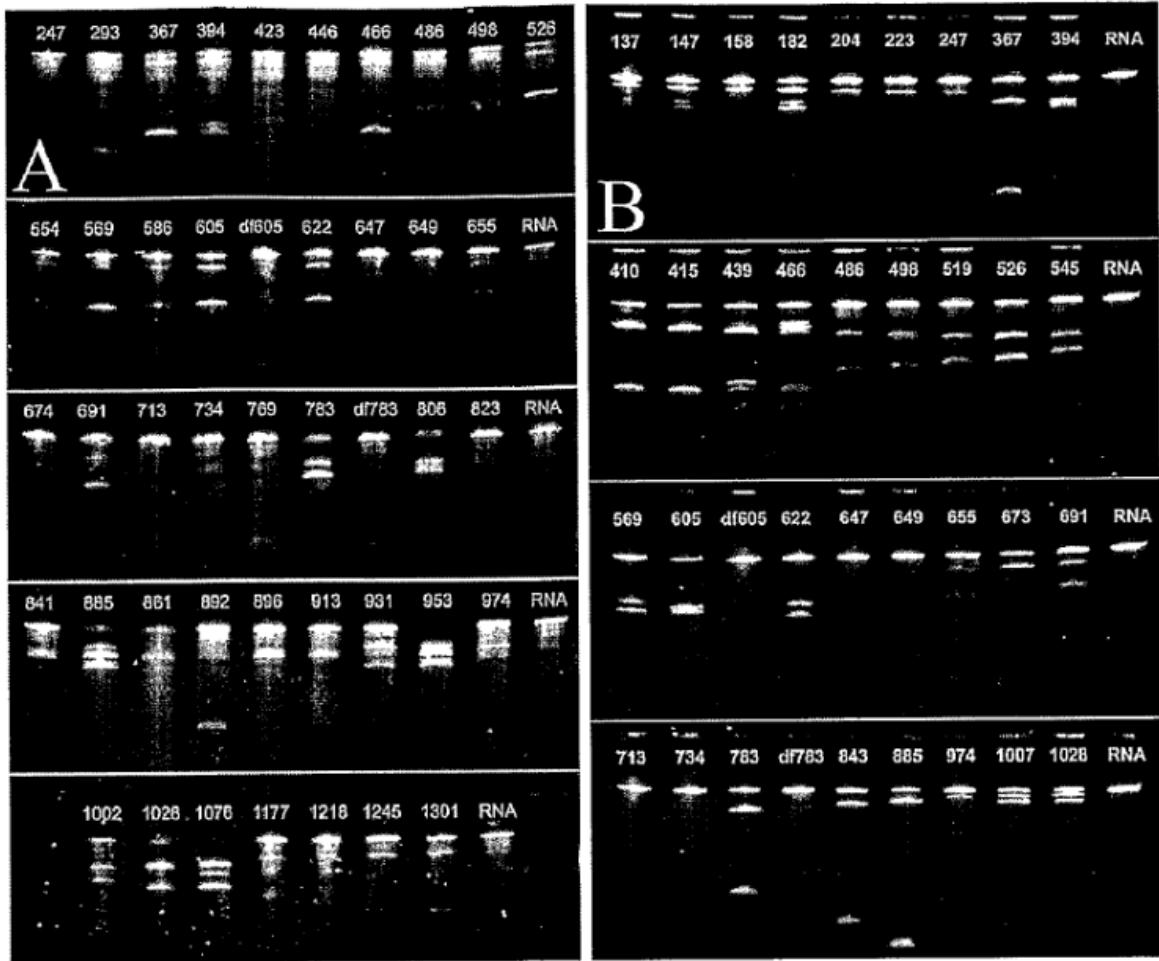


Figura 12

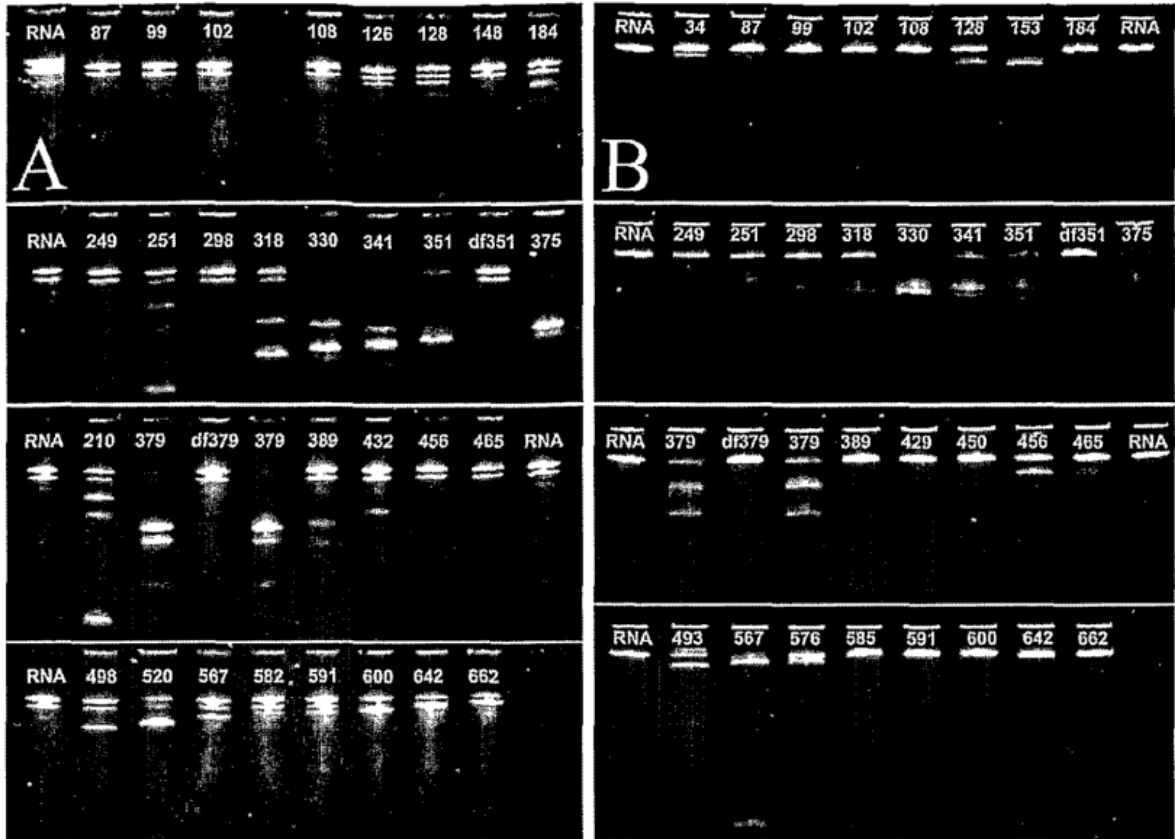


Figura 13

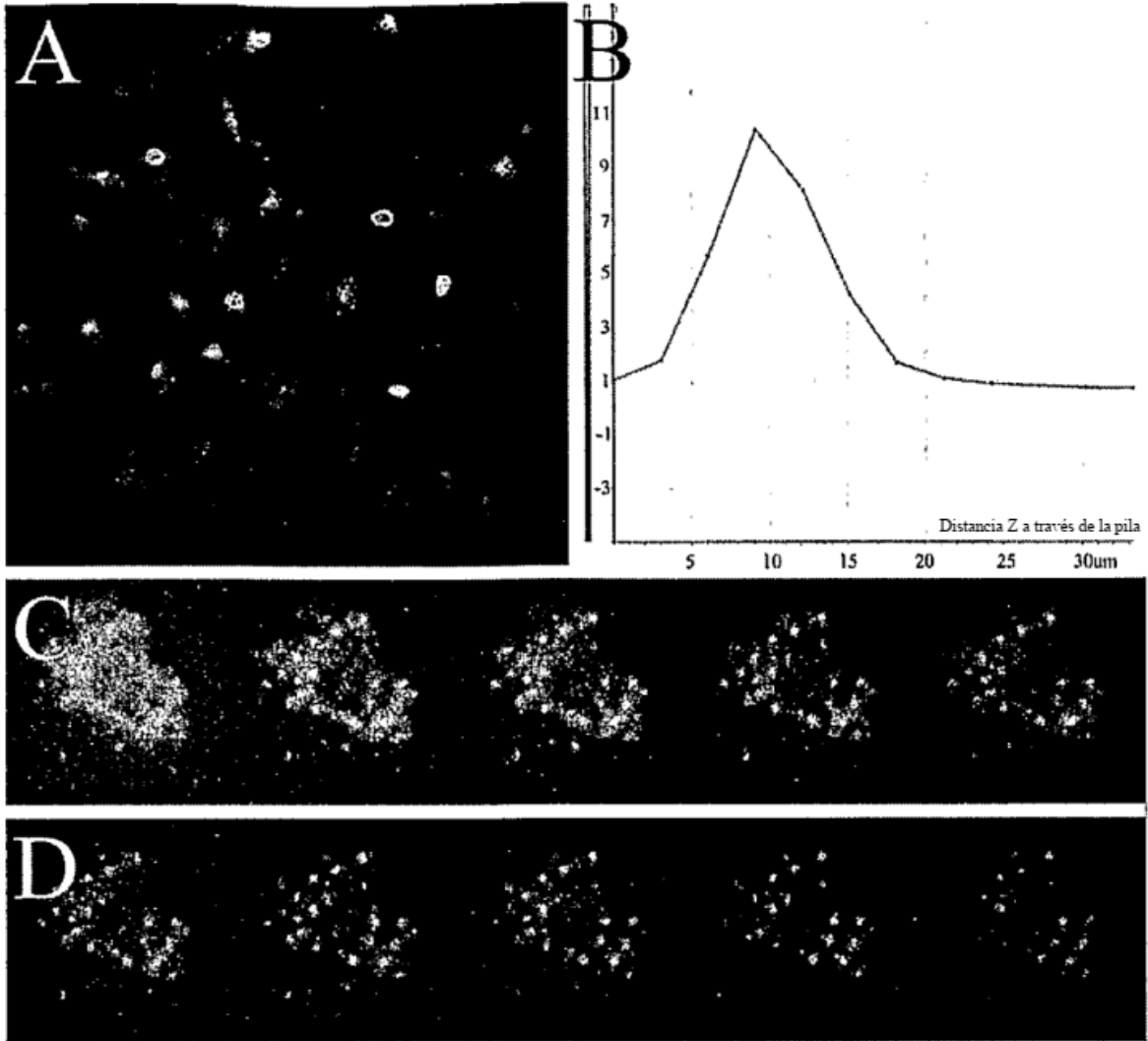


Figura 14

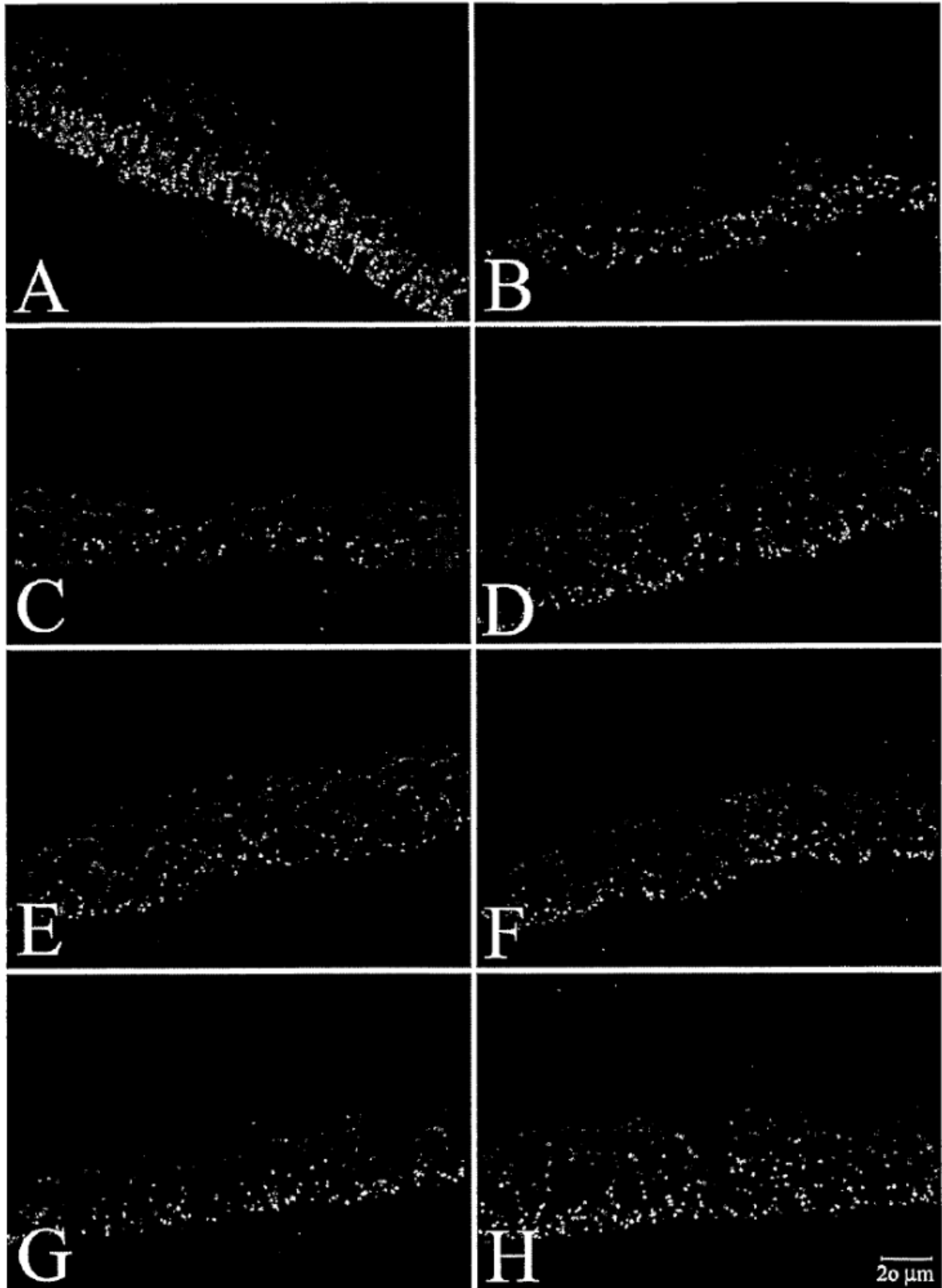


Figura 15

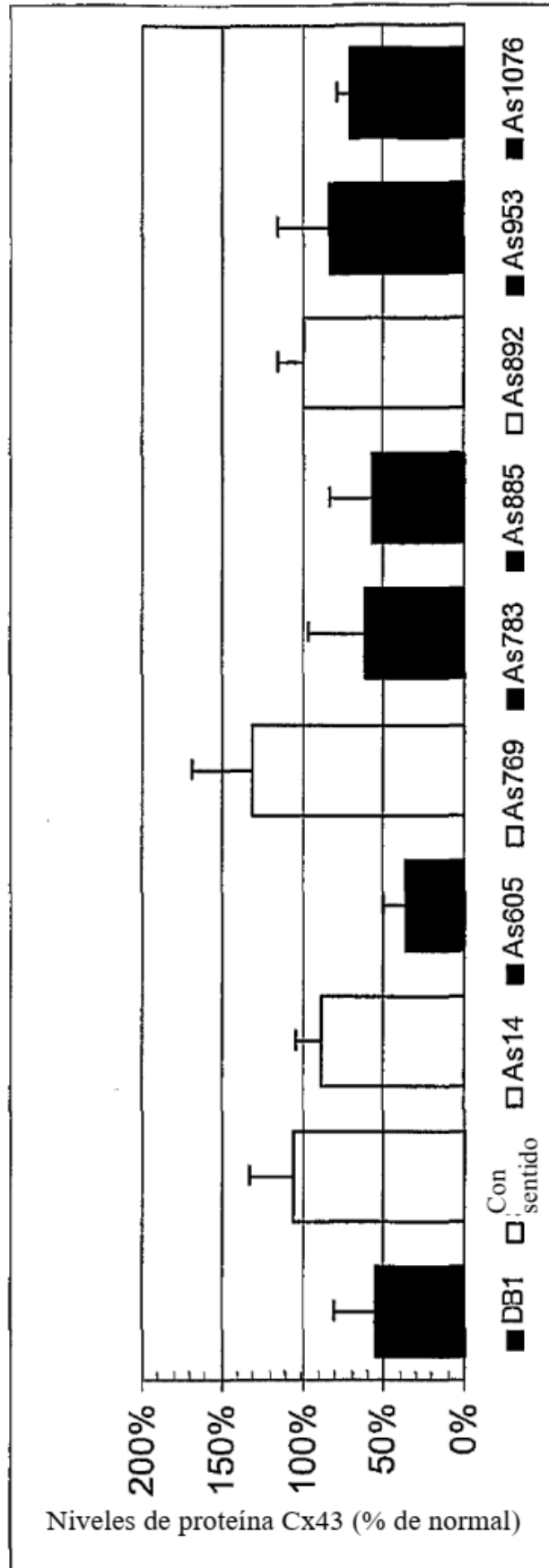


Figura 16

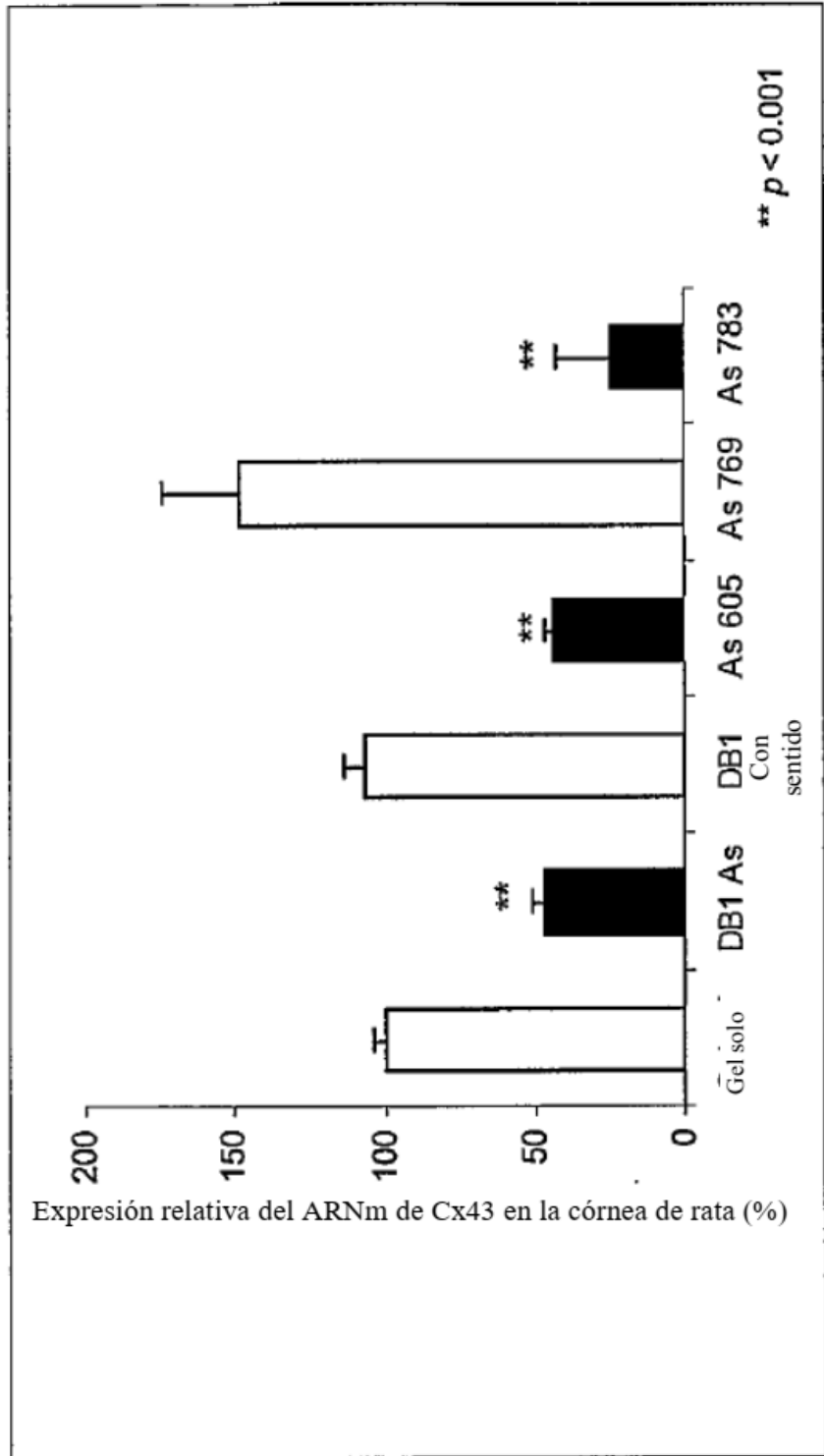


Figura 17

