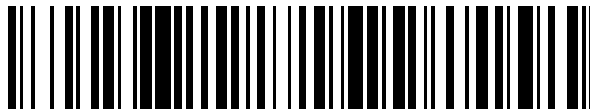


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 220**

21 Número de solicitud: 201731233

51 Int. Cl.:

A61K 31/045 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.10.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.04.2019

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PROFESOR NOVOA SANTOS
(52.5%)
C/ Xubias de Arriba, 84
15006 A Coruña ES;
SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (42.5%) y
UNIVERSIDADE DA CORUÑA (5.0%)**

72 Inventor/es:

**MAYÁN SANTOS, María Dolores;
CARPINTERO FERNÁNDEZ, Paula;
GAGO FUENTES, Raquel;
VARELA EIRÍN, Marta y
BLANCO GARCÍA, Francisco Javier**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Compuestos anti-conexina para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones**

57 Resumen:

Compuestos anti-conexina para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones.

La presente invención se refiere a compuestos, composiciones y formulaciones anti-conexina que comprenden al menos un compuesto anti-conexina para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones, tales como: artritis, osteoartritis, artritis reumatoide y osteoporosis. Los compuestos, composiciones y formulaciones descritas en la presente memoria son adecuados para la inhibición de uniones en hendidura (GJ) y hemicanales.

ES 2 710 220 A1

**COMPUESTOS ANTI-CONEXINA PARA SU USO EN LA PREVENCIÓN Y/O
EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DEGENERATIVAS DE LAS
ARTICULACIONES**

5

DESCRIPCIÓN

La presente descripción se refiere a productos farmacéuticos que incluyen agentes, compuestos, composiciones y formulaciones para la modulación, preferentemente para la inhibición, de uniones en hendidura (*gap-junctions*, GJ) y hemicanales que son útiles, por ejemplo, para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones, tales como artritis, osteoartritis, artritis reumatoide y osteoporosis. Por lo tanto, la presente invención pertenece al campo de la medicina, en particular al campo de las enfermedades degenerativas del cartílago.

15 **TÉCNICA ANTERIOR**

La osteoartritis (OA) es una enfermedad degenerativa de las articulaciones que afecta principalmente al cartílago y al hueso. La osteoartritis es especialmente frecuente en personas mayores y afecta generalmente a una articulación en un lado del cuerpo. En la osteoartritis el cartílago se destruye y se desgasta, causando dolor, hinchazón y pérdida de movilidad de la articulación.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica que, cuando se manifiesta en las articulaciones, afecta principalmente a la membrana sinovial. La artritis reumatoide comienza a edades más tempranas que la osteoartritis, se presenta por lo general bilateralmente en las articulaciones y en ocasiones produce sensación de malestar, cansancio y fiebre.

Aunque la OA y la AR presentan etiologías diferentes, ambas enfermedades se caracterizan por inflamación de la articulación sinovial, degeneración del cartílago y pérdida de la función articular. Las causas de la OA y la AR no se entienden por completo. Mientras que la AR es una enfermedad articular autoinmune, el riesgo de desarrollar OA aumenta sustancialmente con la edad, por mediadores de la

inflamación, traumatismos repetidos, diabetes, obesidad y enfermedades congénitas y de desarrollo, entre otros factores sistémicos y locales .

5 Los condrocitos son células altamente especializadas integradas en la matriz extracelular (MEC) del cartílago articular. Estas células confieren al cartílago articular importantes propiedades mecánicas y son responsables de la formación y remodelación del tejido durante toda la vida adulta. En el cartílago normal existe un equilibrio entre la síntesis y la degradación de la matriz. En el cartílago artrítico, en cambio, la degradación supera a la síntesis.

10

Los condrocitos se encuentran en pequeñas cavidades conocidas como lagunas. Esta característica ha dado origen a la idea de que los condrocitos no están conectados directamente entre sí y que se comunican con otros condrocitos principalmente por difusión de sustancias en la matriz. Sin embargo, una comunicación intercelular adecuada es esencial para la organización de una respuesta oportuna y uniforme a estímulos físicos o biológicos o al daño celular, o simplemente para mantener la homeostasis del tejido. Se ha propuesto que la escasa capacidad regenerativa del cartílago se debe a la ausencia de vasos sanguíneos y linfáticos y al aislamiento relativo de las células. Este, sin embargo, 15 muy probablemente no es el caso del cartílago articular, ya que el envejecimiento reduce la densidad celular y el grosor del cartílago, el cual permite al tejido mantener su estructura y función. 20

El mantenimiento del equilibrio homeostático y el funcionamiento normal de los tejidos son controlados por la interacción entre las redes comunicativas 25 extracelulares e intercelulares. La comunicación intercelular directa, que incluye el intercambio directo de metabolitos, nutrientes, segundos mensajeros, RNA pequeños e iones, se consigue mediante uniones en hendidura (*gap-junctions*, GJ), que desempeñan papeles críticos en la función y el desarrollo. Las GJ son estructuras de la membrana celular que facilitan la comunicación directa célula-célula. Un canal de 30 unión en hendidura está formado por dos hemicanales de conexinas (Cx), compuestos cada uno por seis subunidades de conexina. Cada hemicanal de conexinas hexamérico se acopla con un hemicanal de conexinas en la membrana opuesta para formar una única unión en hendidura. Se ha comunicado que los

canales de unión en hendidura están distribuidos por todo el cuerpo. En general, las conexinas constituyen una familia de proteínas denominadas usualmente de acuerdo con su peso molecular o clasificadas en función de su filogenia en las subclases alfa, beta y gamma. Se han identificado al menos hasta 21 conexinas humanas y 19 isoformas de conexinas murinas. Se ha comunicado que los diferentes tejidos y tipos celulares poseen patrones característicos de expresión proteica de las conexinas.

De hecho, los cambios en los niveles proteicos de las conexinas, el estado de ensamblaje o la localización son característicos de una variedad de enfermedades en las que las conexinas están desreguladas, como trastornos degenerativos e inflamatorios, lesiones neuronales inducidas por hipoxia-isquemia, enfermedad renal crónica o fisiopatología cardíaca. Hay algunos estudios que sugieren que las conexinas podrían desempeñar un papel crucial en la curación y reparación de heridas en los tejidos conectivos. En este sentido, los cebadores de sentido contrario de la conexina 43 (Cx43) impidieron el aumento de los niveles proteicos de la conexina 43 y la regulación por aumento anormal de la conexina 43; asimismo se restablecieron las tasas normales de cierre de heridas en las células endoteliales de la piel y de la córnea.

En realidad, no se dispone actualmente de terapias probadas para enfermedades degenerativas de las articulaciones. Existen solo unos pocos tratamientos paliativos para controlar el dolor y la inflamación. Así pues, los pacientes sufren de un dolor crónico intenso progresivo junto con un deterioro de la función diaria. En la terapia actual se usa una clase de fármacos conocidos como antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) para tratar las enfermedades articulares musculoesqueléticas, tales como la osteoartritis, pero estas terapias presentan una serie de inconvenientes, que incluyen, en particular, enfermedades gastrointestinales, y pueden interferir también con la reparación y formación de cartílago. Otras alternativas recurren a intervenciones quirúrgicas, tales como artroscopia y cirugía de sustitución total de la articulación con material artificial, como las prótesis. Estos tratamientos paliativos, cirugías y terapias físicas convierten a las enfermedades degenerativas de las articulaciones en una de las enfermedades más costosas en los países desarrollados. Pese a los avances en la comprensión de los principios de los mecanismos subyacentes a las enfermedades degenerativas de las articulaciones,

sigue habiendo una importante demanda insatisfecha de opciones terapéuticas nuevas para el tratamiento y/o la prevención de (por ejemplo la progresión de) las enfermedades degenerativas de las articulaciones.

5 RESUMEN DE LA INVENCION

Con el fin de proporcionar una opción terapéutica nueva para el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades degenerativas de las articulaciones, los inventores describen en la presente memoria compuestos anti-conexina para su uso en el
10 tratamiento y/o la prevención de enfermedades degenerativas de las articulaciones. De forma alternativa, la presente invención también se refiere al uso de un compuesto anti-conexina para la preparación de un medicamento o de una composición para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "conexina" se refiere a una familia de proteínas transmembranales relacionadas estructuralmente que se ensamblan para formar uniones en hendidura en vertebrados. Cada unión en hendidura se compone de dos hemicanales, o conexones, que a su vez están formados por seis
20 moléculas de conexina. En un aspecto, la conexina es una conexina presente de forma natural en un ser humano o animal o presente de forma natural en el tejido en el que se ha de reducir la expresión o actividad de la conexina. Como se usa en la presente memoria se entiende, pues, que la referencia a una conexina concreta es una referencia a todas las variantes de la misma en las diferentes especies, incluso
25 aunque sus pesos moleculares sean diferentes. Así, por ejemplo, la referencia a la "conexina 43" no solo se refiere a la conexina 43 humana sino también a la conexina análoga de cualquier otra especie, independientemente de si también pesa 43 Kd o no. De forma similar, la referencia a una "conexina 43" no humana es una referencia al análogo o la variante de conexina 43 en esa especie. Así, por ejemplo, la
30 referencia a la "conexina 43 de caballo" es una referencia al análogo o la variante correspondiente de la conexina 43 humana en el caballo, aun cuando no presente un peso molecular de 43 Kd. El gen de la conexina (incluida la secuencia codificante) generalmente presenta homología con la secuencia codificante de una o más de las conexinas específicas mencionadas en la presente memoria, por ejemplo homología

con la conexina 43. La conexina es típicamente una conexina α o β . Preferentemente, la conexina es una conexina α y se expresa en el tejido que se ha de tratar. La Tabla 1 muestra las secuencias de nucleótidos y polipeptídicas de diferentes conexinas adecuadas para la presente invención.

5

Tabla 1. Lista de las conexinas humanas usadas en la presente invención.

| Conexina (Cx) | Secuencia de nucleótidos | Secuencia polipeptídica |
|----------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Cx43 | SEQ ID NO: 1 | SEQ ID NO: 2 |
| Cx45 | SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: 4 |
| Cx46 | SEQ ID NO: 5 | SEQ ID NO: 6 |
| Cx26 | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 8 |
| Cx32 | SEQ ID NO: 9 | SEQ ID NO: 10 |

10 Como se usa en la presente memoria, el término "proteína" se refiere a cualquier polímero de dos o más aminoácidos individuales (tanto si son naturales como si no) unidos mediante enlaces peptídicos. Además, tal y como se usa en la presente memoria, se entiende que el término "proteína" incluye los términos "polipéptido" y "péptido" (que a veces se pueden usar indistintamente en la presente memoria). De forma similar, los fragmentos, análogos, derivados y variantes de una proteína se pueden denominar "proteínas" en la presente memoria y deberán considerarse una "proteína" salvo que se indique lo contrario. El término "fragmento" de una proteína se refiere a un polipéptido que comprende menos que todos los restos aminoácido de la proteína. Un "dominio" de una proteína también es un fragmento y comprende los restos aminoácido de la proteína que se requieren a menudo para conferir la actividad o función.

15

20

Como se usa en la presente memoria, la expresión "compuesto anti-conexina" se refiere a aquellos compuestos que afectan o modulan la actividad, expresión o formación de una conexina, un hemicanal de conexinas (conexón) o una unión en hendidura. Estos compuestos anti-conexina generalmente van dirigidos a conexinas y/o hemicanales de conexinas (conexones) o a las uniones en hendidura propiamente dichas. Los hemicanales y las uniones en hendidura resultantes que

25

comprenden conexinas están implicados independientemente en la liberación o el intercambio de moléculas pequeñas entre el citoplasma celular y un espacio o tejido extracelular cuando están abiertos los hemicanales, y entre el citoplasma de células contiguas cuando están abiertas las uniones en hendidura. Los compuestos anti-conexina incluyen, sin limitación, compuestos de sentido contrario (p.ej. 5 polinucleótidos de sentido contrario), anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos, así como péptidos y polipéptidos que incluyen péptidos "peptidomiméticos" y "miméticos" y otros compuestos, que incluyen compuestos de fosforilación de conexinas, tales como inhibidores de las Ser/Thr-fosfatasa PP1 y PP2A, tales como 10 ácido okadaico, caliculina A, dragmacidinas, microcistinas, nodularinas, tautomicina, tautomicetina, citostatinas, fosfolina, leustroducsinas, foslactomicinas, fostriecina y cantaridina, tacrolimus, ciclosporina A, tirsiferil-23-acetato, nodularina V (motuporina), 2H-microcistina-LA, nodularina R, microcistina LR, dinofisistoxina 1 y dinofisistoxina 2; compuestos de beanzoilamino-benzopirano tales como tonabersat (sb-220453) y 15 carabersat (sb-204269); fenotiazinas tales como mesoridazina, tioridazina, paroxetina, risperidona, metilfenidato, raloxifeno, minoxidil, tioridazina, haloperidol, droperidol, mesoridazina, meperidina, melperona, ditran B (JB-329), bencilato de N-metil-3-piperidilo, promazina, triflupromazina, levomepromazina, metotrimeprazina, flufenazina, perfenazina, proclorperazina y trifluperazina; fenamatos tales como ácido 20 flufenámico y derivados, el derivado de quinina mefloquina, ácido meclofenámico.

Los términos "modulador" o "modulación" o "modular" de la actividad o expresión de conexinas, tal y como se usan en la presente memoria en sus diversas formas, se refieren a la inhibición total o, preferentemente, parcial de la expresión o acción o 25 actividad de una conexina o de un hemicanal de conexinas o de una unión en hendidura de conexinas, y pueden funcionar como agentes anti-conexina.

Como se usa en la presente memoria, los "compuestos de sentido contrario" incluyen diferentes tipos de moléculas que actúan inhibiendo o disminuyendo la expresión 30 génica, la traducción o la función, incluidos aquellos que están dirigidos a una secuencia específica de mRNA para aplicaciones terapéuticas. Los compuestos de sentido contrario incluyen compuestos de ADN de sentido contrario y compuestos de ARN de sentido contrario. Los oligo- y polinucleótidos anti-conexina adecuados incluyen oligo- y polinucleótidos de ARNi y oligo- y polinucleótidos de siARN. Los

expertos en la técnica conocen la síntesis de oligo- y polinucleótidos de sentido contrario y de otros oligo- y polinucleótidos anti-conexina, tales como ARNi, siARN y oligo- y polinucleótidos de ribozimas, así como de oligo- y polinucleótidos con esqueletos modificados y mixtos. Las secuencias de sentido contrario dirigidas a dianas seleccionadas pueden o no unirse de forma no específica a secuencias distintas de la diana. Se prefieren las secuencias de sentido contrario con una unión no específica mínima, ausente o no detectable a secuencias distintas de la diana.

Aunque los nucleótidos de sentido contrario constituyen una forma preferida de compuestos de sentido contrario, la presente invención abarca otros compuestos oligoméricos de sentido contrario que incluyen, sin limitación, miméticos de oligonucleótidos. Los compuestos de sentido contrario incluyen ribozimas, oligonucleótidos de secuencias guía externas (EGS) (oligozimas) y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que hibridan con el ácido nucleico diana y modulan su expresión. Asimismo incluyen oligodesoxinucleótidos fosforotioato (S-ODN). Así, los compuestos de sentido contrario incluyen, por ejemplo, las principales moléculas silenciadoras de genes basadas en ácidos nucleicos, como, por ejemplo, ácidos oligodesoxirribonucleicos de sentido contrario modificados químicamente (UUJNs; ribozymes and siARNs (Scherer, L. J. and Rossi, J. J. *Nature Biotechnol.* 21: 1457-1465 (2003)). Los compuestos de sentido contrario también pueden incluir moléculas de sentido contrario como, por ejemplo, ácidos peptidonucleicos (PNA), morfolino-fosforodiamidatos, ADNzimas y los ARN nucleares pequeños UI mutados en el extremo 5'. El polinucleótido de sentido contrario generalmente es de sentido contrario con respecto a un mRNA de conexina, preferentemente mRNA de conexina 43, mARN de conexina 45, mARN de conexina 46, mARN de conexina 26 o mARN de conexina 32. Con más preferencia, el polinucleótido de sentido contrario es de sentido contrario con respecto al mARN de conexina 43. Un polipéptido de este tipo puede ser capaz de hibridar con el mARN de la conexina y, por tanto, puede inhibir la expresión de la conexina interfiriendo con uno o más aspectos del metabolismo del mARN de conexina, incluidos la transcripción, el procesamiento del mARN, el transporte del mARN desde el núcleo, la traducción o la degradación del mARN. El polinucleótido de sentido contrario hibrida típicamente con el mARN de conexina para formar un dúplex, que

puede producir la inhibición directa de la traducción y/o la desestabilización del mARN.

5 El uso de un oligonucleótido de sentido contrario como agente terapéutico con el fin de regular por disminución la expresión génica de la conexina induciendo la degradación dependiente de enzimas del mARN complementario se puede administrar preferentemente con ARNi suministrado mediante técnicas nanotecnológicas y nanopartículas y/o mediante el uso de un vector de expresión, un vector vírico o no vírico.

10 También se contempla el uso combinado de polinucleótidos dirigidos a proteínas de conexina separadas (por ejemplo, dirigidos a 1, 2, 3, 4 o más conexinas diferentes). Por ejemplo, se pueden usar en combinación polinucleótidos dirigidos a la conexina 43 y a uno o más miembros de la familia de conexinas.

15 De forma alternativa, los polinucleótidos de sentido contrario pueden formar parte de composiciones que pueden comprender polinucleótidos contra más de una proteína de conexina. Preferentemente, una de las proteínas de conexina a las que se dirigen los polinucleótidos es la conexina 43. Otras proteínas de conexina a las que se dirigen los oligodesoxinucleótidos pueden incluir, por ejemplo, las conexinas 26, 32, 20 45 y 46. Aunque la secuencia exacta del polinucleótido de sentido contrario usado en la invención dependerá de la proteína de conexina diana, han resultado especialmente adecuados para la conexina 43 los polinucleótidos que presentan las secuencias siguientes (Tabla 2).

25 **Tabla 2. Secuencias del gen de la Cx43 usadas para diseñar las secuencias oligonucleotídicas de sentido contrario de ARNi de Cx43.**

| Secuencias del gen Cx43 (5'→3') | SEQ ID NO: | Secuencias de sentido contrario de ARNi de Cx43 (5'→3') | SEQ ID NO: |
|--|-------------------|--|-------------------|
| GGATCGGGTTAAGG GAAAG | 11 | GGAUCGGGUUAAGG GAAAG | 12 |
| GCCTTCTTGCTGATC | 13 | GCCUUCUUGCUGAU | 14 |

| Secuencias del gen Cx43 (5'→3') | SEQ ID NO: | Secuencias de sentido contrario de ARNi de Cx43 (5'→3') | SEQ ID NO: |
|--|-------------------|--|-------------------|
| CAGT | | CCAGU | |
| GCTTAGAGTGGACTA TTAA | 15 | GCUUAGAGUGGACU AUUAA | 16 |
| GCTGGTACTGGCG ACAGA | 17 | GCUGGUUACUGGCG ACAGA | 18 |
| AATTACAGCCACTAG CCATTG | 19 | AAUUACAGCCACUA GCCAUUG | 20 |
| AAGTACGGTATTGAA GAGCAT | 21 | AAGUACGGUAUUGA AGAGCAU | 22 |
| AAGGTGTGGCTGTC AGTACTT | 23 | AAGGUGUGGCUGUC AGUACUU | 24 |
| AACTCCTTGACAAGG TTCAAG | 25 | AACUCCUUGACAAG GUUCAAG | 26 |
| GAGGTGGCCTTCTT GCTG | 27 | GAGGUGGCCUUCUU GCUG | 28 |
| AAGGTTCAAGCCTAC TCAACT | 29 | AAGGUUCAAGCCUA CUCAACU | 30 |

- Asimismo se contempla el uso de oligopéptidos o polipéptidos de sentido contrario contra péptidos de conexina como agentes terapéuticos, con el fin de regular por disminución la actividad del gen de la conexina. Los oligopéptidos o polipéptidos de sentido contrario generalmente son de sentido contrario con respecto a una proteína de conexina, preferentemente una proteína de conexina 43, una proteína de conexina 45, una proteína de conexina 46, una proteína de conexina 26 o una proteína de conexina 32. Con más preferencia, los oligopéptidos o polipéptidos de sentido contrario son de sentido contrario con respecto a la proteína de conexina 43.
- 5 También se contempla el uso combinado de polipéptidos dirigidos a proteínas de conexina separadas (por ejemplo, dirigidos a 1, 2, 3, 4 o más conexinas diferentes). Por ejemplo, se pueden usar en combinación polipéptidos dirigidos a la conexina 43 y a uno o más miembros de la familia de conexinas.
- 10

De forma alternativa, los polipéptidos de sentido contrario pueden formar parte de composiciones que pueden comprender polipéptidos contra más de una proteína de conexina. Preferentemente, una de las proteínas de conexina a las que se dirigen los polipéptidos es la conexina 43. Otras proteínas de conexina a las que se dirigen los polipéptidos pueden incluir, por ejemplo, las conexinas 26, 32, 45 y 46. Aunque la secuencia exacta del polipéptido de sentido contrario usado en la invención dependerá de la proteína de conexina diana, han resultado especialmente adecuados para la conexina 43 los polinucleótidos que presentan las secuencias siguientes (tablas 2). AVESAWGDEQSAFRCN (SEQ ID NO: 31), TQQPGCENVCY (SEQ ID NO: 32), DKSPISHVRFWV (SEQ ID NO: 33), YTCKRDPCPHQVDC (SEQ ID NO: 34) y FLSRPTEKTIFIIF (SEQ ID NO: 35).

Los términos "peptidomimético" y "mimético" incluyen compuestos químicos naturales y sintéticos que pueden presentar sustancialmente las mismas características estructurales y funcionales que las regiones proteicas que mimetizan. En el caso de las conexinas, estos pueden mimetizar, por ejemplo, los bucles extracelulares de conexinas opuestas implicadas en el acoplamiento conexina-conexina y la formación del canal célula-célula y/o los bucles extracelulares de las conexinas de los hemicanales. Por ejemplo, una composición mimética puede ser útil como agente modulador de la unión en hendidura si es capaz de regular por disminución las acciones o actividades biológicas de las conexinas, como, por ejemplo, impedir el acoplamiento de las conexinas para formar comunicaciones célula-célula mediadas por uniones en hendidura o evitar la apertura de las conexinas para exponer el citoplasma celular al medio extracelular. Los peptidomiméticos engloban los descritos en la presente memoria así como los que puedan ser conocidos en la técnica, ya sean los conocidos hasta ahora o los desarrollados posteriormente.

En una realización más preferida, el peptidomimético se selecciona del grupo que consiste en GAP27 (SRPTEKTIFII SEQ ID NO: 52) y rotigaptide (ZP123).

En otra realización preferida, el anticuerpo anti-conexina o el fragmento de unión al antígeno del mismo es un anticuerpo, un fragmento F(v), un fragmento Fab, un fragmento Fab' o un fragmento F(ab')₂.

En una realización más preferida, el anticuerpo anti-conexina se selecciona del grupo formado por anti-conexina 43, anti-conexina 45, anti-conexina 46, anti-conexina 26 o anti-conexina 32. En una realización más preferida, el anticuerpo anti-conexina es
5 anti-conexina 43.

En una realización preferida, los compuestos anti-conexina descritos en la presente memoria para su uso de acuerdo con la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en un inhibidor de uniones en hendidura y/o un inhibidor de
10 hemicanales.

Los términos "trastorno" o "enfermedad", usados indistintamente en todo este documento, se refieren a cualquier estado patológico que se beneficiaría del tratamiento con una molécula o un compuesto o una composición de la invención,
15 incluidos los descritos o reivindicados en la presente memoria.

La expresión "enfermedad degenerativa de las articulaciones" se refiere a un deterioro paulatino del cartílago articular que cubre las articulaciones. Una enfermedad degenerativa de las articulaciones es una enfermedad progresiva no
20 infecciosa de las articulaciones de carga. El cartílago articular normal es liso, blanco y translúcido. Se compone de células cartilaginosas (condrocitos) integradas en una matriz esponjosa hecha de colágeno, polisacáridos proteicos y agua. En la fase temprana de la artritis primaria el cartílago se vuelve amarillo y opaco con áreas localizadas de ablandamiento y arrugamiento de las superficies. A medida que la
25 degeneración avanza, las áreas blandas se agrietan y se desgastan, exponiendo el hueso debajo del cartílago. El hueso comienza entonces a remodelarse y a aumentar su densidad mientras que el cartílago restante empieza a crisparse. Finalmente, se forman osteofitos (espulones de hueso nuevo) cubiertos por cartílago en el borde de la articulación. El cartílago necesita repararse a medida que aumenta el desgaste
30 mecánico. Las células cartilaginosas son incapaces de producir suficiente matriz esponjosa y, por tanto, el cartílago dañado no se puede reparar por sí solo. El cartílago carece de suministro sanguíneo para fomentar la curación. La mayoría de las enfermedades degenerativas de las articulaciones se deben a inestabilidades mecánicas o cambios en la articulación a causa del envejecimiento. Estas incluyen la

artritis degenerativa del anciano y, en individuos más jóvenes, pueden ser el resultado de lesiones, contusiones, configuración anormal de las articulaciones (es decir, displasia de cadera) o desgaste mecánico causado por la ruptura del ligamento cruzado anterior, luxación patelar u osteocondritis disecante, por ejemplo. La enfermedad degenerativa de las articulaciones puede aparecer en cualquier articulación del cuerpo, incluyendo sin limitación rodilla, cadera, hombro, mano y columna vertebral. Los estados incluidos en las enfermedades degenerativas de las articulaciones se seleccionan del grupo formado por osteoartritis, artritis, lesión física, osteoporosis, enfermedad de Paget y artritis reumatoide.

5
10

Como se usa en la presente memoria, "sujeto" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero que incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, así como animales deportivos, de zoológicos o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, ovejas, cerdos, vacas, etc. El mamífero preferido en este caso es un ser humano, incluidos adultos, niños y ancianos.

15

Como se usa en la presente memoria, "prevención", "prevenir" significa prevenir total o parcialmente, o mitigar o controlar, o reducir o detener el progreso de un estado patológico. Como se usa en la presente memoria, una "cantidad efectiva" o "dosis efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" o "dosis terapéuticamente efectiva" en relación con las moléculas, los compuestos o las composiciones de la presente invención se refiere a la cantidad suficiente para inducir un resultado biológico, farmacéutico o terapéutico deseado. Ese resultado puede ser el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad o enfermedad o estado patológico o de cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En la presente invención, el resultado implicará fomentar la curación, previniendo y/o reduciendo el dolor y/o la inflamación y los procesos degenerativos. Las invenciones descritas y reivindicadas en la presente memoria también pueden favorecer la reparación y regeneración del cartílago en estados patológicos tales como las enfermedades degenerativas de las articulaciones, o después de una lesión articular.

20

25

30

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

En una realización más preferida, la enfermedad degenerativa de las articulaciones se selecciona del grupo formado por artritis, osteoartritis, artritis reumatoide, lesión física, enfermedad de Paget y osteoporosis.

- 5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad degenerativa de las articulaciones, comprendiendo la composición al menos un compuesto anti-conexina como se describe en la presente memoria. De forma alternativa, la presente invención también describe el uso de una composición que comprende al menos un compuestos anti-
10 conexina de acuerdo con la presente invención en la producción de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad degenerativa de las articulaciones.

El término "medicamento", "composición" o "composición farmacéutica" hace
15 referencia a una composición que comprende al menos un principio activo, siendo la composición susceptible de investigación en cuanto a un efecto especificado y eficaz en un mamífero (por ejemplo y sin limitación, un ser humano). Los expertos normales en la técnica entenderán y reconocerán las técnicas apropiadas para determinar, en función de las necesidades del experto, si un principio activo presenta el efecto eficaz
20 deseado.

El compuesto anti-conexina puede estar presente en una forma sustancialmente aislada. Se entenderá que el producto puede mezclarse con portadores o diluyentes que no interfieran con el fin para el cual está previsto el producto y considerarse
25 todavía sustancialmente aislado. Los términos "portador" y "diluyente" se refieren a cualquier portador y diluyente farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y que se pueda administrar sin excesiva toxicidad.

- 30 En una realización preferida, la composición de la invención comprende asimismo un excipiente, vehículo o adyuvante farmacéutico aceptable.

La expresión "excipiente farmacéutico aceptable" o "vehículo farmacéutico aceptable" o "adyuvante farmacéutico aceptable" como se usa en la presente memoria se refiere

a aditivos útiles para convertir los compuestos farmacológicamente activos en formas farmacéuticas que sean adecuadas para la administración a los pacientes. Los excipientes, vehículos o adyuvantes adecuados incluyen cargas, aglutinantes, disgregantes, agentes tensioactivos, lubricantes, fluidificantes y colorantes. También se pueden incluir otros excipientes, vehículos o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos y composiciones anti-conexina se pueden administrar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos o principios activos en o alrededor del lugar afectado, por ejemplo por aplicación tópica, instilación o inyección, por ejemplo inyección peritendinal, inyección en tejido blando, inyección intraarticular e inyección periarticular. Los compuestos y composiciones anti-conexina también se pueden administrar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos usando técnicas interoperatorias. La administración también puede realizarse por inyección o de forma interoperatoria en cápsulas articulares o cavidades óseas. Las composiciones de agentes anti-conexina se pueden administrar en monoterapia, concomitantemente o de forma intraoperatoria.

En una realización más preferida, la composición de la invención comprende asimismo un segundo principio activo. En una realización más preferida, el segundo principio activo se selecciona del grupo formado por: analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y terapias intraarticulares, como corticosteroides y ácido hialurónico. En una realización más preferida, el segundo principio activo se selecciona de la lista que comprende: paracetamol, inhibidores específicos de la ciclooxigenasa-2, tramadol, opiáceos, AINE, AINE tópicos, capsaicina, salicilato tópico, esteroides intraarticulares, ácido hialurónico intraarticular y glucosamina y condroitina.

Los compuestos anti-conexina y la composición de la invención se pueden administrar en dosis únicas o divididas. Las dosis se pueden administrar una sola vez, o la aplicación se puede repetir. Típicamente, la aplicación se repetirá semanalmente o cada dos semanas, o mensualmente o con otra frecuencia que podrá ser determinada por los expertos. La administración de el/los agente(s) anti-conexina, por ejemplo para la regulación por disminución de la expresión de

conexina o el bloqueo o la inhibición de la apertura o la actividad de la conexina, modula, por tanto, la comunicación entre células, o la pérdida hacia el espacio extracelular en el caso de regulación de las conexinas, y minimiza las pérdidas o lesiones adicionales de células o las consecuencias de las lesiones.

5

Las vías de administración y las dosificaciones descritas en la presente memoria solo pretenden ser orientativas, puesto que un médico experto determinará la vía de administración y la dosificación óptimas para cada paciente y estado patológico concreto. En cualquiera de los procedimientos para el tratamiento de un sujeto con una enfermedad degenerativa de las articulaciones mencionada o descrita en la presente memoria se puede usar la administración de cualquiera de las dosis, formas farmacéuticas, formulaciones y/o composiciones descritas en la presente memoria.

En otra realización preferida, las composiciones proporcionadas en la presente memoria se encuentran preferentemente en solución o suspensión estéril, o en otras formulaciones farmacéuticamente aceptables. La composición proporcionada en la presente memoria se puede aplicar directamente sobre el tejido afectado o enfermo, o preferentemente se adapta para la administración intraarticular y/o sistémica o parenteral. Las administraciones sistémicas pueden incluir, sin limitación, inyecciones intramusculares, intravenosas o subcutáneas, o la adsorción directa hacia la circulación sanguínea por administración no gastrointestinal transmucosal, por ejemplo sublingual.

En la realización más preferida, los compuestos o las composiciones proporcionados en la presente memoria se adaptan para la inyección directa en un tejido diana, por ejemplo un tendón, un ligamento o un hueso, o se pueden adaptar para la aplicación directa sobre el tejido diana, por ejemplo en un gel o un material pastoso, para mejorar y/o prolongar el contacto con el tejido diana.

En otra realización preferida, la composición de la invención se formula para la inyección directa en el tejido enfermo. En una realización más preferida, el tejido enfermo se selecciona del grupo formado por: cartílago articular, membrana sinovial y hueso subcondral.

El agente terapéutico se puede administrar por inyección intraarticular, periarticular, peritendinal o en tejido blando. El agente terapéutico se puede inyectar en dosis única o en dosis múltiples. Se contempla que los procedimientos y la composición descritos en la presente memoria incluyan la administración usando diversos procedimientos conocidos en la técnica o desarrollados posteriormente, incluyendo, por ejemplo, técnicas laparoscópicas. Ejemplos de estas técnicas pueden incluir técnicas intraoperatorias y/o inyección directa. Estas técnicas pueden facilitar el suministro del fármaco en forma de liberación prolongada, logrando una mejor biodisponibilidad y/o distribución, lo cual mejora la eficacia terapéutica.

5

10

En otra realización preferida, la composición de la invención se usa para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad degenerativa de las articulaciones. En una realización más preferida, la enfermedad degenerativa de las articulaciones se selecciona del grupo formado por artritis, osteoartritis, lesión física, enfermedad de Paget, artritis reumatoide y osteoporosis.

15

Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad degenerativa de las articulaciones, que comprende la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de un compuesto anti-conexina o de la composición descrita en la presente memoria a un paciente que lo necesite.

20

En una realización preferida, el procedimiento de la invención puede ser preferentemente la administración directa en el tejido enfermo. En una realización más preferida, la administración es intraarticular, periarticular o peritendinal.

25

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, la enfermedad degenerativa de las articulaciones se selecciona del grupo formado por artritis, osteoartritis, lesión física, enfermedad de Paget, artritis reumatoide y osteoporosis.

30

En otro aspecto, la invención proporciona un kit para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades degenerativas de las articulaciones. El kit puede incluir una o más composiciones descritas en la presente memoria. Por ejemplo, el kit puede incluir una composición que comprende al menos una cantidad terapéuticamente efectiva

de un compuesto anti-conexina como se describe en la presente memoria o combinaciones de los mismos.

5 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En la práctica de la presente invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones, no pretende excluir otras
10 características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención se harán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción, o pueden aprenderse por la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos, dibujos y listado de secuencias se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

15

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Fotografías de cortes de cartílago congelados de donantes sanos y de sujetos afectados por OA, que muestran que la proteína Cx43 se expresa en exceso
20 en el cartílago articular de los pacientes con OA. La expresión de Cx43 se analizó mediante ensayos inmunohistoquímicos (IHC).

Figura 2. Fotografía de una muestra de cartílago de un paciente con OA teñida con safranina O/verde sólido. El gráfico muestra la expresión de ARN de Col2A1IB,
25 Col2A1IA, MMP3 y MMP9 en muestras de cartílago del paciente con OA. Se muestra que la inhibición de los canales de conexina en el cartílago del paciente con OA conduce a la expresión del gen de colágeno tipo II anabólico y a la disminución de la expresión de los factores catabólicos tales como MMP3 y MMP9.

30 La **figura 3** muestra que la inhibición de los canales de conexina regula el fenotipo de los condrocitos osteoartríticos inhibiendo la proliferación celular y reduciendo la expresión de mediadores catabólicos (A), y provoca una disminución de la expresión de la ciclina D1 (CCND1) y un aumento de la expresión de los inhibidores del ciclo celular p21(Cip1) de los condrocitos osteoartríticos (B y C). Además, el tratamiento

de los condrocitos primarios humanos con 1-octanol aumenta la expresión de colágeno tipo II y reduce la expresión de MMP3 (B y C).

EJEMPLOS

5

La presente invención se describirá con más detalle mediante ejemplos. Los ejemplos pretenden ser ilustrativos y el alcance de la presente invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas no está limitado a o por los ejemplos.

10 **Materiales y métodos**

1.1 Obtención y procesamiento del cartílago

Se obtuvieron muestras de cartílago articular de rodilla y de la cabeza del fémur de
15 sujetos adultos sometidos a cirugía articular. Todos los sujetos firmaron un formulario de consentimiento informado y el comité de ética de la institución aprobó el estudio (código de registro del CAEIG de Galicia: 2012/094-PI13/00591 y 2016/349-PI16/00035). Las muestras de cartílago se congelaron inmediatamente in situ en Cryomold® Standard usando el compuesto Tissue-Tek® O.C.T.TM (Sakura Finetec,
20 Holanda) e isopentano en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. El cartílago de sujetos sanos se obtuvo *in situ* de individuos sin antecedentes de enfermedad articular que habían sufrido una fractura de rodilla o de cadera. Las muestras sanas se asignaron en base a los datos de sus historiales médicos y el estudio histológico. Las muestras histológicas (sanas y OA con diagnóstico radiológico) se clasificaron
25 según la escala de Mankin modificada. Las muestras (pacientes con OA y sujetos sanos de la misma edad) se dividieron en cuatro grupos: normal/sano (puntuación = 0-1); OA temprana (puntuación 2-3), denominada de grado I; OA leve (puntuación = 4-5), denominada de grado II; OA moderada (puntuación = 6-7), denominada de grado III; y OA grave, denominada de grado IV (puntuación = 8-13). Se prepararon
30 muestras de cartílago de 4 mm a partir de explantes de cartílago que se cortaron en el quirófano inmediatamente después de la cirugía. Las muestras se cultivaron durante la noche en placas de cultivo de 48 pocillos en DMEM con 15% de FCS que contenía 1-octanol 1 mM (Sigma) como compuesto anti-canales de conexina y se incubaron durante 17 horas. Para el aislamiento y el cultivo de los condrocitos

primarios se lavó un cartílago recién extraído con solución salina y se aislaron las células. Brevemente, las células (2,5 millones) se sembraron en matraces de 162 cm² y se incubaron a 37 °C en 5% de CO₂ y aire en DMEM suplementado con 100 µg/ml de Primicin™ (InvivoGen, San Diego, EE.UU.) y 15% de FCS hasta alcanzar
5 una confluencia de aproximadamente 80-90%. Los condrocitos se usaron en los experimentos durante la tercera o cuarta semana de cultivo primario.

El 1-octanol es un alcohol de cadena larga y un conocido bloqueante de canales de conexina que reduce la conductancia intercelular e inhibe rápidamente los canales y
10 hemicanales de las uniones en hendidura.

1.2 Procesamiento del tejido y ensayos inmunohistoquímicos (IHC)

Los cortes de cartílago se cortaron en serie (4 mm) a -20°C en un criostato (Leica CM1510). Los cortes de tejido se fijaron con acetona durante 10 min a 4°C, se
15 secaron a temperatura ambiente (TA) y se lavaron durante 10 min con PBST (PBS con 0,1% de Tween 20, pH 7,6). Antes de la tinción se inhibió la actividad peroxidasa endógena por incubación con H₂O₂ y metanol durante 10 min. A continuación, las células se lavaron una vez con PBST y se aplicó durante 1 h a TA el anticuerpo
20 primario anti-Cx43 (sc-6560) obtenido de Santa Cruz Biotechnology. Después de lavarlos tres veces con PBST durante 10 min cada vez, los cortes se incubaron durante 1 h con un polímero marcado con peroxidasa y conjugado con una Ig de cabra dirigida contra Ig de ratón/conejo (Dako, Dinamarca). Después de tres lavados con PBST se reveló la actividad peroxidasa usando una solución recién preparada de
25 cromógeno como sustrato que contenía tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobenzidina y H₂O₂ (Dako, Dinamarca). Los cortes se lavaron en agua destilada, se contratiñeron con hematoxilina de Gill, se deshidrataron paulatinamente con alcohol de diferentes grados y se montaron en xileno con Depex (Serva, Alemania). Se realizaron
30 controles negativos (omitiendo el anticuerpo primario) para probar la especificidad de cada anticuerpo. Los cortes de tejido también se contratiñeron con hematoxilina de Gill. Los portaobjetos se visualizaron usando un microscopio Olympus BX61 y una cámara digital DP71 (Olympus). El calibrado de las imágenes se efectuó con el software AnalySISD V.5.0 (Olympus Biosystems, Hamburgo, Alemania).

1.3 Ensayo de proliferación celular

La progresión del ciclo celular se midió mediante citometría de flujo usando tinción con yoduro de propidio (PI) para detectar el contenido total de ADN. Las células se recogieron con tripsina, se fijaron en etanol frío al 70% y se almacenaron a 4°C durante 12-24 horas. Las células se lavaron por centrifugación (2000 rpm, 15 minutos) en PBS frío. Tras la centrifugación, el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en una solución que contenía 4 mg/ml de RNasa, 1 mg/ml de PI y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se analizaron 20 x 10⁴ células mediante BD FACScalibur™ de BD biosciences.

1.4 Aislamiento de ARN y ensayo de PCR en tiempo real

Los condrocitos primarios cultivados se recuperaron por tripsinización. Por otra parte, las muestras de cartílago articular se digirieron en tampón de digestión (200 mmol/l de Tris-HCl, 200 mmol/l de NaCl, 5% de SDS y 100 mmol/l de citrato sódico) que contenía proteinasa K. Se añadió a la muestra el reactivo TRIzol de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total se trató con DNasa (DNasa libre de RNasa, Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para asegurar la degradación completa del DNA en la muestra. Se sintetizó cDNA a partir de 1 µg de ARN mediante el kit de síntesis de cDNA Superscript® VILO™ (Invitrogen). El cADN se diluyó 10 veces y la PCR en tiempo real se realizó con 5 µl de cDNA con los cebadores enumerados en la tabla 3 y SyBR-Green (Roche) en el LightCycler 480 Instrument Roche Applied Science. El cADN se amplificó a 95°C durante 10 minutos, a 95°C durante 10 segundos, a 60°C durante 10 segundos y a 72°C durante 12 segundos a lo largo de 45 ciclos, y seguidamente a 72°C durante 5 minutos.

Tabla 3. Cebadores usados en los ensayos de PCR en tiempo real

| Nombre | Secuencia del cebador | SEQ ID NO: |
|-------------|--------------------------------|------------------|
| CCND1 | Directa: TTCATCTTTCCAAGGCCAATC | SEQ ID NO: 36 |
| | Inversa: GGGCTGAACCTGGTAGACAG | la SEC ID N°: 37 |
| Col2A-II Bm | Directa: AGGATGTCCGGCAACCAG | SEQ ID NO: 38 |
| | Inversa: CAGGGGTCCCAGGTTCTC | la SEC ID N°: 39 |

| Nombre | Secuencia del cebador | SEQ ID NO: |
|------------|---|-----------------------------------|
| Col2A-IIAm | Directa: GGCCAGGATGTCCAGGAG Inversa: CAGATGGGGCAGCACTCTC | SEQ ID NO: 40 la SEC ID N°: 41 |
| MMP-3 | Directa: TGCTTTGTCCTTTGATGCTG Inversa: AGCCTGTGCCTTCAAAAATG | SEQ ID NO: 42 la SEC ID N°: 43 |
| MMP-9 | Directa: TTCATCTTTCCAAGGCCAATC Inversa: GGGCTGAACCTGGTAGACAG | SEQ ID NO: 44 la SEC ID N°: 45 |
| MMP-13 | Directa: CCCTGGGTCTCTTTCACTCA Inversa: GCTGACAGCATCAAAGGACA | SEQ ID NO: 46 la SEC ID N°: 47 |
| p21 | Directa: CTGAGGTGACACAGCAAAGC Inversa: GCCATTAGCGCATCACAGT | SEQ ID NO: 48 la SEC ID N°: 49 |
| HPRT1 | Directa: TCCACTTTTTGAGCAAGGGTA Inversa: AATCCAGCAGGTCAGCAAAG | SEQ ID NO: 50 la SEC ID N°: 51 |

Ejemplo 1. Identificación de Cx43 como factor inductor de la degeneración del cartílago.

5 La Cx43 se expresa normalmente en varios tejidos normales, que incluyen osteocitos, osteoblastos, condrocitos y células sinoviales. Como se muestra en la Figura 1, la Cx43 se localizó alrededor de los condrocitos y en todas las capas de cartílago articular. Se analizaron las muestras de cartílago con diferentes grados de OA. Los ensayos IHC del cartílago OA mostraron que la Cx43 se localiza en la membrana (zona circundante) y en todo el citoplasma y el núcleo. El cartílago OA
10 mostró niveles de la proteína Cx43 mayores que el cartílago sano. Los portaobjetos se visualizaron bajo un microscopio Olympus BX61 con una cámara digital DP71 (Olympus). El calibrado de las imágenes se efectuó con el software AnalySIS 5.0 (Olympus Biosystems, Hamburgo, Alemania). La tinción se examinó bajo el
15 microscopio óptico a 100x aumentos con barras de escala a 50 µm.

Ejemplo 2. La inhibición de la comunicación intercelular a través de uniones en hendidura (GJIC) ejerce un efecto protector frente a la producción de factores catabólicos en los condrocitos articulares.

20

La pérdida progresiva de cartílago articular incluye la regulación por aumento de las

enzimas que degradan la matriz extracelular, tales como las metaloproteinasas (MMP). La MMP9 y la MMP3, al degradar colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular, desempeñan un papel crítico en la homeostasis de la MEC.

5 Con el fin de demostrar que la regulación por disminución de la Cx43 o de las GJ protege frente a los factores catabólicos en el cartílago OA, se prepararon muestras de cartílago de 4 mm a partir de explantes obtenidos de pacientes con OA que se cortaron en el quirófano inmediatamente después de la cirugía. Las muestras se cultivaron durante la noche en placas de cultivo tisular de 48 pocillos con 1 ml de
10 DMEM con 15% de FCS que contenía 1-octanol 1 mM (Sigma) como compuesto anti-conexina 43 y se incubaron durante 17 horas. La imagen proviene de un explante de cartílago articular de un paciente con OA de grado I. Los resultados presentados en la Figura 2 muestran que la inhibición de los canales de conexina induce una disminución de la expresión de MMP3 y MMP9 y un aumento de la expresión de
15 colágeno tipo II de más del doble. La zona superficial dañada, afectada por la pérdida de proteoglicanos, se tiñe de verde por la absorción de safranina O/verde sólido.

En el análisis de expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real del RNA aislado de explantes de cartílago se observa que el 1-octanol aumenta la expresión de
20 colágeno tipo II y reduce la expresión de MMP3 y MMP9. Estos resultados muestran los efectos beneficiosos del compuesto anti-conexina en los condrocitos articulares de pacientes con OA.

**Ejemplo 3. La inhibición de los canales de uniones en hendidura reduce la
25 proliferación celular de los condrocitos.**

Las células se aislaron de explantes de cartílago de pacientes con OA y se cultivaron durante 3-4 semanas a 37 °C como se ha descrito en materiales y métodos. Los condrocitos se cultivaron durante 48 horas sin suero para aumentar la proporción de
30 células en la fase G0/G1 (70-80%). Al cabo de 48 horas se añadieron al medio 1-octanol 1 mM y suero (15% de suero fetal bovino, FCS) como se muestra en la Figura 3.

La distribución durante las diversas fases del ciclo celular (contenido de ADN) se midió después de 17 horas de tratamiento por citometría de flujo usando 1 mg/ml de yoduro de propidio (IP). El número de células en cada fase del ciclo celular se muestra en porcentajes (Figura 3A). En ausencia de 1-octanol, las células atraviesan el ciclo celular. Sin embargo, el ~ 60% de las células tratadas con octanol permanecieron durante 17 horas en un estado de detención del ciclo celular en G0/G1. Los resultados mostrados en la Figura 3 demuestran que la inhibición de la GJIC usando 1-octanol 1 mM durante 17 horas inhibe la progresión del ciclo celular de los condrocitos en cultivo primario.

5
10

Además, el análisis de la expresión de reguladores del ciclo celular en G1 revelaron que el 1-octanol aumenta la expresión del inhibidor p21 de cdk y reduce la expresión de la proteína nuclear necesaria para la progresión del ciclo celular, la ciclina D1 (CCND1). El análisis de la expresión de factores anabólicos/catabólicos confirmó que el 1-octanol aumenta la expresión de colágeno tipo II y reduce la expresión del gen de MMP3 (Figura 2B).

15

En la Figura 3C se muestran asimismo los resultados obtenidos cuando las células se cultivaron previamente en ausencia de suero. La Figura 3C muestra el análisis de la expresión génica de las células cultivadas durante 17 horas en presencia de 15% de FCS y 1-octanol.

20

En resumen, los datos mostrados en la presente memoria han demostrado que los individuos que sufren de artritis o presentan una lesión articular y/o daño del cartílago experimentan un aumento continuo de la expresión de Cx43 que desencadena cambios fenotípicos, proliferación celular y un aumento de la síntesis de proteínas, acompañado por un aumento de las MMP y otras enzimas que degradan la matriz extracelular. La acción continuada de MMP, ADAMTS y otras proteasas produce la degradación y/o la pérdida del cartílago. El tratamiento de pacientes susceptibles de sufrir artritis y/o degeneración del cartílago con compuestos anti-conexina, preferentemente con compuestos anti-conexina 43, induce la recuperación del fenotipo original y la activación de los mecanismos implicados en la regeneración del cartílago y la reparación del tejido, inactivando la proliferación celular, la síntesis de

25

30

factores catabólicos y la propagación y transmisión de mediadores de la inflamación y otras señales tóxicas a través de los canales GJ.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto anti-conexina para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad degenerativa de las articulaciones.
- 5 2. El compuesto anti-conexina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto anti-conexina se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de uniones en hendidura y/o un inhibidor de hemicanales.
3. El compuesto anti-conexina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el compuesto anti-conexina se selecciona del
10 grupo que consiste en un polinucleótido anti-conexina, un polipéptido anti-conexina, un péptido anti-conexina, un anticuerpo anti-conexina o un fragmento de unión al antígeno del mismo.
4. El compuesto anti-conexina para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el polinucleótido anti-conexina se selecciona del grupo que consiste en
15 oligonucleótidos de sentido contrario, polinucleótidos de sentido contrario, desoxirribosimas, morfolino-oligonucleótidos, moléculas de ARNi, moléculas de siARN, moléculas de PNA, ADNzimas y ARN nucleares pequeños UI mutados en el extremo 5' y análogos de los mismos.
5. El compuesto anti-conexina para su uso de acuerdo con cualquiera de las
20 reivindicaciones 3 a 4, donde el polinucleótido anti-conexina se selecciona de entre cualquiera del grupo que comprende las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 30; el polipéptido anti-conexina se selecciona del grupo que comprende AVESAWGDEQSAFRCN
25 (SEQ ID NO: 31), TQQPGCENVCY (SEQ ID NO: 32), DKSPFISHVRFWV (SEQ ID NO: 33), YTCKRDPCPHQVDC (SEQ ID NO: 34) y FLSRPTEKTIFIIF (SEQ ID NO: 35); el péptido anti-conexina se selecciona de entre cualquiera del grupo que comprende un peptidomimético, un péptido mimético, un compuesto de fosforilación de conexinas, un compuesto de benzoilamino-benzopirano, fenotiazidas y fenamatos; el anticuerpo anti-conexina o el
30 fragmento de unión al antígeno del mismo es un anticuerpo, un fragmento F(v), un fragmento Fab, un fragmento Fab' o un fragmento F(ab')₂.

6. El compuesto anti-conexina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el compuesto anti-conexina bloquea o reduce la comunicación intercelular y/o la apertura de los hemicanales.
- 5 7. El compuesto anti-conexina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el compuesto anti-conexina inhibe la expresión, formación y/o actividad de una conexina, un hemicanal de conexinas o una unión en hendidura de conexinas.
- 10 8. El compuesto anti-conexina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la conexina se selecciona del grupo que comprende: conexina 43, conexina 45, conexina 46, conexina 26 o conexina 32.
9. El compuesto anti-conexina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la conexina es la conexina 43.
- 15 10. El compuesto anti-conexina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la enfermedad degenerativa de las articulaciones se selecciona del grupo que consiste en artritis, osteoartritis, lesión física, enfermedad de Paget, artritis reumatoide y osteoporosis.
- 20 11. Composición para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad degenerativa de las articulaciones que comprende al menos un compuesto anti-conexina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 25 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además un segundo principio activo y excipientes, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 30 13. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, donde la composición se formula para la inyección directa en el tejido enfermo.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, donde el tejido enfermo se selecciona del grupo que consiste en: cartílago articular, membrana sinovial y hueso subcondral.
15. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde la enfermedad degenerativa de las articulaciones se selecciona del grupo que consiste en artritis, osteoartritis, lesión física, enfermedad de Paget, artritis reumatoide y osteoporosis.

FIG. 1

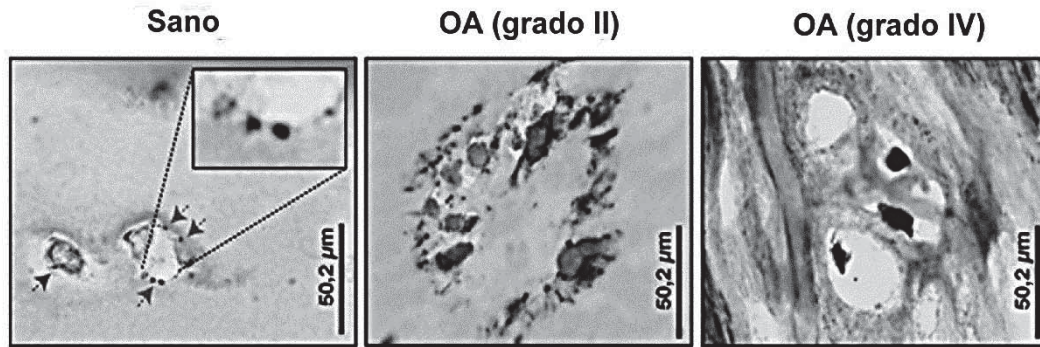


FIG. 2

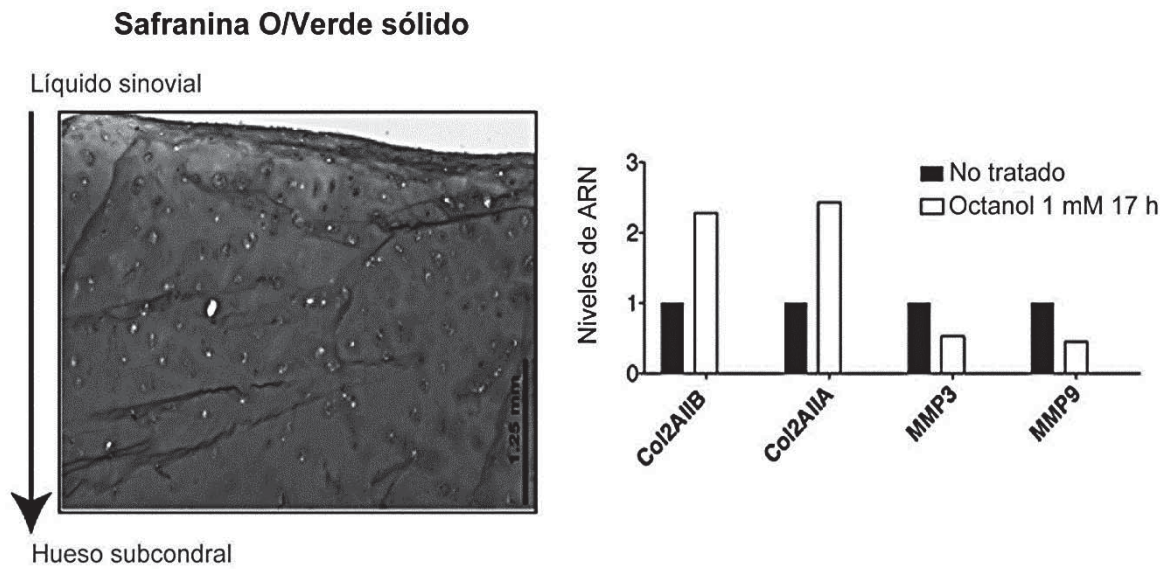


FIG. 3

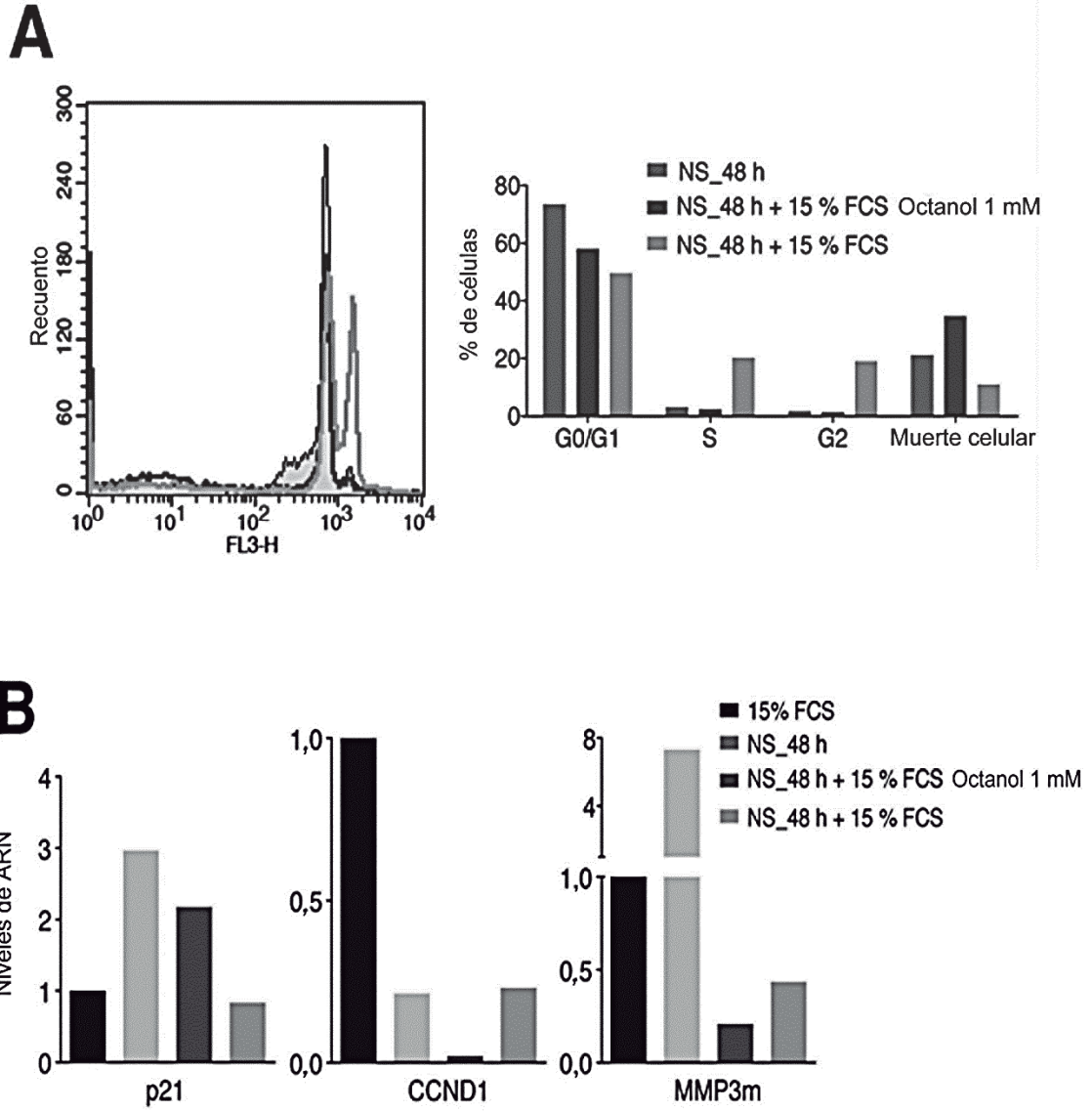
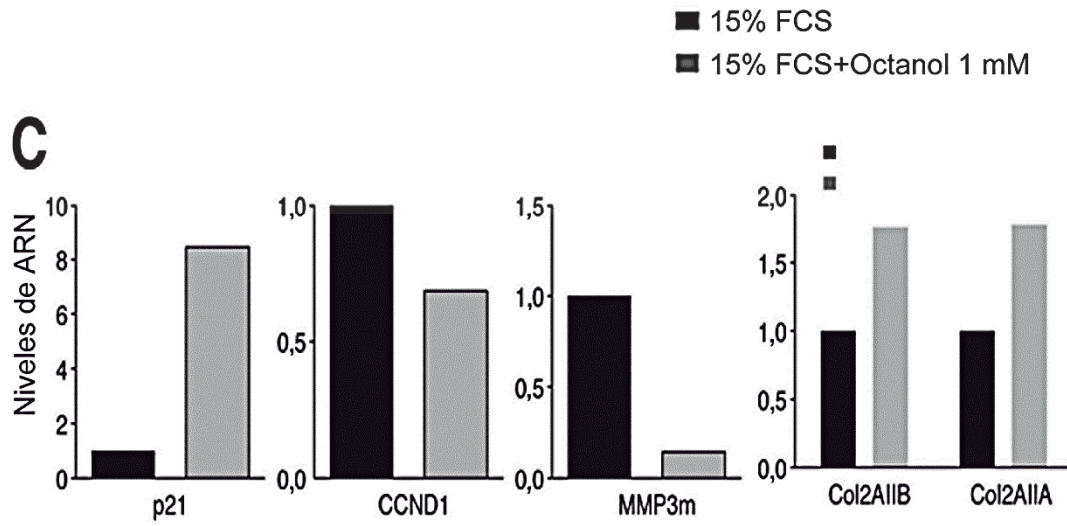


FIG. 3 (cont.)





- ②① N.º solicitud: 201731233
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.10.2017
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | STAINS J P et al. Gap junctions in skeletal development and function. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 20051220 Elsevier, AMSTERDAM, NL. Serra Mauro Dalla; Gambale Franco, 20/12/2005, Vol. 1719, N° 1-2, Páginas 69 - 81, ISSN 0005-2736, <DOI: 10.1016/j.bbamem.2005.10.012>. ver apartado 4.1 | 1, 2, 8-15 |
| X | WO 2006127249 A1 (WADDELL DAVID D) 30/11/2006, ver párrafos [0038] y [0039] | 1, 2, 8-15 |
| A | WO 2017147561 A1 (UNIV TEXAS) 31/08/2017, Todo el documento. | 1, 2, 8-15 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

| | | |
|---|--|------------------------------|
| <p>Fecha de realización del informe 25.04.2018</p> | <p>Examinador M. d. García Coca</p> | <p>Página 1/2</p> |
|---|--|------------------------------|

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/045 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01)

A61P19/08 (2006.01)

A61P19/10 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP y bases de datos TXT