(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 825 078**

(51) Int. CI.:

A61K 48/00 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029685**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145042**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14764420 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2020 EP 2968606**

(54) Título: **Tratamiento de enfermedades autoinmunitarias**

(30) Prioridad:

15.03.2013 US 201361800354 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.05.2021

(73) Titular/es:

LOMA LINDA UNIVERSITY (100.0%)
11145 Anderson Street
Loma Linda, California 92350, US

(72) Inventor/es:

ESCHER, ALAN P.

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

Tratamiento de enfermedades autoinmunitarias

Solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica el beneficio de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2014/288,164 presentada el 17 de marzo de 2014 que reivindica la prioridad del 15 de marzo de 2013.

Campo

La tecnología en cuestión se refiere generalmente a un polinucleótido y su uso en un método para el tratamiento de enfermedades o afecciones autoinmunes, en particular enfermedades o afecciones autoinmunes que dan como resultado la pérdida del cabello, tal como la alopecia.

Antecedentes

La alopecia es una afección en la que se pierde el cabello. La pérdida del cabello en la alopecia no se limita solo al cabello, sino que puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo. Aunque no suele ser potencialmente mortal, dado que se acompaña de una angustia emocional grave debido a problemas relacionados con la apariencia, existe el deseo de un agente excelente para el tratamiento y un agente excelente para la prevención de la alopecia. Además, dado que la alopecia suele ir acompañada de la decoloración del cabello, existe el deseo de un agente para la prevención y un agente para el tratamiento de la decoloración del cabello que acompaña a la alopecia. Además, dado que la alopecia suele ir acompañada de un deterioro de la calidad del cabello, tal como que el cabello se vuelve más fino o el cabello se vuelve más corto, existe el deseo de un agente para la prevención y un agente para el tratamiento del deterioro de la calidad del cabello que acompaña a la alopecia.

Con respecto a los tipos de alopecia, existen alopecia areata, alopecia androgénica, alopecia posmenopáusica, alopecia de patrón femenino, alopecia seborreica, alopecia pityroides, alopecia senil, alopecia inducida por fármacos quimioterapéuticos oncológicos, alopecia por exposición a radiación, tricotilomanía, alopecia posparto, etc.

Estos tipos de alopecia tienen los mismos síntomas de pérdida del cabello, pero son en base a diferentes causas, y las terapias para ello son diferentes entre sí. En particular, la alopecia androgénica, que es en base a la acción de la hormona masculina, y la alopecia areata, que se sospecha que es una enfermedad inmune, son enfermedades muy diferentes. Además, se cree que la alopecia posparto, alopecia de patrón femenino, alopecia seborreica, alopecia pityroides, alopecia senil, alopecia inducida por fármacos quimioterapéuticos oncológicos y la alopecia debida a la exposición a radiación tienen causas diferentes entre sí, y apenas existen terapias efectivas.

La alopecia areata es la alopecia en la que aparecen repentinamente áreas circulares del tamaño de una moneda a calvas irregulares con un contorno claro, sin ningún síntoma subjetivo o prodrómico, etc. en muchos casos, y subsecuentemente, cuando no se produce la recuperación espontánea, aumentan gradualmente en área y se vuelven intratables. Se sospecha que la alopecia areata es una enfermedad autoinmunitaria, pero la causa de la misma aún no se ha descubierto y no se conoce un método de tratamiento definido.

Se sabe que la alopecia areata está asociada con una enfermedad autoinmunitaria tal como una enfermedad de la tiroides representada por la enfermedad de Hashimoto, vitiligo, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide o miastenia gravis o una enfermedad atópica tal como asma bronquial, dermatitis atópica o rinitis alérgica.

La alopecia androgénica (AGA) es una alopecia en la que la hormona masculina actúa sobre los folículos pilosos sensibles a las hormonas masculinas para formar un cabello velloso, y se presenta en aproximadamente la mitad de los hombres y del 10 % al 20 % de las mujeres. Se cree que la predisposición genética es un factor importante en la alopecia androgénica; en la alopecia androgénica en los hombres, el cabello en la región frontal y la coronilla se vuelve fino y corto y se convierte en cabello velloso, la línea del cabello en la frente finalmente se retira y se pierde el cabello en la coronilla. Por otro lado, en la alopecia androgénica en mujeres, en general la línea del cabello no cambia pero el cabello de toda la cabeza, en particular la coronilla y la región frontal, se vuelve más fino. La finasterida mejora solo aproximadamente ¼ de los pacientes con alopecia androgénica en los hombres y, dado que la administración de finasterida a las mujeres está contraindicada, la finasterida no puede usarse para la alopecia androgénica en las mujeres.

La alopecia posparto es una alopecia en la que el cabello cuya fase de crecimiento se ha mantenido por los estrógenos entra en la fase de reposo de una vez debido al parto y aumenta la pérdida del cabello. La pérdida del cabello de la alopecia posparto generalmente comienza aproximadamente 2 meses después del parto y continúa hasta aproximadamente 6 meses después del parto; dado que generalmente se recupera dentro de 1 año a menos que haya una maternidad tardía, en la mayoría de los casos no se requiere un tratamiento particularmente, pero hay casos en los que el cabello no se recupera espontáneamente.

La alopecia de patrón femenino es una alopecia que se cree que ocurre debido a una disminución en la cantidad de la hormona femenina estrógeno con relación a la cantidad de andrógeno en el torrente sanguíneo. A menudo ocurre después de la menopausia, y en este caso también se llama alopecia posmenopáusica. La alopecia de patrón femenino puede mejorarse con la terapia de reemplazo hormonal, pero en muchos casos es intratable.

La alopecia seborreica es la alopecia que es causada por una secreción excesiva de sebo en el cuero cabelludo, los poros se bloquean lo que causa de esta manera inflamación alrededor de los poros o en la raíz del cabello y el cabello se cae. La alopecia seborreica se mejora hasta cierto punto al retirar el sebo al lavar el cabello, pero vuelve a aparecer fácilmente y muestra intratabilidad.

La alopecia pityroides es la alopecia que es causada por la caspa que bloquea los poros para así causar inflamación. La alopecia pityroides a menudo es causada por un lavado excesivo del cabello; la remisión se logra al reducir el número de lavados del cabello o mediante el uso de un champú que tenga un poder de lavado débil, pero se repite fácilmente y es intratable.

La tricotilomanía es la alopecia debida a un trastorno de arrancarse el cabello. La tricotilomanía es un síntoma resultante de la ansiedad patológica y puede tratarse mediante terapia conductual o terapia psicológica.

La alopecia senil es una alopecia en la que, debido al envejecimiento, independientemente del sexo, el vello corporal de todo el cuerpo, incluido todo el cabello, se adelgaza gradualmente. Se piensa que este es un fenómeno natural que aparece en muchas personas debido al envejecimiento, y este no es particularmente un objetivo de tratamiento en la actualidad. Sin embargo, existe el deseo de mejorar, dado que existe una mayor exigencia social para mejorar la calidad de vida de las personas mayores que acompaña a un aumento en la esperanza de vida promedio.

La alopecia inducida por fármacos quimioterapéuticos oncológicos es la alopecia que es un efecto secundario del tratamiento contra el cáncer con un fármaco de quimioterapia contra el cáncer. El impacto que sufre el paciente por la pérdida del cabello en todas las áreas, incluidas no solo la cabeza, sino también las cejas, pestañas, vello nasal, vello de las axilas y vello púbico, es profundo incluso si se explica de antemano. Dado que esto también dificulta la realización de la quimioterapia contra el cáncer, existe una gran necesidad de tratamiento para esto. De manera similar, la alopecia que acompaña a la exposición a radiación es también alopecia que se produce en base al mismo mecanismo que el de la alopecia inducida por fármacos quimioterapéuticos oncológicos en términos de destrucción selectiva de células cancerosas mediante la inhibición de la división celular. Por lo tanto, un fármaco que puede tratar la alopecia que acompaña a la quimioterapia contra el cáncer también puede tratar la alopecia que acompaña a la exposición a radiación.

Además, alopecia debido a una reacción adversa a un fármaco tal como un fármaco antitiroideo, un anticoagulante, talio, un fármaco psicotrópico o un bloqueador β, alopecia debido a un hongo, alopecia debido a un trastorno endocrino tal como dispituitarismo, hipotiroidismo, o hipertiroidismo, alopecia debido a un trastorno metabólico tal como un trastorno nutricional, hipoalbuminemia, caquexia, anemia por deficiencia de hierro, deficiencia de zinc, homocistinuria o cirrosis del hígado, alopecia tóxica, alopecia debida a alta temperatura, parto, cirugía mayor, pérdida repentina de peso corporal, o enfermedades graves, etc. se conocen, y pueden abordarse al retirar las causas respectivas de las mismas.

Entre estos tipos de alopecia, la alopecia de patrón femenino, la alopecia seborreica y la alopecia pityroides pueden abordarse hasta cierto punto al retirar las causas respectivas de las mismas, pero vuelven a aparecer fácilmente y son intratables. Además, aunque se cree que la causa de la alopecia de patrón femenino está relacionada con el balance hormonal, la terapia de reemplazo hormonal está indicada para los trastornos menopáusicos, la osteoporosis y la hiperlipidemia, pero no está indicada para la alopecia de patrón femenino; Dado que existe la posibilidad de que el cáncer sea causado por la terapia de reemplazo hormonal, la terapia de reemplazo hormonal no se lleva a cabo con el fin de tratar la alopecia de patrón femenino. Además, con respecto a la alopecia androgénica, todavía no existe una terapia adecuada, y con respecto a la alopecia areata, incluso la causa de la misma es poco conocida.

Como se describió anteriormente, entre los tipos de alopecia, los tipos de alopecia que son difíciles de tratar son la alopecia areata y la alopecia androgénica, y para la alopecia areata en particular apenas existen métodos de tratamiento efectivos. Además, apenas existen terapias para la alopecia posparto, la alopecia de patrón femenino, la alopecia pityroides, la alopecia senil y la alopecia inducida por fármacos quimioterapéuticos oncológicos.

Existe una necesidad de desarrollar agentes terapéuticos para tratar la pérdida del cabello.

Resumen

La tecnología en cuestión se refiere generalmente a un polinucleótido y su uso en métodos para tratar la pérdida del cabello o estimular el crecimiento del cabello.

Descripción detallada

1. Información general

La tecnología en cuestión se refiere generalmente a un polinucleótido y su uso en métodos para tratar la pérdida del cabello o estimular el crecimiento del cabello.

Como se describió y ejemplificó en la presente descripción, la pérdida del cabello, tal como la alopecia areata, es una afección a menudo atribuible a una enfermedad autoinmunitaria que se dirige a los folículos pilosos. Al administrar una proteína proapoptótica (por ejemplo, al sitio de la inflamación o al sitio de la pérdida del cabello), la proteína proapoptótica induce la apoptosis tolerogénica de los folículos pilosos. Como resultado, se producen los folículos apoptóticos que contienen autoantígeno(s), que a su vez inducen una respuesta reguladora específica para los folículos pilosos. La respuesta reguladora induce tolerancia inmune a autoantígeno(s), de esta manera se reduce la respuesta autoinmune anormal que ataca a las células del folículo piloso.

2. Definiciones

El uso de valores numéricos en los diversos intervalos especificados en esta solicitud, a menos que se indique expresamente de cualquier otra manera, se establecen como aproximaciones como si los valores mínimo y máximo dentro de los intervalos establecidos estuvieran ambos precedidos por la palabra "aproximadamente." Pueden usarse ligeras variaciones por encima y por debajo de los intervalos establecidos para lograr sustancialmente los mismos resultados que los valores dentro de los intervalos. La divulgación de intervalos está destinada a ser un intervalo continuo que incluye cada valor entre los valores mínimo y máximo enumerados, así como también cualquier intervalo que pueda formarse con dichos valores. En consecuencia, el experto en la materia apreciará que muchas de tales relaciones, intervalos e intervalos de relaciones pueden derivarse sin ambigüedades de los datos y números presentados en la presente descripción y todos representan diversas modalidades de la tecnología en cuestión.

Como se usa en esta divulgación, el término "autoantígeno" significa e incluye un antígeno endógeno que estimula la producción de autoanticuerpos, como en una reacción autoinmune, así como también parte de tales antígenos endógenos, o antígenos endógenos modificados que provocan la misma respuesta que el antígeno endógeno completo, como entenderán los expertos en la técnica con referencia a esta divulgación. Por ejemplo, en el contexto de esta divulgación, son autoantígenos anhidrasa carbónica II, cromogranina, colágeno, CYP2D6 (citocromo P450, familia 2, subfamilia Dispositivo 400, polipéptido 6), descarboxilasa de ácido glutámico, descarboxilasa de ácido glutámico secretada 55, hCDR1, HSP60, IA2, IGRP, insulina, proteína básica de mielina, hNineína, Ro 60 kDa, SOX-10 (caja SRY que contiene el gen 10), ZnT8 y similares. También se incluyen fragmentos antigénicos de cualquiera de los autoantígenos anteriores.

El término "aproximadamente" como se usa aquí, se refiere a +/- 5 % de un valor.

El término "fragmento funcional" de una proteína se refiere a un fragmento peptídico que es una porción de la proteína de longitud completa, y tiene sustancialmente la misma actividad biológica, o lleva a cabo sustancialmente la misma función que la proteína de longitud completa (por ejemplo, al llevar a cabo la misma reacción enzimática). Por ejemplo, un fragmento funcional de una proteína proapoptótica puede promover la apoptosis de una célula.

El término "hipermetilado" (a veces abreviado como "metilado") cuando se usa en referencia a un ADN, significa que al menos aproximadamente el 30 % (preferentemente al menos aproximadamente el 35 %, o al menos aproximadamente el 40 %, o al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %) de los dinucleótidos CpG están metilados. Por ejemplo, el ADN de mamífero, en el que entre el 60 % y el 90 % de todos los CpG están metilados, está hipermetilado.

El término "hipometilado" (a veces abreviado como "no metilado") cuando se usa en referencia a un ADN, significa que aproximadamente el 15 % o menos (preferentemente aproximadamente el 10 % o menos, aproximadamente el 7,5 % o menos, aproximadamente el 5 % o menos, o aproximadamente el 3 %, o aproximadamente el 1 % o menos) de los dinucleótidos CpG están metilados. Por ejemplo, el ADN bacteriano, en el que entre el 5 % y el 15 % de todos los CpG están metilados, está hipometilado.

Un nivel de "metilación", cuando se usa en referencia a un ADN, se refiere al porcentaje de dinucleótidos CpG metilados de los dinucleótidos CpG totales de la molécula de ADN.

El término "controlado" significa "unido operativamente," que se refiere a la asociación de una secuencia de ácido nucleico en otro fragmento de ácido nucleico de manera que la función de una se afecta por el otro. Por ejemplo, una secuencia codificante es "controlada" por un promotor cuando el promotor es capaz de afectar la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden unirse operativamente a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido.

3. Polinucleótidos que codifican una proteína proapoptótica

En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma, y en donde aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 60 % de los dinucleótidos CpG del polinucleótido están metilados.

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma, y en donde el nivel de metilación de los dinucleótidos CpG del polinucleótido es aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces mayor en comparación con el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en un genoma de Escherichia coli de tipo salvaje *(E. coli)*.

A. Niveles de metilación

La metilación del ADN en vertebrados ocurre típicamente en sitios CpG. Esta metilación da como resultado la conversión de la citosina en 5-metilcitosina. La formación de Me-CpG se cataliza por la enzima ADN metiltransferasa. Entre el 60 % y el 90 % de todas las CpG están metiladas en mamíferos. El ADN humano tiene aproximadamente un 80 %-90 % de sitios CpG metilados.

El ADN bacteriano contiene niveles bajos de dinucleótidos CpG metilados en comparación con el ADN de los mamíferos. El sistema inmune de los mamíferos usa esta característica del ADN bacteriano como señal para identificar el ADN extraño y responder a las amenazas de los patógenos bacterianos.

Por tanto, el polinucleótido descrito en la presente descripción se hipermetila preferentemente para evitar ser reconocido como un patógeno bacteriano cuando se administra a un sujeto mamífero. Por ejemplo, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 30 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 70 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 65 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 60 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 55 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 50 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 45 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 40 %, de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 60 %, de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 55 %, de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 50 %, de los dinucleótidos CpG del polinucleótido están metilados.

Alternativamente, el nivel de metilación del polinucleótido se puede determinar al comparar el nivel de metilación de dinucleótidos CpG global contra una línea de base. Un nivel de metilación de línea de base adecuado es el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG de un ADN bacteriano (por ejemplo, genoma bacteriano) de una bacteria de tipo salvaje (por ejemplo, una Escherichia coli *(E. coli).* Por ejemplo, el nivel de metilación de los dinucleótidos CpG del polinucleótido puede ser al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces o de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces, más alto en comparación con el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en un genoma de Escherichia coli de tipo salvaje (*E. coli*), o el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en un plásmido de una E. coli de tipo salvaje. El nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en cepas bacterianas de tipo salvaje es generalmente conocido o determinable.

El nivel de metilación del polinucleótido descrito en la presente descripción, o el nivel de metilación promedio de la línea de base de una bacteria de tipo salvaje también se puede determinar mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el documento WO2011109529 divulga métodos para detectar la prevalencia de metilación de una secuencia de ADN en una muestra de ADN; ver además, Wu y otros, Statistical Quantification of Methylation Levels by Next-Generation Sequencing, PLoS ONE 6(6): e21034. doi:10.1371/journal.pone.0021034.

Los métodos para preparar un polinucleótido con un nivel de metilación deseado pueden lograrse mediante múltiples métodos. Por ejemplo, la solicitud de patente PCT PCT/US12/56761 divulga una cepa bacteriana que comprende una secuencia de polinucleótidos modificados que codifica una metilasa controlada por un promotor constitutivo, en donde dicho polinucleótido modificado se incorpora de forma estable en el ADN cromosómico de dicha bacteria. Esta cepa bacteriana puede usarse para producir polinucleótidos que tengan un nivel de metilación deseado. Por ejemplo, los niveles de metilación pueden ajustarse al modular el nivel de expresión de la metilasa en el huésped bacteriano (por ejemplo, mediante el uso promotores de diferente fuerza). También puede usarse la metilación in vitro. Ver, por ejemplo, Wyngaert y otros, Genomic Imprinting: Methods and Protocols, en Capítulo 18, In Vitro Methylation of Predetermined Regions in Recombinant DNA Constructs 243-250, DOI: 10.1385/1-59259-211-2:243.

B. Proteínas proapoptóticas

Las proteínas proapoptóticas se refieren a proteínas que son capaces de activar directa o indirectamente los mecanismos de muerte celular por apoptosis.

Las proteínas proapoptóticas adecuadas incluyen, por ejemplo, Bax, Bak, Bim, Puma, Bad, Bik, Noxa, Bmf, Hrk, Bid, FAS, un mutante de caspasa (una caspasa modificada), un mutante de survivina (una proteína de survivina modificada), receptor de muerte 4 (DR4), receptor de muerte 5 (DR5), un receptor FAS y un receptor del factor de necrosis tumoral. También se incluye un fragmento funcional de cualquiera de estas proteínas proapoptóticas.

Se han caracterizado proteínas proapoptóticas ilustrativas descritas en la presente descripción.

Los miembros de la familia Bcl-2 representan algunos de los reguladores mejor definidos de la vía de la apoptosis. Algunos miembros de la familia Bcl-2, incluidos Bcl-2, Bcl-XL, Ced-9, Bcl-w, etcétera, promueven la supervivencia celular, mientras que otros miembros, incluidos Bax, Bcl-Xs, Bad, Bak, Bid, Bik y Bim se ha demostrado que potencian la apoptosis (Adams y Cory, 1998). Las funciones biológicas de los miembros de la familia Bcl-2 incluyen la formación de dímeros (Oltvai y otros, J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell, 74: 609-619, 1993.), la activación de proteasa (Chinnaiyan y otros, a novel FAD D-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. Cell 1996; 85: 817-827), la despolarización de la membrana mitocondrial, la generación de intermediarios reactivos de oxígeno (Hockenbery y otros, Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell, 75: 241-251, 1993), la regulación del flujo de calcio (Lam y otros, Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca2+ fluxes. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 91: 6569-6573, 1994; Huiling y otros, Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2. J. Cell Biol. 138: 1219-1228, 1997) y la formación de poros.

En la familia Bcl-2 hay una homología notable agrupada dentro de dos regiones conservadas: Los dominios de homología de Bcl-2 1 y 2 (BH1 y BH2) (Oltvai y otros, 1993; Boise y otros, bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell. 27 de agosto de 1993; 74(4):597-608; Kozopas y otros, MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. Proc Natl Acad Sci EUA. 15 de abril de 1993; 90(8):3516-20; Lin y otros, Characterization of Al, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. J. Immunol. 15 de agosto de 1993; 151(4):1979-88). Otro dominio conservado en Bax, distinto de BH1 y BH2, se denomina BH3 y media la muerte celular y las funciones de unión a proteínas. Un subconjunto de las proteínas proapoptóticas contiene solo el dominio BH3, lo que implica que este dominio en particular puede ser de importancia única en la promoción de la apoptosis (Diaz y otros, Dimerization properties of human BAD. Identification of a B H-3 domain and analysis of its binding to mutant BCL-2 and BCL-XL proteins. J Biol. Chem. 1997 Dec. 5; 272(49):30866-72).

Bax, un miembro de la familia Bcl-2 promotor de la muerte de 21 kDa, se identificó por primera vez como una proteína que coinmunoprecipitaba con Bcl-2 a partir de diferentes líneas celulares (Oltvai y otros, 1993). La sobreexpresión de Bax acelera la muerte celular en respuesta a una amplia gama de resultados citotóxicos. La determinación de la secuencia de aminoácidos de la proteína Bax mostró que era altamente homóloga a Bcl-2. El gen Bax consta de seis exones y produce transcriptos alternativos, cuya forma predominante codifica un ARNm de 1,0 kb y se denomina Baxa. Como Bcl-2 y varios otros miembros de la familia Bcl-2, la proteína Bax tiene regiones altamente conservadas, dominios BH1, BH2 y BH3, y el análisis de hidropatía de las secuencias de estas proteínas indica la presencia de un segmento transmembrana hidrófobo en su extremo C-terminal (Oltvai y otros, 1993). Bax se expresa ampliamente sin ninguna especificidad tisular aparente.

También se ha informado de una variante de empalme de Bax, Bax-alfa.

Bak se expresa en una amplia variedad de tipos de células y se une al homólogo de Bcl-2 Bcl-x2 en levadura. Se identificó un dominio en Bak como necesario y suficiente para la actividad de citotoxicidad y la unión a Bcl-x1. Además, se han identificado en Bax y Bipl secuencias similares a este dominio que son distintas de BH1 y BH2. Este dominio es fundamental para mediar la función de múltiples proteínas reguladoras de la muerte celular que interactúan con los miembros de la familia Bcl-2.

Bad posee los motivos de aminoácidos clave de los dominios BH1 y BH2. Bad carece de la secuencia de anclaje de señal C-terminal clásica responsable de las posiciones integrales de la membrana de otros miembros de la familia. Bad dimeriza selectivamente con Bcl-X_L así como también Bcl-2, pero no con Bax, Bcl-Xs-Mcl1, A1 o él mismo. Bad revierte la actividad represora de muerte de Bcl-X_L, pero no la de Bcl-2.

Bik, otro miembro de la familia Bcl-2, interactúa con las proteínas promotoras de la supervivencia celular, Bcl-2 y Bcl-X_L así como también las proteínas promotoras de la supervivencia viral, el virus de Epstein Barr-BHRF1 y el adenovirus E1B-19 kDa. En ensayos de transfección transitoria, Bik promueve la muerte celular de una manera similar a Bax y Bak, otros miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2. Esta actividad proapoptosis de Bik se puede suprimir mediante la coexpresión de Bcl-2, Bcl-X_L, las proteínas EBV-BHRF1 y EIB-19 kDa, lo que sugiere que Bik puede ser un objetivo común para proteínas antiapoptóticas tanto celulares como virales. Si bien Bik no contiene homología manifiesta con los dominios conservados BH1 y BH2 característicos de la familia Bcl-2, comparte un dominio de 9 aminoácidos (BH3) con Bax y Bak, que puede ser un determinante crítico para la actividad promotora de la muerte de estas proteínas.

PUMA (modulador de apoptosis sobre regulado por p53) es un objetivo para la activación por p53. Un gen codifica dos proteínas que contienen el dominio BH3 (PUMA-alfa y PUMA-beta) que se inducen en las células después de la activación de p53. PUMA-alfa y PUMA-beta muestran actividades similares; se unen a Bcl-2, se localizan en las mitocondrias para inducir la liberación del citocromo c y activan la rápida inducción de la muerte celular programada. La inhibición antisentido de la expresión de PUMA redujo la respuesta apoptótica a p53, y es probable que PUMA desempeñe un papel en la mediación de la muerte celular inducida por p53 a través de la vía dependiente del citocromo c/Apaf-1. Ver, por ejemplo, Nakano y otros, Mol Cell. marzo de 2001;7(3):683-94.

La proteína Bim exclusiva de BH3 es una proteína proapoptótica que induce la oligomerización de Bax/Bak en las mitocondrias. Ver, por ejemplo, Gogada y otros, BIM, a proapoptotic protein, upregulated via transcription factor E2F1-dependent mechanism, functions as a prosurvival molecule in cancer, doi:10.1074/jbc.M112.386102jbc.M112.386102.

La activación de la vía apoptótica intrínseca por p53 a menudo requiere la transcripción de las proteínas proapoptóticas Bcl-2 Noxa, Puma o ambas. Se ha informado que Noxa es necesaria para la muerte celular inducida por materia particulada y la inflamación pulmonar.

Bmf es una proteína proapoptótica exclusiva de BH3 regulada por interacción con el complejo motor miosina V actina, activado por anoikis.

El miembro de la familia exclusiva de BH3, HRK (también conocido como DP5) está involucrado en la regulación de la apoptosis. Se encontró que la expresión del gen Hrk estaba restringida a células y tejidos de los sistemas nerviosos central y periférico.

El gen del agonista de muerte del dominio de interacción BH3, o BID, es un miembro proapoptótico de la familia de proteínas Bcl-2. En respuesta a la señalización apoptótica, BID interactúa con otra proteína de la familia Bcl-2, Bax, lo que lleva a la inserción de Bax en las membranas de los organelos, principalmente la membrana mitocondrial externa. Se cree que Bax interactúa e induce la apertura del canal aniónico mitocondrial dependiente del voltaje, VDAC. Alternativamente, la evidencia creciente sugiere que Bax y/o Bak activados forman un poro oligomérico, MAC en la membrana externa. Esto da como resultado la liberación de citocromo c y otros factores proapoptóticos (como SMAC/DIABLO) de las mitocondrias, a menudo denominada permeabilización de la membrana externa mitocondrial, que conduce a la activación de caspasas. Esto define a BID como un activador directo de Bax, un papel común a algunas de las proteínas proapoptóticas Bcl-2 que contienen solo el dominio BH3.

El ligando Fas (FasL o CD95L) es una proteína transmembrana de tipo II que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Su unión con su receptor induce la apoptosis. Las interacciones ligando Fas/receptor juegan un papel importante en la regulación del sistema inmune y la progresión del cáncer.

El receptor FAS (FasR), también conocido como antígeno de apoptosis 1 (APO-1 o APT), conglomerado de diferenciación 95 (CD95) o miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 6 (TNFRSF6) es una proteína que en humanos está codificada por el gen TNFRSF6. El receptor Fas es un receptor de muerte en la superficie de las células que conduce a la muerte celular programada (apoptosis). Es una de las dos vías de apoptosis, la otra es la vía mitocondrial. FasR se encuentra en el cromosoma 10 en humanos y 19 en ratones. En la mayoría de los mamíferos se encuentran secuencias similares relacionadas por evolución (ortólogos).

Las caspasas, o proteasas cisteína-aspárticas o proteasas dirigidas por aspartato dependientes de cisteína son una familia de cisteína proteasas que desempeñan funciones esenciales en la apoptosis (muerte celular programada), necrosis e inflamación. Se han identificado doce caspasas en humanos. Hay dos tipos de caspasas apoptóticas: caspasas iniciadoras (apicales) y caspasas efectoras (verdugas). Las caspasas iniciadoras (por ejemplo, CASP2, CASP8, CASP9 y CASP10) escinden las pro-formas inactivas de las caspasas efectoras, de esta manera las activan. Las caspasas efectoras (por ejemplo, CASP3, CASP6, CASP7) a su vez escinden otros sustratos proteicos dentro de la célula para desencadenar el proceso apoptótico. El inicio de esta reacción en cascada está regulado por inhibidores de caspasas. CASP4 y CASP5, que se sobreexpresan en algunos casos de vitiligo y enfermedades autoinmunitarias asociadas causadas por variantes de NALP1, no se clasifican actualmente como iniciadores o efectores en MeSH, porque son enzimas inflamatorias que, junto con CASP1, están involucradas en la maduración de células T. También se contemplan en la presente descripción mutantes de caspasas que retienen la actividad proapoptótica.

Survivina, también llamada inhibidor baculoviral de la apoptosis que contiene repeticiones 5 o BIRC5, es una proteína que, en humanos, está codificada por el gen BIRC5. Secuencia de referencia NCBI: NG_029069.1. Survivina es un miembro de la familia de inhibidores de la apoptosis (IAP). La proteína survivina actúa para inhibir la activación de la caspasa, lo que conduce de esta manera a una regulación negativa de la apoptosis o muerte celular programada. En la presente descripción se contemplan mutantes de survivina que anulan la actividad antiapoptótica.

El receptor de muerte 4 (DR4) es una proteína en la superficie de ciertas células que se une a otra proteína llamada TRAIL, que puede matar algunas células cancerosas. Un aumento en la cantidad o actividad del receptor de muerte 4 en las células cancerosas puede matar más células. También se llama DR4, receptor TRAIL 1, TRAIL-R1 y miembro 10A de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral.

El miembro 10b de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral también se conoce como: DR5, CD262, KILLER, TRICK2, TRICKB, ZTNFR9, TRAILR2, TRICK2A, TRICK2B, TRAIL-R2, KILLER/DR5. La proteína es un miembro de la superfamilia del receptor de TNF y contiene un dominio de muerte intracelular. Este receptor puede ser activado por el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNFSF10/TRAIL/APO-2L) y transduce la señal de apoptosis. Los ratones tienen un gen homólogo, tnfrsf10b, que ha sido esencial en el esclarecimiento de la función de este gen en humanos. Los estudios con ratones deficientes en FADD sugirieron que FADD, una proteína adaptadora que contiene el dominio de muerte, se requiere para la apoptosis mediada por esta proteína.

Un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), o receptor de muerte, es un receptor de citocina trimérico que se une a los factores de necrosis tumoral (TNF). El receptor coopera con una proteína adaptadora (tal como TRADD, TRAF, RIP), que es importante en la determinación del resultado de la respuesta (por ejemplo, apoptosis, inflamación).

También pueden usarse fragmentos proapoptóticos de las proteínas proapoptóticas descritas en la presente descripción. Un fragmento proapoptótico de un proapoptótico comprende una porción, pero no la secuencia de longitud completa del proapoptótico, mientras que retiene la actividad proapoptótica.

La proteína proapoptótica o fragmentos de la misma puede ser una proteína de origen natural que tiene actividad proapoptótica, o una variante activa de una proteína de origen natural.

Como se usa en la presente descripción, "variantes activas" se refiere a péptidos variantes que retienen la actividad proapoptótica. Una variante activa difiere en la secuencia de aminoácidos de una proteína proapoptótica de referencia, pero retiene la actividad proapoptótica. Las variantes activas de proteínas proapoptóticas o fragmentos de las mismas incluyen variantes de origen natural (por ejemplo, formas alélicas) y variantes que no se sabe que ocurren de forma natural.

En general, los fragmentos proapoptóticos pueden contener el dominio funcional de las proteínas proapoptóticas.

Generalmente, las diferencias se limitan de manera que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante activa son muy similares en general y, en muchas regiones, idénticas. Una variante activa de una proteína proapoptótica o un fragmento de la misma y una proteína proapoptótica de referencia o fragmento de la misma pueden diferir en la secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, adiciones, deleciones, truncamientos, fusiones de aminoácidos o cualquier combinación de las mismas. Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservadoras. Una sustitución de aminoácidos conservadora se refiere a la sustitución de un primer aminoácido por un segundo aminoácido que tiene propiedades químicas y/o físicas (por ejemplo, carga, estructura, polaridad, hidrofobicidad/hidrofilicidad) que son similares a las del primer aminoácido. Las sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un aminoácido por otro dentro de los siguientes grupos: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); aspartato (D) y glutamato (E); asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), tirosina (Y), K, R, H, D y E; alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), fenilalanina (F), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C) y glicina (G); F, W e Y; C, S y T.

Pueden prepararse variantes activas de proteínas proapoptóticas o fragmentos de las mismas mediante el uso de métodos adecuados, por ejemplo, mediante síntesis directa, mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis de exploración) y otros métodos de tecnología de ADN recombinante. Las variantes activas pueden identificarse y/o seleccionarse mediante el uso de un ensayo de apoptosis adecuado.

También se contemplan proteínas de fusión que comprenden una proteína proapoptótica o un fragmento de la misma. Una proteína de fusión puede abarcar un polipéptido que comprende una proteína proapoptótica, un fragmento de la misma o una variante activa de la misma como un primer resto, unido mediante un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico) a un segundo resto (un compañero de fusión) no que se produce en la proteína proapoptótica como se encuentra en la naturaleza. Las proteínas de fusión se pueden prepararse mediante el uso de métodos adecuados, por ejemplo, mediante síntesis directa, tecnología de ADN recombinante, etc.

La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican una proteína proapoptótica, un fragmento de la misma o una variante de la misma.

C. Autoantígenos.

Opcionalmente, las composiciones descritas en la presente descripción pueden comprender un autoantígeno. El autoantígeno puede estar codificado por el mismo polinucleótido o por un segundo polinucleótido. Preferentemente, el autoantígeno está presente en la piel o en los folículos pilosos.

4. Suministro de polinucleótidos

Al ser una molécula de alto peso molecular cargada negativamente, los polinucleótidos tienen dificultades para pasar espontáneamente a través de las membranas celulares de fosfolípidos. Por tanto, diversos vectores se usan para permitir la transferencia de genes, incluidos los vectores virales, por un lado, los vectores químicos y/o bioquímicos naturales o sintéticos por el otro.

Los vectores virales (retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, etc.) son muy efectivos, en particular para atravesar las membranas, pero presentan una serie de riesgos, tales como patogenicidad, recombinación, replicación, inmunogenicidad y similares. Los vectores químicos y/o bioquímicos permiten evitar estos riesgos. Son, por ejemplo, cationes (fosfato de calcio, DEAE-dextrano y similares) que actúan mediante formación de precipitados con ADN, cuyos precipitados luego pueden ser "fagocitados" por las células. También pueden ser liposomas en los que se incorpora el ADN y que se fusionan con la membrana plasmática. Los vectores de transferencia de genes sintéticos son generalmente

lípidos catiónicos o polímeros cuyo ADN complejo puede formar con ellos una partícula que lleva cargas superficiales positivas. Estas partículas son capaces de interactuar con las cargas negativas de la membrana celular y luego cruzar esta última. Los ejemplos de dichos vectores pueden incluir dioctadecilamidoglicilespermina (DOGS, Transfectam™) o cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA, Lipofectin™). También se han desarrollado proteínas quiméricas: consisten en una porción policatiónica que condensa el ADN, unida a un ligando que se une a un receptor de membrana y da lugar al complejo en las células por endocitosis. Por tanto, es teóricamente posible "apuntar" a un tejido o ciertas poblaciones celulares para mejorar la biodisponibilidad *in vivo* del gen transferido.

El vector viral puede suministrarse a una célula huésped en forma de virus recombinante. El vector viral recombinante puede empaquetarse en cubiertas o cápsides virales mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, al transfectar el vector viral recombinante en una línea celular de empaquetamiento. Puede usarse cualquier línea celular de empaquetamiento adecuada para generar virus recombinante. Las líneas de empaquetamiento adecuadas para retrovirus incluyen derivados de células PA317, células ψ-2, células CRE, células CRIP, células E-86-GP y células 293GP. Las células de la línea 293 pueden usarse para adenovirus y virus adenoasociados. Las células de neuroblastoma pueden usarse para el virus del herpes simple, por ejemplo, el virus del herpes simple tipo 1. A veces, puede ser necesario un virus auxiliar (que proporciona proteínas faltantes para la producción de nuevos viriones) para producir un virus recombinante descrito en la presente descripción.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína proapoptótica, o un fragmento de la misma, también pueden suministrarse mediante el uso de un sistema de suministro de ácido nucleico no viral. Por ejemplo, los métodos para suministrar un ácido nucleico a una célula objetivo se han descrito en las patentes de Estados Unidos Núm. 6,413,942, 6,214,804, 5,580,859, 5,589,466, 5,763,270 y 5,693,622.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente descripción pueden empaquetarse en liposomas antes de suministrar a un sujeto o a células, como se describió en las patentes de Estados Unidos Núm. 5,580,859, 5,549,127, 5,264,618, 5,703,055. Para una revisión del uso de liposomas como portadores para el suministro de ácidos nucleicos, ver, Hug y Sleight (1991) Biochim. Biophys. Acta. 1097:1-17; Straubinger y otros (1983) en Methods of Enzymology Vol. 101, pp. 512-27; de Lima y otros (2003) Current Medicinal Chemistry, Volumen 10(14): 1221-31. Los liposomas representativos incluyen, pero no se limitan a, liposomas catiónicos, opcionalmente recubiertos con polietilenglicol (PEG) para reducir la unión no específica de proteínas del suero y prolongar el tiempo de circulación. Ver Koning y otros, 1999; Nam y otros, 1999; y Kirpotin y otros, 1997. También pueden usarse liposomas sensibles a la temperatura, por ejemplo THERMOSOMES™ como se divulgó en la patente de Estados Unidos No. 6,200,598. El uso de complejos vector-liposoma se ha descrito en la patente de Estados Unidos No. 5,851 ,818. Los liposomas pueden prepararse mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Betageri y otros, 1993; Gregoriadis, 1993; Janoff, 1999; Lasic & Martin, 1995; Nabel, 1997; y las patentes de Estados Unidos Núm. 4,235,871; 4,551 ,482; 6,197,333; y 6,132,766.

Los ácidos nucleicos también se pueden suministrarse en composiciones de lípidos de cocleato similares a las descritas por Papahadjopoulos y otros (1975) Biochem. Biophys. Acta. 394:483-491. Ver además la patente de Estados Unidos Núm. 4,663,161 y 4,871,488. Por ejemplo, un vector plasmídico puede formar complejo con Lipofectamine 2000. Wang y otros (2005) Mol. Therapy 12(2):314-320.

Los sistemas de suministro biolísticos que emplean portadores en partículas tales como oro y tungsteno también pueden usarse para suministrar ácidos nucleicos (por ejemplo, vectores virales recombinantes y vectores no virales). Las partículas se recubren con el vector y se aceleran a alta velocidad, generalmente a presión reducida, mediante el uso de una descarga de pólvora a partir de una "pistola de genes." Ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Núm. 4,945,050, 5,036,006, 5,100,792, 5,179,022, 5,371,015 y 5,478,744.

Puede usarse una amplia variedad de otros métodos para suministrar los ácidos nucleicos descritos en la presente descripción. Dichos métodos incluyen transfección mediada por DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polilisina o poliornitina, o precipitación mediante el uso de otras sales inorgánicas insolubles, tales como fosfato de estroncio, silicatos de aluminio que incluyen bentonita y caolín, óxido crómico, silicato de magnesio, talco y similares. Otros métodos útiles de transfección incluyen electroporación, sonoporación, fusión de protoplastos, suministro de peptoide o microinyección. Ver, por ejemplo, Sambrook y otros (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, para una discusión de técnicas para transformar células de interés; y Felgner, P. L. (1990) Advanced Drug Delivery Reviews 5:163-87, para una revisión de los sistemas de suministro útiles para la transferencia de genes. Los métodos ilustrativos de suministro de ADN mediante el uso de electroporación se describen en las patentes de Estados Unidos Núm. 6,132,419; 6,451,002, 6,418,341, 6,233,483, la publicación de patente de Estados Unidos No. 2002/0146831y publicación internacional No. WO 00/45823.

5. Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

Un aspecto de la tecnología en cuestión describe métodos para tratar la pérdida del cabello, el uso de los polinucleótidos descritos en la presente descripción en terapia y el uso de los polinucleótidos descritos en la presente descripción en la fabricación de un medicamento para terapia. El término tratamiento que incluye el tratamiento profiláctico en ausencia de un síntoma, así como también el tratamiento que alivió una enfermedad o los síntomas de una enfermedad.

La tecnología en cuestión proporciona una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido descrito en la presente descripción. Opcionalmente, se puede proporcionar un sistema de suministro para suministrar el ácido nucleico (por ejemplo, liposomas). El sistema de suministro puede formularse conjuntamente con el ácido nucleico en una composición farmacéutica o suministrarse por separado (por ejemplo, en un contenedor separado en un estuche). Si se proporciona por separado, el sistema de suministro puede mezclarse con el ácido nucleico antes de la administración.

Los polinucleótidos divulgados en la presente descripción se formulan generalmente en una composición adecuada para la administración in vivo. Tales composiciones generalmente incluyen un portador que puede ser aceptable para formular y administrar el agente a un sujeto. Dichos portadores aceptables se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas tales como agua o solución salina tamponada fisiológicamente u otros disolventes o vehículos como glicoles, glicerol, aceites tal como aceite de oliva o ésteres orgánicos inyectables. Un portador aceptable puede contener compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar o aumentar la absorción del conjugado. Tales compuestos fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizadores o excipientes. Un experto en la técnica sabrá que la elección de un portador aceptable, incluido un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de las características fisicoquímicas del agente terapéutico y de la vía de administración de la composición, que puede ser, por ejemplo, por vía oral o parenteral, tal como por vía intravenosa, y por inyección, intubación u otro método conocido en la técnica. La composición farmacéutica también puede contener un segundo reactivo tal como un reactivo de diagnóstico, sustancia nutricional, toxina o agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico contra el cáncer.

Los polinucleótidos descritos en la presente descripción pueden incorporarse dentro de un material encapsulante tal como en una emulsión de aceite en agua, una microemulsión, micela, micela mixta, liposoma, microesfera u otra matriz polimérica (ver, por ejemplo, Gregoriadis, Liposome Technology, Vol. 1 (CRC Press, Boca Raton, Fla. 1984); Fraley, y otros, Trends Biochem. Sci., 6:77 (1981)). Los liposomas, por ejemplo, los cuales consisten de fosfolípidos u otros lípidos, son portadores no tóxicos, fisiológicamente aceptables y metabolizables que son relativamente simples de preparar y administrar. Los liposomas "sigilosos" (ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Núm. 5,882,679; 5,395,619; y 5,225,212) son un ejemplo de tales materiales encapsulantes particularmente útiles para preparar una composición útil en un método de la invención, y otros liposomas "enmascarados" de manera similar pueden usarse, tales liposomas extienden el tiempo que el agente terapéutico permanece en la circulación. Los liposomas catiónicos, por ejemplo, también pueden modificarse con receptores o ligandos específicos (Morishita y otros, J. Clin. Invest., 91:2580-2585 (1993), que se incorpora en la presente descripción como referencia). Además, puede introducirse un polinucleótido en una célula mediante el uso de, por ejemplo, complejos de adenovirus-ADN polilisina (ver, por ejemplo, Michael y otros, J. Biol. Chem. 268:6866-6869 (1993)).

En un aspecto, la tecnología en cuestión proporciona un polinucleótido, en donde dicho polinucleótido comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma para usar en un método de tratamiento de alopecia areata, adecuado para administrarlo a un sujeto que lo necesite, y en donde aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 60 % de los dinucleótidos CpG del polinucleótido están metilados.

En un aspecto, la tecnología en cuestión proporciona un polinucleótido para usar en un método de tratamiento de alopecia areata, adecuado para administrarlo a un sujeto que lo necesite, en donde dicho polinucleótido comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma, y en donde el nivel de metilación de dinucleótidos CpG del polinucleótido es aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces mayor en comparación con el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en un genoma de Escherichia coli de tipo salvaje (*E. coli*).

El sujeto puede ser un sujeto con alopecia que tiene antecedentes, o coexiste, enfermedad alérgica o enfermedad autoinmunitaria.

La alopecia areata puede ser alopecia areata normal, alopecia totalis, alopecia universalis o alopecia ofiásica.

Las composiciones descritas en la presente descripción también se pueden usar para tratar el cabello blanco, la formación de cabello velloso o un agente para inhibir el cuero cabelludo seborreico o la aparición de caspa.

En un aspecto, la tecnología en cuestión proporciona un polinucleótido, en donde dicho polinucleótido comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma para usar en un método de estimulación del crecimiento de un tallo del cabello a partir de un folículo piloso, adecuado para administrarlo a un sujeto que lo necesite, y en donde aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 60 % de los dinucleótidos CpG del polinucleótido están metilados.

En un aspecto, la tecnología en cuestión proporciona un polinucleótido, en donde dicho polinucleótido comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma para usar en un método de estimulación del crecimiento de un tallo del cabello a partir de un folículo piloso, adecuado para administrarlo a un sujeto que lo necesite, y en donde el nivel de metilación de dinucleótidos CpG del polinucleótido es aproximadamente 2 veces a

aproximadamente 4 veces mayor en comparación con el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en un genoma de Escherichia coli de tipo salvaje (*E. coli*).

En un aspecto, la tecnología en cuestión proporciona un polinucleótido, en donde dicho polinucleótido comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma para usar en un método de tratamiento de la pérdida del cabello, en donde dicha pérdida del cabello es atribuible a una enfermedad autoinmunitaria, adecuado para administrarlo a un sujeto que lo necesite, y en donde aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 60 % de los dinucleótidos CpG del polinucleótido están metilados.

En un aspecto, la tecnología en cuestión proporciona un polinucleótido, en donde dicho polinucleótido comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma para usar en un método de estimulación del crecimiento de un tallo del cabello a partir de un folículo piloso, adecuado para administrarlo a un sujeto que lo necesite, y en donde el nivel de metilación de dinucleótidos CpG del polinucleótido es aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces mayor en comparación con el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en un genoma de Escherichia coli de tipo salvaje (*E. coli*).

En muchos casos, la pérdida del cabello se puede atribuir a una afección autoinmune. enfermedades autoinmunitarias ilustrativas que podrían resultar en pérdida del cabello incluyen, por ejemplo, lupus eritematoso discoide crónico, esclerodermia localizada, pénfigo, penfigoide, herpes gestacional, dermatosis ampollosa IgA lineal, epidermólisis ampollosa adquirida, vitiligo, nevo de Sutton, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide o miastenia gravis

La alopecia androgénica también puede provocar la pérdida del cabello. La alopecia androgénica puede ser en un hombre o alopecia androgénica en una mujer.

Se administra una cantidad efectiva a un sujeto que lo necesite. Una "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad que es suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado bajo las condiciones de administración, tal como una cantidad suficiente para reducir/mejorar los síntomas de la enfermedad.

La ruta de administración de la composición que contiene polinucleótidos descrita en la presente descripción dependerá, en parte, de la estructura química de la molécula. Los polipéptidos y polinucleótidos, por ejemplo, no son particularmente útiles cuando se administran por vía oral porque pueden degradarse en el tracto digestivo. Sin embargo, los métodos para modificar químicamente polipéptidos, por ejemplo, para hacerlos menos susceptibles a la degradación por proteasas endógenas o más absorbibles a través del tracto alimentario se divulgan en la presente descripción o de cualquier otra manera se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Blondelle y otros, Supra, 1995; Ecker y Crook, supra, 1995). Además, puede prepararse un polipéptido mediante el uso de D-aminoácidos, o puede contener uno o más dominios en base a peptidomiméticos, que son moléculas orgánicas que imitan la estructura de un dominio; o en base a un peptoide tal como un peptoide vinílogo.

Una composición como se divulga en la presente descripción puede administrarse a un individuo por diversas vías que incluyen, por ejemplo, por vía oral o parenteral, tal como por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraorbital, intracapsular, intraperitoneal, intrarrectal, intracistérnica o por absorción pasiva o facilitada a través de la piel mediante el uso de, por ejemplo, un parche cutáneo o iontoforesis transdérmica, respectivamente. Además, la composición puede administrarse mediante inyección, intubación, por vía oral o tópica, esta última puede ser pasiva, por ejemplo, mediante la aplicación directa de una pomada, o activa, por ejemplo, mediante el uso de un spray nasal o inhalante, en cuyo caso un componente de la composición es un propulsor apropiado. También puede administrarse una composición farmacéutica en el sitio de una afección patológica, por ejemplo, en el cuero cabelludo donde se produce o es probable que se produzca la pérdida del cabello.

La vía de administración preferida incluye al menos una de las siguientes: subcutánea, intradérmica o transdérmica. Las composiciones se pueden administrar en el sitio de la pérdida del cabello, por ejemplo, la región frontal o la coronilla.

La cantidad total del polinucleótido a administrar en la práctica de un método de la invención puede administrarse a un sujeto como una dosis única, ya sea como un bolo o por infusión durante un período de tiempo relativamente corto, o puede administrarse mediante el uso de un protocolo de tratamiento fraccionado, en el que se administran múltiples dosis durante un período de tiempo prolongado. Un experto en la técnica sabría que la cantidad de la composición para tratar una afección patológica en un sujeto depende de muchos factores que incluyen la edad y la salud general del sujeto así como también la vía de administración y el número de tratamientos a administrar. En vista de estos factores, el experto en la materia podría ajustar la dosis particular según sea necesario. En general, la formulación de la composición y las vías y frecuencia de administración se determinan, inicialmente, mediante el uso de ensayos clínicos de Fase I y Fase II.

En diversas modalidades, cuando el método comprende administrar uno o más de uno o más agentes inmunosupresores, el uno o más de un agente o agentes inmunosupresores se pueden administrar de forma simultánea, separada o secuencial.

En diversas modalidades, uno o más de uno o más agentes inmunosupresores pueden seleccionarse del grupo que consiste en corticosteroides, glucocorticoides, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina (6-MP), azatioprina (AZA), metotrexato ciclosporina, micofenolato de mofetilo (MMF), ácido micofenólico (MPA), tacrolimus (FK506), sirolimus ([SRL] rapamicina), everolimus (Certican), mizoribina, leflunomida, deoxispergualina, brequinar, azodicarbonamida, análogos de vitamina D, tales como MC1288 y bisindolilmaleimida VIII, globulina antilinfocítica, globulina antitimocítica (ATG), anticuerpos monoclonales anti-CD3, (Muromonab-CD3, Orthoclone-OKT3), anticuerpos anti-receptor de interleucina(IL)-2 (anti-CD25), (Daclizumab, Zenapax, basiliximab, Simulect), anticuerpos anti-CD52, (Alemtuzumab, Campath-1H), anticuerpos anti-CD20 (Rituximab, Rituxan), reactivos del factor de necrosis antitumoral (TNF) (Infliximab, Remicade, Adalimumab, Humira), inhibidores de LFA-1 (Efalizumab, Raptiva) y similares.

En un aspecto, la tecnología en cuestión proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma, en donde aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 60 % de los dinucleótidos CpG del polinucleótido están metilados para el uso del tratamiento de la alopecia areata.

En un aspecto, la tecnología en cuestión proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma, en donde el nivel de metilación de dinucleótidos CpG del polinucleótido es aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces mayor en comparación con el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en un genoma de Escherichia coli de tipo salvaje (*E. coli*) para el uso del tratamiento de la alopecia areata.

En un aspecto, la tecnología en cuestión proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma, en donde aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 60 % de los dinucleótidos CpG del polinucleótido están metilados para el uso de la estimulación del crecimiento de un tallo del cabello de un folículo piloso.

En un aspecto, la tecnología en cuestión proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma, en donde el nivel de metilación de dinucleótidos CpG del polinucleótido es aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces mayor en comparación con el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en un genoma de Escherichia coli de tipo salvaje (*E. coli*) para el uso de la estimulación del crecimiento de un tallo del cabello de un folículo piloso.

En un aspecto, la tecnología en cuestión proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma, en donde aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 60 % de los dinucleótidos CpG del polinucleótido están metilados para el uso del tratamiento del cabello pérdida, en donde dicha pérdida del cabello es atribuible a una enfermedad autoinmunitaria.

En un aspecto, la tecnología en cuestión proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento funcional de la misma, en donde el nivel de metilación de los dinucleótidos CpG del polinucleótido es aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces mayor en comparación con el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en un genoma de Escherichia coli de tipo salvaje *(E. coli)* para el uso del tratamiento de la pérdida del cabello, en donde dicha pérdida del cabello es atribuible a una enfermedad autoinmunitaria.

Los siguientes ejemplos proporcionan más ilustraciones de la tecnología en cuestión y no pretenden limitar el alcance de la tecnología en cuestión.

EJEMPLIFICACIÓN

Ejemplo 1. Uso de la vacuna de ADN para el tratamiento de la alopecia areata

Se elabora un constructo de ADN plasmídico que codifica una proteína proapoptótica. La proteína proapoptótica se selecciona de: Bax, Bak, Bim, Puma, Bad, Bik, Noxa, Bmf, Hrk, Bid, FAS, un mutante de caspasa o un mutante de survivina. El plásmido se aísla de una cepa bacteriana que hipermetila dinucleótidos CpG y de una cepa bacteriana que no hipermetila dinucleótidos CpG (es decir, hipometilada). En el caso del constructo de ADN hipermetilado, el promotor que controla la transcripción del gen/ADNc que codifica la proteína proapoptótica no se inactiva por hipermetilación de CpG, por ejemplo, el promotor de SV40. En el caso del constructo no hipermetilado, el promotor puede ser cualquier promotor inducible o constitutivo, por ejemplo, el promotor CMV o LTR.

Cada constructo de ADN plasmídico o diferentes combinaciones de diversas proporciones de los dos constructos se suministran luego a la piel para tratar la alopecia areata, por ejemplo, mediante el uso del modelo de ratón C3H/HeJ. El ADN se suministra por vía intradérmica en piel sana, es decir, con cabello, o directamente en el área enferma que muestra pérdida del cabello. Las cantidades de ADN pueden variar de 1 microgramo a 200 microgramos o más por tratamiento, y el tratamiento se suministra semanalmente hasta que se observa el crecimiento del cabello. Alternativamente, el ADN puede suministrarse por vía transdérmica después del empaquetamiento en nanopartículas o micropartículas que promueven la transfección celular.

LISTADO DE SECUENCIAS

Además, el constructo de ADN plasmídico también puede codificar un autoantígeno presente en los folículos pilosos. En este caso, el ADN puede inyectarse en la piel que no tiene folículo piloso o células madre que promueven la formación de folículos pilosos.

Apéndice: secuencias

1. Secuencia de nucleótidos que codifica BAX humana

```
atggacgggt ccggggagca gcccagaggc gggggggccca ccagctctga gcagatcatg     60
aagacagggg ccctttttgct tcagggtttc atccaggatc gagcagggcg aatgggggggg    120
gaggcacccg agctggccct ggacccggtg cctcaggatg cgtccaccaa gaagctgagc    180
gagtgtctca agcgcatcgg ggacgaactg gacagtaaca tggagctgca gaggatgatt    240
gccgccgtgg acacagactc cccccgagag gtctttttcc gagtggcagc tgacatgttt    300
tctgacggca acttcaactg gggccgggtt gtcgcccttt tctactttgc cagcaaactg    360
gtgctcaagg ccctgtgcac caaggtgccg gaactgatca gaaccatcat gggctggaca    420
ttggacttcc tccgggagcg gctgttgggc tggatccaag accagggtgg ttgggacggc    480
ctcctctcct actttgggac gcccacgtgg cagaccgtga ccatctttgt ggcgggagtg    540
ctcaccgcct cgctcaccat ctggaagaag atgggctga                           579
```

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido, en donde el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica seleccionada de Bax, Bak, Bim, Puma, Bad, Bik, Noxa, Bmf, Hrk, Bid, FAS, caspasa o un fragmento proapoptótico de la misma y en donde el nivel de metilación de dinucleótidos CpG del polinucleótido es aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces mayor en comparación con el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en un genoma de Escherichia coli de tipo salvaje (*E. coli*), o
aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 60 % de los dinucleótidos CpG del polinucleótido están metilados,
para usar en un método de estimulación del crecimiento de un tallo del cabello a partir de un folículo piloso, para tratar la alopecia areata o para tratar la pérdida del cabello atribuida a una enfermedad autoinmunitaria.

2. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el uso comprende tratar la alopecia areata.

3. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la alopecia areata comprende alopecia ofiásica, alopecia totalis o alopecia universalis.

4. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la pérdida del cabello atribuida a enfermedades autoinmunitarias comprende una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso discoide crónico, esclerodermia localizada, pénfigo, penfigoide, herpes gestacional, dermatosis ampollosa IgA lineal, epidermólisis ampollosa adquirida, vitiligo, nevo de Sutton, una enfermedad tiroidea autoinmunitaria, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, miastenia gravis o una combinación de los mismas.

5. El polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha proteína proapoptótica se selecciona del grupo que consiste en Bax, Bak, Bim, Puma, Bad, Bik, Noxa, Bmf, Hrk, Bid, FAS y una caspasa.

6. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho polinucleótido es adecuado para administrarlo al menos por vía subcutánea o intradérmica.

7. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho polinucleótido es adecuado para administrarlo en un sitio de pérdida del cabello.

8. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho polinucleótido se produce en una bacteria, por ejemplo, en donde dicha bacteria comprende una secuencia codificante de metilasa modificada controlada por un promotor constitutivo y en donde dicha secuencia codificante de metilasa modificada se incorpora de forma estable en el ADN cromosómico de dicha bacteria.

9. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la bacteria es Escherichia coli (*E. coli*).

10. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la metilasa es una metilasa de CpG.

11. Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento proapoptótico de la misma, en donde aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 60 % de los dinucleótidos CpG del polinucleótido están metilados para el uso del tratamiento de la alopecia areata, o
en donde el nivel de metilación de dinucleótidos CpG del polinucleótido es aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces mayor en comparación con el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en un genoma de Escherichia coli de tipo salvaje (*E. coli*) para el uso del tratamiento de la alopecia areata.

12. Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento proapoptótico de la misma, en donde aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 60 % de los dinucleótidos CpG del polinucleótido están metilados para el uso de la estimulación del crecimiento de un tallo del cabello de un folículo piloso, o
en donde el nivel de metilación de dinucleótidos CpG del polinucleótido es aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces mayor en comparación con el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en un genoma de Escherichia coli de tipo salvaje (*E. coli*) para el uso de la estimulación del crecimiento de un tallo del cabello de un folículo piloso.

13. Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una proteína proapoptótica, o un fragmento proapoptótico de la misma, en donde aproximadamente del 30 % a aproximadamente el 60 % de los dinucleótidos CpG del polinucleótido están metilados para el uso del tratamiento de la pérdida del cabello atribuida a una enfermedad autoinmunitaria, o
en donde el nivel de metilación de dinucleótidos CpG del polinucleótido es aproximadamente 2 veces a aproximadamente 4 veces mayor en comparación con el nivel de metilación promedio de dinucleótidos CpG en un genoma de Escherichia coli de tipo salvaje (*E. coli*) para el uso del tratamiento de la pérdida del cabello atribuida a una enfermedad autoinmunitaria.