

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 565**

51 Int. Cl.:
A61K 38/22 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04745067 .1**
96 Fecha de presentación: **05.08.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1651161**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

54 Título: **COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y MÉTODOS PARA ACELERAR LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS.**

30 Prioridad:
07.08.2003 US 493000 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.03.2012

73 Titular/es:
HealOr Ltd.
Ruhrberg Science Building Graham Bell
Entrance, Floor 5 3 Pekeris Street
76702 Rehovot, IL

72 Inventor/es:
BRAIMAN-WIKSMAN, Liora y
SOLOMONIK, Innesa

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 375 565 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas y métodos para acelerar la cicatrización de heridas

CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para acelerar el proceso de cicatrización de heridas. En particular, la presente invención utiliza moléculas bioactivas que son segregadas por adipocitos (adipoquinas) y moléculas bioactivas que regulan la diferenciación, la proliferación y/o la actividad de los adipocitos, para inducir o acelerar el proceso de cicatrización de heridas de la piel.

10 El principal objetivo en el tratamiento de heridas es conseguir el cierre de dichas heridas. Las heridas cutáneas abiertas representan una importante categoría dentro de las heridas e incluyen heridas por quemadura, úlceras neuropáticas, llagas de decúbito, úlceras por estasis venosa y úlceras diabéticas.

15 Las heridas cutáneas abiertas cicatrizan habitualmente por un proceso que comprende seis etapas principales: (i) inflamación; (ii) proliferación de fibroblastos; (iii) proliferación de vasos sanguíneos; (iv) síntesis de tejido conjuntivo; (v) epitelización; y (vi) contracción de la herida. La cicatrización de una herida se ve afectada cuando no se realizan apropiadamente estas etapas, individualmente o en su totalidad. Numerosos factores pueden afectar la cicatrización de una herida, que incluyen malnutrición, infección, agentes farmacológicos (por ejemplo, actinomicina y esteroides), edad avanzada y diabetes [véase Hunt and Goodson en *Current Surgical Diagnosis & Treatment* (Way; Appleton & Lange), pp. 86-98 (1988)]. También un problema corriente es la cicatrización de heridas después de un proceso quirúrgico en varias partes del cuerpo, la cirugía se ha realizado con éxito pero la herida abierta no cicatriza.

20 La piel es un epitelio escamoso estratificado en el que las células en crecimiento y diferenciación están estrictamente compartimentadas. En la etapa fisiológica, la proliferación está confinada a las células basales que se adhieren a la membrana basal. La diferenciación es un proceso espacial en el que las células basales pierden su adherencia a la membrana basal, interrumpen la síntesis del DNA y experimentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos. La última etapa de maduración es la producción de la capa queratinizada que forma la barrera protectora de la piel (1, 2). Los primeros cambios observados cuando las células basales comienzan a diferenciarse están asociados con la capacidad de las células basales de separarse y migrar desde la membrana basal (3). Cambios similares están asociados al proceso de cicatrización de las heridas en el que las células migran a la zona de la herida y se mejora la capacidad proliferante. Estos procesos son obligatorios para la reestructuración de las capas de la piel y la inducción de la diferenciación apropiada de las capas epidérmicas.

30 El análisis de los mecanismos que regulan el crecimiento, diferenciación y migración de las células epidérmicas ha sido facilitado por el desarrollo de sistemas de cultivo para queratinocitos de ratones y seres humanos (2, 4). *In vitro*, los queratinocitos pueden ser mantenidos como células proliferantes basales con una alta tasa de crecimiento. Además, la diferenciación puede ser inducida *in vitro* siguiendo el modelo de maduración de la epidermis *in vivo*. Los primeros episodios incluyen la pérdida de componentes de las hemidesmosomas (3, 5) y una pérdida selectiva de la integrina $\alpha 6 \beta 4$ y la unión celular a las proteínas matrices. Esto sugiere que los cambios en la expresión de la integrina son episodios tempranos en la diferenciación de los queratinocitos. La pérdida temprana del contacto hemidesmosómico conduce a la migración suprabasal de queratinocitos y está relacionada con la inducción de queratina 1 (K1) en queratinocitos cultivados y en la piel (1, 3, 6). Más diferenciación hasta el fenotipo de la capa granular está asociada con la sub-regulación de la expresión tanto de la integrina $\beta 1$ como $\beta 4$, a la pérdida de la adherencia potencial a todas las proteínas de la matriz y es seguida por la formación de la envoltente queratinizada y la muerte celular. Por último las células que se diferencian se desprenden de la cápsula de cultivo en forma de escamas maduras (2, 7). Este programa de diferenciación *in vitro* se ajusta al modelo de maduración de la epidermis *in vivo*.

45 La cicatrización de heridas puede ser inducida *in vivo* por diversos agentes bioactivos que promueven directa o indirectamente el crecimiento, la diferenciación y/o la migración de las células epidérmicas. Así, las Patentes de EE.UU. N° 5.591.709 y 5.461.030 describen el uso de una hormona anabólica no esteroide, tal como insulina, hormona del crecimiento, triyodotironina y tiroxina para inducir el cierre de heridas. La Patente de EE.UU. N° 5.145.679 describe el uso de insulina y pancreatina para inducir el cierre de heridas. La Patente de EE.UU. N° 6.541.447 describe el uso de una mezcla de factores del crecimiento y hormonas del crecimiento para inducir el cierre de heridas y la solicitud de patente internacional WO 02/09639 describe el uso de agentes moduladores de la PKC para inducir el cierre de heridas.

50 S. Romano Di Peppe et al. (*Gene Therapy*, 2002, 9, 1271-1277) describen que la transferencia del gen VEGF165 mediada por adenovirus induce la cicatrización acelerada de heridas promoviendo la angiogénesis en el sitio de la lesión. La presente invención no está descrita ni sugerida en esta publicación.

55 Frank et al. (*The Journal of Clinical Investigation*, August 2000, Volume 106, Number 4, pages 501-509) describen que la leptina mejoraba la re-epitelización de heridas por escisión en ratones ob/ob y aceleraba las condiciones normales de cicatrización de heridas en ratones naturales (no manipulados genéticamente). La leptina actúa aquí como estímulo mitógeno para los queratinocitos durante la reparación de la piel. La presente invención no está descrita ni sugerida en esta publicación.

Sin embargo, no se muestra en la técnica anterior la utilización de adipocitos, moduladores de adipocitos o moléculas segregadas por adipocitos, para inducir o acelerar los procesos asociados a la cicatrización de heridas.

5 Existe por tanto la necesidad ampliamente reconocida, y además sería muy ventajoso, de disponer de nuevos métodos para promover la cicatrización de heridas. La presente invención proporciona un nuevo método para tratar heridas utilizando adipocitos, células capaces de diferenciar adipocitos, productos segregados por adipocitos y moduladores de adipocitos, para inducir o acelerar los procesos asociados con la cicatrización de heridas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

10 Mientras realizaban experimentos sobre la cicatrización de las heridas, los autores de la presente invención descubrieron que los adipocitos están asociados muy estrechamente con la migración de los queratinocitos al hueco de la herida durante una etapa temprana del proceso de cicatrización, lo que indicaba que los adipocitos, los moduladores de adipocitos y las adipoquinas están implicados en el proceso de cicatrización de heridas y por consiguiente se pueden utilizar para influir en él.

15 Mientras la presente invención se llevaba a la práctica, como se define más adelante en las realizaciones y ejemplos preferidos siguientes, se encontró que al administrar a heridas una adipoquina o un modulador de adipocitos, se promovía sustancial y eficazmente la cicatrización de las heridas.

Por consiguiente, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una adipoquina para la preparación de una composición farmacéutica adaptada para aplicación tópica para inducir o acelerar un proceso de cicatrización de una herida de la piel, en el que dicha adipoquina se selecciona del grupo que consiste en adipina y adiponectina y en el que dicha adiponectina es una molécula bioactiva segregada por adipocitos.

20 En otro aspecto de la invención, se proporciona un vector viral que comprende un polinucleótido que codifica una adipoquina para la preparación de una composición farmacéutica para transformar células de una herida de la piel para que exprese y segregue dicha adipoquina, induciendo o acelerando con ello un proceso de cicatrización de la herida de la piel, en donde dicha adipoquina se selecciona del grupo que consiste en adipina y adiponectina y en donde dicha adipoquina es una molécula bioactiva segregada por adipocitos. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica está adaptada para administración local, particularmente subcutánea.

De acuerdo con otros aspectos de las realizaciones preferidas descritas, la herida se selecciona del grupo que consiste en una úlcera, una quemadura, un desgarramiento y una incisión quirúrgica.

30 De acuerdo con otros aspectos de las realizaciones preferidas descritas, el vehículo de la composición farmacéutica se selecciona del grupo que consiste en una solución acuosa, un gel, una crema, una pasta, una loción, un espray (aerosol), una suspensión, un polvo, una dispersión, un ungüento y una pomada.

De acuerdo con otros aspectos de las realizaciones preferidas descritas, la composición farmacéutica incluye un soporte sólido.

De acuerdo con otros aspectos de las realizaciones preferidas descritas, la herida es una herida por incisión que se efectúa en un animal experimental.

35 De acuerdo con otros aspectos de las realizaciones preferidas descritas, la administración de una adipoquina se puede efectuar en una o más concentraciones.

De acuerdo con otros aspectos de las realizaciones preferidas descritas, la administración de una adipoquina se puede efectuar en una o más aplicaciones.

40 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas y métodos nuevos para tratar heridas utilizando adipocitos, células capaces de diferenciarse en adipocitos, moduladores de adipocitos y moléculas segregadas por adipocitos, para inducir o acelerar la cicatrización de heridas de acuerdo con las reivindicaciones.

45 Salvo indicación contraria, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que aplican generalmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o ensayos de la presente invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria de la patente, que incluye las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no limitativos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 La invención se describe en la presente memoria, sólo como ejemplo, con referencia a los dibujos que se acompañan. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se insiste que los detalles mostrados son solo a modo de ejemplo y con el fin de un estudio ilustrativo de las realizaciones preferidas de la presente invención y se incluyen para proporcionar la descripción que se cree más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se muestran más que los rasgos de los detalles estructurales de la

invención necesarios para una comprensión fundamental de la invención, siendo evidente para los expertos en la técnica que la descripción incluida en los dibujos muestra las diversas formas de la invención que pueden ser realizadas en la práctica.

En los dibujos:

5 La FIG. 1 ilustra el efecto de la insulina sobre el reclutamiento de adipocitos y la migración de las células epidérmicas en la zona de la herida. Se efectuaron por incisión heridas en el lomo de ratones C57BL. Las heridas se trataron diariamente durante seis días con aplicación tópica de insulina inductora de la cicatrización (1 μ M), a continuación se sacrificaron los ratones y se analizaron la migración de las células epidérmicas y el reclutamiento de adipocitos de sus heridas. Se determinó la migración de las células epidérmicas por tinción con anticuerpo K14 considerándose positiva si la herida se teñía en su totalidad. Se determinó el reclutamiento de adipocitos por tinción con H&E, considerándose positivo si se detectaban adipocitos en el tejido de granulación. Las barras oscuras representan el tratamiento con insulina y las barras claras representan el control tratado con tampón. Los resultados se expresan como porcentaje de heridas cerradas (positivo) y cada barra representa la media de seis repeticiones \pm error estándar.

15 Las FIGURAS 2A-B son micrografías histoquímicas que ilustran la asociación de adipocitos con el proceso de cicatrización de heridas. Se efectuaron por incisión heridas en el lomo de ratones C57BL. Se sacrificaron los ratones siete días después de las lesiones, a continuación se seccionaron y se tiñeron con anticuerpo K14 para realzar las células epidérmicas migrantes. Las micrografías muestran que durante una etapa temprana del proceso de cicatrización de las heridas están presentes en el hueco de las heridas abundantes adipocitos reclutados (Figura 2A, 20 aumentos; Figura 2B, 10 aumentos).

La FIG. 3 ilustra el efecto de un antagonista de PPAR γ (GW9662) sobre la migración de queratinocitos primarios *in vitro*. Los queratinocitos cultivados no se trataron (control) o se trataron con GW9662 (2 μ M). La migración de los queratinocitos se observó al microscopio óptico. Los paneles superiores muestran micrografías de los cultivos antes del tratamiento (Día 0) y los paneles inferiores muestran el de la izquierda el cultivo de control y el de la derecha el cultivo tratado (Día 2). Las líneas azules marcan los bordes de migración de los queratinocitos y las flechas indican la migración potenciada de los cultivos tratados con GW9662, en comparación con el control no tratado.

La FIG. 4 es un gráfico que ilustra los efectos de un antagonista de PPAR γ (GW9662) y adiposina sobre la cicatrización de heridas *in vivo*. Se efectuaron por incisión heridas en el lomo de ratones C57BL y a continuación se midieron (Día 0). Las zonas de las heridas se trataron diariamente, durante seis días, con aplicación tópica de PBS (control), adiposina o GW9662 2 μ M. A continuación se sacrificaron los ratones y se midieron las áreas de las heridas (Día 6). Se calculó la porción de área de las heridas contraída en los seis días desde el área inicial (% de contracción de la herida) para cada tratamiento. El gráfico muestra que tanto GW9662 como la adiposina promovían una contracción sustancial de las heridas, en comparación el control tratado con tampón.

La FIG. 5 es una micrografía histoquímica que ilustra los efectos de un antagonista de PPAR γ (GW9662) y adiposina sobre el cierre de heridas *in vivo*. Se efectuaron por incisión heridas en el lomo de ratones C57BL y a continuación se midieron sus áreas (Día 0). Las heridas se trataron diariamente, durante seis días, con aplicación tópica de PBS (control), adiposina 1 μ M o GW9662 2 μ M. A continuación se sacrificaron los ratones, se fijaron sus heridas con paraformaldehído y se observaron al microscopio binocular de 5 aumentos. La micrografía muestra que las áreas de las heridas que se trataron con GW9662 o con adiposina, son sustancialmente más pequeñas que las áreas de las heridas del control tratado con tampón.

La FIG. 6 ilustra el efecto de la adiposina sobre la migración de las células epidérmicas y el cierre de las heridas. Se efectuaron por incisión heridas en el lomo de ratones C57BL. Se trataron las heridas diariamente, durante siete días, con aplicación tópica de adiposina 1 μ M, a continuación se sacrificaron, se seccionaron y analizaron para determinar el cierre epidérmico y la migración por tinción con anticuerpo K14. El cierre epidérmico se consideró positivo si la herida se teñía en su totalidad a través del hueco completo de la herida. La migración epidérmica se consideró positiva si la herida se teñía pero no completamente a través del hueco de la herida. El gráfico de barras muestra que tanto el cierre epidérmico como la migración epidérmica mejoraban notablemente con el tratamiento de adiposina. Cada barra representa la media de seis repeticiones.

La FIG. 7 es una micrografía histoquímica que ilustra los efectos de un antagonista de PPAR γ (GW9662) y adiposina sobre el cierre de heridas (contracción). Se efectuaron por incisión heridas en el lomo de ratones C57BL y se trataron diariamente, durante seis días, con adiposina (1 μ M), con GW9662 (2 μ M) o no se trataron (control). Los ratones tratados se sacrificaron seis días después de las lesiones. Se realizaron secciones histoquímicas, se tiñeron con H&E (panel superior) o con anticuerpo K14 (panel inferior) y se observaron al microscopio óptico de 5 aumentos. La contracción se consideró positiva si podía observarse en un solo campo en ambos bordes de las heridas dérmicas (marcados por líneas negras). El área abierta de la herida en la sección del control no tratada (derecha) era demasiado grande para estar contenida en un sólo campo (por tanto se consideró una contracción dérmica negativa), mientras que la sección tratada con adiposina (izquierda) y la sección tratada con GW9662 (centro) muestran contracciones dérmicas positivas.

La FIG. 8 ilustra el efecto de un agonista de PPAR- γ (troglitazona) sobre la migración de queratinocitos primarios *in vitro*. Los queratinocitos cultivados no fueron tratados (control) o lo fueron con troglitazona 100 μ M y se observó su migración al microscopio. Los paneles superiores (Tiempo 0) muestran micrografías de cultivos tratados previamente y los paneles inferiores, izquierdo y derecho, muestran los cultivos de control y tratados resultantes, respectivamente (en las 48 horas siguientes). Las líneas marcan los bordes de los queratinocitos cultivados e indican una migración sustancialmente inhibida de queratinocitos cultivados tratados con troglitazona, en comparación con el control no tratado.

La FIG. 9 es una micrografía histoquímica que ilustra los efectos de la insulina y un agonista de PPAR γ (troglitazona) sobre el cierre de heridas *in vivo*. Se efectuaron por incisión heridas en el lomo de ratones C57BL y se trataron diariamente, durante seis días, con aplicación tópica de PBS (control), insulina (10 nM), troglitazona (100 μ M) o una combinación de troglitazona (100 μ M) + insulina (10 nM). A continuación se sacrificaron los ratones, se fijaron sus heridas con paraformaldehído y se observaron al microscopio binocular de 5 aumentos. La micrografía muestra que el área de las heridas tratadas con insulina es sustancialmente menor que la de las heridas de control tratadas con tampón, mientras que las heridas tratadas con troglitazona y con troglitazona + insulina son sustancialmente mayores que las heridas de control tratadas con tampón.

La FIG. 10 ilustra el efecto de la insulina y un agonista de PPAR γ (troglitazona) sobre la incidencia del cierre de heridas. Se efectuaron por incisión heridas en el lomo de ratones C57BL. Las heridas se trataron diariamente, durante seis días, con aplicación tópica de PBS (control), insulina (10 nM), troglitazona (100 μ M) o troglitazona (100 μ M) + insulina (10 nM), a continuación se sacrificaron, se seccionaron y se analizaron para determinar el cierre de las heridas. Este cierre se determinó por tinción con anticuerpos K14 y K1. El cierre de la herida se consideró positivo si la herida se tiñó en su totalidad a través del hueco de la herida. Cada barra representa la media de seis repeticiones.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente invención se refiere a los usos y a las composiciones farmacéuticas para acelerar el proceso de cicatrización de heridas. Específicamente, la presente invención utiliza adipocitos, células capaces de diferenciarse en adipocitos, moléculas bioactivas segregadas por adipocitos (adipoquinas) para acelerar el proceso de cicatrización de heridas de la piel.

Antes de explicar con detalle al menos una realización de la invención, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y disposición de los componentes incluidos en la siguiente descripción o ilustrados en los ejemplos. La invención abarca otras realizaciones o puede ser practicada o realizada de diversos modos. También, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en la presente memoria tienen como finalidad servir en la descripción y no deben considerarse limitantes.

La piel de los adultos incluye dos capas, una epidermis estratificada queratinizada y una capa gruesa subyacente de tejido conjuntivo dérmico rico en colágeno que proporciona soporte y nutrición. La piel sirve como barrera protectora frente al mundo exterior. Por consiguiente, cualquier lesión o rotura de la piel debe ser reparada rápida y eficazmente. Como se describe en el apartado Antecedentes anterior, la primera etapa de reparación de la piel se consigue por formación de un coágulo que taponaa la herida inicial. A continuación, las células inflamatorias, los fibroblastos y los capilares invaden el coágulo formando un tejido granular. Las siguientes etapas implican la re-epitelización de la herida, en la que los queratinocitos basales deben perder sus contactos hemidesmosómicos y migrar al tejido granular para cubrir la herida. Después de la migración de los queratinocitos, estos entran en un estado proliferante, que permite la sustitución de células perdidas durante la formación de la herida. Después que la herida está cubierta por una monocapa de queratinocitos (es decir, cierre epidérmico) se forman una nueva epidermis estratificada y se restablece la nueva membrana basal (8-11).

Mientras realizaban experimentos sobre la cicatrización de heridas, los autores de la presente invención descubrieron inesperadamente que en la zona de la herida los adipocitos están estrechamente asociados a los queratinocitos migrantes, durante una etapa temprana del proceso de cicatrización de las heridas. Por consiguiente, el Ejemplo 1 del apartado Ejemplos siguiente ilustra que el aspecto de los queratinocitos migrantes en el hueco de la herida está directamente relacionado con el aspecto de los adipocitos reclutados en la misma zona. Además, las heridas tratadas con insulina reclutan más adipocitos en el hueco de la herida y por tanto cicatrizan más rápidamente que las heridas no tratadas de control. Esta estrecha asociación recientemente descubierta de los adipocitos y los queratinocitos migrantes en las heridas cicatrizantes, unida a la correlación directa observada entre la incidencia de adipocitos reclutados y la eficacia de cicatrización de las heridas, indica que los adipocitos, los moduladores de adipocitos y los productos de adipocitos (adipoquinas) están implicados en el proceso de cicatrización de heridas y por consiguiente pueden usarse para influir en él.

Los adipocitos segregan varias moléculas bioactivas, conocidas como adipoquinas, que juegan un papel en el mantenimiento de la homeostasis energética regulando la secreción de insulina, la acción de la insulina, el metabolismo de glucosa y lípidos, el balance energético, la inflamación y la reproducción.

Sin embargo, la posible implicación de moléculas bioactivas segregadas por adipocitos en la cicatrización de heridas

no ha sido señalada ni sugerida en la técnica anterior.

Basándose en los descubrimientos iniciales antes descritos y mientras adaptaban la presente invención a la práctica, los autores de la presente invención anticiparon y a continuación descubrieron que una adipoquina ilustrativa, la adipsina, que se había elegido de una lista de adipoquinas conocidas, aceleraba sustancialmente la migración de los queratinocitos *in vitro* y promovía eficazmente la cicatrización de heridas de la piel *in vivo* (véase en el Ejemplo 3 del apartado de Ejemplos siguiente).

Por consiguiente, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una adipoquina para la preparación de una composición farmacéutica adaptada para aplicación tópica que induce o acelera el proceso de cicatrización de una herida de la piel, en donde dicha adipoquina es una molécula bioactiva segregada por adipocitos y en donde dicha adipoquina se selecciona entre la adipsina y la adiponectina.

El término "herida" como se usa en la presente memoria se refiere ampliamente a lesiones en la piel y en el tejido subcutáneo iniciadas por uno cualquiera de una variedad de modos (por ejemplo, llagas de decúbito debido a un reposo en cama continuado, heridas inducidas por traumatismos, cortes, úlceras, quemaduras, incisiones quirúrgicas y similares) y con características variables.

Las heridas se clasifican típicamente en cuatro categorías dependiendo de la profundidad de la herida: (i) Categoría I: las heridas se limitan al epitelio; (ii) Categoría II: las heridas se extienden en la dermis; (iii) Categoría III: las heridas se extienden en el tejido subcutáneo; y (iv) Categoría IV (o heridas en todo el grosor de la piel): las heridas en las que se pone al descubierto el hueso (por ejemplo, un punto de presión óseo, tal como el trocánter mayor o el sacro).

La expresión "herida de espesor parcial" utilizada en la presente memoria se refiere a heridas comprendidas en las Categorías I-III; ejemplos heridas de espesor parcial incluyen heridas por quemaduras, llagas de decúbito, úlceras por estasis venosa y úlceras diabéticas.

La expresión "herida profunda" utilizada en la presente invención se entiende que incluye las heridas tanto de la Categoría III como de la Categoría IV.

La expresión "herida crónica" utilizada en la presente memoria se refiere a una herida que no cicatriza antes de treinta días.

El término "cicatrización" respecto a una herida se refiere a un proceso de reparación de una herida por formación de una cicatriz.

La presente invención considera el tratamiento de todos los tipos de heridas, incluyendo las heridas profundas y las heridas crónicas.

El término "adipoquina" como se utiliza en la presente invención se refiere a cualquier molécula bioactiva que es segregada por adipocitos *in vivo* o *in vitro*, incluyendo, aunque sin limitación, enzimas segregadas por adipocitos, factores de crecimiento, citoquinas y hormonas. Preferiblemente, la adipoquina de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en factores D del complemento (adipsina) y adiponectina (Acrp30). Preferiblemente la adipoquina es adipsina.

Además de la administración de adipoquinas a las heridas, la cicatrización de estas puede ser inducida o acelerada de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente inventan por un modulador de adipocitos.

La frase "modulador de adipocitos" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier molécula capaz de modular la expresión y/o secreción de adipoquinas a partir de los adipocitos, la diferenciación de adipocitos, la proliferación de adipocitos, la migración de adipocitos o la atracción de los adipocitos al hueco de la herida.

Los adipocitos se diferencian de los preadipocitos en un proceso conocido como adipogénesis. En cultivo, la adipogénesis depende completamente de la insulina, la dexametasona y la isobutilmetilxantina, acentuando la implicación de las vías de la insulina, los glucocorticoides y el cAMP.

Aunque muchas vías de señalización y bioquímicas juegan un papel fundamental en este proceso, la mayoría de los cambios conocidos que ocurren durante la adipogénesis son en el nivel de transcripción de los genes. Los factores de transcripción claves implicados en el proceso adipógeno incluyen las proteínas que pertenecen a la familia CCAAT/potenciador de proteínas de unión, factor 1 dependiente de la determinación y diferenciación de adipocitos (también conocido como elemento regulador del esteroide – proteína de unión 1) y receptores activados por proliferadores de peroxisomas y (Rangwala and Lazar, *Ann. Rev. Nutt.* 20:535-539, 2000).

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) comprenden tres tipos, PPAR α , PPAR β y PPAR γ . Son receptores nucleares inducibles por ligandos que modulan directamente la actividad de los genes uniéndose a secuencias de nucleótidos definidas en la región promotora de los genes diana. El PPAR γ juega un papel crucial en la diferenciación terminal por transactivación de genes específicos de adipocitos. Resultados recientes sugieren una comunicación entre los PPAR y la vía del metabolismo del colesterol en la epidermis. Todas las isoformas de los PPAR se expresan en la piel embrionaria y madura. La expresión de PPAR γ aumenta

drásticamente en las últimas etapas de la maduración fetal. En posnatales, así como en la piel de adultos, disminuye la expresión de PPAR γ . Se ha sugerido un papel importante para PPAR β y PPAR α en la diferenciación de los queratinocitos durante la formación de la epidermis (Wabli W., *Swiss Med. Wkly.* 132: 83-91, 2002). También se ha demostrado que PPAR β y PPAR α están sobre-regulados en los bordes de la piel herida y que en ratones sin estas isoformas son empeoradas la cicatrización de las heridas (Michalnik et al., *J. Cell Biol.* 154: 199-814, 2001). Hasta ahora, en la técnica anterior no ha sido descrita ni sugerida la implicación del PPAR γ en el proceso de cicatrización de heridas.

La Patente de EE.UU. N° 6.403.656 describe el uso de activadores de PPAR γ para tratar alteraciones de la piel relacionadas con una anomalía de la diferenciación de las células epidérmicas. Además, la Solicitud de Patente Internacional N° WO 2002/33724 describe el uso de activadores de PPAR γ , tal como una prostaglandina J2 o D2, para tratar la obesidad y la diabetes. Sin embargo, ninguna de estas descripciones se refiere ni sugiere la utilización de activadores de PPAR γ , o inhibidores, para la cicatrización de heridas.

Mientras adaptaban la presente invención a la práctica, los autores de la presente invención descubrieron que la actividad de PPAR γ está inversamente relacionada con el proceso de cicatrización de heridas. Por consiguiente, el Ejemplo 2 del apartado de Ejemplos siguiente ilustra que la administración de troglitazona, un agonista de PPAR γ , inhibía la contracción de las heridas. Por otro lado, la administración de GW9662, que es un antagonista de PPAR γ , promovía la contracción de las heridas.

Así, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para inducir o acelerar un proceso de cicatrización de una herida de la piel, que comprende administrar a la herida de la piel una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de modular la diferenciación de los adipocitos, induciendo o acelerando con ello el proceso de cicatrización de la herida de la piel. El agente de acuerdo con este aspecto de la presente invención puede ser cualquier agonista o antagonista de un factor, tal como un factor transcripcional que esté implicado en la diferenciación de los adipocitos, incluyendo, aunque sin limitación, una proteína que pertenece a la familia CCAAT/proteínas de unión promotoras, factor 1 dependiente de la determinación y diferenciación de adipocitos y PPAR γ . Preferiblemente, el agente es un antagonista de PPAR γ , más preferiblemente GW9662.

Además de los moduladores de la diferenciación de los adipocitos, el proceso de cicatrización de heridas puede ser promovido por utilización de otros promotores de adipocitos. Por tanto, de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, un proceso de cicatrización de una herida de la piel puede ser inducido o acelerado administrando a la herida de la piel una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que es capaz de: (i) modular la expresión y/o la secreción de una adipoquina por los adipocitos, (ii) potenciar la proliferación de adipocitos, (iii) potenciar la migración de los adipocitos o (iv) atraer los adipocitos a la zona de la herida.

En el contexto de la presente invención se ofrece un ensayo fácilmente realizable por un experto normal en la técnica relevante de determinar si un agente específico, por ejemplo, una adipoquina o un modulador de adipocitos para analizar si dicho agente específico es realmente un inductor o acelerador de un proceso de cicatrización de heridas.

Por tanto, la capacidad de una adipoquina o un modulador de adipocitos para inducir o acelerar un proceso de cicatrización de una herida de la piel puede ser determinada administrando la adipoquina o el modulador de adipocitos en cuestión a una herida de la piel y evaluar las heridas tratadas en lo que respecta a la migración de queratinocitos y/o al cierre epidérmico.

Preferiblemente, la herida de la piel se efectúa en el lomo de un ratón C57BL por incisión y se trata con una o más aplicaciones, cada una con una o más concentraciones de la adipoquina.

Tras un periodo de tiempo deseado desde la herida, preferiblemente alrededor de 6 días, el ratón es sacrificado y se toman muestras para biopsias de la herida. Las biopsias de la herida se analizan luego respecto a la migración de queratinocitos al hueco de la herida y/o respecto al cierre epidérmico del hueco de la herida, usando métodos conocidos en la técnica, preferiblemente usando los métodos que se describen en el apartado Ejemplos que se encuentra más adelante.

Un aumento significativo en la incidencia de migración de queratinocitos y/o el cierre epidérmico, sobre un control no tratado, determinaría que la adipoquina o de el modulador adipocitos analizado es capaz de inducir o acelerar el proceso de cicatrización de una herida de la piel.

Los adipocitos, preferiblemente los adipocitos autólogos, se implantan en la herida, de modo que induzcan o aceleren el proceso de cicatrización de la herida de la piel.

Los adipocitos se pueden obtener a partir de tejido adiposo de cualquier fuente animal, preferiblemente a partir de un donante humano, más preferiblemente a partir de una fuente humana autóloga. Se pueden tomar muestras del tejido adiposo de un sitio subcutáneo o peri-renal, preferiblemente subcutáneo, usando protocolos muy reconocidos, tales como quirúrgico, succión, liposucción, panniculectomía o vía biopsia. Las células adipocitos se separan preferiblemente de la muestra de tejido adiposo usando enzimas que destruyen los contactos físicos de las células (por ejemplo, colagenasas) o usando agitación mecánica, por energía sónica o ultrasónica y similares. Los

adipocitos separados se pueden cultivar usando métodos de cultivo de tejidos conocidos en la técnica, tales como por ejemplo, los descritos en detalle en la solicitud de patente internacional WO2001/032129. Los adipocitos cultivados se dejan crecer hasta que se alcanza la casi confluencia, luego se retiran por rascado suave del medio de crecimiento y se implantan en la herida.

5 Los adipocitos se puede generar también a partir de preadipocitos cultivados. El término "preadipocito" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier célula que sea capaz de diferenciarse en un adipocito. Preferiblemente, los preadipocitos son adipocitos humanos, más preferiblemente adipocitos autólogos aislados del tejido adiposo del propio paciente o de otro tejido. Se pueden tomar muestras del tejido adiposo a partir de sitios subcutáneos o peri-renales usando protocolos muy reconocidos, tales como succión, liposucción, panniculectomía o
10 vía biopsia. Las células preadipocitos pueden ser aisladas de las muestras de tejidos usando métodos tales como los descritos por Rodbell et al. (*Meth. Enzymol.* 31:103-114, 1974). Los preadipocitos aislados se pueden hacer crecer, expandir y diferenciar en adipocitos *in vitro*, usando métodos y procedimientos, tales como los descritos por Hauner et al. (*Journal Clin. Invest.*, 34:1663-1670, 1989), Digby, et al, (*Diabetes* 5;138-141, 1998), y solicitud de patente internacional WO 2000/044882. Los adipocitos diferenciados se pueden cosechar del medio de cultivo usando métodos de cosecha tales como los descritos por Freshney (*Culture of Animal Cells*, pp. 310-312, 3rd Ed.,
15 1994) y ser implantados en la herida preferiblemente vía una cámara de injerto, tal como se describe en la solicitud de patente internacional N° PCT/US97/0061. La cámara de injerto puede ser retirada de la herida después de al menos 1 día, preferiblemente después de al menos 1 semana tras la implantación de los adipocitos. Opcionalmente, los adipocitos implantados se exponen a un modulador de adipocitos, tales como, sin limitación, un antagonista de PPAR- γ , preferiblemente GW9662.
20

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, los preadipocitos pueden ser implantados en la herida, de modo que induzcan o aceleren el proceso de cicatrización de la herida de la piel. Los preadipocitos pueden ser aislados, hechos crecer y expandidos *in vitro*, usando los métodos y procedimientos tales como los descritos para los adipocitos anteriormente, pero omitiendo la etapa de diferenciación. Los preadipocitos no diferenciados se cosechan del medio de cultivo y se implantan en la herida usando métodos como los descritos para los adipocitos anteriormente. Opcionalmente, los preadipocitos implantados se exponen a un modulador de adipocitos, tal como, sin limitación, un antagonista de PPAR- γ , preferiblemente GW9662.
25

Los adipocitos y/o los preadipocitos se pueden generar también a partir de células madres cultivadas. La expresión "células madres" como se usa en la presente memoria se refiere a células embrionarias o adultas que no están terminalmente diferenciadas, que pueden dividirse sin límites, y se dividen para proporcionar células madre o que se diferencian irreversiblemente para proporcionar un nuevo tipo de células, tal como preadipocitos o un adipocito.
30

El aislamiento y la expansión *ex vivo* de células madre puede realizarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, Van Epps et al. (*Blood Cells* 20:411, 1994) y Emerson S. G. (*Blood* 87:3082, 1996) describen métodos para el aislamiento de células madre hematopoyéticas humanas de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical neonatal, y su expansión en cultivo. Las células madre embrionarias humanas (hESC) se pueden preparar a partir de blastocistos humanos, obtenidos de embriones de pre-implantación *in vivo* en seres humanos, usando métodos tales como los descritos en la patente de EE.UU. N° 5.843.780, y por Reubinoff et al. (*Nature Biotech.* 18:399, 2000). Las células madre mesenquimales humanas (hMSC) pueden ser aisladas y expandidas por métodos usando métodos tales como los descritos en las patentes de EE.UU. N° 5.197.985, 5.486.359 y 6.214.369. Las hMSC se encuentran en la médula ósea, sangre, dermis y periosteo, las cuales son capaces de diferenciarse en cualquiera de los tipos específicos de tejidos mesenquimales, tales como tejido adiposo.
35
40

Las células madre se pueden administrar directamente a la herida de la piel y se le deja diferenciar en adipocitos *in vivo* con o sin la co-administración de factores que facilitan dicha diferenciación. Alternativamente, las células madre pueden diferenciarse en preadipocitos o adipocitos *ex vivo* y luego ser implantados en la herida.
45

Las hMSC cultivadas pueden ser inducidas para diferenciación adipogénica, usan métodos tales como los descritos en la patente de EE.UU. N° 6.322.784. Por consiguiente, los adipocitos pueden ser generados a partir de hMSC primarios exponiendo las células a un glucocorticoide y un compuesto capaz de sobre-regular la producción de cAMP o inhibiendo la degradación de cAMP, tal como un inhibidor de fosfodiesterasa. Los adipocitos generados de células madre se cosechan posteriormente y se implantan en heridas usando métodos como los descritos antes, de modo que induzcan o aceleren el proceso de cicatrización de la herida de la piel.
50

En una realización alternativa de la presente invención, se usa un vector viral que comprende un polinucleótido que codifica una adipoquina para la preparación de una composición farmacéutica, y las células de la herida se transforman para expresar y segregar una adipoquina induciendo o acelerando de este modo el proceso de cicatrización de la herida de la piel, en donde la adipoquina se selecciona de adipina o adiponectina.
55

Las células de la herida pueden ser de cualquier tipo de células que esté implicado en el proceso de cicatrización de heridas, tales como queratinocitos, adipocitos o preadipocitos. Las células pueden ser transformadas por un polinucleótido que codifica una adipoquina, tales como adipina o adiponectina. Alternativamente, las células pueden ser transformadas por un polinucleótido que codifica un polipéptido capaz de una actividad de adipoquina, tal como

el polinucleótido que codifica actividad de adipina/complemento D que se describe en la patente de EE.UU. N° 5.223.425.

El polinucleótido adecuado puede ser introducido en las células por una cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos se pueden encontrar generalmente descritos en Sambrook et al., [5] [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992)]; Ausubel et al., [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)]; Chang et al., [Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, MI (1995)]; Vega et al., [Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor MI (1995)]; Vectors [A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston MA (1988)] and Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512 (1986)] e incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, véase la patente de Estados Unidos 4.866.042 para vectores que implican al sistema nervioso central y también las patentes de Estados Unidos 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positiva-negativa para inducir recombinación homóloga.

Un método preferido para introducir un polinucleótido que codifica una adipina en células de la herida es usando un vector viral. Los vectores virales ofrecen varias ventajas incluyendo transformación de alta eficacia, y dirección a tipos específicos de células, y propagación en dichas células. Los vectores virales pueden ser también modificados con receptores específicos o ligandos para alterar la especificidad de la diana a la que se dirigen a través de receptores celulares específicos, tales como receptores de células cancerosas.

Los vectores retrovirales representan una clase de vectores adecuada para uso con la presente invención. En la transferencia de genes a células de mamíferos se usan retrovirus defectuosos [para una revisión véase Miller, A.D., Blood 76: 271 (1990)]. Un retrovirus recombinante que incluye un polinucleótido que codifica adipina puede ser construido usando técnicas moleculares muy conocidas. Se pueden eliminar porciones del genoma retroviral para convertir el retrovirus defectuoso en su replicación y el retrovirus defectuoso en su replicación puede ser empaquetado en viriones, que se pueden usar para infectar células dianas a través del uso de un virus auxiliar y empleando al mismo tiempo técnicas estándares. Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con dichos virus puede encontrarse en, por ejemplo, Ausubel et al., [eds, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989)]. Los retrovirus se han usado para introducir una variedad de genes en muchos tipos diferentes de células, incluyendo células epiteliales, linfocitos, mioblastos, hepatocitos y células de la médula ósea.

Otro vector de expresión adecuado puede ser un vector adenovirus. El adenovirus es un vector de transferencia de genes ampliamente estudiado y usado generalmente. Las ventajas claves de un vector de adenovirus incluyen eficiencia de transducción relativamente alta de división y células quiescentes, tropismo natural para una amplia gama de tejidos epiteliales y facilidad de producción de títulos elevados [Russel, W.C. J. Gen. Virol. 81: 57-63 (2000)]. El DNA de adenovirus es transportado al núcleo, pero no se integra en él. Por tanto está minimizado el riesgo de mutagénesis con vectores adenovirales, mientras que la expresión a corto plazo es particularmente adecuada para tratar células cancerosas, tales como células cancerosas resistentes a múltiples fármacos. Los vectores adenovirales usados en tratamientos experimentales del cáncer están descritos por Seth et al. [Adenoviral vectors for cancer gene therapy. En: P. Seth (ed.) Adenoviruses: Basic biology to Gene Therapy, Landes, Austin, TX , (1999) pp. 103-120].

También se puede considerar los aspectos que limitan la expresión en tipos particulares de células. Dichos aspectos incluyen, por ejemplo, elementos promotores y reguladores que son específicos del tipo célula deseada. El vector viral puede incluir también una secuencia de nucleótido que codifica una señal para la secreción del fragmento del anticuerpo al exterior de la célula. Las señales de secreción contienen generalmente una secuencia corta (7-20 residuos) aminoácidos hidrófobos. Las señales de secreción adecuadas para uso en esta invención están ampliamente disponibles y son bien conocidas en la técnica, véase, por ejemplo por von Heijne [J. Mol. Biol. 184:99-105 (1985)] y por Lej et al., [J. Bacteriol. 169: 4379 (1987)].

El vector recombinante puede ser administrado de varios modos. Si se usan vectores virales el método puede aprovechar su especificidad de diana y en consecuencia, dichos vectores no tendrán que ser administrados localmente en el sitio del tumor. Sin embargo, la administración local puede proporcionar un tratamiento más rápido y más eficaz. La administración de vectores virales se puede realizar también, por ejemplo, por inyección intravenosa o subcutánea en el sujeto. Tras la inyección los vectores virales, circularán hasta que reconozcan las células hospedantes con especificidad de diana apropiada para la infección.

De acuerdo con la presente invención se puede usar en terapia una adipina o un modulador de adipocitos *per se* o como un ingrediente activo de una composición farmacéutica.

Tal como se usa en la presente memoria "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes farmacéuticamente adecuados. La finalidad de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En lo sucesivo, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que se

pueden usar intercambiamente se refieren a un vehículo o diluyente que no causa una irritación significativa a un organismo y no suprime la actividad biológica y las propiedades de un ingrediente activo administrado. Un adyuvante está incluido en el significado de estas frases.

5 En la presente memoria "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar más la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, sin limitación, de excipiente incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Las técnicas para la formulación y administración de fármacos pueden encontrarse en el texto "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser fabricadas por procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezclamiento, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento y/o liofilización.

15 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden ser formulados por tanto de un modo convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprende excipientes y auxiliares, que facilitan el tratamiento de los ingredientes activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente.

20 De acuerdo con la presente invención, el vehículo farmacéuticamente aceptable es para aplicación tópica y puede ser, por ejemplo, pero sin limitación, un gel, una crema, una pasta, una loción, un espray (aerosol), una suspensión, un polvo, una dispersión, un bálsamo y una pomada, como se detalla adicionalmente en lo sucesivo. Los soportes sólidos se pueden usar también para liberación prolongada del ingrediente activo en la herida.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad en una cantidad eficaz para conseguir el fin deseado. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad del ingrediente activo eficaz para inducir o acelerar la cicatrización de la herida.

25 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria, el ensayo descrito antes y el apartado de Ejemplos que sigue.

30 Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz o dosis puede ser estimada inicialmente a partir de un ensayo de herida en piel usando animales experimentales como se ha descrito anteriormente. Dicha información se puede usar para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos.

35 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente memoria pueden ser determinadas por métodos farmacéuticos estándares *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y en cultivos celulares y estudios en animales puede ser usados en formular una intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación puede ser elegida por un medico individual teniendo en cuenta el estado del paciente. (Véase, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p. 1).

40 La cantidad de dosificación y el intervalo pueden ser ajustados individualmente a los niveles de ingrediente activo que son suficientes para, por ejemplo, inducir la cicatrización de heridas (concentración mínima eficaz, CME). La CME variará para cada preparación, pero puede ser estimada de datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para conseguir la CME dependerá de las características individuales y la vía de administración.

45 Dependiendo de la gravedad y la respuesta de la herida que se ha de tratar, la dosificación puede ser una sola o una pluralidad de administraciones, durando el curso del tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se consigue una disminución de la herida.

La cantidad de una composición que ha de ser administrada será, naturalmente, dependiente del sujeto que se trata, la gravedad de la afección, el modo de administración, la opinión del médico encargado del caso, etc.

50 Las composiciones de la presente invención pueden, si se desea, ser presentadas en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen los ingredientes activos. El envase puede, por ejemplo, comprender una hoja metálica o de plástico conformada en un tubo para dispensar las formulaciones para administración tópica. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado por instrucciones para la administración. El envase o dispensador puede llevar incorporado un aviso asociado con el envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, el cual refleja la aprobación de la agencia de la forma de las composiciones para administración a seres humanos o animales. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser una etiqueta

55

aprobada por U.S. Food and Drug Administración (FDA) para los fármacos de prescripción o un prospecto del producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un vehículo farmacéutico compatible pueden ser también preparadas, colocadas en un recipiente apropiado, y etiquetadas para el tratamiento de un estado indicado, como se ha descrito con detalle anteriormente.

- 5 Se apreciará que el modo de administración preferido de los ingredientes activos de la presente invención es tópico - administración local, aunque no está excluida la administración sistémica, mediante vías de administración aceptables, tales como oral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica, peritoneal y similares usando formulaciones adecuadas, como es bien conocido en la técnica.

- 10 Por tanto, la presente invención proporciona nuevos usos y composiciones para uso en el tratamiento de heridas utilizando adipocitos, células que pueden diferenciarse en adipocitos, moduladores de adipocitos y moléculas segregadas por adipocitos, es decir, adiposina o adiponectina para inducir o acelerar la cicatrización de heridas de un modo seguro y eficaz.

- 15 Otros objetos, ventajas y nuevos aspectos de la presente invención serán evidentes para un experto ordinario en la técnica por examen de los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean limitativos. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se han descrito anteriormente y como se reivindican en el apartado de reivindicaciones anexos encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos que, junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de un modo no limitativo.

- 20 Generalmente, la nomenclatura usada en la presente memoria y los métodos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de DNA recombinante. Dichas técnicas están ampliamente explicadas en la literatura técnica. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook et al, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como las expuestas en las patentes de EE.UU. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); los inmunoensayos disponibles están exhaustivamente descritos en literatura de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSI-IL Press (1996); la totalidad de las cuales se incorpora como referencia como si estuvieran completamente descritas en la presente memoria. A través de este documento se incorporan otras referencias generales. Los métodos descritos en dichas referencias se cree que son muy bien conocidos por los expertos en la técnica y se aportan para conveniencia del lector. Toda la información contenida en dichos documentos se incorpora en la presente memoria como referencia.

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

- 50 **Materiales:** Todos los productos químicos estándares fueron de (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). El medio Paraplast Embedding también se compró a Sigma. El anticuerpo anti-queratina 14 y el anticuerpo policlonal anti-queratina 1 se compraron a Bacto-Covance (Richmond, CA, USA). El anticuerpo anti-conejo de cabra biotinilado y la estreptavidina peroxidasa de rábano silvestre (HRP) fueron comprados a ZYMED Laboratories Inc. (San Francisco, CA, USA). GW9662 fue comprado a Cayman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, USA). La adiposina (factor complementario D) fue comprada a Calbiochem (San Diego, CA, USA). La hematoxilina fue comprada a DAKO Corp. (Carpinteria, CA, USA); la eosina fue comprada a ICN Biomedicals Inc. (Aurora, Ohio, USA) y *entellan* fue comprado a MERCK (Darmstadt, Alemania).

- 55 **Aislamiento y cultivo de queratinocitos de mûridos:** Los queratinocitos primarios fueron aislados de la piel de recién nacidos como se describe en la referencia 18. Los queratinocitos se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) que contenía suero de bovino fetal tratado con Chelex al 8% (Chelex-100, BioRad). Para mantener un fenotipo celular basal proliferante, la concentración final de Ca^{2+} se ajustó a 0,05 mM. Los experimentos se

realizaron cinco a siete días después del cultivo en placas.

Ensayo de migración de queratinocitos: Queratinocitos primarios de ratón fueron no tratados o tratados con el antagonistas de PPAR γ , GW9662 (μM) o el agonista de PPAR γ , troglitazona (μM). El ensayo de arañado de herida se realizó 24 horas después del tratamiento y los campos representativos fueron fotografiados inmediatamente después de la herida (Día 0) y 48 horas más tarde (Día 2). El valor medio de cierre de herida se representó como porcentaje en comparación con la anchura inicial del arañazo de la herida (% de cierre de herida).

Ensayo de cicatrización de heridas: Se hicieron heridas en los lomos de ratones C57BL mediante una incisión de 20 mm y se trataron diariamente, durante 6 días, con diversos agentes. Los ratones se sacrificaron 6 días después de la herida. Las biopsias de las heridas se muestrearon, se procesaron y se analizaron morfológicamente y/o histoquímicamente respecto a diversos parámetros de la cicatrización de heridas, es decir, contracción de las heridas, migración y diferenciación de adipocitos, migración epidérmica y cierre epidérmico.

Análisis de la contracción de heridas: La zona herida se midió antes y después del tratamiento y se calculó el porcentaje de reducción de la zona de la herida.

Preparación de secciones de heridas incrustadas en parafina: Las biopsias de heridas se fijaron en paraformaldehído al 4%, luego se deshidrataron aumentando las concentraciones de etanol (50 - 100%). Las preparaciones deshidratadas se sumergieron rápidamente en solución de parafinas al 50% y xileno al 50% y luego en parafina pura. Los bloques de parafina se cortaron con un microtomo y las secciones se montaron en portaobjetos Super Frost⁺™.

Tinción con H&E: Los portaobjetos con secciones de heridas incrustadas en parafina se incubaron a 60°C durante 60 minutos y luego se desparafinaron lavando los portaobjetos dos veces con tolueno (100%) durante 10 minutos, una vez con etanol al 100 % durante 15 minutos y una vez con etanol al 100 % durante 10 minutos. Los portaobjetos desparafinados se tiñeron con hematoxilina (lista para usar en solución) durante 10 minutos, se lavaron con agua, se tiñeron con eosina (al 0,5% en DDW) durante 5 minutos, luego se lavaron con etanol al 70% durante 1 minuto. A continuación, los portaobjetos se deshidrataron lavándolos una vez con etanol al 95% durante 5 minutos, dos veces con etanol al 100% durante 5 minutos, y dos veces con xileno (100%) durante 10 minutos, luego se sellaron usando *entellan* (MERCK Darmstadt, Alemania).

Tinción con queratina 4 y queratina 14: Los portaobjetos con secciones de heridas incrustadas en parafina se desparafinaron como se ha descrito para la tinción con H&E y se incubaron en solución de bloqueo (BSA al 5% y Tween 20™ al 5% en PBS) durante 1 hora. Los portaobjetos se incubaron luego con el anticuerpo anti-queratina 1 o el anticuerpo anti-queratina 14 (Babco-Covance) en solución de bloqueo (1:1000) (BSA al 5% y Tween 20™ al 5% en PBS) a 4°C durante una noche. A continuación, los portaobjetos se lavaron cinco veces con tampón de lavado (Tween 20™ al 5% en PBS) seguido por incubación con el anticuerpo anti-conejo de cabra biotinilado (ZYMED Laboratories Inc.) suspendido en solución de bloqueo (1:200) (BSA al 5% y Tween 20™ al 5% en PBS) durante 1 hora. Los portaobjetos se lavaron luego tres veces con tampón de lavado seguido por incubación con un anticuerpo de estreptavidina biotinilado secundario en solución de bloqueo (1:300) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos se lavaron dos veces con tampón de lavado durante 5 minutos, una vez con PBS durante 5 minutos y una vez con tampón TRIS (0,05 M en PBS), seguido por incubación en reactivo DAB (2 comprimidos 1 oro 1 plata disuelto en DDW) para el desarrollo de color. La reacción se terminó sumergiendo los portaobjetos en agua seguido por contra-tinción con eosina (ICN, 0,5% en DDW).

RESULTADOS EXPERIMENTALES

EJEMPLO 1

Asociación de adipocitos con queratinocitos migrantes durante el proceso de cicatrización de heridas

Se observaron células epidérmicas migrantes (queratinocitos) y adipocitos reclutados en tejido de herida de siete días (Figuras 2A-B). Los adipocitos reclutados observados aparecían esencialmente exentos de grasa almacenada (es decir, adipocitos tempranos). Como puede verse en la Figura 1, se observaron queratinocitos migrantes a través del hueco completo de la herida en aproximadamente 60% de las heridas no tratadas, aunque también estaban presentes adipocitos en aproximadamente 60% de las heridas no tratadas. La Figura 1 muestra también que se observaron queratinocitos migrantes y adipocitos reclutados en aproximadamente 90% y 80% de las heridas tratadas con insulina, respectivamente.

Estos resultados revelan que la migración de queratinocitos a la zona del hueco de la herida está estrechamente asociada con el reclutamiento de adipocitos a la misma zona durante una etapa temprana del proceso de cicatrización de la herida. Los resultados indican por tanto que los adipocitos migrantes, que no están completamente diferenciados en células que acumulan grasa, están implicados en el proceso de cicatrización de heridas.

EJEMPLO 2

El efecto de moduladores de PPAR γ en la migración de queratinocitos y contracción de heridas

Se evaluó *in vitro* el efecto de inhibir o potenciar la actividad de los receptores gamma activados por proliferadores de peroxisoma (PPAR γ) sobre la migración de queratinocitos. Como puede verse en la Figura 3, el tratamiento de queratinocitos de ratón primarios cultivados con el antagonista de PPAR γ , GW9662, promovió la migración de queratinocitos. Por otro lado, el tratamiento de queratinocitos cultivados con el agonista de PPAR γ , troglitazona, inhibió la migración de queratinocitos (Figura 8).

También se evaluó *in vivo* el efecto de inhibir o potenciar la actividad de PPAR γ usando antagonistas y agonistas del PPAR γ , respectivamente, en la cicatrización de heridas. En consecuencia, se efectuaron heridas por incisión en el lomo ratones C57BL y se trataron diariamente, durante 6 días, con tampón de PBS (control), o con diversos agentes. Los ratones se sacrificaron seis días después de la herida y luego se analizaron las heridas. Como se puede ver en las Figuras 4, 5 y 6, el tratamiento con GW9662 (un antagonista de PPAR γ) promovió la contracción de la herida, en comparación con el control. Por otro lado, un tratamiento similar con troglitazona (un agonista de PPAR γ) inhibió la contracción de la herida (Figura 9). Además, la troglitazona perjudicó la cicatrización inducida por insulina (Figuras 9 y 10).

Por tanto, los resultados demuestran claramente que la actividad de PPAR γ impide la cicatrización de heridas y que la inhibición de PPAR γ puede promover eficazmente el proceso de cicatrización. Por consiguiente, los resultados indican que los antagonistas de PPAR γ , tales como GW9662 se pueden usar eficazmente para acelerar la cicatrización de heridas.

EJEMPLO 3

El efecto de adiposina en la migración de queratinocitos y la contracción de heridas

Se evaluó *in vivo* el efecto de adiposina (Factor D del complemento, que es segregada por los adipocitos) en la cicatrización de heridas. En consecuencia, las heridas por incisión se efectuaron en el lomo de ratones C57BL y se trataron diariamente, durante 6 días, con tampón PBS (control) o con adiposina 1 μ M. Los ratones se sacrificaron seis días después de la herida y luego se analizaron las heridas. Como se ilustra en las Figuras 4, 5 y 7, la adiposina promovió sustancialmente la contracción de las heridas (Figuras 4, 5 y 7). Además, la adiposina aumentó el cierre epidérmico desde aproximadamente 15% hasta aproximadamente 30%, y aumentó la migración de queratinocitos desde aproximadamente 30% hasta aproximadamente 65%, en comparación con el tampón de control (Figura 6).

Estos resultados demuestran que una adipoquina, tal como adiposina, puede inducir o acelerar eficazmente la cicatrización de heridas.

Se apreciará que ciertos aspectos de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una sola realización. Inversamente, diversos aspectos de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar separadamente o en cualquier sub-combinación adecuada.

Aunque la invención ha sido descrita en conjunción con sus realizaciones específicas, es evidente que para los expertos en la técnica serán evidentes muchas alternativas, modificaciones y variaciones.

REFERENCIAS CITADAS POR NÚMEROS

(Referencias adicionales se citan en el texto)

1. Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., and Yuspa, S.H. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*, 19: 245-254, 1980.

2. Yuspa, S.H., Kilkenny, A.E., Steinert, P.M., and Roop, D.R. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J. Cell Biol.*, 109: 1207-1217, 1989.

3. Fuchs, E. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell Biol.*, 111: 2807-2814, 1990.

4. Yuspa, S.H. The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis-Thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.*, 54: 1178-1189, 1994.

5. Hennings, H. and Holbrook, K.A. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp. Cell Res.*, 143: 127-142, 1983.

6. Tennenbaum, T., Li, L., Belanger, A.J., De Luca, L.M., and Yuspa, S.H. Selective changes in laminin adhesion and $\alpha 6 \beta 4$ integrin regulation are associated with the initial steps in keratinocyte maturation. *Cell Growth Differ.*, 7: 615-628, 1996.

7. Tennenbaum, T., Belanger, A.J., Quaranta, V., and Yuspa, S.H. Differential regulation of integrins and extracellular matrix binding in epidermal differentiation and squamous tumor progression. *J. Invest. Dermatol.*, 1: 157-161, 1996.

8. Weinstein, M.L. Update on wound healing: a review of the literature. *Mil. Med.*, 163: 620-624, 1998.

5

9. Singer, A. J. and Clark, R.A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 341: 738-746, 1999.

10. Whitby, D. J. and Ferguson, M. W. Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev. Biol.*, 147: 207-215, 1991.

11. Kiritsy, C.P., Lynch, B., and Lynch, S.E. Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 4: 729-760, 1993.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una adipoquina para la preparación de una composición farmacéutica adaptada para aplicación tópica para inducir o acelerar un proceso de cicatrización de una herida de la piel, en donde dicha adipoquina se selecciona del grupo que consiste en adipsina y adiponectina y en donde dicha adipoquina es una molécula bioactiva segregada por adipocitos.
2. El uso de la reivindicación 1, en donde dicha adipoquina es adipsina.
3. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha herida de la piel es una llaga por presión causada por un descanso prolongado en lecho, una herida inducida por trauma, un corte, una úlcera, una quemadura o una incisión quirúrgica.
- 10 4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha composición farmacéutica se selecciona del grupo que consiste en una solución acuosa, un gel, una crema, una pasta, una loción, un spray (aerosol), una suspensión, un polvo, una dispersión, un bálsamo, y una pomada.
5. El uso de la reivindicación 4, en donde dicha composición farmacéutica incluye un soporte sólido.
- 15 6. Uso de un vector viral que comprende un polinucleótido que codifica adipoquina para la preparación de una composición farmacéutica para transformar células de una herida de la piel para expresar y segregar dicha adipoquina, induciendo con ello o acelerando un proceso de cicatrización de una herida de la piel, en donde dicha adipoquina se selecciona del grupo que consiste en adipsina y adiponectina y en donde dicha adipoquina es una molécula bioactiva segregada por los adipocitos.
7. El uso de la reivindicación 6, en donde dicho vector viral es un vector adenoviral.
- 20 8. El uso de la reivindicación 6 o 7, en donde dicha adipoquina es adipsina.
9. El uso de la reivindicación 6, en donde dicha composición farmacéutica está adaptada para administración local, particularmente subcutánea.
- 25 10. Una composición farmacéutica que comprende una adipoquina adaptada para aplicación tópica para uso en inducir o acelerar un proceso de cicatrización de una herida de la piel, en donde dicha adipoquina se selecciona del grupo que consiste en adipsina y adiponectina y en donde dicha adipoquina es una molécula bioactiva segregada por los adipocitos.
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende un vector viral que comprende un polinucleótido que codifica una adipoquina para uso en transformar células de una herida de la piel para expresar y segregar dicha adipoquina, induciendo o acelerando con ello un proceso de cicatrización de la herida de la piel, en donde dicha adipoquina se selecciona del grupo que consiste en adipsina y adiponectina y en donde dicha adipoquina es una molécula bioactiva segregada por los adipocitos.

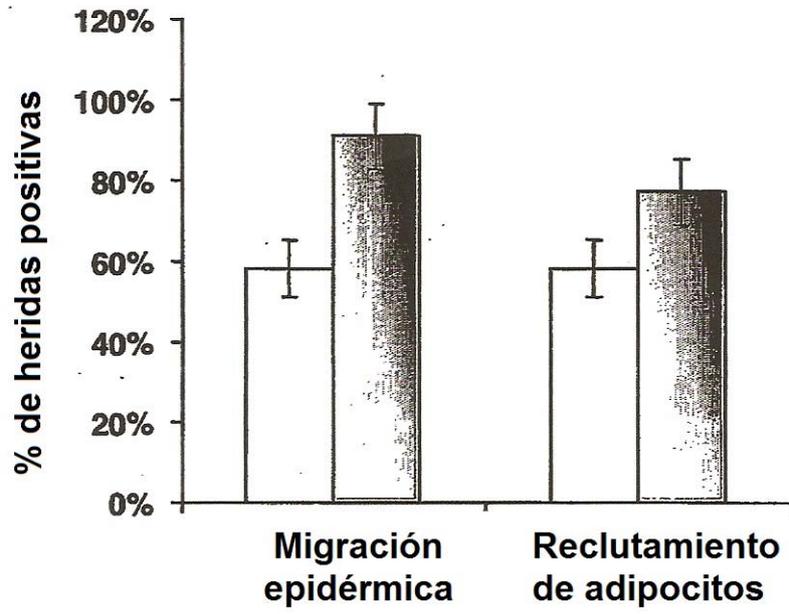


Fig. 1



Fig. 2A

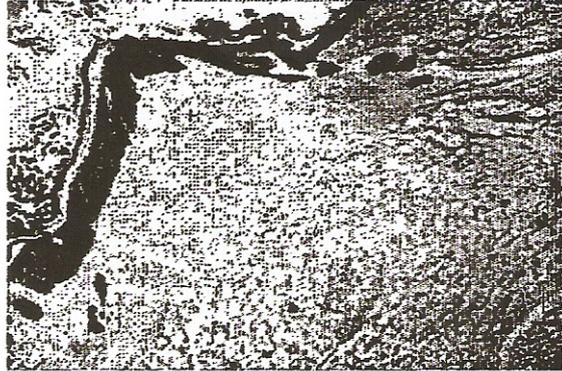


Fig. 2B

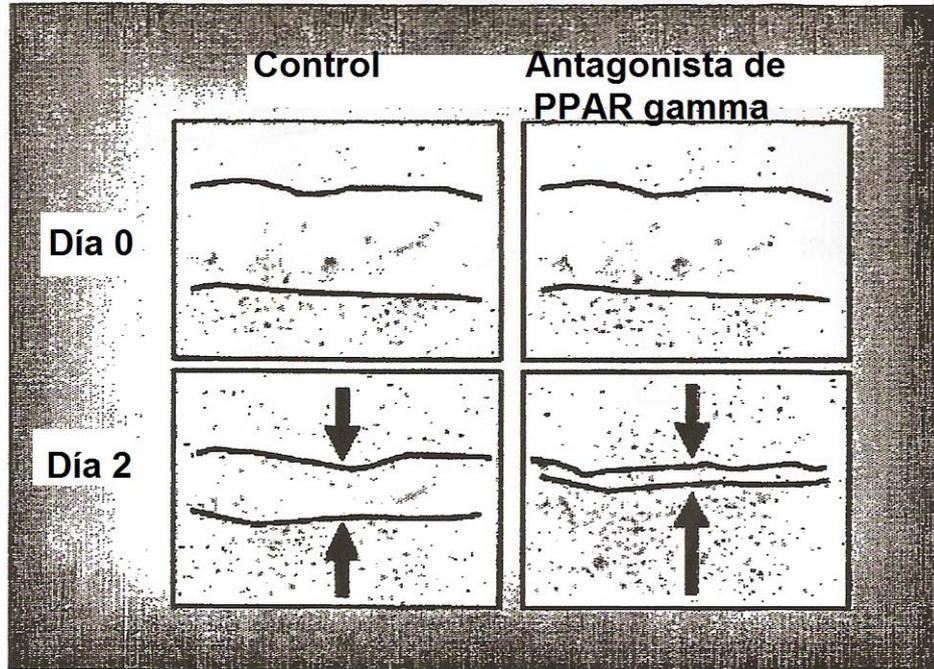


Fig. 3

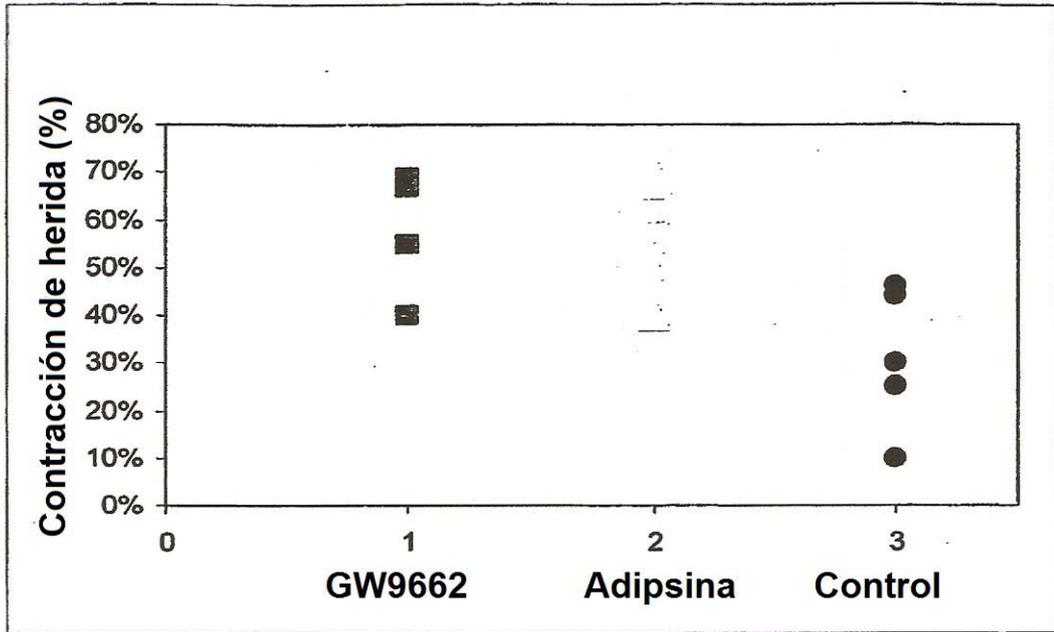
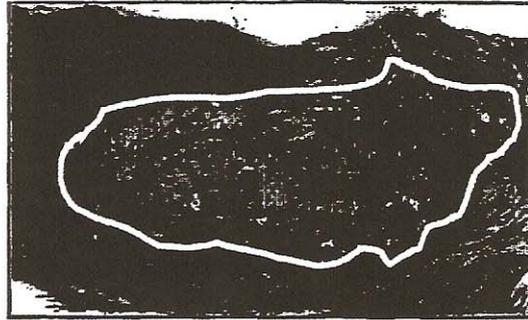
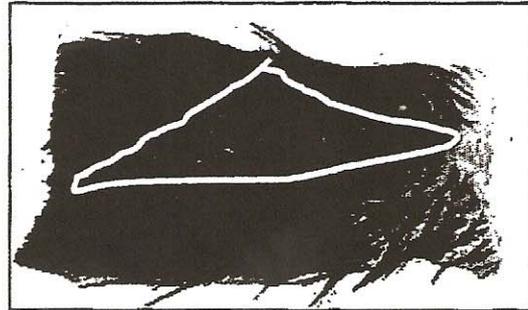


Fig. 4

Control



**Antagonista de
PPARgamma
(GW9662)**



Adipsina

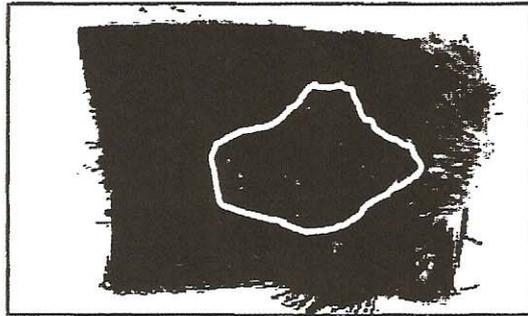


Fig. 5

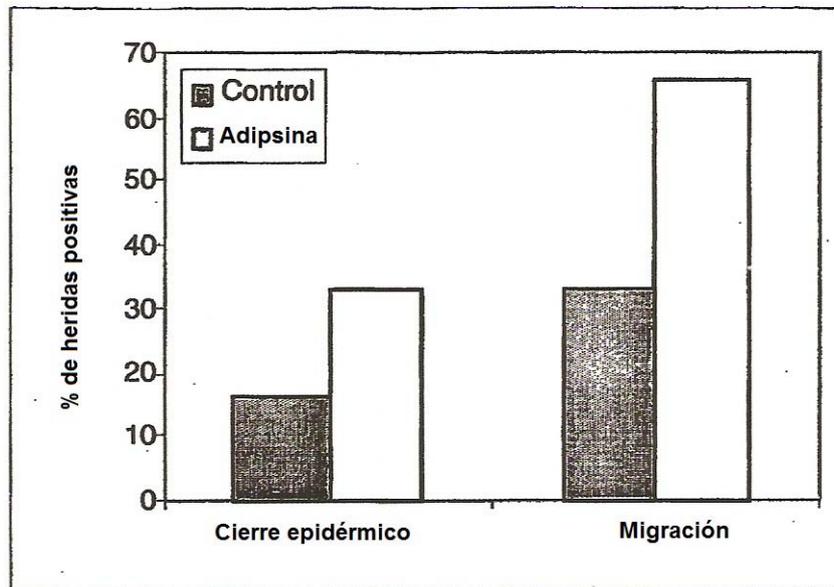


Fig. 6

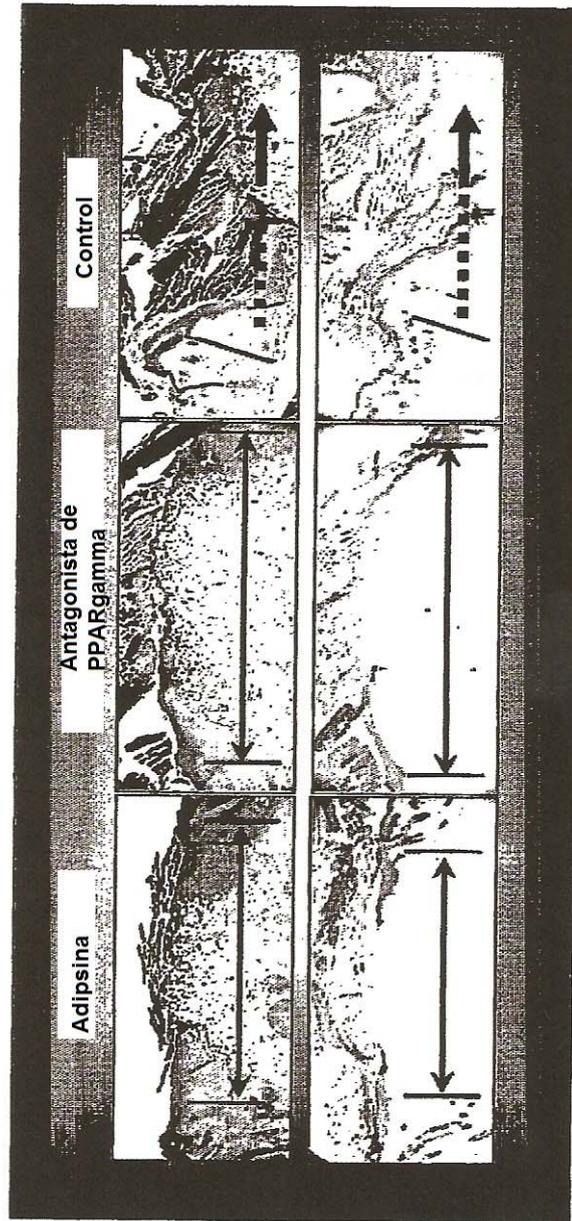


Fig. 7

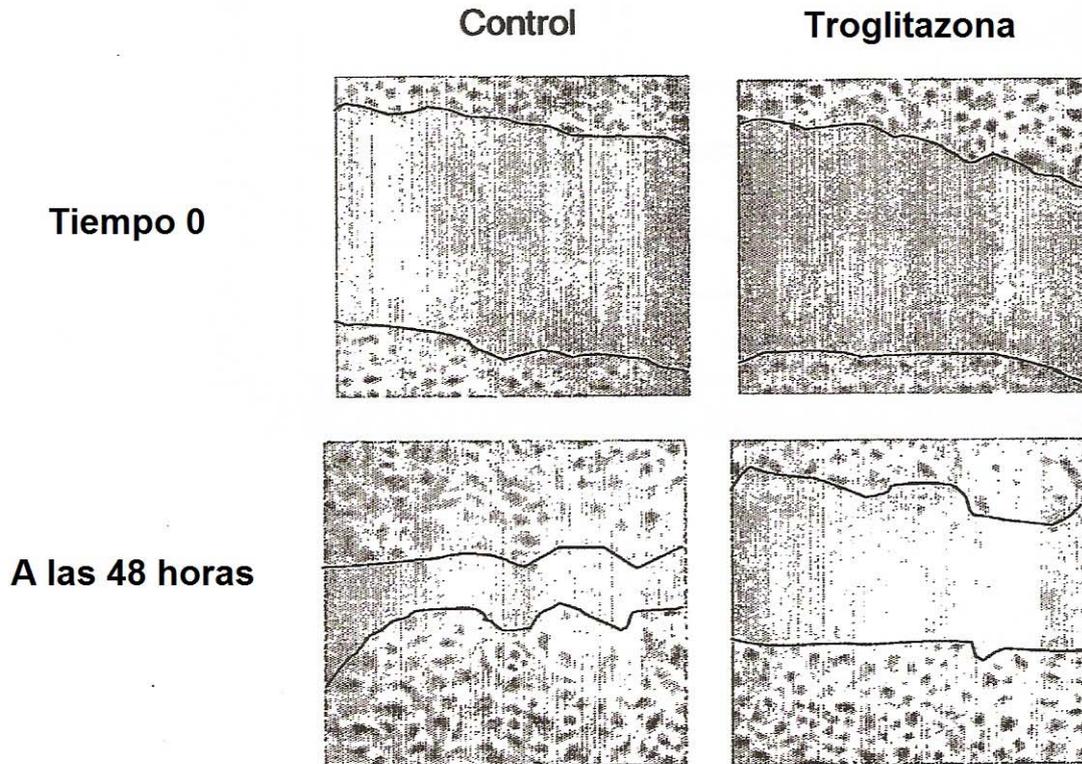


Fig. 8

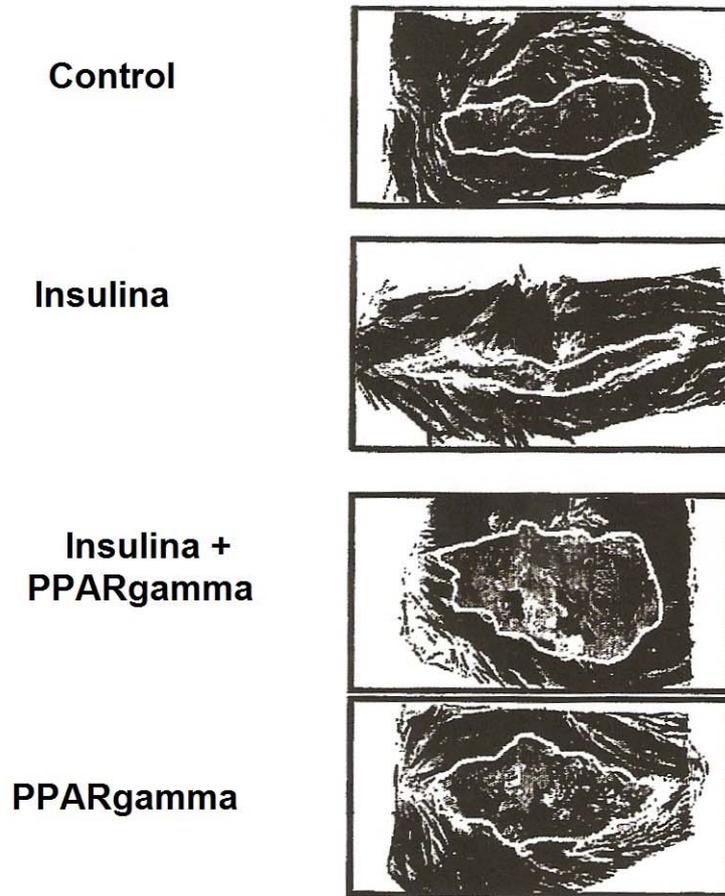


Fig. 9

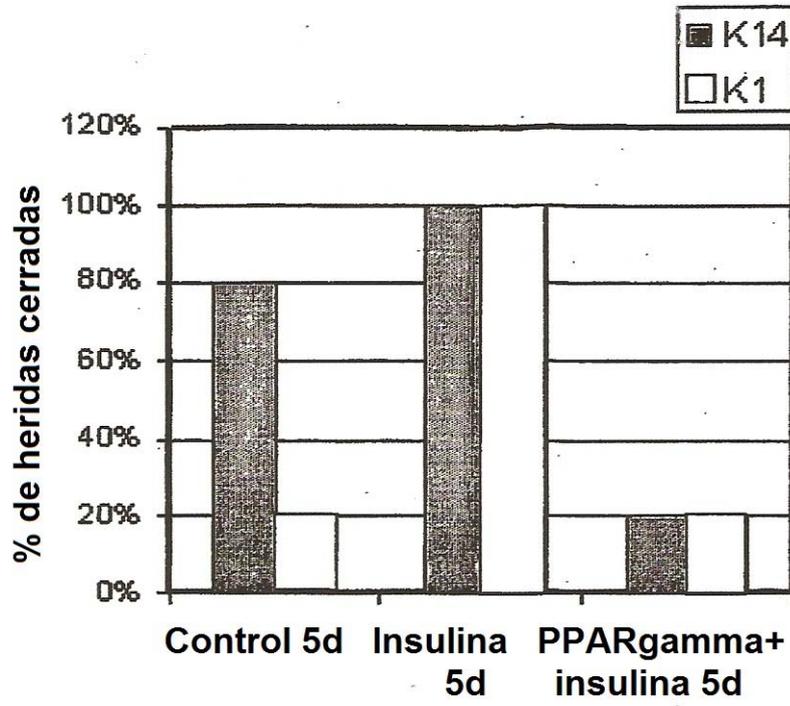


Fig. 10