

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 824**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2012 E 12780667 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2773367**

54 Título: **Proteínas de la familia S100 y sus usos**

30 Prioridad:

**31.10.2011 EP 11008711**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.12.2015**

73 Titular/es:

**LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
(100.0%)  
Geschwister-Scholl-Platz 1  
80539 München, DE**

72 Inventor/es:

**GAUGLITZ, GERD y  
WOLF, RONALD**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 554 824 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

Proteínas de la familia S100 y sus usos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a proteínas de la familia S100 y a sus usos. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de la familia S100

**Antecedentes de la invención**

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano. Cumple importantes funciones como una primera línea de defensa contra organismos patógenos, como un órgano sensorial, reteniendo nutrientes y agua y ayudando a regular la temperatura corporal.

10 Hay diversos tipos de trastornos y enfermedades de la piel que están asociados con un deterioro del estado o de la función de la piel. Estas incluyen enfermedades de la piel causadas por alergias e inflamación (tales como dermatitis alérgica de contacto, eczema, rosácea o psoriasis), trastornos de la piel causados por infecciones (tales como abscesos, herpes zóster o verrugas), y enfermedades de la piel resultantes de otras causas diversas (tales como acné o quemaduras solares).

15 Muchos de estos trastornos de la piel pueden provocar dolor y malestar importantes. En la sociedad moderna, la piel se ha convertido en un signo de salud y atractivo, de modo que los trastornos de la piel pueden tener un gran impacto en la imagen de uno mismo y en la autoestima. Algunos trastornos de la piel pueden incluso ser potencialmente mortales, tales como el cáncer de piel.

20 Tanto las cicatrices hipertróficas como los queloides representan cicatrizaciones patológicamente alteradas, con formación excesiva de tejido cicatricial y descomposición reducida de colágeno dérmico [1,6]. A menudo, también se observa una expresión aumentada de proteínas como fibronectina, laminina y actina alfa de músculo liso. Recientemente, algunos estudios han demostrado que la reacción inflamatoria elevada y la posterior liberación de diferentes factores de crecimiento (tales como TGF- $\beta$  (siglas en inglés del factor de crecimiento transformante beta) por fibroblastos y queratinocitos, conduce a una homeostasis alterada dentro del tejido conectivo. Se ha discutido una implicación de factores genéticos en la formación de cicatrices hipertróficas y queloides, debido a una mayor frecuencia de estos trastornos de la piel en ciertas familias.

25 Basándose en los hallazgos actuales, un planteamiento prometedor de las cicatrices hipertróficas y queloides es cuestionable, porque el defecto original no se ha descubierto. Sin embargo, los medicamentos y terapias utilizadas actualmente pueden reducir el tamaño, la diseminación y el volumen de las cicatrices hipertróficas hasta cierto nivel, y conseguir un resultado cosmético mejorado, y reducir el malestar como picor, dolor, o la sensación de tensión. Sin embargo, la mayoría de las terapias están asociadas con riesgos considerables, con una alta probabilidad de efectos secundarios y con altos índices de reaparición. Los nuevos planteamientos para el tratamiento antiproliferativo de las cicatrices hipertróficas son, por tanto, un área crucial de la investigación en dermatología.

30 Los trastornos fibroproliferativos (FPD, del inglés *fibroproliferative disorders*) son trastornos comunes y frecuentemente letales que implican una variedad de tejidos humanos, como cirrosis y fibrosis del hígado y fibrosis pulmonar idiopática [2]. Las cicatrices hipertróficas (CH) y los queloides representan los equivalentes cutáneos de los FPD. Ambas afecciones están asociadas con una morbilidad significativa al causar prurito, dolor y/o contracturas que, en consecuencia, afectan a la calidad de vida del paciente. Las CH y los queloides se forman durante una cicatrización alterada y evolucionan después de lesiones de la dermis profunda. Hasta ahora, la fisiopatología de la formación de la cicatriz hipertrófica y el queloide no se conoce bien. La mayoría de los planteamientos terapéuticos siguen siendo insatisfactorios, debido al escaso conocimiento de los complejos mecanismos subyacentes al proceso de cicatrización excesiva.

35 La formación excesiva de tejido cicatricial se produce por un aumento de la deposición de grandes cantidades de matriz extracelular (MEC) en la dermis. Las cicatrices excesivas están densamente pobladas por fibroblastos y células inflamatorias que mantienen un microambiente fibrogénico mediante la secreción de factores de crecimiento transformantes  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y otras citocinas. Esto conduce a una mayor producción de colágeno, proteoglicanos y fibronectina, a una degradación de la MEC y remodelación deficientes [3]. La investigación actual en la fisiopatología del queloide sugiere, además, que las interacciones epidérmicas-dérmicas [4], las alteraciones del fenotipo de los fibroblastos por medio de varios factores de crecimiento y las rutas de señalización corriente abajo [5] están implicadas en la cicatrización excesiva. En particular, el TGF- $\beta$ , las citocinas y las rutas de señalización de Smad corriente abajo son reguladores clave de las etapas tempranas de la formación de cicatrices normales e hipertróficas. Mientras que el TGF- $\beta$ 1 y -2 representan los estimuladores más importantes de la síntesis de colágeno y proteoglicano [6,7], la administración de TGF- $\beta$ 3 reduce la deposición de tejido conectivo [8]. A pesar de los alentadores resultados utilizando recombinantes humanos de TGF- $\beta$ 3 o anti- TGF- $\beta$ 1 o -2 para evitar la deposición exagerada de colágeno, los resultados clínicos no son convincentes [9,10]. Por tanto, se necesitan nuevos planteamientos para abordar el equilibrio alterado en el tejido queloide.

En consecuencia, ha sido el objeto de la presente invención proporcionar una vía mejorada de prevenir, reducir o tratar cicatrices hipertróficas, queloides, o trastornos fibroproliferativos relacionados.

**Sumario de la invención**

- 5 Los objetos de la presente invención se resuelven mediante una proteína de la familia S100 para su uso en la prevención, reducción o tratamiento de una cicatriz hipertrófica, un queloide o un trastorno fibroproliferativo, en la que dicha proteína de la familia S100 se selecciona de la proteína S100A7 y la proteína S100A15, y en la que dicha proteína se administra a un paciente que lo necesite.
- En una realización, dicho trastorno fibroproliferativo es aterosclerosis, cirrosis hepática o fibrosis pulmonar.
- 10 En una realización, dicha proteína S100A7 es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, o es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90%, preferentemente al menos un 95%, más preferentemente al menos un 98% idéntica a la SEC ID N°: 1.
- En una realización, dicha proteína S100A15 es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, o es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90%, preferentemente al menos un 95%, más preferentemente al menos un 98% idéntica a la SEC ID N°: 2.
- 15 En una realización, dicho paciente es un mamífero, preferentemente un ser humano.
- En una realización, dicha proteína se administra por vía intradérmica, preferentemente mediante inyección y/o por vía tópica, o se administra por vía sistémica, preferentemente mediante inyección o ingestión.
- 20 En una realización, dicha administración intradérmica se produce en un intervalo de dosificación de 1 µg a 50 µg por cm<sup>2</sup>, preferentemente de 1 µg a 10 µg por cm<sup>2</sup> de superficie de piel afectada por dicho trastorno, preferentemente por cm<sup>2</sup> de superficie de piel afectada por formación de cicatriz hipertrófica o formación de queloide.
- En una realización, dicha administración intradérmica se produce en un intervalo de dosificación de 1 µg a 500 µg por cm<sup>2</sup>, preferentemente de 1 µg a 100 µg por cm<sup>2</sup> de superficie de piel a la que se aplica dicha proteína de la familia S100.
- 25 En una realización, dicha administración se produce una vez a la semana, si dicha proteína se administra por vía intradérmica, o dos veces al día, si dicha proteína se administra por vía tópica.
- En una realización, dicha administración se produce antes, durante y/o después de que dicho paciente haya sufrido una herida superficial.
- En una realización, dicha proteína se usa en combinación con al menos alguna otra de las diferentes proteínas de la familia S100.
- 30 En una realización, dicha al menos alguna otra de las diferentes proteínas de la familia S100, se selecciona del grupo que comprende la proteína S100A7 y la proteína S100A15.
- En una realización preferida, se usa una combinación de la proteína S100A7 y la proteína S100A15. In una realización particularmente preferida, no se utiliza ninguna otra proteína de la familia S100 junto con dicha combinación de la proteína S100A7 y la proteína S100A15.
- 35 En una realización, dicha administración de dicha proteína a dicho paciente que lo necesite, es el único tratamiento preventivo o terapéutico, en relación con dicho trastorno de la piel, a la que se somete el paciente.
- En una realización, simultáneamente con dicha administración de dicha proteína a dicho paciente que lo necesite, dicho paciente se somete a uno o más tratamientos preventivos o terapéuticos adicionales para tratar trastornos de la piel seleccionados del grupo que comprende presoterapia, terapia con gel de silicona, aplicación de flavonoides, preferentemente de quercetina y/o kaempferol, aplicación de corticosteroides, preferentemente de un compuesto de triamcinolona, crioterapia, escisión de la cicatriz, radioterapia, terapia con láser, aplicación de interferón, preferentemente de interferón-α2b, aplicación de 5-fluorouracilo, aplicación de imiquimod, inhibición de TGF-β1 y/o TGF- β2, y aplicación de TGF- β3.
- 40 En una realización, dicha proteína se administra externamente.
- 45 En una realización, dicha proteína se genera dentro de dicho paciente mediante expresión proteica a partir de un ácido nucleico introducido en dicho paciente.
- En una realización, dicha proteína no es tóxica para las células fibroblásticas humanas.
- 50 En una realización, cuando dicha proteína se administra a células fibroblásticas humanas a una concentración de 0,01 µg /ml en un experimento de cultivo celular según el Ejemplo 2, se llega a un descenso de la vitalidad celular que es inferior al 40%, preferentemente inferior al 20%, más preferentemente inferior al 10%, cuando se compara

con células no tratadas.

En una realización, dicha proteína tiene efectos terapéuticos, tanto contra las cicatrices hipertróficas como contra los queloides.

5 Los objetos de la presente invención también se resuelven mediante una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína de la familia S100, como se define anteriormente, para su uso en la prevención, reducción o tratamiento de una cicatriz hipertrófica, un queloide o un trastorno fibroproliferativo, en la que dicha composición farmacéutica se administra a un paciente que lo necesite.

10 Los objetos de la presente invención también se resuelven mediante un procedimiento para la prevención, reducción o tratamiento de una cicatriz hipertrófica, un queloide o un trastorno fibroproliferativo, comprendiendo dicho procedimiento la administración de una proteína de la familia S100 para un paciente que lo necesite.

En dicho procedimiento, dichos cicatriz hipertrófica, queloide, trastorno fibroproliferativo, proteína de la familia S100 y paciente se definen en las realizaciones anteriores.

15 Los objetos de la presente invención también se resuelven mediante el uso de una proteína de la familia S100 en la fabricación de un medicamento para la prevención, reducción o tratamiento de una cicatriz hipertrófica, un queloide o un trastorno fibroproliferativo.

En una realización, dichos prevención, reducción o tratamiento se producen mediante la administración de dicha proteína de la familia S100 a un paciente que lo necesite.

En dicho uso y en la realización a la que se refiere, dichos proteína de la familia S100, cicatriz hipertrófica, queloide, trastorno fibroproliferativo y paciente se definen en las realizaciones anteriores.

## 20 **Descripción detallada de la invención**

Los presentes inventores han descubierto que, sorprendentemente, las proteínas S100A7 y S100A15, de la familia S100, son muy eficaces en el tratamiento de los trastornos de la piel que pueden aliviarse y/o prevenirse mediante la reducción de la síntesis de colágeno y/o el aumento de la descomposición de colágeno, tales como las cicatrices hipertróficas y los queloides, así como los trastornos fibroproliferativos.

25 Los genes de la familia S100 codifican proteínas pequeñas (9-13 kDa) de unión a calcio de tipo mano-EF. Las proteínas S100 son efectores de procesos dependientes de calcio e intervienen en el control del ciclo celular, crecimiento celular, diferenciación celular, además de como quimioatrayentes para las células inflamatorias ([11], revisado en: [12]). Por tanto, la expresión de las proteínas S100 está asociada con la maduración, la inflamación y la cicatrización epidérmicas [13-15].

30 Los presentes inventores han llevado a cabo una investigación del papel de las proteínas S100 en la formación de queloides. Sorprendentemente, se ha descubierto que la expresión y producción de S100A7 (psoriasina) están significativamente reducidas en el tejido cicatricial de los queloides, en comparación con la piel normal (figs. 1A, B). A través de inmunotinción de biopsias de tejido completo se ha demostrado una marcada regulación descendente de la expresión de S100A7 en epidermis derivada de queloides con S100A7 apenas detectable (fig. 1C). Este conjunto de datos sugiere que los fibroblastos subepidérmicos en el tejido queloide están expuestos a niveles reducidos de S100A7 secretada.

35 En experimentos adicionales, los fibroblastos primarios de piel normal y de tejido queloide se aislaron, se cultivaron y se determinó la expresión de colágeno. La expresión de los colágenos COL1A1 y COL3A1 en fibroblastos derivados de queloide (FQ) estaba marcadamente aumentada (fig. 2A). Para probar si las proteínas S100 afectan a la producción de colágeno, fibroblastos normales (FN) aislados se cultivaron y se estimularon con proteínas S100 a diferentes concentraciones. Muy sorprendentemente, los datos mostraron que tanto S100A7 (psoriasina) como S100A15 (koebnerisina) inhibían la expresión de COL1A1, COL1A2, y COL3A1 (figs. 2B, C, D). Los efectos de las proteínas S100 fueron similares a los del interferón- $\gamma$ , previamente establecido como uno de los inhibidores más potentes de la síntesis de colágeno en los fibroblastos (fig. 2D). La viabilidad celular no fue afectada por ninguna de las proteínas (fig. 2E).

40 Estos hallazgos permiten llegar a la conclusión de que las proteínas S100A7 y S100A15, de la familia S100 pueden utilizarse para reducir la cantidad de colágeno producido por las células de la piel y, por tanto, son eficaces en la prevención, reducción o tratamiento de las cicatrices hipertróficas y los queloides.

45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de la familia S100" se refiere a una proteína que es un miembro de la familia de proteínas S100. Con la expresión también se quiere englobar a proteínas con una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90%, preferentemente un 95%, más preferentemente un 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una proteína que es un miembro de la familia de proteínas S100. Además, con la expresión también se quiere englobar a proteínas con una secuencia de aminoácidos obtenida por delección, inserción o adición de aminoácidos de (a) la secuencia de aminoácidos de un miembro de la familia de

5 proteínas S100, o (b) de la secuencia de aminoácidos de una proteína con una secuencia de aminoácidos al menos un 90%, preferentemente un 95%, más preferentemente un 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una proteína que es un miembro de la familia de proteínas S100, en la que dicha proteína con una secuencia de aminoácidos derivada por delección, inserción o adición de aminoácidos es capaz de causar una reducción de la síntesis de colágeno y/o un aumento de la descomposición de colágeno en fibroblastos humanos. La familia de proteínas S100 es una familia multigénica de proteínas no ubicuas de tipo mano-EF, que se expresa exclusivamente en vertebrados. Los miembros de la familia S100 conocidos actualmente son las proteínas S100A1, S100A2, S100A3, S100A4, S100A5, S100A6, S100A7 (psoriasina), S100A8, S100A9, S100A10, S100A11, S100A12, S100A13, S100A14, S100A15 (koebnerisina), S100A16, S100B, S100P, S100Z, CRNN, FLG, HRNR, IFPS, RPTN, S100G, TCHH y THHL1.

15 Con la expresión "proteína S100A7" se quiere designar a una proteína con la secuencia de aminoácido dada mediante la SEC ID N°: 1, o con una secuencia de aminoácidos al menos un 90%, preferentemente un 95%, más preferentemente un 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos dada mediante la SEC ID NO: 1. Además, con la expresión se quieren incluir proteínas con una secuencia de aminoácidos derivada por delección, inserción o adición de aminoácidos de (a) la secuencia de aminoácidos dada mediante la SEC ID NO:1, o (b) de una secuencia de aminoácidos al menos un 90%, preferentemente un 95%, más preferentemente un 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos dada mediante la SEC ID NO:1, en la que dicha proteína con una secuencia de aminoácidos derivada por delección, inserción o adición de aminoácidos es capaz de causar una reducción de la síntesis de colágeno y/o un aumento de la descomposición de colágeno en fibroblastos humanos.

20 Con la expresión "proteína S100A15" se quiere designar a una proteína con la secuencia de aminoácido dada mediante la SEC ID N°: 2, o con una secuencia de aminoácidos al menos un 90%, preferentemente un 95%, más preferentemente un 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos dada mediante la SEC ID NO: 2. Además, con la expresión se quieren incluir proteínas con una secuencia de aminoácidos derivada por delección, inserción o adición de aminoácidos de (a) la secuencia de aminoácidos dada mediante la SEC ID NO:2, o (b) de una secuencia de aminoácidos al menos un 90%, preferentemente un 95%, más preferentemente un 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos dada mediante la SEC ID NO:2, en la que dicha proteína con una secuencia de aminoácidos derivada por delección, inserción o adición de aminoácidos es capaz de causar una reducción de la síntesis de colágeno y/o un aumento de la descomposición de colágeno en fibroblastos humanos.

30 "Trastorno linfoproliferativo", como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno caracterizado por una proliferación excesiva de fibroblastos y/o tejido conectivo. La expresión incluye, pero no se limita a fibrosis pulmonar, esclerosis sistémica, cirrosis hepática, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar idiopática cardiovascular y aterosclerosis.

35 Las "cicatrices hipertróficas" y los "queloides" son formaciones excesivas de tejido cicatricial. Estos trastornos de la piel tienen características clínicas, histológicas, bioquímicas y moleculares conocidas por el personal experto en la técnica. Notablemente, mientras que ambos tipos de cicatriz aparecen por encima del nivel de la piel, por lo general, sólo los queloides se proyectan más allá de los márgenes originales de la herida, mientras que las cicatrices hipertróficas no se extienden más allá del lugar inicial de la lesión. El experto conoce más diferencias entre estos dos tipos de trastornos de la piel y en la bibliografía pertinente se documentan con detalle (véase, por ejemplo, [6]).

40 En algunos casos, la presente solicitud se refiera a un porcentaje al cual una primera secuencia de aminoácidos es "idéntica" a una segunda secuencia de aminoácidos. Este porcentaje se determina alineando las dos secuencias de aminoácidos utilizando algoritmos apropiados, que son conocidos por el personal experto en la técnica, utilizando parámetros predeterminados; determinando el número de aminoácidos idénticos en la(s) porción(es) alineada(s); dividiendo ese número entre el número total de aminoácidos de la segunda secuencia de aminoácidos; y después, multiplicando el número resultante por 100 para obtener el porcentaje de aminoácidos idénticos.

45 El término "intradérmico", como se usa en el presente documento, en el contexto de la administración intradérmica, se refiere a una administración cuyo resultado es la colocación de la sustancia o mezcla de sustancias administradas dentro o entre las capas de la piel. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la inyección de la sustancia o mezcla de sustancias entre las capas de la piel.

50 El término "tópico", como se usa en el presente documento, en el contexto de la administración tópica, se refiere a una administración de una sustancia o mezcla de sustancias que se produce mediante la aplicación de la sustancia o mezcla de sustancias en la superficie de la piel, preferentemente la superficie de un área de la piel afectada por un trastorno de la piel.

55 La frase "se usa en combinación con", como se usa en el presente documento, en el contexto de una primera sustancia o mezcla de sustancias que se usan en combinación con una segunda sustancia o mezcla de sustancias, quiere indicar que la primera sustancia o mezcla de sustancias se administra junto con una segunda sustancia o mezcla de sustancias. La administración puede ser simultánea o una después de la otra, puede ser a través de la misma vía, o a través de diferentes vías, puede ser mediante la misma forma de dosificación, o mediante formas de dosificación distintas.

La frase sobre que algo/ un acontecimiento se produce “simultáneamente con dicha administración de dicha proteína a dicho paciente que lo necesite” quiere indicar que el acontecimiento se produce (a) al mismo tiempo que se aplica dicha proteína al paciente, (b) en un tiempo que transcurre entre las administraciones individuales de dicha proteína, si la administración de dicha proteína se produce en varias administraciones individuales o (c), después de la administración de dicha proteína, mientras que la proteína aún está presente en el tejido, la sangre o el sistema digestivo del paciente o sobre la superficie de la piel del paciente.

En algunos casos, la presente solicitud se refiere a varios tratamientos preventivos y/o terapéuticos para trastornos de la piel, tales como presoterapia, terapia con gel de silicona, aplicación de flavonoides, aplicación de corticosteroides, crioterapia, escisión de cicatrices, radioterapia, terapia con láser, aplicación de interferón, aplicación de 5-fluorouracilo, aplicación de imiquimod, inhibición de TGFβ1 y/o TGFβ2, y aplicación de TGFβ3. Estos tratamientos son conocidos por la persona experta. Se citan, por ejemplo, en la referencia [1] y se describen con detalle en la bibliografía sobre la técnica.

Cuando la presente solicitud se refiere a una proteína que está siendo “generada dentro de dicho paciente mediante expresión proteica a partir de un ácido nucleico introducido en dicho paciente”, esto significa que se introduce un ácido nucleico, tal como ADN, dentro de una célula de dicho paciente, por ejemplo, una célula de la piel, por ejemplo, por medio de un vector viral que porta dicha secuencia. Mediante la expresión proteica de dicho ácido nucleico se genera una proteína con la secuencia de aminoácidos codificada por dicho ácido nucleico dentro de dicho paciente.

La expresión “administrado externamente”, como se usa en el presente documento en el contexto de una proteína que se está administrando externamente, se refiere a una forma de dispensar una proteína en la cual, la proteína no se dispensa generándola dentro de dicho paciente mediante expresión proteica, sino en la cual la proteína se dispensa desde el exterior, opcionalmente, en forma de una proteína precursora.

La expresión “transportador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un material diluyente o a una formulación auxiliar de cualquier tipo, no tóxica, inerte, sólida, semisólida o líquida. “Farmacéuticamente aceptable” en este contexto quiere indicar que dicho transportador es compatible con los otros ingredientes de la composición farmacéutica y que no es perjudicial para el paciente al que se le administra la composición farmacéutica. Como ejemplos de transportadores farmacéuticamente aceptables se incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones de agua y propilenglicol, o soluciones acuosas de polietilenglicol.

### **Leyendas de las figuras**

#### Figura 1

La figura 1 muestra un descenso de la expresión y producción de S100A7 en tejido queloide.

El panel A muestra el resultado de la PCRc (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) en tiempo real para la expresión de S100A7, que se llevó a cabo a partir de ARN de piel normal (PN) y de tejido cicatricial de queloide preparado según el Ejemplo 1.

El panel B muestra el análisis de transferencia de Western de lisados de células completas incubados con anticuerpos específicos contra S100A7 y β-actina (control de carga), según el Ejemplo 1. hS100A7: anti S100A7 humana; beta actina: anti-β-actina humana.

El Panel C muestra la inmunotinción para S100A7 en secciones tisulares congeladas de piel de individuos normales (izquierda) y pacientes con queloides (derecha). Barra de escala: 20 μm. Mientras que en las secciones de piel de individuos normales se observa una señal de inmunotinción clara, dicha señal no se observa en la epidermis de secciones de piel de queloides, lo que demuestra, por tanto, una marcada regulación descendente de S100A7 en la epidermis de los queloides.

#### Figura 2

La figura 2 muestra inhibición de la expresión de COL1A1, COL1A2, y COL3A1 en fibroblastos humanos por S100A7 y S100A15

El panel A muestra el resultado de la PCRc en tiempo real de COL1A1, COL1A2, and COL3A1 a partir de ARN total de fibroblastos normales (FN) y fibroblastos de queloide (FQ) según el Ejemplo 2. La expresión de COL1A1 y COL3A1 en fibroblastos derivados de queloide (FQ) está aumentada en comparación con la de los fibroblastos normales (FN).

El panel B muestra el resultado de la PCRc en tiempo real de COL1A1 a partir de ARN total extraído después de 6 y 24 horas a partir de FN tratados con las concentraciones indicadas de S100A7 o interferón-γ, según el Ejemplo 2. La expresión de COL1A1 en fibroblastos humanos está inhibida por S100A7.

El panel C muestra el resultado de la PCRc en tiempo real de COL1A1 a partir de ARN total extraído después de 6 y 24 horas a partir de FN tratados con las concentraciones indicadas de S100A15 o interferón-γ (“IFN-γ”), según el Ejemplo 2. La expresión de COL1A1 en fibroblastos humanos está inhibida por S100A15.

El panel D muestra el resultado de la PCRc en tiempo real de COL1A1, COL1A2 y COL3A1 a partir de ARN total extraído después de 24 horas a partir de FN tratados con las concentraciones indicadas de S100A7 o S100A15, respectivamente, según el Ejemplo 2. La expresión de COL1A1 en fibroblastos humanos está inhibida por S100A7 y S100A15.

El panel E muestra el número de células viables en fibroblastos en cultivo tratados con S100A7 y S100A15, y

teñidos con cristal violeta, según el Ejemplo 2.

FN: Fibroblastos normales; FQ: Fibroblastos derivados de queloide; C: Control; IFN- $\gamma$ : Tratamiento con Interferón- $\gamma$ ; A7: Tratamiento con S100A7 a las concentraciones indicadas; A15: Tratamiento con S100A15 a las concentraciones indicadas.

5 **Figura 3**

La figura 3 muestra la inhibición de la expresión de fibronectina, laminina y alfa-actina de músculo liso en fibroblastos humanos por el tratamiento con S100A7 or S100A15, medida mediante PCRc en tiempo real.

C: Control; IFN- $\gamma$ : Tratamiento con Interferón- $\gamma$  (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); A7: Tratamiento con S100A7 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); A15: Tratamiento con S100A15 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

10 **Figura 4**

La figura 4 muestra mediciones mediante PCRc en tiempo real que demuestran la inhibición de la expresión de COL1A1, COL1A2 y COL3A1 (panel A), fibronectina, laminina y alfa-actina de músculo liso (panel B) en fibroblastos humanos, después del tratamiento con una combinación de S100A7 y S100A15 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cada una), en comparación con el tratamiento con interferón- $\gamma$  (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

15 C: Control; IFN- $\gamma$ : Tratamiento con Interferón- $\gamma$  (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); A7 + A15: Tratamiento con una combinación de S100A7 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y S100A15 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

**Figura 5**

20 En la figura 5 se demuestra la inhibición de la expresión de COL1A1, COL1A2 y COL3A1 en fibroblastos derivados de queloide humano, tanto por S100A7 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), como por S100A15 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), en comparación con la inhibición por Interferón- $\gamma$  (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Las mediciones se llevaron a cabo mediante PCRc en tiempo real.

C: Control; IFN- $\gamma$ : Tratamiento con Interferón- $\gamma$  (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); A7: Tratamiento con S100A7 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); A15: Tratamiento con S100A15 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

**Figura 6**

25 La figura 6 muestra la inhibición de la proliferación de fibroblastos después del tratamiento con una combinación de S100A7 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y S100A15 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), determinada mediante un ensayo con BrdU.

CN: Control normal; INF- $\gamma$ : Tratamiento con interferon- $\gamma$  (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); S100A7: Tratamiento con S100A7 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). S100A15: Tratamiento con S100A15 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

**Ejemplos**

30 Adicionalmente, la invención se describirá ahora mediante los siguientes ejemplos, que se ofrecen para ilustrar la invención, no para limitarla.

**Ejemplo 1**

35 Se aislaron fibroblastos primarios normales y de queloide a partir de tejido de piel normal y tejido cicatricial de queloide. Las muestras de tejido se cortaron en trozos pequeños y se colocaron en la placa, con la dermis arriba. Las muestras se incubaron entre diez y veinte días en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) complementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, ampicilina/estreptomicina y anfotericina, a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Los fibroblastos crecieron fuera del tejido y después se tripsinizaron. Sólo las células de los pases 3 a 5 se utilizaron para los experimentos. Las células se sembraron en placas de 12 pocillos o de 6 pocillos en DMEM con SBF al 10%. Después de tres días, el medio se cambió por medio sin suero durante 24 h. 40 Entonces, las células se estimularon con S100A7, S100A15 o interferón- $\gamma$  en DMEM sin suero durante otras 6 o 24 h.

Se extrajo ARN de piel normal (n= 8) y tejido cicatricial de queloide (n= 8), y se llevó a cabo la PCRc en tiempo real para la expresión de S100A7 (véase la figura 1, panel A).

45 Se exploraron lisados celulares totales (15  $\mu\text{g}$  por carril) con anticuerpos específicos contra hS100A7 y  $\beta$ -actina en transferencias de Western (véase la figura 1, panel B).

La inmunotinción para hS100A7 se llevó a cabo en secciones tisulares congeladas de piel de individuos normales y de pacientes con queloide (véase la figura 1, panel C).

**Ejemplo 2**

50 Se extrajo ARN total de fibroblastos normales (n= 3) y de fibroblastos de queloide (n= 3), y se realizó la PCRc en tiempo real (véase la figura 2, panel A).

Se trataron FN (fibroblastos normales) con cualquiera de las diferentes concntraciones de S100A7 y S100A15 en los medios de cultivo (0,001  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , o 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Después de 6 y 24 horas, se extrajo el ARN total de las células y se realizó la PCRc en tiempo real (véase la figura 2, paneles B, C y D).

Los fibroblastos cultivados tratados con S100A7 o S100A15 se tiñeron con cristal violeta y se midieron los números de células viables (véase la figura 2, panel E).

### Ejemplo 3

- 5 El efecto de S100A7 y S100A15 sobre la proliferación de los fibroblastos se determinó mediante un ensayo de BrdU (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), según las instrucciones del fabricante. Los fibroblastos cultivados se expusieron a IFN- $\gamma$  (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), y a S100A15 y S100A7 (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cada una) en combinación durante 48 horas. A las 24 horas se añadió medio de marcaje 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), y la BrdU incorporada durante la proliferación celular se detectó mediante un anticuerpo anti-BrdU marcado con HRP. La absorbancia se midió a 570 nm usando un lector de microplaca.
- 10 La incubación de los fibroblastos cultivados con concentraciones efectivas de colágeno de S100A7 y S100A15 combinadas dio como resultado un descenso significativo de la absorbancia en comparación con los fibroblastos no tratados, lo que indicaba un marcado descenso de la proliferación de fibroblastos. La incubación con IFN- $\gamma$  no redujo la proliferación de fibroblastos; por el contrario, el tratamiento con IFN- $\gamma$  produjo acusados incrementos de la proliferación de fibroblastos, como se muestra en la figura 6.
- 15 Las características de la presente invención desveladas en la memoria descriptiva, en las reivindicaciones y/o en los dibujos adjuntos, podrían, tanto por separado como en cualquier combinación de los mismos, ser un material para la realización de la invención en diversas formas de la misma.

### Referencias

- 20 1. Marneros, A.G. and T. Krieg, Keloids--clinical diagnosis, pathogenesis, and treatment options. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2004. 2(11): p. 905-13.
2. Ladak, A. and E.E. Tredget, Pathophysiology and management of the burn scar. *Clin Plast Surg*, 2009. 36(4): p. 661-74.
3. Brown, J.J. and A. Bayat, Genetic susceptibility to raised dermal scarring. *Br J Dermatol*, 2009. 161(1): p. 8-18.
- 25 4. Armour, A., P.G. Scott, and E.E. Tredget, Cellular and molecular pathology of HTS: basis for treatment. *Wound Repair Regen*, 2007. 15 Suppl 1: p. S6-17.
5. Butler, P.D., M.T. Longaker, and G.P. Yang, Current progress in keloid research and treatment. *J Am Coll Surg*, 2008. 206(4): p. 731-41.
6. Köse, O. and A. Waseem, Keloids and hypertrophic scars: are they two different sides of the same coin? *Dermatol Surg*, 2008. 34(3): p. 336-46.
- 30 7. Szulgit, G., et al., Alterations in fibroblast alpha1beta1 integrin collagen receptor expression in keloids and hyper-trophic scars. *J Invest Dermatol*, 2002. 118(3): p. 409-15.
8. Bock, O., et al., Studies of transforming growth factors beta 1-3 and their receptors I and II in fibroblast of keloids and hypertrophic scars. *Acta Derm Venereol*, 2005. 85(3): p. 216-20.
- 35 9. Ferguson, M.W., et al., Prophylactic administration of avotermin for improvement of skin scarring: three doubleblind, placebo-controlled, phase I/II studies. *Lancet*, 2009. 373(9671): p. 1264-74.
10. Shah, M., D.M. Foreman, and M.W. Ferguson, Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci*, 1995. 108 (Pt 3): p. 985-1002.
11. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(7): p. 517-29.
- 40 12. Donato, R., S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001. 33(7): p. 637-68.
13. Schafer, B.W. and C.W. Heizmann, The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*, 1996. 21(4): p. 134-40.
- 45 14. Watson, P.H., E.R. Leygue, and L.C. Murphy, Psoriasin (S100A7). *Int J Biochem Cell Biol*, 1998. 30(5): p. 567-71.
15. Kim, E.J. and D.M. Helfman, Characterization of the metastasis-associated protein, S100A4. Roles of calcium binding and dimerization in cellular localization and interaction with myosin. *J Biol Chem*, 2003. 278(32): p. 30063-73.

**SECUENCIAS**

La SEC ID N°: 1 es la secuencia proteica de la S100A7 humana (hS100A7), la SEC ID N°: 2 es la secuencia proteica de la S100A15 humana (hS100A15),

SEC ID N°: 1

MSNTQAERSIIGMIDMFHKYTRRDDKIDKPSLLTMMKENFPNFLSACDKKGTN

YLADVFEKKDKNEDKKIDFSEFLSLLGDIATDYHKQSHGAAPCSGGSQ

5

SEC ID N°: 2

MSNTQAERSIIGMIDMFHKYTGRDGKIEKPSLLTMMKENFPNFLSACDKKGIH

YLATVFEKKDKNEDKKIDFSEFLSLLGDIADYHKQSHGAAPCSGGSQ

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Ludwig-Maximilians-Universität Munchen

10

<120> Proteínas de la familia S100 y sus usos

<130> FB25168

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 101

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Ser Asn Thr Gln Ala Glu Arg Ser Ile Ile Gly Met Ile Asp Met  
1 5 10 15

Phe His Lys Tyr Thr Arg Arg Asp Asp Lys Ile Asp Lys Pro Ser Leu  
20 25 30

Leu Thr Met Met Lys Glu Asn Phe Pro Asn Phe Leu Ser Ala Cys Asp  
35 40 45

Lys Lys Gly Thr Asn Tyr Leu Ala Asp Val Phe Glu Lys Lys Asp Lys  
50 55 60

Asn Glu Asp Lys Lys Ile Asp Phe Ser Glu Phe Leu Ser Leu Leu Gly  
65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Asp Tyr His Lys Gln Ser His Gly Ala Ala Pro Cys  
85 90 95

Ser Gly Gly Ser Gln  
100

ES 2 554 824 T3

<210> 2  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 2

Met Ser Asn Thr Gln Ala Glu Arg Ser Ile Ile Gly Met Ile Asp Met  
 1 5 10 15

Phe His Lys Tyr Thr Gly Arg Asp Gly Lys Ile Glu Lys Pro Ser Leu  
 20 25 30

Leu Thr Met Met Lys Glu Asn Phe Pro Asn Phe Leu Ser Ala Cys Asp  
 35 40 45

Lys Lys Gly Ile His Tyr Leu Ala Thr Val Phe Glu Lys Lys Asp Lys  
 50 55 60

Asn Glu Asp Lys Lys Ile Asp Phe Ser Glu Phe Leu Ser Leu Leu Gly  
 65 70 75 80

Asp Ile Ala Ala Asp Tyr His Lys Gln Ser His Gly Ala Ala Pro Cys  
 85 90 95

Ser Gly Gly Ser Gln  
 100

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de la familia S100 para su uso en la prevención, reducción o tratamiento de una cicatriz hipertrófica, un queloide o un trastorno fibroproliferativo, en la que dicha proteína de la familia S100 se selecciona de la proteína S100A7 y la proteína S100A15, y en la que dicha proteína se administra a un paciente en necesidad de la misma.
2. Una proteína de la familia S100 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho trastorno fibroproliferativo es aterosclerosis, cirrosis hepática o fibrosis pulmonar.
- 10 3. Una proteína de la familia S100 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicha proteína S100A7 es una proteína que tiene una secuencia SEC ID N°: 1, o es una proteína que es al menos un 90%, preferentemente al menos un 95%, más preferentemente al menos un 98% idéntica a la secuencia SEC ID N°: 1, y en la que dicha proteína S100A15 es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 2, o es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90%, preferentemente al menos un 95%, más preferentemente al menos un 98% idéntica a la secuencia SEC ID N°: 2.
- 15 4. Una proteína de la familia S100 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho paciente es un mamífero, preferentemente un ser humano.
5. Una proteína de la familia S100 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha proteína se administra por vía intradérmica, preferentemente mediante inyección, y /o por vía tópica, o se administra por vía sistémica, preferentemente mediante inyección o ingestión.
- 20 6. Una proteína de la familia S100 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicha administración intradérmica se produce en un intervalo de dosificación desde 1 µg hasta 50 µg por cm<sup>2</sup>, preferentemente de 1 µg a 10 µg por cm<sup>2</sup> de superficie de piel afectada por dicho trastorno, preferentemente por cm<sup>2</sup> de superficie de piel afectada por formación de cicatriz hipertrófica o formación de queloide.
- 25 7. Una proteína de la familia S100 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicha administración tópica se produce en un intervalo de dosificación desde 10 µg hasta 500 µg por cm<sup>2</sup>, preferentemente de 10 µg a 100 µg por cm<sup>2</sup> de superficie de piel afectada a la que se aplica dicha proteína de la familia S100.
8. Una proteína de la familia S100 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha administración se produce una vez a la semana, si dicha proteína se administra por vía intradérmica, o dos veces al día, si dicha proteína se administra por vía tópica.
- 30 9. Una proteína de la familia S100 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha administración se produce antes, durante y/o después de que dicho paciente haya sufrido una herida superficial.
10. Una proteína de la familia S100 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha proteína se usa en combinación con al menos otra de las diferentes proteínas de la familia S100.
- 35 11. Una proteína de la familia S100 para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicha al menos otra proteína de las diferentes proteínas de la familia S100 se selecciona del grupo que comprende la proteína S100A7 y la proteína S100A15.
- 40 12. Una proteína de la familia S100 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha administración de dicha proteína a dicho paciente que lo necesite es el único tratamiento preventivo o terapéutico con respecto a dicho trastorno de la piel al que se somete a dicho paciente, o en las que, simultáneamente con dicha administración de dicha proteína a dicho paciente que lo necesite, dicho paciente se somete a uno o más tratamientos preventivos o terapéuticos adicionales para tratar trastornos de la piel seleccionados del grupo que comprende presoterapia, terapia con gel de silicona, aplicación de flavonoides, preferentemente de quercetina y/o kaempferol, aplicación de corticosteroides, preferentemente de un compuesto de triamcinolona, crioterapia, escisión de la cicatriz, radioterapia, terapia con láser, aplicación de interferón, preferentemente de interferón-α2b, aplicación de 5-fluorouracilo, aplicación de imiquimod, inhibición de TGF-β1 y/o TGF-β2, y aplicación de TGF-β3.
- 45 13. Una proteína de la familia S100 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha proteína se administra externamente.
- 50 14. Una proteína de la familia S100 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 9 a 13, en la que dicha proteína se genera dentro de dicho paciente mediante expresión proteica a partir de un ácido nucleico introducido en dicho paciente.
15. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína de la familia S100, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en la prevención, reducción o tratamiento de cicatrices hipertróficas, queloides o de un trastorno fibroproliferativo, en la que dicha composición

farmacéutica se administra a un paciente en necesidad de la misma.

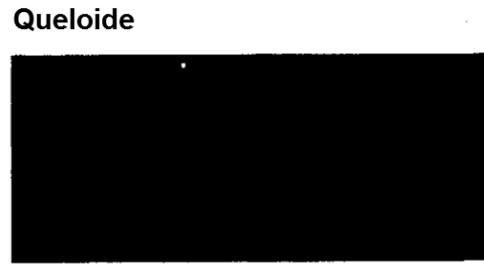
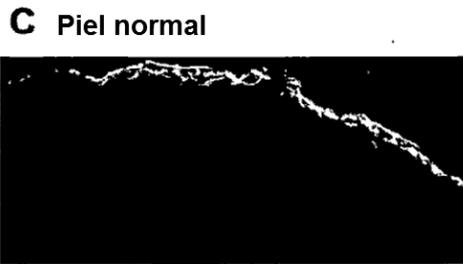
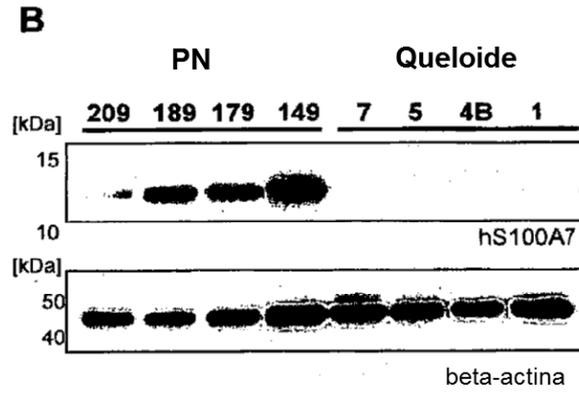
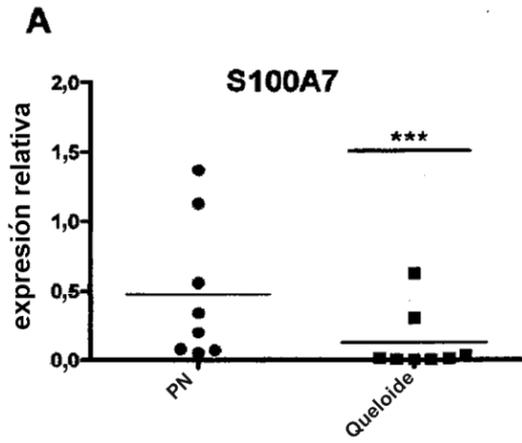


Figura 1

**A**



**Figura 2 A**

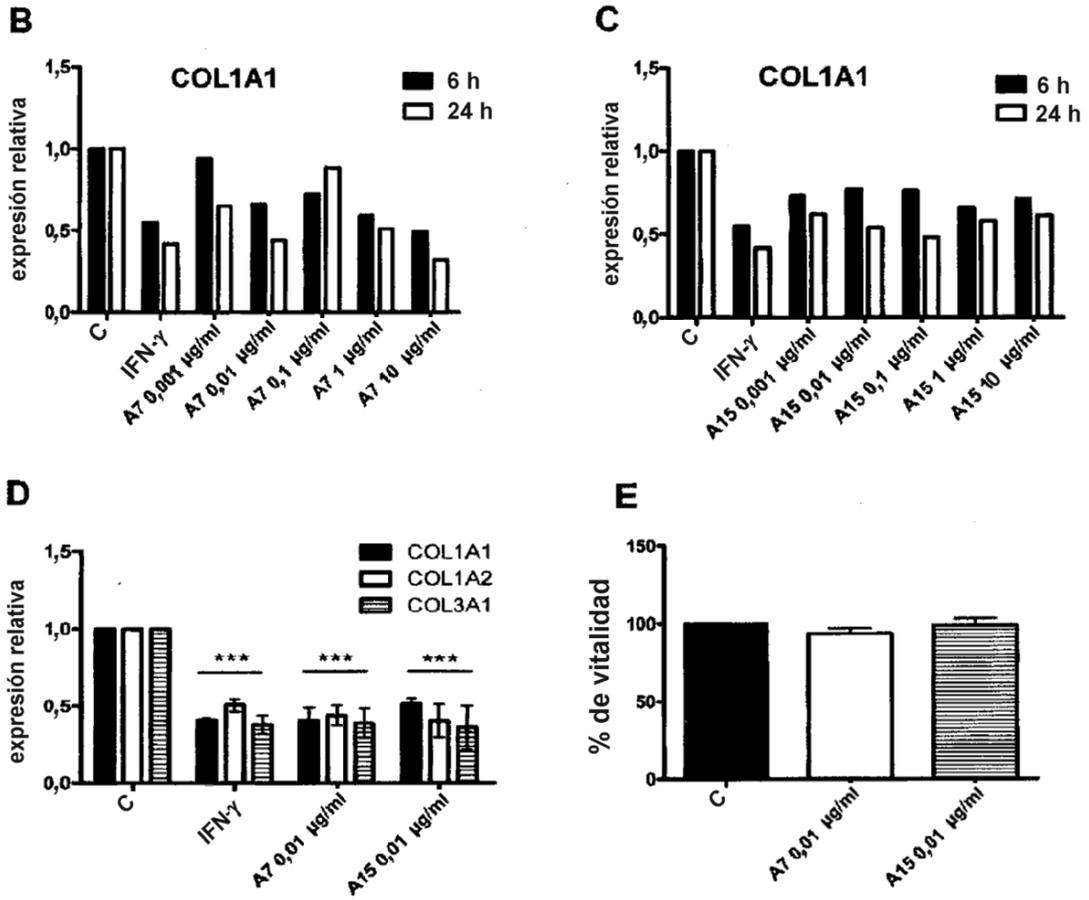


Figura 2 B, C, D, E

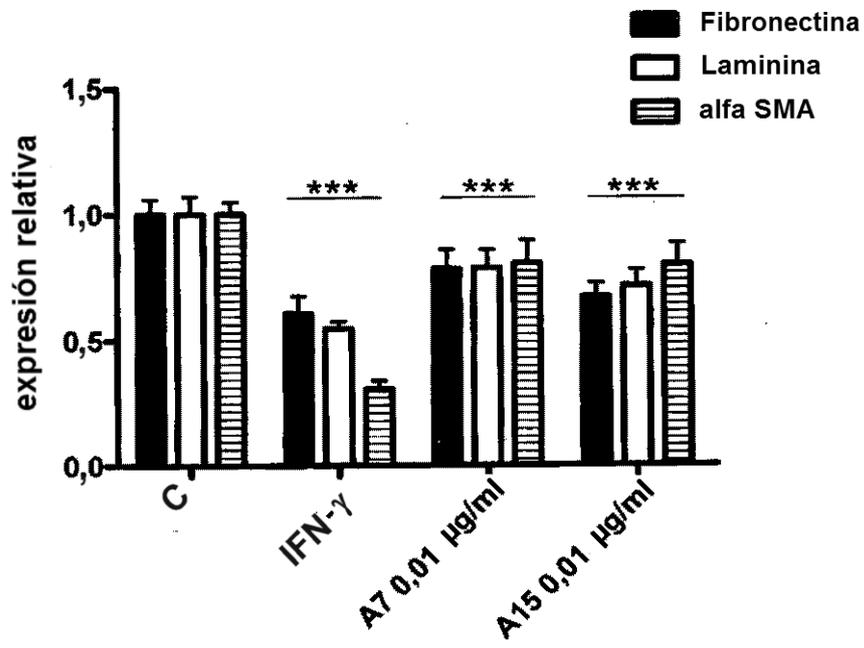


Figura 3

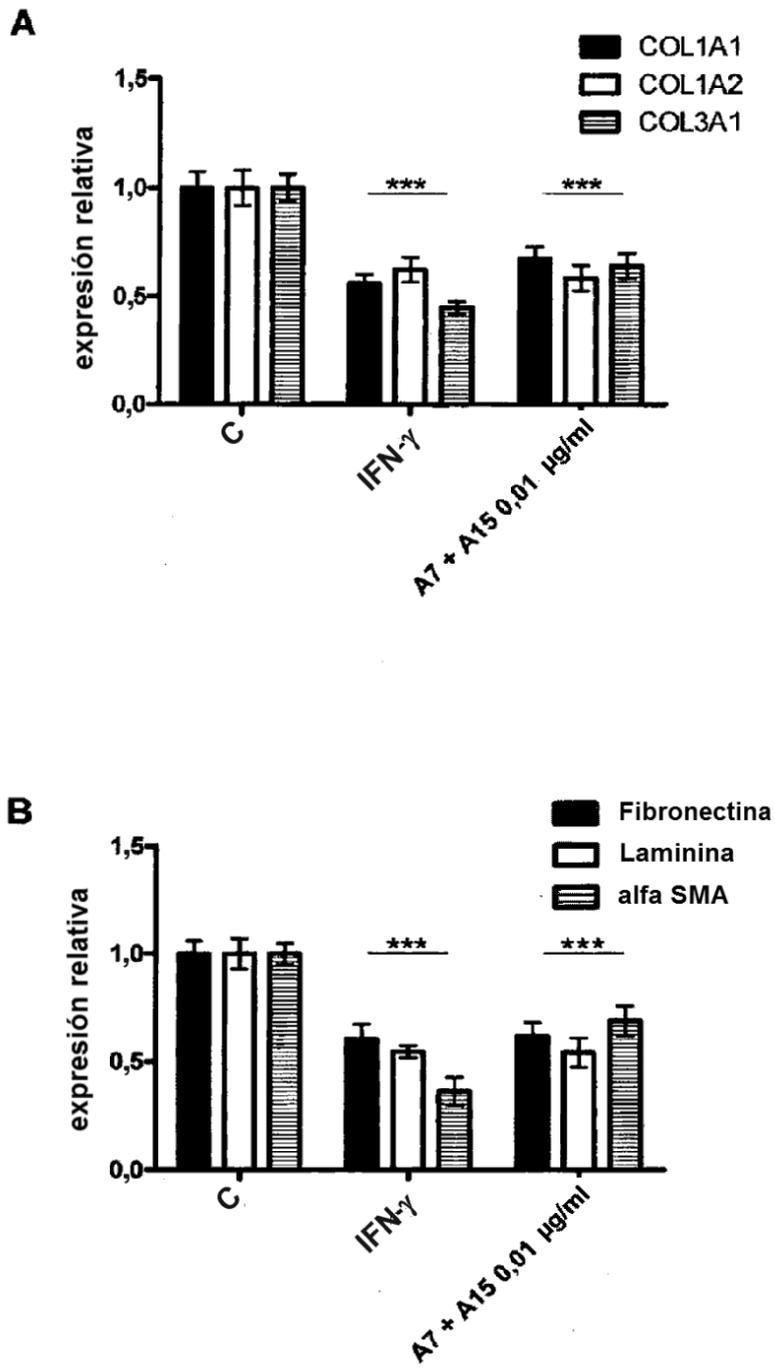


Figura 4

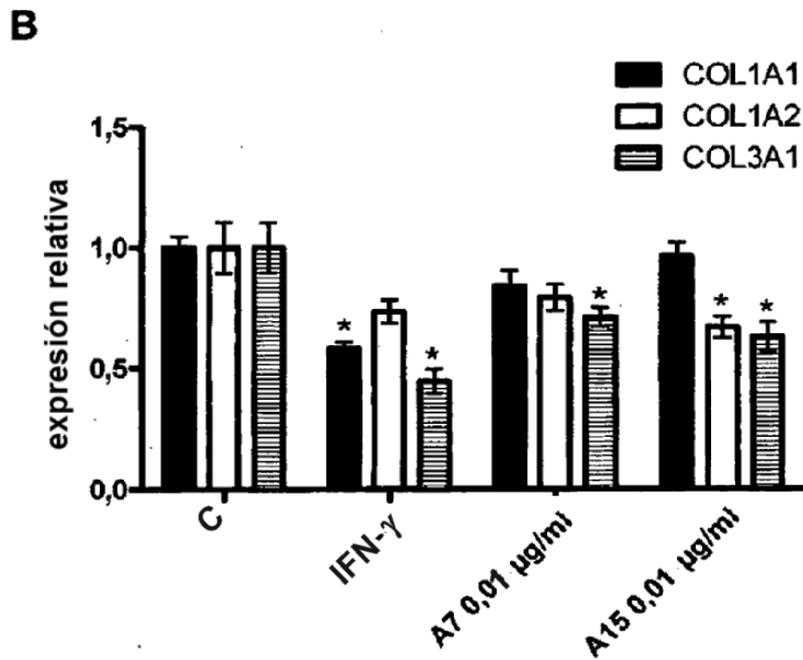
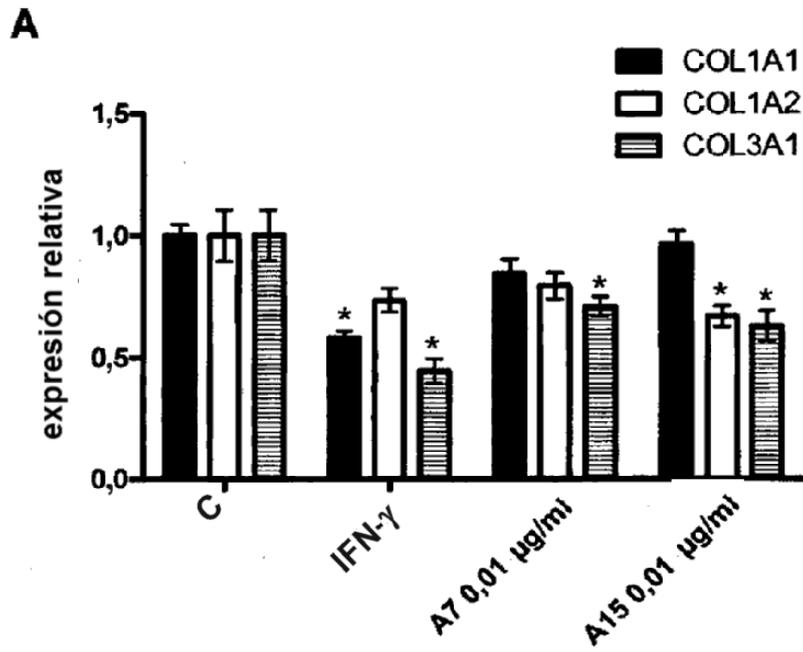


Figura 5

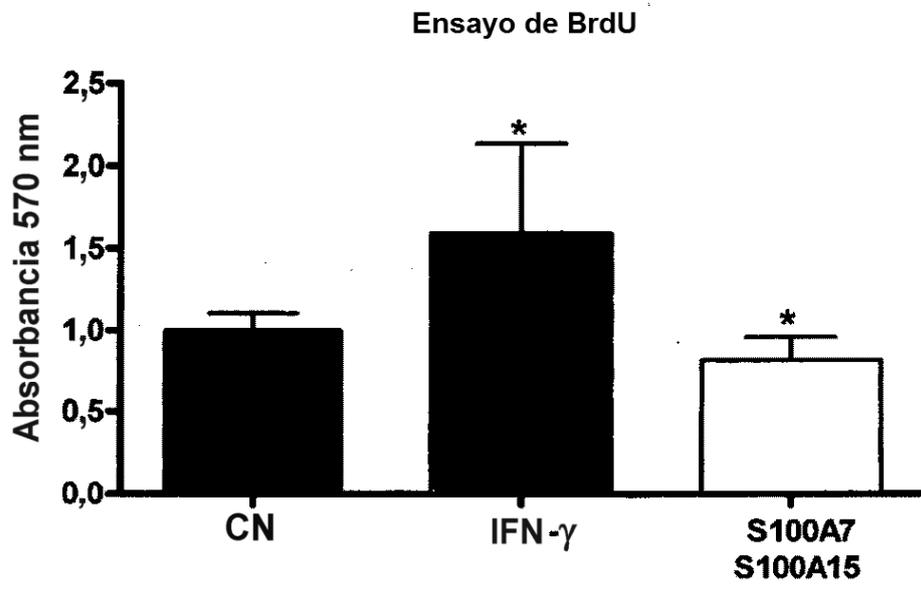


Figura 6