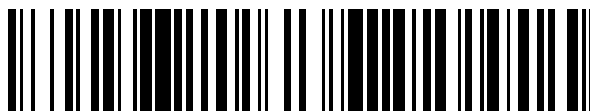


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 785**

51 Int. Cl.:

A61K 31/137 (2006.01)

A61K 31/167 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2009 E 09724558 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2271326**

54 Título: **Agonistas del receptor β 2-adrenérgico para su uso en el tratamiento de cicatrices
queloides e hipertróficas**

30 Prioridad:

27.03.2008 GB 0805535

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

29.03.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF LEICESTER (100.0%)
University Road
Leicester LE1 7RH, GB**

72 Inventor/es:

PULLAR, CHRISTINE ELAINE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el
folleto original publicado por la Oficina
Europea de Patentes**

ES 2 564 785 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

Agonistas del receptor $\beta 2$ -adrenérgico para su uso en el tratamiento de cicatrices queloides e hipertróficas

5 En el presente documento se describen composiciones farmacéuticas, medicamentos y métodos de tratamiento para su uso para modificar de forma simultánea la cantidad de TGF $\beta 1$ y TGF $\beta 3$ que produce un fibroblasto, y para modificar la función, actividad y diferenciación fibroblástica. La invención se refiere a la reducción o prevención de la formación de cicatrices. En el presente documento también se describen composiciones, medicamentos y métodos para su uso en el tratamiento de trastornos fibróticos, para su uso en la modificación del depósito de colágeno, y para su uso en el tratamiento de arrugas en la piel. El alcance de la invención es como se indica en las reivindicaciones.

15 Los fibroblastos están implicados en muchos procesos en el cuerpo. La cicatrización de heridas es un proceso complejo que necesita la activación combinada de numerosos procesos que incluyen la modulación de la actividad fibroblástica. Durante el proceso de cicatrización de la herida, los fibroblastos dérmicos migran al lecho de la herida en el cual el Factor de Crecimiento Transformante 1 (TGF- $\beta 1$) de la herida secretado por células, las moléculas de la matriz (por ejemplo una variante de corte y empalme de la fibronectina) y los estímulos mecánicos (es decir tensión de la matriz) de la herida, inician su diferenciación en miofibroblastos. Los miofibroblastos se pueden distinguir de los fibroblastos de la dermis porque expresan α -actina de músculo liso, contienen haces de microfilamentos contráctiles, y tienen extensos sitios de unión de la célula a la matriz. Los miofibroblastos sintetizan, depositan y remodelan la matriz extracelular para formar tejido fibroso, y de este modo contraen la herida. El tejido conectivo que se forma durante el proceso de curación a menudo es de naturaleza fibrosa, y normalmente forma una cicatriz de tejido conectivo mediante un proceso conocido como fibrosis.

25 En el embrión, los procesos de curación se activan y se detienen para regenerar perfectamente el tejido, y por lo tanto la cicatrización podría no producirse. Sin embargo, en el adulto, la evolución ha optimizado los procesos de cicatrización de heridas para conseguir el cierre rápido de la herida, lo que minimiza el riesgo de infección pero da como resultado la formación de la cicatriz. Vistas macroscópicamente, las cicatrices pueden estar hundidas por debajo de la superficie del tejido circundante, o elevadas por encima de la superficie de la piel no dañada. Las cicatrices pueden ser de color relativamente más oscuro que el tejido no lesionado (hiperpigmentación) o puede tener un color más pálido (hipopigmentación) que las inmediaciones. Tanto las cicatrices hiperpigmentadas como las hipopigmentadas constituyen un defecto cosmético fácilmente observable, y 100 millones de pacientes desarrollan cicatrices de heridas cada año a partir de operaciones optativas, traumatismo, lesiones por quemaduras y queloides. Se ha demostrado que el aspecto cosmético de una herida es uno de los principales factores que contribuyen al impacto psicológico de las heridas sobre el que las sufre, y que estos efectos pueden permanecer durante un largo tiempo después de que la propia herida se haya curado.

40 La actividad excesiva de los miofibroblastos también produce las deformaciones tisulares que son características de las enfermedades fibróticas. Por consiguiente, se piensa los agentes que podrían disminuir la migración, proliferación o diferenciación fibroblástica que reducen la cicatrización y la fibrosis de las heridas. Además, también se ha demostrado que diversos tratamientos que aceleran la reparación de las heridas disminuyen la fibrosis y la cicatrización (Ha *et al.* (2003) Chin Med J (Engl) 116, 1029-33; Huang *et al.* (2002) Faseb J 16, 1269-70; Rodgers *et al.* (2003) J Invest Dermatol 127, 526-37).

45 La prosecución de la curación sin cicatrices ha resaltado diversas diferencias entre las heridas embrionarias y del adulto. En particular, las heridas embrionarias tienen niveles disminuidos de TGF- $\beta 1$ y TGF- $\beta 2$, y niveles aumentados de TGF- $\beta 3$, no presentan respuesta inflamatoria, y contienen algunos fibroblastos, lo que por lo tanto da como resultado una reparación de la herida sin cicatriz. Sin embargo, por el contrario, las heridas en el adulto tienen niveles aumentados de TGF- $\beta 1$ y TGF- $\beta 2$, y niveles disminuidos de TGF- $\beta 3$, presentan respuestas inflamatorias, y contienen muchos fibroblastos, lo que frecuentemente de este modo da como resultado la formación de cicatrices durante la reparación de la herida. Se ha demostrado anteriormente que la reducción de los niveles de TGF- $\beta 1$ en el sitio de la herida en el adulto reduce la formación de cicatriz. Además, se ha demostrado que añadir TGF- $\beta 3$ recombinante a heridas en el adulto reduce la inflamación, el depósito de la matriz y la cicatrización.

55 En el momento actual no hay un producto farmacéutico en el mercado para reducir de forma eficaz la cicatrización de heridas, si bien Renovo tiene dos tratamientos potenciales que actualmente están en los ensayos clínicos, es decir Juvindex™ y Juvista™. Juvindex™ es una formulación de manosa-6-fosfato que inhibe las acciones de TGF- $\beta 1$ y $\beta 2$, mientras que Juvista™ es un TGF- $\beta 3$ de ser humano recombinante. Actualmente Juvindex™ está solo en ensayos clínicos para el tratamiento de la cicatrización de la córnea, debido a que debe utilizarse a muy altas dosis para ser terapéuticamente eficaz, y la única vía por la cual una dosis suficientemente alta se puede administrar es mediante colirios a añadir de forma directa al ojo. Juvista™ ha demostrado ser eficaz en la reducción de las cicatrices si se añade en el momento de la formación de la herida a una herida quirúrgicamente limpia. Sin embargo, Juvista™ es muy caro.

65 El documento WO 2006/108176 se refiere a agonistas y antagonistas de $\beta 2$ AR para la modulación de la cicatrización de heridas, la contracción de heridas y/o la epitelización. Se divulgan diversos usos u observaciones

sobre agonistas de $\beta 2$ AR en los documentos EP 1 719 507; WO 01/94319; WO 2007/137204; US 5.958.432; WO 03/097073; WO 2006/027579; Eggleston *et al.* (1991) Chest 99, 1088-1092; Barzon *et al.* (1991) Eur. Resp. J. 19, 2307-2311; Skipsii *et al.* (1991) Terapevticheski Arkhiv 63, 125-127; Pullar e Isseroff (2005) Wound Rep. & Regen. 13, 405-411; Pullar *et al.* (2006) FASEB J. 20, 76-86; y Akutsu *et al.* (2006) Br. J. Pharmacol. 147, 412-421.

Por lo tanto es un objetivo de la presente invención superar o mitigar uno o más de los problemas de la técnica anterior, ya sea que estén identificados en el presente documento o en otro sitio, y proporcionar composiciones y medicamentos que puedan utilizarse en métodos para modificar de forma simultánea la cantidad de TGF β 1 y TGF β 3 producida por un fibroblasto, para prevenir o reducir la cicatrización, y modificar el depósito de colágeno. Estos tratamientos implican la modulación de la diferenciación, actividad y/o función fibroblástica. La invención es como se indica en las reivindicaciones.

Anteriormente, la inventora de la presente invención ha demostrado que los agonistas del receptor $\beta 2$ -adrenérgico ($\beta 2$ -AR) disminuyen la migración de queratinocitos *in vitro* (Pullar *et al.* (2003) J Biol Chem 278, 22555-62), la reepitelización en la piel de ser humano *ex vivo* (Pullar *et al.* (2006) Faseb J 20, 76-86) y la contracción de geles de colágeno flotantes mediada por fibroblastos de la dermis (Pullar e Isseroff (2005) Wound Repair Regen 13, 405-11), que es un modelo para la homeostasis de la dermis. Basándose en estos hallazgos, la inventora dedujo que los agonistas de $\beta 2$ -AR no aumentan la tasa de cicatrización de heridas. La comprensión general en la técnica es que se espera que un agente que no aumenta la tasa de la cicatrización de heridas, tenga poco o ningún efecto en la reducción o inhibición de la cicatrización. A la inversa, el técnico experto esperaría que un agente que no aumenta la tasa de cicatrización de heridas, también reduzca o inhiba la cicatrización, y otros trastornos fibróticos. Por consiguiente, basándose en las observaciones anteriores de la inventora en las cuales un agonista de $\beta 2$ -AR fue incapaz de aumentar la tasa de cicatrización de heridas, el técnico experto esperaría que el agonista de $\beta 2$ -AR tenga poco o ningún efecto en la reducción de la cicatrización.

Por lo tanto, la inventora investigó el efecto de los antagonistas de $\beta 2$ -AR en la tasa de cicatrización de heridas y la cicatrización con la expectativa de que serían capaces de reducir la cicatrización. Sin embargo, como se muestra en las figuras adjuntas, contrariamente a sus expectativas, la inventora se sorprendió al observar que los antagonistas de $\beta 2$ -AR eran incapaces de reducir o evitar la cicatrización. Sin embargo, encontró que los antagonistas de $\beta 2$ -AR son capaces de modular la actividad de los fibroblastos, y que los antagonistas de $\beta 2$ -AR son capaces de aumentar el depósito de colágeno (Figuras 6 y 7). La inventora investigó el efecto de los agonistas de $\beta 2$ -AR sobre la cicatrización, y se sorprendió al encontrar que un agonista selectivo de $\beta 2$ -AR (por ejemplo salbutamol) alteró la cantidad de citocinas que secretan los fibroblastos de la dermis, en comparación con un control. En particular, como se muestra en la Figura 9, la inventora observó de forma bastante inesperada que el agonista de $\beta 2$ -AR disminuía la cantidad de TGF- β 1 que se secretó a partir de fibroblastos de la dermis, mientras que aumentaba de forma simultánea la cantidad de TGF- β 3 que se secretó a partir de fibroblastos. Aunque la inventora no desea estar limitado por ninguna hipótesis, la inventora cree que esta modificación en el perfil de citocinas (es decir, disminución de la concentración de TGF- β 1 y aumento de la concentración de TGF- β 3) en el fibroblasto disminuye la tasa de diferenciación de fibroblastos en una herida, disminuyendo de este modo la concentración de miofibroblastos en la herida. Estudios anteriores han demostrado que la reducción de los niveles de TGF- β 1 y el aumento de los niveles de TGF- β 3 en el sitio de la herida en el adulto, dan como resultado una reducción de la formación de cicatrices. Por lo tanto, la inventora cree que este efecto doble obtenido después de la aplicación de un único compuesto (es decir el agonista selectivo de $\beta 2$ -AR) sería terapéuticamente eficaz para el tratamiento de los trastornos fibróticos, para su uso en modificación del depósito de colágeno y para su uso en la reducción de la cicatrización. Los datos en la Figura 9 también muestran que un antagonista selectivo de $\beta 2$ -AR aumenta de forma simultánea la secreción de TGF- β 1 y TGF- β 2 en los fibroblastos de la dermis.

Además, datos adicionales demostraron un aumento mediado por agonista de $\beta 2$ -AR en el cierre de heridas de la piel de ratones (como se muestra en la Figura 3), y la inventora postula adicionalmente que una reducción de la concentración de los miofibroblastos de la herida disminuye el depósito de la matriz mediada por miofibroblastos, el remodelado de la herida, y por lo tanto la cicatrización. Se apreciará que las cicatrices son áreas de tejido fibroso que reemplazan al tejido normal después de la lesión, mediante un proceso conocido como fibrosis. La inventora también ha demostrado que un agonista de $\beta 2$ -AR disminuye la concentración de la α -actina del músculo liso en la dermis (como se muestra en las Figuras 4 y 5), y también disminuye la cantidad de depósito de colágeno en la dermis (como se muestra en las Figuras 6 y 7). La inventora también ha demostrado que los agonistas de $\beta 2$ -AR disminuyen la incorporación de células inflamatorias en las heridas (Figuras 10 a 14) y que los agonistas de $\beta 2$ -AR disminuyen la cantidad de VEGF, mientras que los antagonistas de $\beta 2$ -AR aumentan la cantidad de VEGF que secretan los fibroblastos y neutrófilos de la dermis. Por lo tanto, la inventora cree que un agonista de $\beta 2$ -AR puede también aprovecharse para el tratamiento o la prevención de trastornos fibróticos particulares y que los moduladores de $\beta 2$ -AR pueden modular de forma simultánea la expresión de TGF β 1 y TGF β 3 que produce un fibroblasto, modular la diferenciación, actividad y función fibroblástica, y modular el depósito de colágeno.

Los inventores proporcionan composiciones para su uso en la disminución de la cantidad de TGF β 1 y el aumento de la cantidad de TGF β 3 que produce un fibroblasto de forma simultánea. El fibroblasto se pone en contacto con un agente que modula de forma positiva el receptor $\beta 2$ -adrenérgico.

Antes de la presente invención no se había apreciado que la modulación de $\beta 2$ -AR podría modificar de forma simultánea la cantidad de TGF $\beta 1$ y TGF $\beta 3$ que produce un fibroblasto y tampoco se había apreciado que los agentes que modulan $\beta 2$ -AR podrían influenciar los procesos implicados en la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos, la secreción de VEGF (estando VEGF implicado en los procesos angiogénicos que pueden estar asociados con la enfermedad fibrótica), y el depósito de colágeno.

Los inventores describen composiciones para su uso en la reducción de la diferenciación fibroblástica. El fibroblasto se pone en contacto con un agente que modula de forma positiva el receptor $\beta 2$ -adrenérgico.

El miofibroblasto es un factor clave en la reconstrucción fisiológica del tejido conectivo en la dermis después de la lesión y en los acontecimientos patofisiológicos que conducen a la fibrosis tisular. La diferenciación del fibroblasto a miofibroblasto es un proceso de dos etapas: de forma inicial, a los pocos días de producida la herida, fibroblastos "quiescentes" sin movilidad en la dermis adquieren un fenotipo migratorio mediante la regulación positiva de la expresión de fibras de estrés, haces contráctiles que permiten que los fibroblastos generen pequeñas fuerzas de tracción para moverse hacia la dermis de la herida. De forma adicional, el entorno de la dermis de la herida estimula a los fibroblastos "activados" para diferenciarse en miofibroblastos. Los estímulos principales para la diferenciación fibroblástica son TGF $\beta 1$, una variante de corte y empalme de la fibronectina de la dermis (ED-A FN) y la tensión mecánica en la dermis de la herida. TGF $\beta 1$ es la principal citocina profibrótica conocida hasta la fecha. Estos estímulos promueven la expresión de la alfa actina del músculo liso (α -MLA), la que se incorpora en los haces contráctiles en la célula permitiendo que los miofibroblastos remodelen de forma activa el colágeno sintetizado recientemente etc. para formar la dermis de la herida cicatrizante. Durante la cicatrización normal de la herida, cuando se completa la reparación, los miofibroblastos en la dermis morirán mediante apoptosis y la remodelación cesará. En la reparación patofisiológica de heridas, los miofibroblastos continúan sintetizando y remodelando la matriz, lo que da como resultado la cicatrización hipertrófica.

Es particularmente preferente disminuir la diferenciación fibroblástica mediante el uso de un agente que module de forma positiva $\beta 2$ -AR, debido a que esto reduce el número de miofibroblastos en la dermis de la herida y por lo tanto reduce el depósito de colágeno y el remodelado.

Los inventores describen composiciones para su uso en la disminución de la cantidad de VEGF que secreta un fibroblasto o un neutrófilo. El fibroblasto o neutrófilo se pone en contacto con un agente que modula de forma positiva el receptor $\beta 2$ -adrenérgico.

VEGF es el promotor principal de la angiogénesis en la herida. Las heridas crónicas tienen angiogénesis reducida y VEGF puede acelerar la curación en heridas crónicas pero también aumentar la cicatrización.

En los aspectos posteriores, se prefiere que el fibroblasto sea un fibroblasto de la dermis. Se prefiere que el fibroblasto esté presente en un animal (es decir el método se lleva a cabo en el animal). Se prefiere que el animal sea un ser humano. Normalmente, el fibroblasto está presente en el sitio de la herida.

Los inventores proporcionan composiciones para su uso en la reducción del depósito del colágeno en un sujeto. Se administra un agente que modula de forma positiva el receptor $\beta 2$ -adrenérgico.

Uno de los cambios más visibles asociados con el proceso de envejecimiento en los seres humanos se relaciona con una disminución progresiva del grosor de la piel y la aparición de arrugas gruesas y finas. El mecanismo de la formación de arrugas parece implicar cambios de componentes de la matriz extracelular de la dermis, incluyendo pérdida del depósito de colágeno I. La laxitud, las arrugas y el fotoenvejecimiento de la piel en general se tratan mediante procedimientos ablativos que lesionan o destruyen la epidermis y su membrana basal, al menos al principio, y posteriormente conduce a la fibrosis de la dermis papilar. El tratamiento ideal sería conservar la epidermis y promover la formación normal de colágeno y elastina en la dermis. Los inventores han demostrado que un antagonista de $\beta 2$ -AR promueve el depósito de colágeno mediado por fibroblastos de la dermis (Figuras 6 y 7). Por lo tanto, la aplicación del antagonista de $\beta 2$ -AR, en particular su aplicación tópica, promovería el depósito de colágeno, restableciendo la elasticidad de la piel y reduciendo el aspecto de líneas finas y arrugas, proporcionando así un medio para combatir o reducir las arrugas.

Los inventores proporcionan una composición para su uso en la prevención, reducción o inhibición (de forma colectiva "combatir") la cicatrización en un sujeto, mediante la administración de tal tratamiento a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, que modula de forma positiva la conformación del receptor $\beta 2$ -adrenérgico, o la actividad del receptor, o la activación del mismo.

Los hallazgos de la inventora que un agente, que modula de forma positiva $\beta 2$ -AR (tal como un agonista de $\beta 2$ -AR), reduce la cicatrización y los trastornos fibróticos fueron inesperados debido a dos razones. En primer lugar, la observación se contraponen con la compresión general en el campo técnico, que sugiere que un modulador negativo de $\beta 2$ -AR debería en efecto reducir la cicatrización, y que un modulador positivo no debería tener efecto en la cicatrización. Por consiguiente, el técnico experto no esperaría que un modulador positivo sea eficaz para reducir la cicatrización o para tratar los trastornos fibróticos. En segundo lugar, el técnico experto no esperaría que el

modulador positivo de $\beta 2$ -AR disminuya la concentración de TGF- $\beta 1$ así como el aumento de forma simultánea la concentración de TGF- $\beta 3$. Como se indica anteriormente, no hay nada en la técnica anterior que indique que un agonista de $\beta 2$ -AR module de forma fortuita los niveles de TGF- $\beta 1$ y TGF- $\beta 3$ de forma simultánea.

5 Además, se sabe que los moduladores de $\beta 2$ -AR para su uso en los métodos de la invención son seguros y bien tolerados en el hombre. No se observaron efectos adversos en los experimentos *in vivo* descritos en los Ejemplos utilizando el modulador positivo, que no sea el retraso de la reparación de la herida. Más aún, los moduladores de $\beta 2$ -AR son baratos y fáciles de fabricar.

10 El técnico experto apreciará lo que denota la expresión “receptor $\beta 2$ -adrenérgico” o “ $\beta 2$ -AR”. Estos receptores se conocen en la técnica y se han revisado en Johnson M, (J Allergy Clin. Immunol. (2006) 117, 18-24). Sin embargo, para evitar dudas, los receptores adrenérgicos son una clase de receptores acoplados a proteína G que se unen a, y se activan mediante, sus ligandos endógenos, las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina. Los receptores adrenérgicos caen dentro de 5 tipos: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, y $\beta 3$, y la presente invención atañe al receptor $\beta 2$ -adrenérgico (es decir $\beta 2$ -AR). Las secuencias de ADN y de proteína para el receptor $\beta 2$ -adrenérgico de ser humano están disponibles en bases de datos de acceso libre y se discuten en Kobilka *et al.* (1987 PNAS 84, 46-50). La localización cromosómica del gen que codifica el receptor $\beta 2$ -adrenérgico es el cromosoma Sq 31-32. De forma adicional, está disponible la estructura cristalina del $\beta 2$ -AR (Rasmussen S *et al.* Nature (2007) 450, 383-387).

20 Por la expresión “modula de forma positiva la conformación del receptor $\beta 2$ -adrenérgico”, los inventores se refieren al agente (o modulador) que es capaz de modificar la forma y configuración tridimensional del receptor de su conformación inactiva a la activa.

25 Preferentemente, el agente, que modula de forma positiva $\beta 2$ -AR de acuerdo con la invención, es capaz de modular de forma selectiva la conformación del receptor $\beta 2$ -adrenérgico, o la actividad del receptor, o la activación del mismo. Por lo tanto, el agente es un modulador positivo selectivo de $\beta 2$ -AR.

30 Por la expresión “modula de forma selectiva”, los inventores se refieren a que el agente modifica la conformación de $\beta 2$ -AR, o potencia o bloquea la actividad de $\beta 2$ -AR, o la activación del mismo (dado que el caso puede depender de si el agente es un modulador positivo o negativo) en mayor medida, o a dosis más bajas, que otros tipos de receptores adrenérgicos, es decir receptores $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta 1$ -, o $\beta 3$ -adrenérgicos. Por lo tanto, es preferente que el agente sea selectivo para el receptor $\beta 2$ -adrenérgico. Se apreciará que un β bloqueado inhibe a los receptores $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, y $\beta 3$ -adrenérgicos en medida similar, y, así, no inhibe de forma selectiva al receptor $\beta 2$ -adrenérgico. De forma semejante, los bloqueantes α inhiben a los receptores $\alpha 1$ - y a los $\alpha 2$ -adrenérgicos, y, así, no inhiben de forma selectiva al receptor $\beta 2$ -adrenérgico.

El agente, el cual modula de forma positiva $\beta 2$ -AR, es capaz de: -

- 40 (i) modificar el estado conformacional del receptor, por ejemplo mediante la estabilización de la conformación activa del receptor y/o manteniendo el receptor en su conformación activa para de este modo permitir que el receptor se una a su ligando natural, es decir las catecolaminas;
- (ii) unirse al receptor $\beta 2$ -adrenérgico, y aumentar, promover o incrementar la transmisión en el receptor;
- (iii) promover o activar las rutas de señalización aguas abajo mediante la unión del modulador al receptor;
- 45 (iv) aumentar, promover o incrementar la transcripción, traducción o expresión del receptor $\beta 2$ -adrenérgico;
- (v) aumentar la síntesis o la liberación del receptor $\beta 2$ -adrenérgico, o los agonistas del mismo, a partir de depósitos intracelulares; o
- (vi) disminuir la tasa de degradación del receptor $\beta 2$ -adrenérgico, o de los agonistas del mismo.

50 Se apreciará que cada uno de los mecanismos (i) a (vi) da como resultado la modificación de la transmisión en el receptor, y por lo tanto la actividad del mismo, para de este modo modular de forma positiva al receptor $\beta 2$ -adrenérgico.

Así mismo los agentes que modulan de forma negativa $\beta 2$ -AR son conocidos y en general tienen los efectos opuestos a los de los agentes que modulan de forma positiva $\beta 2$ -AR.

55 Como se indica en el presente documento, el técnico experto no esperaría que el agente, que modula de forma positiva $\beta 2$ -AR, disminuya la concentración de TGF- $\beta 1$, así como el aumento de forma simultánea de la concentración de TGF- $\beta 3$ secretada a partir de fibroblastos. Convenientemente, el agente, que modula de forma positiva $\beta 2$ -AR, es capaz de disminuir la concentración de TGF- $\beta 1$ que se secreta a partir de fibroblastos en al menos el 5 %, más convenientemente al menos el 10 %, incluso más convenientemente al menos el 15 %, y todavía más convenientemente al menos el 20 %, en comparación con la concentración de TGF- $\beta 1$ que se secretaría a partir de fibroblastos en ausencia del modulador positivo. Preferentemente, el agente, que modula de forma positiva $\beta 2$ -AR, es capaz de disminuir la concentración de TGF- $\beta 1$ que se secreta a partir de fibroblastos al menos el 25 %, más preferentemente al menos el 30 %, incluso más preferentemente al menos el 35 %, y aún más preferentemente al menos el 40 %, en comparación con la concentración de TGF- $\beta 1$ que se secretaría a partir de fibroblastos en ausencia del modulador positivo. Es especialmente preferente que el agente, el cual modula de forma positiva $\beta 2$ -

AR, sea capaz de disminuir la concentración de TGF- β 1 que se secreta a partir de fibroblastos en al menos el 45 %, más preferentemente al menos el 50 %, y aún más preferentemente al menos el 55 % en comparación con la concentración de TGF- β 1 que se secretaría a partir de fibroblastos en ausencia del modulador positivo.

5 Convenientemente, el agente, que modula de forma positiva β 2-AR, es capaz de aumentar la concentración de TGF- β 3 que se secreta a partir de fibroblastos en al menos el 25 %, más convenientemente al menos el 50 %, incluso más convenientemente al menos el 100 %, y aún más convenientemente al menos el 125 % en comparación con la concentración de TGF- β 3 que se secretaría a partir de fibroblastos en ausencia del modulador positivo. Preferentemente, el agente, el cual modula de forma positiva β 2-AR, es capaz de aumentar la concentración de TGF- β 3 secretado a partir de fibroblastos en al menos el 150 %, más preferentemente al menos el 175 %, incluso más preferentemente al menos el 200 %, y aún más preferentemente al menos el 225 %, en comparación con la concentración de TGF- β 3 que se secretaría a partir de fibroblastos en ausencia del modulador positivo. Es especialmente preferente que el agente, el cual modula de forma positiva β 2-AR, sea capaz de aumentar la concentración de TGF- β 3 secretado a partir de fibroblastos en al menos el 250 %, más preferentemente al menos el 275 %, y aún más preferentemente al menos el 300 % en comparación con la concentración de TGF- β 3 que se secretaría a partir de fibroblastos en ausencia del modulador positivo. Como se muestra en la Figura 9, la inventora observó de forma bastante inesperada que el agonista de β 2-AR disminuyó la cantidad de TGF- β 1 que se secretaba a partir de fibroblastos de la dermis en cuatro veces, mientras que aumentaba de forma simultánea la cantidad de TGF- β 3 que se secretaba a partir de fibroblastos en cinco veces. Se apreciará que el modulador positivo del receptor β 2-adrenérgico se puede adaptar para modular las concentraciones de TGF- β 1 y de TGF- β 3 hasta cualquier grado como se indica en el presente documento, por ejemplo reduciendo la concentración de TGF- β 1 en alguno del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % y así, y aumentando la concentración de TGF- β 3 en cualquiera del 25 %, 50 %, 75 % y etcétera, preferentemente *in vivo*.

25 Como se muestra en la Figura 9, la inventora observó de forma bastante inesperada que el antagonista de β 2-AR aumentó la cantidad de TGF- β 1 que se secretaba a partir de fibroblastos de la dermis en tres veces, mientras que aumentaba de forma simultánea la cantidad de TGF- β 2 que se secretaba a partir de fibroblastos de la dermis en 1,6 veces.

30 Convenientemente, el valor de la afinidad de unión (valor K_i) del modulador positivo del receptor β 2-adrenérgico es menor que aproximadamente 100 nM, más convenientemente menor que 80 nM, y más convenientemente menor que 50 nM. Preferentemente, el valor K_i del modulador positivo para el receptor β 2-adrenérgico es menor que 30 nM, más preferentemente menor que 15 nM, y más preferentemente menor que 10 nM.

35 Un agente preferente, que modula de forma positiva β 2-AR, es un agonista del receptor β 2-adrenérgico. Por el término "agonista", los inventores se refieren a una molécula que se une de forma selectiva al receptor β 2-adrenérgico para iniciar la reacción de transducción de señales.

40 Un agonista adecuado se puede seleccionar de una lista de agonistas que consiste en un compuesto químico orgánico o inorgánico simple; un péptido; una proteína; un ácido nucleico; un azúcar; un anticuerpo (o un fragmento activo del mismo); o cualquier otro agente biológico o químico; cada uno de los cuales es capaz de modificar la conformación/estabilidad del receptor, o de inducir la actividad del receptor. Los agonistas adecuados del receptor β 2-adrenérgico pueden incluir fenoterol, butoxamina, salbutamol, clenbuterol, formoterol, o salmeterol. Sin embargo, un agonista selectivo de receptor β 2-adrenérgico preferente es salbutamol, según se describe en los Ejemplos. Salbutamol es un agonista de β 2-AR altamente selectivo, y será conocido para el técnico experto.

50 El log K_d (constante de disociación) del salbutamol para β 1 es -4,66, para β 3 es -4,33, y para β 2 es -6,12. Por lo tanto, el log K_d es mucho menor para el receptor β 2-adrenérgico que para el β 1- o para el β 3-AR. Por lo tanto el salbutamol es al menos el 29 veces más selectivo para β 2-AR que para el β 1-AR, y 62 veces más selectivo para β 2-AR que para el β 3-AR, y por lo tanto puede describirse como que es un agonista selectivo de β 2-AR.

55 Los inventores proporcionan un agente que modula de forma positiva el receptor β 2-adrenérgico para su uso en, de forma simultánea, la disminución de la cantidad de TGF β 1 y el aumento de la cantidad de TGF β 2 que produce un fibroblasto o un neutrófilo; para la reducción de la diferenciación fibroblástica; para la disminución de la cantidad de VEGF que secreta un fibroblasto; para de forma simultánea disminuir la cantidad de TGF β 1 y aumentar la cantidad de TGF β 3 en el sitio de la herida; para reducir el depósito de colágeno en un sujeto.

60 Los inventores describen un agente que modula de forma positiva al receptor β 2-adrenérgico en la fabricación de un medicamento para su uso en, de forma simultánea, la disminución de la cantidad de TGF β 1 y el aumento de la cantidad de TGF β 2 que produce un fibroblasto; para la reducción de la diferenciación de fibroblastos o neutrófilos; para la disminución de la cantidad de VEGF que secreta un fibroblasto; para de forma simultánea disminuir la cantidad de TGF β 1 y aumentar la cantidad de TGF β 3 en el sitio de la herida; para reducir la depósito de colágeno en un sujeto.

65 Se apreciará que la capacidad de los agentes para tener los efectos descritos en relación con la modulación de la cantidad de TGF β 1 y TGF β 3 que produce un fibroblasto, en la modulación de la diferenciación de fibroblastos, en la

modulación de la secreción de VEGF de un fibroblasto, y en la modulación del depósito de colágeno, da lugar a muchos usos clínicos en la piel sin lesiones, por ejemplo para tratar el eccema o la soriasis.

Se apreciará que la capacidad de los usos de la invención, que implica un agente que modula de forma positiva β 2-AR para tratar los trastornos fibróticos o para reducir la cicatrización, significa que estos usos son valiosos en un amplio rango de situaciones clínicas. Los medicamentos de acuerdo con la invención pueden utilizarse para reducir la cicatrización como resultado de muchos tipos de lesión distintos. Por ejemplo, los medicamentos de la invención se pueden utilizar para reducir la cicatrización provocada por heridas penetrantes o heridas no penetrantes formadas como resultado de agresiones o lesiones físicas que incluyen (pero sin limitación): rozaduras, abrasiones, incisiones quirúrgicas, y otros procedimientos quirúrgicos (en particular injertos de grosor parcial de tejidos tales como la piel), "quemaduras" (las que, excepto donde el contexto requiere lo contrario, se puede considerar que incluyen daño tisular como resultado de la exposición a altas o bajas temperaturas, a agentes químicos o a radiación) u otras formas de traumatismo.

Se sabe que TGF- β 1 promueve la cicatrización durante la cicatrización de heridas, y que TGF- β 3 reduce la cicatrización. Por consiguiente, debido a que los medicamentos proporcionados en el presente documento han mostrado reducir de forma sorprendente los niveles de TGF- β 1 y de forma simultánea aumentar los niveles de TGF- β 3 en un fibroblasto, la cicatrización durante la cicatrización de heridas se puede evitar. Esto es particularmente importante cuando el tratamiento de afecciones oftalmológicas como una cicatriz en el ojo con frecuencia da como resultado una pérdida de la calidad de visión. Por lo tanto, los medicamentos proporcionados en el presente documento pueden utilizarse en el tratamiento de las afecciones oftalmológicas, tales como defectos epiteliales persistentes, queratitis neurotrófica, queratopatía bullosa, extirpación de lesiones, tales como tumor de la conjuntiva, y en asociación con la cirugía de trasplante de células madre.

Los inventores han encontrado que el agonismo de la actividad del receptor β 2-adrenérgico es particularmente eficaz en la prevención o el tratamiento de cicatrices, por ejemplo una cicatriz patológica. Por lo tanto, los usos de acuerdo con la invención son utilizados para la reducción de la formación de una cicatriz seleccionada un grupo de cicatrices que consiste en cicatrices queloides y cicatrices hipertróficas.

Los agentes para los usos de acuerdo con la invención que modulan de forma positiva β 2-AR se utilizan en la reducción de la formación de cicatrices de acuerdo con las reivindicaciones, lo que puede estar asociado con los procedimientos de injerto. El tratamiento que utiliza los agentes de la invención será beneficioso en un sitio donante de injerto (en el cual puede ayudar al restablecimiento de una capa epitelial funcional mientras que se reduce la formación de cicatriz), y también en los sitios receptores de injerto (en los cuales los efectos anticicatrización del tratamiento reducen la formación de cicatrices). La inventora cree que los agentes de la invención confieren ventajas en los contextos de injertos que utilizan piel, piel artificial, y sustitutos de piel.

Los agentes de acuerdo con la invención que modulan de forma positiva β 2-AR se pueden aplicar al sitio de la herida o a un sitio que puede dar como resultado cicatrización de acuerdo con las reivindicaciones, como un injerto o parche a un lado, por debajo, o sobre el área afectada y adyacente al tejido sano, como se describe de forma amplia en la bibliografía publicada. Por lo tanto, debería apreciarse que el agente, que modula de forma positiva β 2-AR (por ejemplo un agonista), se puede aplicar de forma directa al sitio a ser tratado. Como alternativa, el modulador positivo se puede procesar en una composición terapéuticamente aceptable adecuada para la aplicación posterior, tal como un aceite, crema, aerosol, hidrogel o líquido, dependiendo del sitio de tratamiento, como se describe en el presente documento.

Los agentes de acuerdo con la invención que modulan de forma positiva β 2-AR, de acuerdo con las reivindicaciones se pueden utilizar durante el trasplante de piel, o como un vendaje biológico para la piel quemada, para heridas de la piel, y para úlceras crónicas, por ejemplo en la pierna, como un tejido suplementario en la reconstrucción quirúrgica de partes corporales artificiales, o para prevenir la adhesión tisular en procedimientos quirúrgicos del abdomen, la cabeza y la pelvis.

La prevención o la reducción de la cicatrización en el contexto de la presente invención debería entenderse como que abarca cualquier reducción de la cicatrización de acuerdo con las reivindicaciones, en comparación con el nivel de cicatrización que se presenta en una herida tratada de control o no tratada, es decir una a la que no se ha administrado un agente que modula de forma positiva β 2-AR. Aunque los agentes que modulan de forma positiva β 2-AR se pueden utilizar para reducir la cicatrización de heridas y/o tratar trastornos fibróticos en un amplio intervalo de tejidos descritos en el presente documento, se utilizan para reducir la cicatrización de la piel. La reducción de la cicatrización de la dermis lograda utilizando los usos de la invención se puede evaluar con referencia al aspecto microscópico y/o, preferentemente macroscópico de una cicatriz tratada en comparación con el aspecto de una cicatriz no tratada. Más preferentemente, la reducción en la cicatrización se puede evaluar con referencia al aspecto macroscópico y microscópico de la cicatriz tratada. Por la expresión "cicatriz tratada", los inventores se refieren a una cicatriz formada en la curación de una herida tratada, mientras que una "cicatriz no tratada" se refiere a la cicatriz formada en la curación de una herida no tratada, o de una herida tratada con un placebo o un cuidado convencional. Las cicatrices de comparación adecuadas se pueden emparejar preferentemente con la cicatriz tratada con referencia a la edad, sitio, tamaño y paciente.

En la consideración del aspecto macroscópico de una cicatriz resultante de una herida tratada, la extensión de la cicatrización, y por lo tanto la magnitud de cualquier reducción lograda en la cicatrización, se puede evaluar con referencia a cualquiera de diversos parámetros. Los parámetros adecuados para la evaluación macroscópica de cicatrices puede incluir: (i) color de la cicatriz; (ii) altura de la cicatriz; (iii) textura de la superficie de la cicatriz; y (iv) la rigidez de la cicatriz. Una cicatriz tratada preferentemente demostrará una reducción en la cicatrización según se evalúe con referencia a al menos uno de los parámetros para la evaluación macroscópica indicados anteriormente. Más preferentemente, una cicatriz tratada puede demostrar cicatrización reducida en referencia a al menos dos de los parámetros, incluso más preferentemente a al menos tres de los parámetros, y muy preferentemente los cuatro parámetros.

Los parámetros adecuados para la evaluación microscópica de cicatrices puede incluir: - (i) grosor de las fibras de la matriz extracelular (MEC); (ii) orientación de las fibras de la MEC; (iii) la composición de MEC de la cicatriz; y (iv) la celularidad de la cicatriz. Una cicatriz tratada preferentemente demostrará una reducción en la cicatrización según se evalúa con referencia a al menos uno de los parámetros para la evaluación microscópica indicados anteriormente. Más preferentemente, una cicatriz tratada puede demostrar cicatrización reducida con referencia a al menos dos de los parámetros, incluso más preferentemente a al menos tres de los parámetros, y muy preferentemente los cuatro parámetros. Una reducción o una mejora en la cicatrización de una herida tratada puede evaluarse adicionalmente con referencia a parámetros adecuados utilizados en:-

- i) la evaluación clínica macroscópica de las cicatrices, en particular la evaluación de cicatrices en un sujeto;
- ii) evaluación de imágenes fotográficas de cicatrices; y
- iii) evaluación microscópica de cicatrices, por ejemplo mediante análisis histológicos de la estructura microscópica de cicatrices.

Se apreciará que una mejora en la cicatrización de una herida tratada se puede indicar mediante la mejora de uno o más de tales parámetros adecuados, y que en el caso de una mejora según se evalúa con referencia a diversos parámetros, que estos parámetros se pueden combinar a partir de distintos esquemas de valoración (por ejemplo mejora en al menos un parámetro utilizado en la valoración macroscópica y al menos un parámetro utilizado en la valoración microscópica). Una reducción o mejora en la cicatrización se puede demostrar mediante una mejora en uno o más parámetros que indican que una cicatriz tratada se aproxima de forma más estrecha a la piel sin cicatrices con referencia al/los parámetro(s) seleccionados que a una cicatriz no tratada o de control.

Los parámetros adecuados para la medición y evaluación clínica de cicatrices se pueden seleccionar basándose en diversas medidas o evaluaciones incluyendo las descritas por Beausang *et al.* (1998, *Plast. Reconstr. Surg.* 102(6): 1954-1961) y van Zijl *et al.* (2002, *Plast. Reconstr. Surg.* 109(3): 1108-22). Una valoración global de la cicatrización se puede hacer utilizando, por ejemplo, una Escala Análoga Visual o una escala de evaluación digital. Por lo tanto, normalmente, los parámetros adecuados pueden incluir: valoración con respecto a la puntuación de cicatrices de la Escala Análoga Visual (EAV), altura de la cicatriz, ancho de la cicatriz, perímetro de la cicatriz, área de la cicatriz o volumen de la cicatriz, aspecto y/o color de la cicatriz en comparación con la piel sin cicatrices circundante, distorsión de la cicatriz y funcionamiento mecánico, contorno de la cicatriz y textura de la cicatriz, organización del colágeno, grosor de las fibras y densidad de las fibras. Cada uno de estos parámetros será conocido para el técnico experto. Una reducción o mejora de la cicatrización se puede demostrar mediante un cambio de cualquiera de estos parámetros de tal manera que un sitio de herida potencial o una cicatriz tratados con el modulador positivo de β 2-AR se asemeje de forma más estrecha a la piel sin cicatrices que una cicatriz de control o no tratada.

Es preferente que la herida a ser tratada sea una en la que no se desea una disminución en la contracción de la herida. Esto es para evitar o tratar resultados no deseados. La contracción excesiva de la herida puede provocar efectos cosméticos desagradables, afectación de la movilidad e incomodidad debido a la tensión aumentada a través del sitio de la herida y que se produce debido a la contracción excesiva de tejidos existentes. Estas heridas se distinguirán de las heridas a ser evaluadas mediante esta invención, en las cuales los resultados adversos (por ejemplo cicatrización) se deben al depósito y/o remodelado de colágeno anormal.

Es preferente que el sujeto o persona sea uno que no padezca lupus eritematoso o esclerodermia o esclerosis sistémica.

Es preferente que el agonista de β 2-AR no sea una molécula que también tenga actividad fosfodiesterasa-4 (PDE-4).

Se apreciará que las cicatrices son áreas de tejido fibroso que reemplazan el tejido normal después de la lesión mediante el proceso conocido como fibrosis. Por lo tanto, en referencia a la cicatrización, el técnico experto conocerá que los trastornos fibróticos son manifestaciones médicas en las que la fibrosis excesiva conduce al desarreglo patológico y al mal funcionamiento del tejido. Los trastornos fibróticos se caracterizan por la acumulación de un modo anormal de tejido fibroso (de forma predominante colágenos) en el tejido. La acumulación de tales tejidos fibrosos puede originarse a partir diversos procesos patológicos. Como se muestra en las Figuras 6 y 7, la inventora ha demostrado que las heridas tratadas con agonista de β 2-AR contienen menos depósito de colágeno III

que las heridas de control no tratadas. Por lo tanto, a la vista de estos datos, la inventora cree que la administración de un agente, que modula de forma positiva $\beta 2$ -AR, puede utilizarse en el tratamiento, mejora o prevención de trastornos fibróticos.

La inventora cree que los agentes que modulan de forma positiva $\beta 2$ -AR son capaces de reducir la cicatrización de acuerdo con las reivindicaciones o que se pueden utilizar para tratar trastornos fibróticos cuando se administran antes de la formación de la herida, o una vez que la herida ya se ha formado. Los agentes de la invención se pueden utilizar de forma profiláctica, es decir en los sitios en los cuales no existe herida, pero en los cuales se puede formar una herida que de otra forma daría lugar a una cicatriz o una herida crónica. A modo de ejemplo, los agentes de acuerdo con la invención se pueden administrar en sitios que experimentarían la formación de una herida como resultado de procedimientos optativos (tales como cirugía, por ejemplo cirugía plástica), o en sitios que se cree que están en alto riesgo de formación de heridas. Puede ser preferente que los medicamentos de la invención se administren en el sitio de forma inmediatamente anterior a la formación de una herida (por ejemplo en el periodo de hasta seis horas antes de la formación de la herida) o que los medicamentos se puedan administrar en un tiempo temprano antes de la formación de la herida (por ejemplo hasta 48 horas antes de que una herida se forme).

El técnico experto apreciará que los tiempos más preferentes de administración antes de la formación de una herida se determinarán con referencia a diversos factores, incluyendo la formulación y la vía de administración del medicamento seleccionado, la dosificación del medicamento a administrar, el tamaño y la naturaleza de la herida a formarse, y el estado biológico del paciente (que se puede determinar con referencia a factores tales como edad, salud, y predisposición a las complicaciones en la curación o cicatrización adversa del paciente). Los usos profilácticos de acuerdo con la invención es una realización preferente de la invención, y es particularmente preferente en la reducción de la cicatrización en el contexto de las heridas quirúrgicas.

Los agentes de la invención también son útiles para reducir la cicatrización si se administran después de que una herida se ha formado. Es preferente que tal administración debe producirse tan pronto como sea posible después de la formación de la herida, pero los usos de la invención son capaces de reducir la cicatrización en cualquier momento hasta que el proceso de curación se haya completado (es decir incluso en el acontecimiento de que una herida ya se haya curado de forma parcial, los usos de la invención se pueden utilizar para reducir la cicatrización con respecto a cualquier porción restante no curada). Se apreciará que el intervalo de tiempo en el que los medicamentos de la invención se pueden utilizar para reducir la cicatrización es dependiente de la naturaleza de la herida en cuestión (incluyendo el grado de daño que ha tenido lugar, y el tamaño del área herida). Por lo tanto, en el caso de una herida grande, los agentes de la invención pueden administrarse relativamente tarde en la respuesta de curación y aun así ser capaces de reducir la cicatrización. Los agentes de la invención pueden, por ejemplo, administrarse preferentemente dentro de las primeras 24 horas después de que se forma una herida, pero pueden todavía reducir la cicatrización si se administran hasta dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez, o más, días después de la formación de la herida.

Los agentes de la invención se pueden administrar una o más ocasiones según sea necesario para reducir la cicatrización. Por ejemplo, para reducir el proceso de cicatrización las cantidades terapéuticamente eficaces de los medicamentos se pueden administrar a una herida tan frecuentemente como se necesite hasta que el proceso de curación se haya completado. A modo de ejemplo, los agentes de la invención se pueden administrar diariamente o dos veces al día a una herida durante al menos los primeros tres días después de la formación de la herida.

Muy preferentemente, los agentes de la invención pueden administrarse antes y después de la formación de una herida. Se apreciará que la cantidad de un agente para uso de la invención, que debería aplicarse a una herida depende de varios factores tales como la actividad biológica y la biodisponibilidad del agente presente en el medicamento, que a su vez depende, entre otros factores, de la naturaleza del agonista del receptor $\beta 2$ -adrenérgico, y el modo de administración del medicamento.

En general, cuando los agentes para su uso de acuerdo con la invención se utilizan para tratar heridas existentes, el agente debería administrarse tan pronto como la herida se haya producido (o en el caso de heridas que no son evidentes de forma inmediata, tales como las de sitios corporales internos, tan pronto como la herida se haya diagnosticado). La terapia con agentes de acuerdo con la invención debería continuar hasta que se haya acelerado el proceso de curación, y la cicatrización se haya reducido, hasta la satisfacción del médico clínico.

Se apreciará que el agente, el cual modula de forma positiva $\beta 2$ -AR, y los usos de acuerdo con la invención, se pueden utilizar en una monoterapia (es decir el uso de un agente, que modula de forma positiva la conformación de $\beta 2$ -AR, o la actividad del receptor o solo la activación del receptor), para reducir la cicatrización o para tratar trastornos fibróticos. Como alternativa, el agente que modula de forma positiva $\beta 2$ -AR, y los usos de acuerdo con la invención, se pueden utilizar como un complemento de, o en combinación con, terapias conocidas para reducir la cicatrización o para tratar trastornos fibróticos. Por ejemplo, se puede utilizar en combinación con terapéuticos anticicatrización conocidos, tales como inyecciones de corticoesteroide, crioterapia, láminas de silicona tópicas, radiación, indumentaria compresiva e Imiquimod (Meier K y Nanney L, B, Expert Opinion in Emerging Drugs (2006) 11(1), 39).

El agente de la invención puede ser mediante cualquiera vía adecuada capaz de conseguir el efecto deseado, de reducir la cicatrización de acuerdo con las reivindicaciones. Con respecto a la cicatrización es preferente que los agentes se administren por vía local en el sitio de la herida o en el sitio de la herida previsto. Por lo tanto, el agente, el cual modula β 2-AR, se puede combinar en composiciones farmacéuticas que tengan varias formas distintas dependiendo de, en particular, la manera en que la posición se va a utilizar. Por lo tanto, por ejemplo, la composición puede estar en la forma de un polvo, comprimido, cápsula, líquido, pomada, crema, gel, hidrogel, aerosol, pulverización, solución miscelar, parche transdérmico, suspensión liposomal o cualquier otra forma adecuada que puede administrarse a un sujeto que necesite tratamiento. Se apreciará que el vehículo de los medicamentos debería ser uno que sea bien tolerado por el sujeto al cual se proporcionará.

Los medicamentos que comprenden al agente, los cuales modulan β 2-AR, pueden utilizarse de varias maneras. Por ejemplo, puede necesitarse administración oral, en cuyo caso el modulador de β 2-AR puede estar contenido dentro de una composición que puede, por ejemplo, ingerirse por vía oral en la forma de un comprimido, cápsula o líquido. Las composiciones que comprenden al modulador de β 2-AR se pueden administrar mediante inhalación (por ejemplo por vía intranasal).

Como alternativa, o de forma adicional, los medicamentos pueden administrarse en una forma tópica, por ejemplo los moduladores positivos de β 2-AR para su uso para reducir la cicatrización. Tal administración se puede efectuar como parte de la atención inicial y/o de seguimiento del área herida. Los inventores creen que la reducción de la cicatrización o el tratamiento de trastornos fibróticos se mejora de forma particular mediante la aplicación tópica de un modulador positivo de β 2-AR a una herida (o, en el caso de aplicación profiláctica, a un tejido o sitio en el cual se podría formar una herida). Por lo tanto, por ejemplo, los medicamentos adecuados pueden estar en la forma de un líquido, pomada, crema, gel, hidrogel, polvo o aerosol. Todos de tales componentes son adecuados para la aplicación tópica a una herida, la cual es un medio preferente de administración del modulador positivo de β 2-AR a un sujeto (por ejemplo una persona o un animal) que necesite tratamiento. Es preferente que tales formulaciones se apliquen de forma directa a un sitio de la herida, o por lo menos a un sitio de la herida adyacente. Estos medios para la aplicación tópica también son útiles para la administración de un modulador negativo de β 2-AR, tal como un antagonista de β 2, al sitio de arrugas en la piel.

Como alternativa, el modulador positivo de β 2-AR o medicamento se puede proporcionar en un vehículo (tal como un vendaje o parche estéril), el cual se puede utilizar para cubrir un sitio de la herida o sitio de fibrosis anómala. Se apreciará que el vehículo debería ser uno que sea bien tolerado por el paciente y que permita la liberación del agente activo a la herida. Tal vehículo preferentemente es biodegradable, biorreabsorbible y/o no inflamatorio.

El positivo o modulador de β 2-AR utilizado de acuerdo con la invención también puede incorporarse en un dispositivo de liberación lenta o retardada. Tales dispositivos pueden, por ejemplo, insertarse en o debajo de la piel, y el medicamento se puede liberar a lo largo de días, semanas o incluso meses. El dispositivo se puede localizar al menos adyacente al sitio de tratamiento, por ejemplo de forma directa en un sitio de la herida. El medicamento se aplica en y/o alrededor de una herida para reducir la cicatrización. Tales dispositivos pueden ser particularmente ventajosos cuando se necesita tratamiento prolongado con el modulador positivo de β 2-AR y el cual normalmente necesitaría la administración frecuente (por ejemplo, al menos inyección diaria).

En una realización, farmacéuticamente un vehículo para la administración del modulador positivo de β 2-AR puede ser un líquido, y una composición farmacéutica adecuada estaría en la forma de una solución. En otra realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un sólido, y una composición adecuada del medicamento está en la forma de un polvo o comprimido. En una realización adicional, el positivo o modulador de β 2-AR se puede formular como parte de un parche transdérmico farmacéuticamente aceptable.

Los inventores creen que la reducción óptima de la cicatrización se puede efectuar mediante la administración de un agente, el cual modula de forma positiva β 2-AR mediante la inyección en o alrededor del sitio de la herida. Por ejemplo, en el caso de heridas dérmicas, el modulador positivo de β 2-AR puede administrarse por medio de inyección intradérmica. Por lo tanto, un medicamento preferente de acuerdo con la invención comprende una solución de un agente, el cual modula de forma positiva β 2-AR, el cual es inyectable de forma directa en un sitio que necesita tratamiento (por ejemplo para inyección alrededor de los márgenes de un sitio de daño epitelial o un sitio que probablemente se dañará). Por lo tanto, en una realización preferente el medicamento puede inyectarse en una herida, o en el sitio de una incisión quirúrgica inminente. Las inyecciones pueden ser intravenosas (bolo o infusión) o subcutáneas (bolo o infusión), o intradérmicas (bolo o infusión). También está previsto que los medicamentos se puedan administrar por vía sistémica a un sujeto mediante la inyección en el torrente sanguíneo.

Se apreciará que la cantidad del modulador positivo de β 2-AR que se necesita se determina mediante su actividad biológica y biodisponibilidad, lo que a su vez depende del modo de administración, las propiedades físico químicas del agente y si el agente está utilizándose como una monoterapia o en una terapia combinada. La frecuencia de administración también estará influenciada por los factores mencionados anteriormente y de forma particular la supervivencia del agente en el sujeto a ser tratado. Los expertos en la materia pueden determinar las dosificaciones óptimas a ser administradas, y variará con el agente particular en uso, la fuerza de la composición farmacéutica, el modo de administración, y el avance de la cicatrización o enfermedad fibrótica. Los factores adicionales que

dependen del sujeto en particular que se trata darán como resultado una necesidad de ajuste de las dosificaciones, incluyendo edad, peso, género, dieta del sujeto, y tiempo de administración.

Normalmente, para efectuar el tratamiento la cantidad de un modulador de β 2-AR necesaria para su uso en la persona estará dentro del rango de 0,001 ng a 100 mg del agente por 24 horas, aunque este diagrama se puede modificar hacia arriba o hacia abajo en respuesta a los factores descritos anteriormente. Para el tratamiento de un sitio de la herida, la cantidad del modulador positivo de β 2-AR a administrar puede preferentemente ser de 50 a 500 ng por centímetro lineal de daño epitelial en el sitio de la herida. En general, una dosis diaria de entre 0,001 μ g/kg de peso corporal y 10 mg/kg de peso corporal del modulador positivo de β 2-AR se puede utilizar para reducir la cicatrización dependiendo de cuál modulador se utiliza. Más preferentemente, la dosis diaria del modulador positivo de β 2-AR está entre 0,01 μ g/kg de peso corporal y 1 mg/kg de peso corporal, más preferentemente entre 0,1 μ g/kg y 100 μ g/kg de peso corporal, y muy preferentemente entre aproximadamente 0,1 μ g/kg y 10 μ g/kg de peso corporal.

La frecuencia de administración dependerá de la semivida biológica del medicamento utilizado. Normalmente debería administrarse una crema o pomada que contiene el modulador positivo de β 2-AR a un tejido diana de forma tal que la concentración del modulador en el sitio de tratamiento, tal como una herida (se mantiene a un nivel adecuado para tener un efecto terapéutico. Esto puede necesitar la administración diaria, o incluso varias veces al día. Las dosis diarias pueden proporcionarse como una administración única (por ejemplo una inyección diaria única). Como alternativa, el modulador positivo de β 2-AR puede necesitar la administración dos o más veces en el transcurso de un día. Como ejemplo, el modulador positivo de β 2-AR puede administrarse como dos (o más, dependiendo de la gravedad de la afección a ser tratada) dosis diarias de entre 0,07 μ g y 700 mg (es decir asumiendo un peso corporal de 70 kg). Un paciente que recibe el tratamiento puede tomar una primera dosis al levantarse y después una segunda dosis por la tarde (si es en un régimen de dos dosis), o dosis a intervalos de 3 o 4 horas.

Como alternativa, para proporcionar dosis óptimas del modulador positivo de β 2-AR a un paciente sin necesidad de administrar dosis repetidas, se puede utilizar un dispositivo de liberación lenta o retardada. Tales dispositivos pueden, por ejemplo, ponerse sobre o insertarse bajo la piel y el modulador positivo de β 2-AR se puede liberar a lo largo de días, semanas o incluso meses. Tal dispositivo puede ser particularmente útil para pacientes (tales como los que padecen heridas crónicas) que necesitan reducción de la cicatrización prolongada. Los dispositivos pueden ser particularmente ventajosos cuando se utilizan para la administración de un modulador positivo de β 2-AR, el cual normalmente necesitará administración frecuente (por ejemplo al menos la administración diaria mediante otras vías).

Los procedimientos conocidos, tales como los empleados de forma convencional por la industria farmacéutica (por ejemplo experimentación *in vivo*, ensayos clínicos, etc.), se pueden utilizar para formar formulaciones específicas de los agentes de acuerdo con la invención y regímenes terapéuticos precisos (tales como dosis diarias de los agentes y la frecuencia de administración). La inventora cree que él es el primero en sugerir que los moduladores de β 2-AR son capaces de modular de forma simultánea las concentraciones de TGF β 1 y TGF β 3 que producen los fibroblastos, y las aplicaciones de los moduladores de β 2-AR como se divulga en el presente documento.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, se proporciona una composición anticicatrización que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, el cual modula de forma positiva la conformación de β 2-AR, o la actividad del receptor, o la activación del mismo, y de forma opcional un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por la expresión "composición anticicatrización", los inventores se refieren a un compuesto farmacéutico utilizado en la prevención, reducción o inhibición terapéutica de la cicatrización en un paciente.

En un aspecto adicional los inventores proporcionan un proceso para preparar la composición de acuerdo con los aspectos anteriores, comprendiendo el proceso la combinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, el cual modula de forma positiva la conformación de β 2-AR, o la actividad del receptor, o la activación del mismo (según sea el caso), con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El agente, el cual modula de forma positiva β 2-AR, en la composición de acuerdo con los aspectos anteriores preferentemente es selectivo para β 2-AR, y puede ser un agonista de β 2-AR. El agonista se puede seleccionar de una lista de agonistas que consiste en un compuesto químico orgánico o inorgánico simple; un péptido; una proteína; un ácido nucleico; un azúcar; un anticuerpo (o un fragmento activo del mismo); cada uno de los cuales es capaz de modificar la conformación/estabilidad del receptor, o de inducir la actividad del receptor. El agonista selectivo de β 2-AR puede ser fenoterol, butoxamina, salbutamol, clenbuterol, formoterol, o salmeterol. Sin embargo, en la composición un agonista selectivo de β 2-AR preferente es salbutamol.

Un "sujeto" puede ser un vertebrado, mamífero, o animal doméstico. Por lo tanto, los usos de acuerdo con la invención pueden ser utilizados para tratar cualquier mamífero, por ejemplo animales de producción (por ejemplo un caballo), animales de compañía o puede utilizarse en otras aplicaciones veterinarias. Muy preferentemente, el sujeto es un ser humano.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" del agente es cualquier cantidad que, cuando se administra a un sujeto, da como resultado una reducción de la cicatrización en el sujeto.

Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente utilizada puede ser desde aproximadamente 0,07 µg a aproximadamente 700 mg, y preferentemente desde aproximadamente 0,7 µg a aproximadamente 70 mg. Es preferente que la cantidad del agente sea una cantidad desde aproximadamente 7 µg a aproximadamente 7 mg, y muy preferentemente desde aproximadamente 7 µg a aproximadamente 700 µg.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" al que se hace referencia en el presente documento es cualquier compuesto conocido o combinación de compuestos conocidos que es útil en la formulación de composiciones farmacéuticas que es conocido para los expertos en la materia.

En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido, y la composición puede estar en la forma de un polvo o comprimido. Un vehículo farmacéuticamente aceptable sólido puede incluir una o más sustancias las cuales pueden también actuar como agentes aromatizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, colorantes, rellenos, emolientes, ayudas de compresión, aglutinantes inertes, edulcorantes, conservantes, colorantes, agentes de revestimiento, o agentes de desintegración de comprimidos. El vehículo también puede ser un material encapsulante. En polvos, el vehículo es un sólido dividido de forma fina que está en combinación con los agentes activos divididos de forma fina de acuerdo con la invención. En comprimidos, el agente activo puede estar mezclado con un vehículo que tenga las propiedades de compresión necesarias en proporciones adecuadas y puede estar compactado en la forma y tamaño deseados. Los polvos y comprimidos preferentemente contienen hasta el 99 % de los agentes activos. Los vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, polivinilpirrolidona, ceras de baja fusión y resinas de intercambio iónico. En otra realización, el vehículo farmacéutico puede ser un gel y la composición puede estar en la forma de una crema o similar.

Sin embargo, en una realización preferente, el vehículo farmacéutico es un líquido, y la composición farmacéutica está en la forma de una solución. Los vehículos líquidos se utilizan en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas. El agente activo de acuerdo con la invención puede disolverse o suspenderse en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable tal como agua, un disolvente orgánico, una mezcla de ambos o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados tales como solubilizadores, emulsionantes, tampones, conservantes, edulcorantes, agentes saporíferos, agentes de suspensión, agentes espesantes, colores, reguladores de la viscosidad, estabilizantes u osmoreguladores. Los ejemplos adecuados de vehículos líquidos para la administración oral o parenteral incluyen agua (que contiene de forma parcial aditivos como anteriormente, por ejemplo derivados de celulosa, preferentemente solución de carboximetilcelulosa de sodio), alcoholes (incluyendo alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, por ejemplo glicoles) y sus derivados, y aceites (por ejemplo aceite de coco y aceite de cacahuete fraccionados). Para la administración parenteral, el vehículo puede también ser un éster oleoso tal como oleato de etilo o miristato de isopropilo. Para la administración parenteral, los vehículos líquidos estériles son útiles en las composiciones en forma líquida estéril. El vehículo líquido para las composiciones presurizadas puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propulsor farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles se pueden utilizar mediante, por ejemplo, inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal, intravenosa y particularmente subcutánea. El modulador positivo de β 2-AR puede prepararse como una composición sólida estéril que puede disolverse o suspenderse en el momento de la administración utilizando agua estéril, solución salina u otro medio inyectable estéril apropiado.

Los agentes y composiciones se pueden administrar por vía oral en la forma de una solución o suspensión estéril que contenga otros solutos o agentes de suspensión (por ejemplo, solución salina o glucosa suficiente para hacer isotónica la solución), sales biliares, goma arábiga, gelatina, monooleato de sorbitán, polisorbato 80 (ésteres oleato de sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con óxido de etileno) y similares. Los agentes utilizados de acuerdo con la invención también pueden administrarse por vía oral en forma de composición líquida o sólida. Las composiciones adecuadas para la administración oral incluyen formas sólidas, tales como píldoras, cápsulas, granulados, comprimidos, y polvos, y formas líquidas, tales como soluciones, jarabes, elixires, y suspensiones. Las formas útiles para la administración parenteral incluyen soluciones, emulsiones, y suspensiones estériles.

Para una mejor comprensión de la invención, y para mostrar cómo las realizaciones de la misma pueden llevarse a efecto, se hará referencia ahora, por medio de ejemplo, a los siguientes Ejemplos y Figuras adjuntas, en las que:-

La Figura 1 es un diagrama de barras que demuestra que un antagonista de β 2-AR aumenta la tasa de migración de fibroblastos de la dermis individuales. "Velocidad" es la velocidad promedio en µm/minuto a la que las células se desplazan en un periodo de tiempo de una hora. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba T de Student (*P < 0,01);

La Figura 2 es un gráfico que muestra que los antagonistas de $\beta 2$ -AR potencian la contracción de gel de colágeno flotante mediada por 30 fibroblastos de la dermis. Una solución de colágeno bovino de tipo I (97 %) y tipo III se mezcló con DMEM de triple fuerza, DMEM que contenía tampón Hepes 20 mM, suero de ternera, células (desprendidas mediante tripsina de cultivos confluentes en monocapa), y en la presencia (la línea es una combinación de línea discontinua y puntos, es decir “_..._”) o ausencia (línea negra continua) de 10 nM antagonista del $\beta 2$ -adrenoreceptor (ICI 118.551);

La Figura 3 es un gráfico que muestra que un antagonista de $\beta 2$ -AR potencia el cierre de heridas en ratón *in vivo*, mientras que el agonista de $\beta 2$ -AR retrasa el cierre de la herida. Las heridas se trataron por vía tópica con 100 μ l de gel hidroactivo solo (línea negra continua y símbolos circulares) o que contenía agonista selectivo de $\beta 2$ -AR al 0,1 % (salbutamol, línea punteada y símbolos cuadrados) o antagonista selectivo de $\beta 2$ -AR al 0,1 % (ICI 118.551, línea discontinua y símbolos con forma de diamante) de forma inmediatamente anterior a la formación de la herida y posteriormente de forma diaria hasta la recolección. Las imágenes se capturan diariamente y el área de la herida se calculó utilizando Image J.

La Figura 4 son fotografías que muestran que los antagonistas de $\beta 2$ -AR aumentan el nivel de la tinción de la α -actina de músculo liso (AML) en la dermis herida, 5 días después de la formación de la herida, mientras que los agonistas de $\beta 2$ -AR disminuyen el nivel de la tinción de la α -actina de músculo liso en la dermis herida, 5 días después de la formación de la herida. Las imágenes de las secciones de herida con AML teñida se capturaron con un aumento de 2x en un microscopio vertical Nikon SMZ-U con el programa informático Nikon ACT-1, y se muestran imágenes representativas. La barra de escala es 500 μ m;

La Figura 5 es un diagrama de barras que muestra que los antagonistas de $\beta 2$ -AR aumentan el nivel de tinción de la α -actina de músculo liso en la dermis herida, 5 días después de la formación de la herida, mientras que los agonistas de $\beta 2$ -AR disminuyen el nivel de tinción de la α -actina de músculo liso en la dermis herida, 5 días después de la formación de la herida;

La Figura 6 son fotografías que muestran que los antagonistas de $\beta 2$ -AR aumentan la cantidad de tinción del colágeno III en la dermis herida, 5 días después de la formación de la herida, mientras que los agonistas de $\beta 2$ -AR disminuyen la cantidad de tinción del colágeno III en la dermis herida, 5 días después de la formación de la herida. Las imágenes de las secciones de la herida con tinción del colágeno III se capturaron a un aumento de 20x en un microscopio invertido Nikon Eclipse 2000 U con el programa informático NIS-Elements. Se muestran imágenes representativas. La barra de escala es 100 μ m;

La Figura 7 es un diagrama de barras que muestra que los antagonistas de $\beta 2$ -AR aumentan la cantidad de tinción del colágeno III en la dermis herida, 5 días después de la formación de la herida, mientras que los agonistas de $\beta 2$ -AR disminuyen la cantidad de tinción del colágeno III en la dermis herida, 5 días después de la formación de la herida;

La Figura 8 muestra que los agonistas de $\beta 2$ -AR disminuyen la diferenciación y función fibroblástica y la función en un modelo de gel de colágeno anclado, un modelo 3D de dermis herida mientras que, por el contrario, los antagonistas de $\beta 2$ -AR aumentan la diferenciación y función fibroblástica en geles de colágeno anclado.

El Panel A muestra que el tratamiento con antagonista de $\beta 2$ -AR aumenta la rigidez de los geles de colágeno sembrados con fibroblastos de la dermis de ser humano después de 4 días de incubación. Los fibroblastos de la dermis de ser humano se incorporaron en geles de colágeno al 40 % anclados durante 4 días, se sumergieron en medio solo o medio que contenía agonista de beta2-adrenorreceptor 10 μ M (salbutamol) o antagonista (ICI 118.551). Los geles se incubaron a 37 °C hasta 216 horas y se fotografiaron después de 72, 96, 168 y 216 horas para observar el mantenimiento de la tensión en los geles.

El Panel B muestra que el tratamiento con agonista de $\beta 2$ -AR disminuye la tinción de colágeno I mientras que el tratamiento con antagonista aumenta la tinción de colágeno I en fibroblastos de la dermis de ser humano liberados de geles de colágeno después de 4 días de incubación. Los fibroblastos de la dermis de ser humano se incorporaron en geles de colágeno anclados durante 4 días, se sumergieron en medio solo o medio que contenía agonista de beta2-adrenorreceptor 1 μ M (salbutamol) o antagonista (ICI 118.551). Las células se liberaron de los geles mediante tratamiento con collagenasa, se sembraron en placas recubiertas con colágeno I, se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se tiñeron con un anticuerpo anticolágeno I (coloración negra).

El Panel C muestra que el tratamiento con agonista de $\beta 2$ -AR disminuye la proliferación de fibroblastos de la dermis de ser humano mientras que el tratamiento con antagonista aumenta la proliferación celular en geles de colágeno después de 4 días de incubación. Los fibroblastos de la dermis de ser humano se incorporaron en geles de colágeno al 40 % anclados durante 4 días, se sumergieron en medio solo o en medio que contenía agonista de beta2-adrenorreceptor 10 μ M (salbutamol) o antagonista (ICI 118.551). Los geles se incubaron a 37 °C durante 96 horas, se fotografiaron en un microscopio invertido Nikon cada 24 horas.

El Panel D muestra que el tratamiento con agonista de β 2-AR disminuye la tinción de alfa actina de músculo liso mientras que el tratamiento con antagonista aumenta la tinción de alfa actina de músculo liso en fibroblastos de la dermis de ser humano liberados de geles de colágeno después de 4 días de incubación. Los fibroblastos de la dermis de ser humano se incorporaron en geles de colágeno anclados durante 4 días, se sumergieron en medio solo o en medio que contenía agonista de beta2-adrenorreceptor 10 μ M (salbutamol) o antagonista (ICI 118.551). Las células se liberaron de los geles mediante tratamiento con colagenasa, se sembraron en placas recubiertas con colágeno I, se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se tiñeron con un anticuerpo específico anti alfa actina de músculo liso.

La Figura 9 muestra que los agonistas de β 2-AR disminuyen la secreción de factores de crecimiento profibróticos y aumentan la secreción de factores de crecimiento antifibróticos. Mientras que, por el contrario, los antagonistas de β 2-AR aumentan la secreción de factores de crecimiento profibróticos, los agonistas de β 2-AR disminuyen la cantidad de TGF β 1 profibrótico secretado en el 74 % y aumenta la cantidad de TGF β 3 antifibrótico secretado en 5 veces, después de 24 horas. Por el contrario, los antagonistas de β 2-AR aumentan los niveles de TGF β 2 profibrótico en 1,6 veces después de 6 horas y aumentan los niveles de TGF β 1 en 3 veces después de 24 horas. Se sembraron en placa fibroblastos de la dermis de ser humano en presencia o ausencia (control) de agonista de beta2-adrenorreceptor 10 μ M (salbutamol) o antagonista (ICI 118.551). El sobrenadante se recolectó después de 6 horas o 24 horas y se analizó utilizando ELISA individuales específicos para TGFbeta 1, 2 o 3.

La Figura 10 son fotografías que muestran que los agonistas de β 2-AR disminuyen el número de neutrófilos en el lecho de la herida después de 3 días. Las imágenes de las heridas teñidas con Ly6G-6C se capturaron a un aumento de 60x en un microscopio invertido Nikon Eclipse 2000U con el programa informático NIS-Elements. Se muestran imágenes representativas. La barra de escala es 100 μ M;

La Figura 11 es un diagrama de barras que muestra que los agonistas de β 2-AR disminuyen el número de neutrófilos (células polimorfonucleares, PMN) en el lecho de la herida después de 3 días;

La Figura 12 son fotografías que muestran que los agonistas de β 2-AR disminuyen el número de macrófagos en el lecho de la herida después de 3 días. Las imágenes de heridas teñidas con F 4/80 se capturaron con un aumento de 60x en un microscopio invertido Nikon Eclipse 2000U con el programa informático NIS-Elements. Se muestran imágenes representativas. La barra de escala es 100 μ M; y

La Figura 13 es un diagrama de barras que muestra que los agonistas de β 2-AR disminuyen el número de macrófagos en el lecho de la herida después de 3 días.

La Figura 14 muestra que los agonistas de β y β 2-AR disminuyen la incorporación de células inflamatorias en heridas de la cola de pez cebra, 6 horas después de la formación de la herida. Se biseccionó la aleta caudal de embriones de pez cebra de tres días con un bisturí para crear una herida en la aleta caudal. 6 horas más tarde los embriones se fijaron en paraformaldehído al 4 % y se tiñeron con fluoresceína-tiramina para visualizar la incorporación de neutrófilos en las heridas de la cola en un microscopio invertido a un aumento de 20x. Aquí se demuestra que los agonistas de β -AR y β 2-AR reducen la incorporación de neutrófilos en las heridas de la aleta caudal del pez cebra en el 60 y 62 %, dentro de las 6 horas de la formación de la herida, respectivamente. Por el contrario, un antagonista de β -AR no tuvo efecto (Figura 14). Estos datos muestran una nueva inhibición de la orientación de neutrófilos hacia una herida mediada por β 2-AR. Además, este es el primer informe de algún efecto fisiológico de un agonista de β 2-AR en embriones de pez cebra.

La Figura 15 muestra que los agonistas de β 2-AR disminuyen la cantidad de VEGF profibrótico secretado mientras que los antagonistas de β 2-AR aumentan los niveles de VEGF profibrótico secretado de fibroblastos de la dermis de ser humano y neutrófilos de ser humano después de 48 horas. Se sembraron en placa los fibroblastos o neutrófilos de la dermis de ser humano en presencia o ausencia (control) de agonista o antagonista de β -adrenorreceptor. Se recolectó el sobrenadante después de 48 horas y se analizó utilizando un ELISA específico para VEGF. Iso es isoproterenol. Salb es salbutamol. Salm es salmeterol. Form es formoterol. Tim es timolol. Timolol es un antagonista, los otros compuestos son agonistas.

Ejemplos

Materiales

Los siguientes experimentos utilizaron un agonista selectivo del receptor β 2-adrenérgico, salbutamol (Sigma-Aldrich, St Louise, MO). Este compuesto es un agonista del receptor β 2-adrenérgico altamente selectivo, que tiene valores de K_i de -6,12, -4,66 y -4,33 nM para los receptores β 2-, β 1- y β 3-adrenérgicos, respectivamente. Los experimentos también utilizaron un antagonista selectivo del receptor β 2-adrenérgico, ICI 118.551 (Tocris Cookson, Inc., Ellisville, MO). Este compuesto es un antagonista del receptor β 2-adrenérgico altamente selectivo que tiene valores de K_i de 1,2, 120, y 257 nM para los receptores β 2-, β 1-, y β 3-adrenérgicos, respectivamente (Bilski *et al.* (1983) J. Cardiovasc. Pharmacol 5, 430).

Métodos

Ensayo de migración de células individuales

Se recubrieron placas de 35 mm con fondo de vidrio (MatTek Corporation) con colágeno I (60 µg/ml) (Cohesion Technologies) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 hora a 37 °C. Se sembraron en placa fibroblastos de la dermis de ser humano (Cascade Biologics, RU) a una densidad de 25 células/mm² en medio de crecimiento de fibroblastos (FM) (FM: Medio de Eagle Modificado por Dulbecco, DMEM, o que contenía suero de ternero al 10 %) durante 2 horas a 37 °C. Las células se incubaron con FM solo (control) o con FM que contenía antagonista selectivo de β2-AR 10 nM (ICI 118.551, Tocris) en el tiempo 0. Las placas de 35 mm con fondo de vidrio se pusieron en una cámara de calefacción, diseñada para mantener el medio entre 35-37 °C, y asegurada a la plataforma de un microscopio invertido Nikon Diaphot según se describe en (Pullar (2006) Chin Med J (Engl) 116, 1029-33). "Velocidad" es la velocidad promedio en µm/min que las células recorren en un periodo de tiempo de una hora, según se muestra en la Figura 1.

Ensayos de geles flotantes y anclados de colágeno

Una solución de colágeno bovino de tipo I (97 por ciento) y III (3 mg de colágeno/ml, Vitrogen 100, Collagen Corporation, Palo Alto, CA) se mezcló con DMEM de tiple fuerza, DMEM que contenía tampón Hepes 20 mM (Gibco, Grand Island, NY) para mantener el pH neutro, suero de ternero, células (desprendidas mediante tripsina de cultivos confluentes en monocapa), y diluciones apropiadas de un agonista del receptor β2-adrenérgico (es decir salbutamol) y antagonista (es decir ICI 118.551). Las soluciones individuales se prepararon y enfriaron a 4 °C antes de la mezcla para evitar la gelación prematura. La solución final contenía Vitrogen al 40 % (v/v), DMEM al 20 %, DMEM al 30 % con tampón Hepes, y suero de ternero al 10 %. Las células se incubaron con la concentración de fármaco apropiada durante 30 minutos a 37 °C y se añadieron a la mezcla de gel de colágeno justo antes de la fundición de gel a la concentración de 30.000 por ml. Las estructuras reticulares se fundieron, con 1,7 ml de la solución final por placa, en placas bacteriológicas de 35 mm (Falcon Labware, BD Biosciences), a las que los fibroblastos se adhieren mal. La mezcla gelificó dentro de los 30 minutos después de la incubación a 37 °C en una atmósfera humidificada de aire al 95 por ciento y CO₂ al 5 por ciento.

Para determinar el efecto de los antagonistas de β2-AR en la contracción del gel flotante (como se muestra en la Figura 2), las estructuras reticulares se desprendieron de los lados de las placas después de 2 h, bordeando los bordes de las placas utilizando una punta estéril de 100 µl y agitando suavemente las placas hasta que los geles se deslizaron libremente. La retracción de las estructuras reticulares se midió cada día poniendo las placas sobre una regla plana en un fondo negro. Para determinar el efecto de los agonistas y antagonistas de β2-AR sobre la proliferación de células en un modelo de la dermis herida, los geles permanecieron anclados a un lado de la placa (como se muestra en la Figura 8).

Modelo de herida

Se adquirieron ratones FVB/NJ (β2-AR+/+) del laboratorio The Jackson (Bar Harbor, Maine). Todos los animales utilizados en el estudio eran hembras de entre 8-12 semanas. Los ratones β2-AR+/+ se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg)/xilacina (10 mg/kg) (Pfizer). Se afeitó la piel del lomo y se crearon en el centro del lomo dos heridas por escisión, de grosor total de 6 mm circulares separadas en 2 cm, utilizando un punzón de biopsia de 6 mm estéril (SMS Inc.). Las heridas se trataron por vía tópica con 100 µl de gel hidroactivo solo (Duoderm, ConvaTec) o que contenía agonista selectivo de β2-AR al 0,1 % (salbutamol) o antagonista selectivo de β2-AR al 0,1 % (ICI 118.551) inmediatamente después de la formación de la herida y posteriormente a diario hasta la recolección (n = 5-7 ratones por grupo, 2 heridas por ratón). Después de la formación de la herida cada ratón se alojó de forma separada hasta la recolección de la herida. Las heridas se dejaron descubiertas y se fotografiaron diariamente de forma digital, para determinar la contracción de la herida a lo largo del tiempo. Las heridas se recolectaron en los días 3 y 5 después de la formación de la herida mediante la aplicación cuidadosa de un punzón de 8 mm (SMS Inc.) alrededor del sitio de la herida original y presionando ligeramente para formar un contorno en la piel. Después se utilizaron tijeras para retirar el sitio de la herida sin dañar el delicado lecho de la herida.

Recolección, inmunohistoquímica y análisis del tejido

Para el análisis histológico las heridas se fijaron en un fijador de cinc HIC (BD Biosciences). Las biopsias fijadas en cinc se biseccionaron para asegurar que las secciones se tomaban del centro de la herida, se deshidrataban a través de una serie de etanol xileno, y se incluyeron en parafina. Se tiñeron secciones transversales de 7 µm de grosor, utilizando la técnica de hematoxilina eosina (H y E) o se tiñeron con un anticuerpo contra α-actina de músculo liso (AML, Dako) (Figuras 4, 5 y 8B), colágeno III (Rockland) (Figuras 6 y 7), Ly6G-6C (un marcador de neutrófilos, BD Pharmingen) (Figuras 10 y 11), o F4-80 (un marcador de macrófagos, Serotec) (Figuras 12 y 13) seguido de detección por diaminobencidina (DAB) (BD Pharmingen) de acuerdo con los protocolos de los fabricantes.

Se excluyeron del estudio los especímenes que se dañaron en el proceso histológico o que de otro modo no eran interpretables. Se cuantificó el cierre de la herida mediante la medición del área de la herida de cada herida a partir de las fotos digitales tomadas cada día con Image J, sitio web del National Institutes of Health. Cada foto se calibró de forma individual (como se muestra en la Figura 3). Se capturaron imágenes de las heridas con alfa actina de músculo liso (AML) teñida a un aumento de 2x en un microscopio vertical Nikon SMZ-U con el programa informático Nikon ACT-1 (como se muestra en la Figura 4). Se utilizó Image J para determinar el área de tinción de la AML en cada grupo (como se muestra en la Figura 5). Se capturaron las imágenes de las heridas con colágeno III teñidos a un aumento de 20x en un microscopio invertido Nikon Eclipse 2000U con el programa informático NIS-Elements (como se muestra en la Figura 6). La intensidad de la tinción de colágeno III se graduó en una escala de 0-6, recibiendo la no tinción una valoración de 0 y la tinción más oscura recibiendo una valoración de 6 (como se muestra en la Figura 7). La tinción de cada herida se valoró en una manera de ocultación doble y se calculó para cada grupo la intensidad de tinción media.

Se capturaron diez imágenes de las heridas teñidas con Ly-6G-6C y F4-80 (aumento de 6x) en un microscopio invertido Nikon Eclipse 2000U con el programa informático NIS-Elements (las Figuras 10 y 12 muestran campos representativos). Los diez campos se seleccionaron de la dermis por debajo de los márgenes de la herida y a través del lecho de la herida utilizando un molde para asegurar que las imágenes se capturaban de áreas similares en cada herida. El número de células teñidas en cada imagen se contó en una manera de ocultación doble y se calculó para cada grupo el número de células promedio (como se muestra en las Figuras 11 y 13).

Medición de la secreción de TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 y VEGF de fibroblastos de la dermis, y de VEGF de neutrófilos

Se sembraron fibroblastos de la dermis de ser humano (Figuras 9 y 15) o neutrófilos de ser humano (solamente VEGF) (Figura 15) en placas de 6 pocillos y se cultivaron en FM hasta el 60 % de confluencia. El medio se reemplazó en el tiempo 0 con medio solo o que contenía agonista de β 2-AR 10 μ M (salbutamol) o antagonista (ICI 118.551). Los sobrenadantes se prepararon y ensayaron utilizando kits de ELISA para TGF- β 1, TGF- β 2, 15 TGF- β 3 y VEGF (R & D systems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Método para el experimento de producción de heridas en pez cebra

Las aletas caudales de embriones de pez cebra se transfectaron con una hoja de bisturí estéril de 1 mm a partir de la punta. Se incubaron los embriones a 28 °C durante 6 horas en agua estancada +/- isoproterenol (agonista no específico de β), salbutamol (agonista específico de β 2) o timolol (antagonista no específico de β 2) (todos 10 μ M), después se incubaron con fluoresceína-tiramina (Perkin Elmer) seguido de fijación. Se tomaron imágenes de los embriones en un sistema de microscopio invertido Nikon TE2000E a un aumento de 20x (n = 15-30).

Análisis estadístico

Las variables categóricas se compararon con una prueba Exacta de Fisher de dos colas mientras que todas las variables continuas se compararon con la prueba *t* de Student para muestras no relacionadas con varianza desigual. Los inventores consideraron $P < 0,05$ como significativo.

Resultados

Haciendo referencia a la Figura 1, la inventora ha demostrado que los antagonistas de β 2-AR potencian la migración de los fibroblastos de la dermis. Además, como se muestra en la Figura 2, los antagonistas de β 2-AR potencian la contracción mediada por fibroblastos de la dermis de geles de colágeno flotantes. Por consiguiente, a la vista de estas observaciones, la inventora postula que la aceleración de la reparación de la heridas mediada por antagonista de β 2-AR puede también disminuir la acción de los fibroblastos, y de este modo reducir la cicatrización.

Para analizar esta hipótesis, se crearon heridas producidas con punzón de 6 mm en el lomo de ratones FVB hembra. Se trataron las heridas de grosor completo diariamente, por vía tópica, con 100 μ l de hidrogel solo o un hidrogel que contenía agonista de β 2-AR al 0,1 % (salbutamol) o antagonista de β 2-AR al 0,1 % (ICI 118.551). Haciendo referencia a la Figura 3, se muestran los resultados de una cuantificación macroscópica del cierre de la herida a partir de fotografías digitales diarias las cuales confirmaron la aceleración esperada del cierre de la herida después de la aplicación del antagonista de β 2-AR, mientras que el cierre de la herida se retrasó en los ratones tratados con agonista de β 2-AR. La tinción inmunohistoquímica de secciones de 5 μ m de 5 heridas fijadas en cinc, incluidas en parafina, 5 días después de la formación de la herida, demostraron que había un aumento de las células que expresaban α -actina de músculo liso en las heridas tratadas con antagonista de β 2-AR, en comparación con los controles (como se muestra en las Figuras 4 y 5). Además, las Figuras 6 y 7 demuestran que había un aumento en el depósito de colágeno III en las heridas tratadas con antagonista de β 2-AR, en comparación con los controles.

Sin embargo, al contrario de las heridas tratadas con antagonista de β 2-AR, como se muestra en las Figuras 4 y 5, las heridas tratadas con agonista de β 2-AR contenían menos células que expresaban α -actina de músculo liso que las heridas no tratadas. Además, como se muestra en las Figuras 6 y 7, las heridas tratadas con agonista de β 2-AR

contenían menos depósito de colágeno III que las heridas no tratadas de control. Por lo tanto, a la vista de estos datos, parece que el tratamiento con antagonista de $\beta 2$ -AR potencia el cierre de la herida, posiblemente reduciendo la cicatrización.

Para modelar la dermis de la herida *in vitro*, se sembraron fibroblastos de la dermis en geles de colágeno adherentes, los cuales mimetizan el estrés mecánico presente en el lecho de la herida (Grinnell, 2003, Trends Cell Biol 13, 264-9). Los fibroblastos en las matrices ancladas proliferarán y adoptarán la morfología elongada, bipolar característica de los miofibroblastos (Arora *et al.* (1999) Am J Pathol 154, 871-82), mientras que los fibroblastos sembrados en las matrices flotantes se harán quiescentes a los pocos días. Se sembraron geles de colágeno I al 50 % con 30.000 células por ml en la ausencia o presencia de un agonista de $\beta 2$ -AR o de un antagonista de $\beta 2$ -AR. Como se muestra en la Figura 8, mientras que los geles tratados con antagonista de $\beta 2$ -AR contenían fibroblastos que proliferaban rápidamente y permanecían anclados, los geles no tratados comenzaron a retraerse dentro de las 96 horas. Sin embargo, el tratamiento con agonista de $\beta 2$ -AR disminuyó la proliferación de fibroblastos en los geles, lo que dio como resultado la pérdida de tensión y la liberación del gel a partir de la placa dentro de las 72 horas.

Se sabe que TGF- $\beta 1$ estimula la proliferación de fibroblastos de la dermis (Ghahary *et al.* (2002) Wound Repair Regen 10, 328-35). Por lo tanto, la inventora formula la hipótesis de que los antagonistas de $\beta 2$ -AR pueden aumentar la producción de TGF- $\beta 1$ y/o TGF- $\beta 2$ y quizás reducir TGF- $\beta 3$ en los geles anclados que generan la proliferación prolongada de fibroblastos, y se dispuso a probar esta hipótesis. Por lo tanto, se cultivaron fibroblastos de la dermis en ausencia o presencia de un antagonista de $\beta 2$ -AR (ICI 118.551) o de un agonista de $\beta 2$ -AR (salbutamol) durante 24 horas. Se recogieron los sobrenadantes, y se realizaron ELISA para determinar las cantidades de TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ y TGF- $\beta 3$ que secretaban los fibroblastos de la dermis. Como se muestra en la Figura 9, el tratamiento con antagonista de $\beta 2$ -AR aumentó los niveles de TGF- $\beta 1$ en 3 veces y los niveles de TGF- $\beta 2$ en 1,6 veces, mientras que no tuvo efecto sobre los niveles de TGF- $\beta 3$. Sin embargo, de forma sorprendente, los agonistas de $\beta 2$ -AR disminuyeron de forma significativa la cantidad de TGF- $\beta 1$ que se secretó a partir de fibroblastos en 4 veces y aumentó la cantidad de TGF- $\beta 3$ secretada en 5 veces. Por lo tanto, la inventora se sorprendió más al observar que las alteraciones mediadas por agonista de $\beta 2$ -AR en los niveles de TGF- $\beta 1$ y TGF- $\beta 3$ reflejaban los niveles relativos de citocinas halladas en heridas de embriones, las cuales no cicatrizan (Redd *et al.* (2004) Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 359, 777-84). En efecto, se sabe que la reducción de los niveles de TGF- $\beta 1$ en el sitio de la herida en el adulto reduce la formación de cicatriz, mientras que se sabe que la adición de TGF- $\beta 3$ recombinante a las heridas en el adulto reduce la inflamación, la depósito de matriz y por lo tanto la cicatrización (Shah *et al.* (1995) J Cell Sci 108 (Pt 3), 985-1002).

En las heridas en adultos, las plaquetas agranulares de vasos sanguíneos dañados liberan un cóctel de citocinas y factores de crecimiento. El cóctel de factores de crecimiento promueve una respuesta inflamatoria rápida, iniciando la quimiotaxis de células inflamatorias hacia la herida. Los neutrófilos migran al sitio de la herida dentro de horas desde la formación de la herida, mientras que los macrófagos se incorporan a las heridas después de 2-3 días en los cuales se convierten en una fuente principal de factores de crecimiento, que incluye el factor de crecimiento profibrótico, TGF- $\beta 1$. Por el contrario, los embriones carecen de plaquetas y los linajes celulares inflamatorios se desarrollan bastante tarde en el desarrollo embrionario. Por consiguiente, el perfil de citocinas/factores de crecimiento de una herida embrionaria es marcadamente distinto del de una herida en el adulto. Las heridas embrionarias tienen niveles disminuidos de TGF- $\beta 1$ y $\beta 2$ y niveles aumentados de TGF- $\beta 3$ y no tienen respuesta inflamatoria. Los niveles de TGF- $\beta 1$ y $\beta 2$ neutralizantes o de TGF- $\beta 3$ potenciadores, pueden producir la curación sin cicatriz en ratones, ratas y cerdos adultos.

Aunque la inventora no desea limitarse a ninguna hipótesis, cree que la reducción de la incorporación de células inflamatorias a la herida podría disminuir los niveles de TGF- $\beta 1$ en la herida, y de este modo reducir la fibrosis y la cicatrización. Por lo tanto la inventora se dispuso a comprobar esta hipótesis después de la adición de un agonista selectivo de $\beta 2$ -AR a las heridas.

Haciendo referencia a las Figuras 10 y 11, la adición de agonista de $\beta 2$ -AR a las heridas *in vivo* disminuyó los números de neutrófilos presentes en la herida 3 días después de la formación de la herida. Además, haciendo referencia a las Figuras 12 y 13, la adición de agonista de $\beta 2$ -AR a las heridas *in vivo* disminuyó los números de macrófagos presentes en la herida, 3 días después de la formación de la herida. La inventora postula que una disminución de la inflamación mediada por agonista de $\beta 2$ -AR podría también contribuir a sus efectos anticicatrización y antifibrótico.

Conclusiones

La inventora ha demostrado que la aplicación de un agonista selectivo de $\beta 2$ -AR, tal como salbutamol, al sitio de la herida, da como resultado una disminución en la cantidad de TGF- $\beta 1$ y un aumento concomitante de la cantidad de TGF- $\beta 3$ y que esto media una modificación de la función, actividad y diferenciación fibroblástica. Estos cambios en la función, actividad y diferenciación fibroblástica dan como resultado una reducción del depósito de colágeno y una disminución de la acumulación de colágeno remodelado de forma anómala. Por lo tanto, la inventora cree que un agonista selectivo de $\beta 2$ -AR podría utilizarse como un tratamiento eficaz para varias afecciones médicas

caracterizadas por la fibrosis anómala, en las cuales se indujo mediante traumatismo o como consecuencia de iatrogenia o de susceptibilidad metabólica o genética.

- 5 De forma similar, un antagonista de β 2-AR se considera eficaz en condiciones en las cuales se necesita un aumento de la diferenciación fibroblástica y el aumento concomitante del depósito de colágeno, tal como en las cuales se necesita una reducción de las arrugas de la piel.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agonista del receptor β 2-adrenérgico para su uso en la reducción de la formación de una cicatriz queloide o de una cicatriz hipertrófica.
- 10 2. El agonista del receptor β 2-adrenérgico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para la reducción de la formación de una cicatriz queloide o de una cicatriz hipertrófica en una herida que es uno o más de: una rozadura, una abrasión, incisión quirúrgica, injerto de grosor parcial de piel, una quemadura, o que se produce como resultado de acné.
- 15 3. El agonista del receptor β 2-adrenérgico para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la quemadura comprende daño tisular que se produce por la exposición a temperaturas altas o bajas, agentes químicos o radiación.
- 20 4. Un agonista del receptor β 2 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el sujeto o individuo es un ser humano.
5. Un agonista del receptor β 2 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el agonista del receptor β 2-adrenérgico es uno cualquiera de salbutamol, fenoterol, butoxamina, clenbuterol, formoterol o salmeterol.

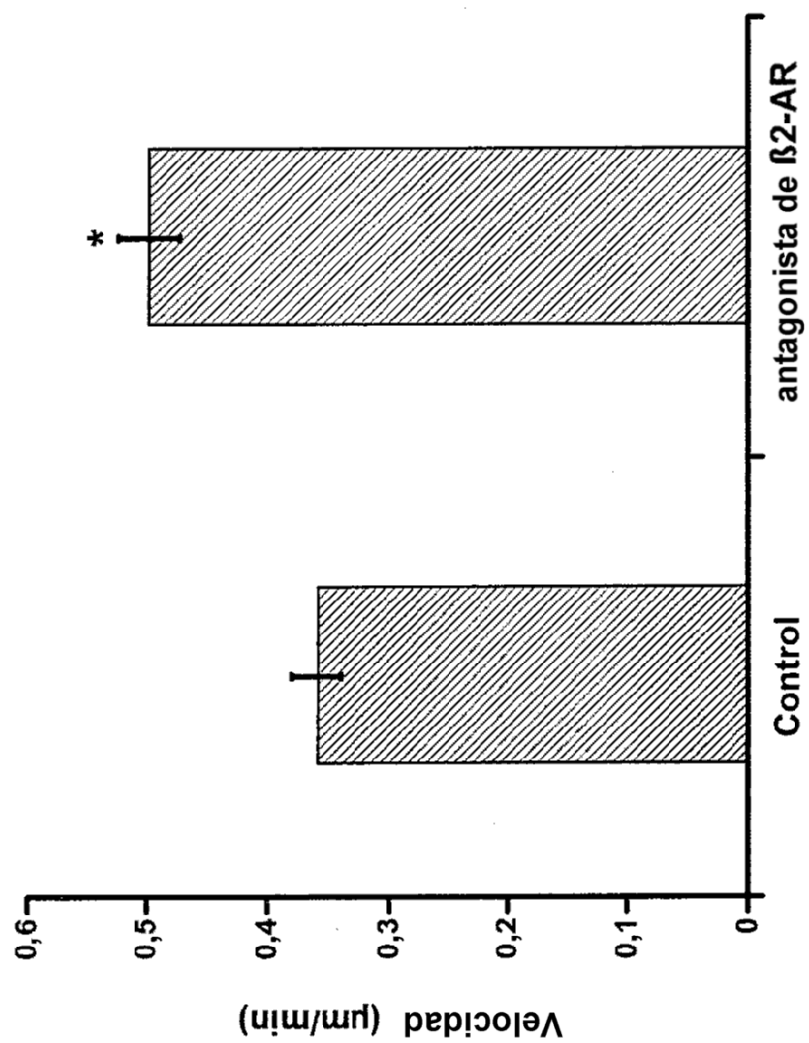
Figura 1

Figura 2

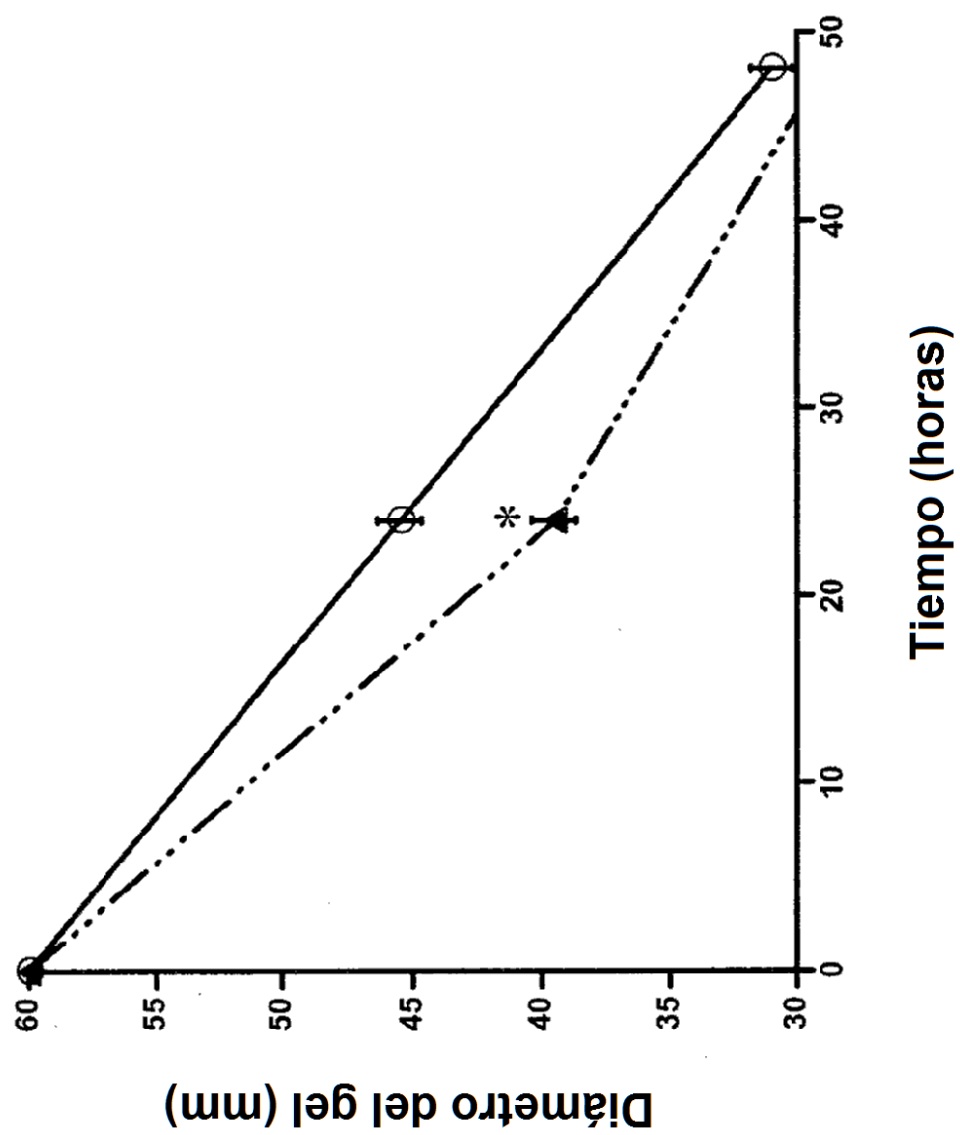


Figura 3

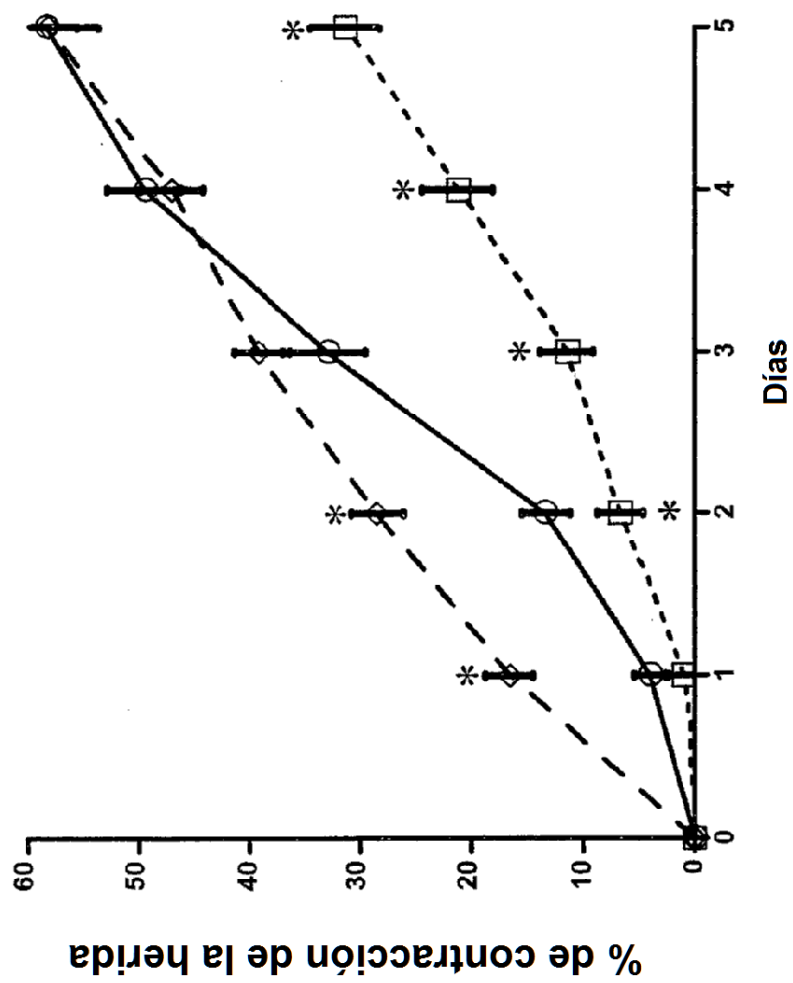


Figura 4

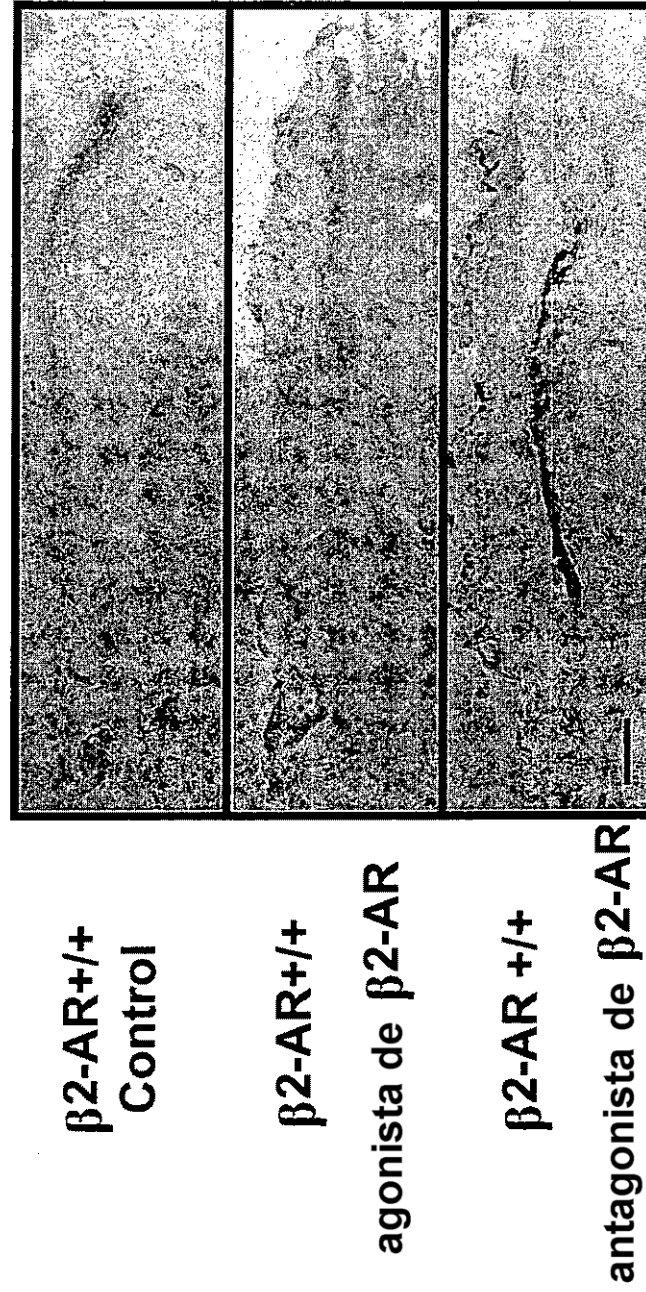


Figura 5

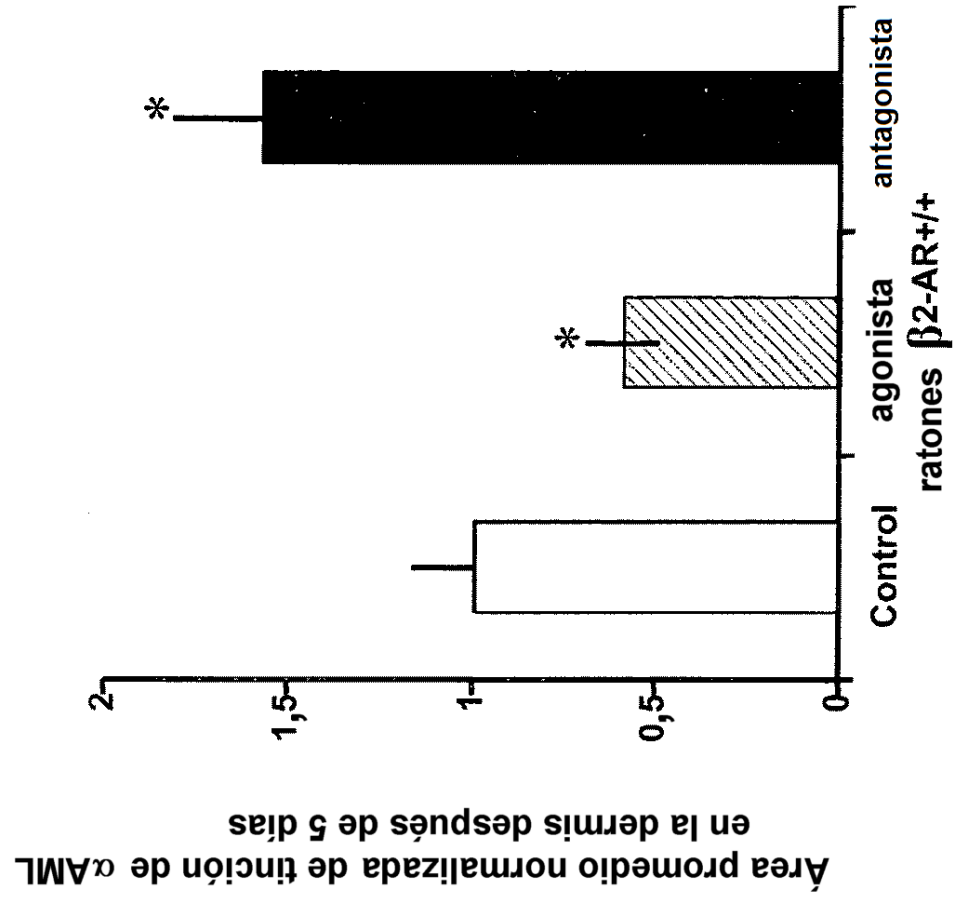


Figura 6

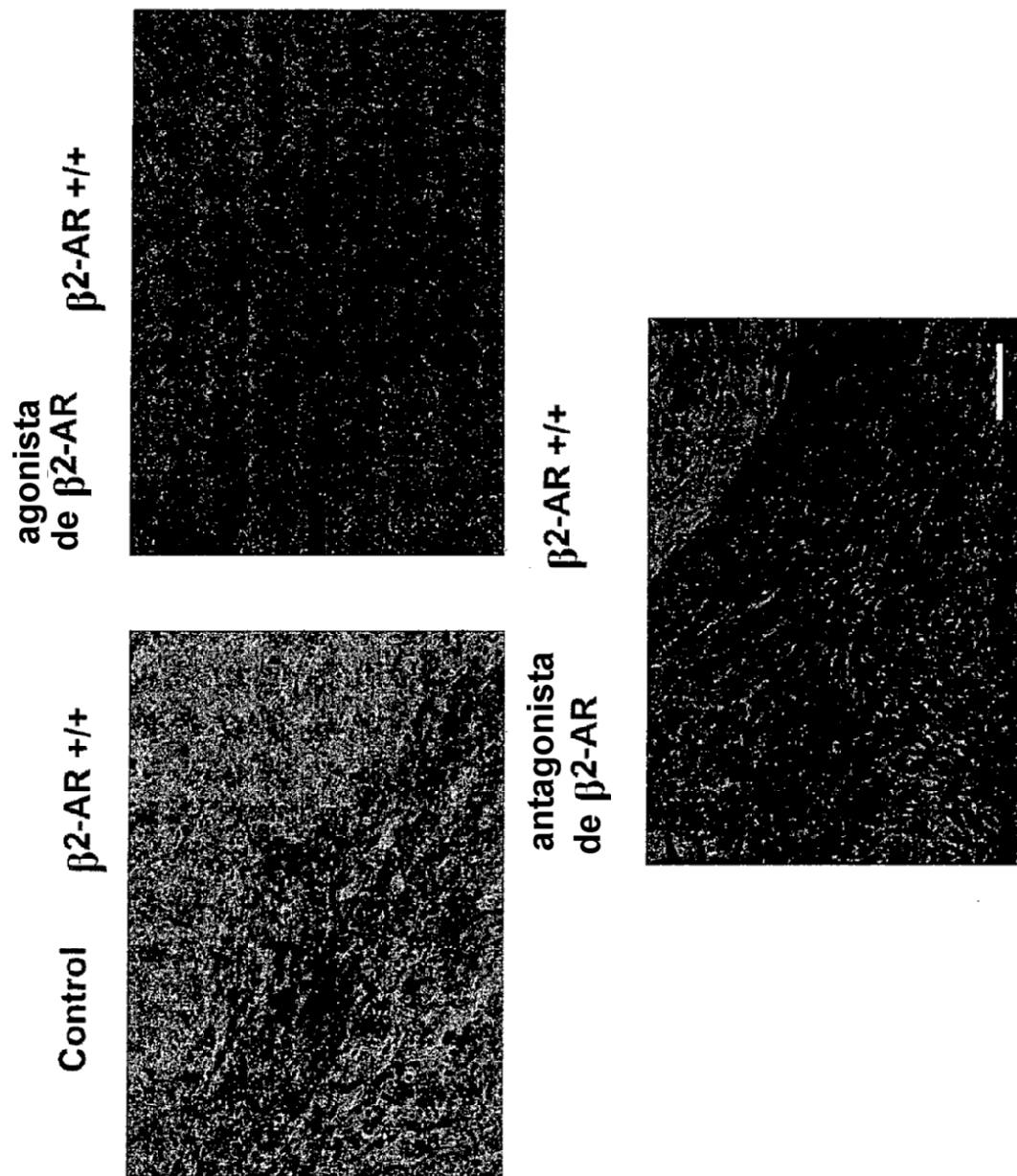
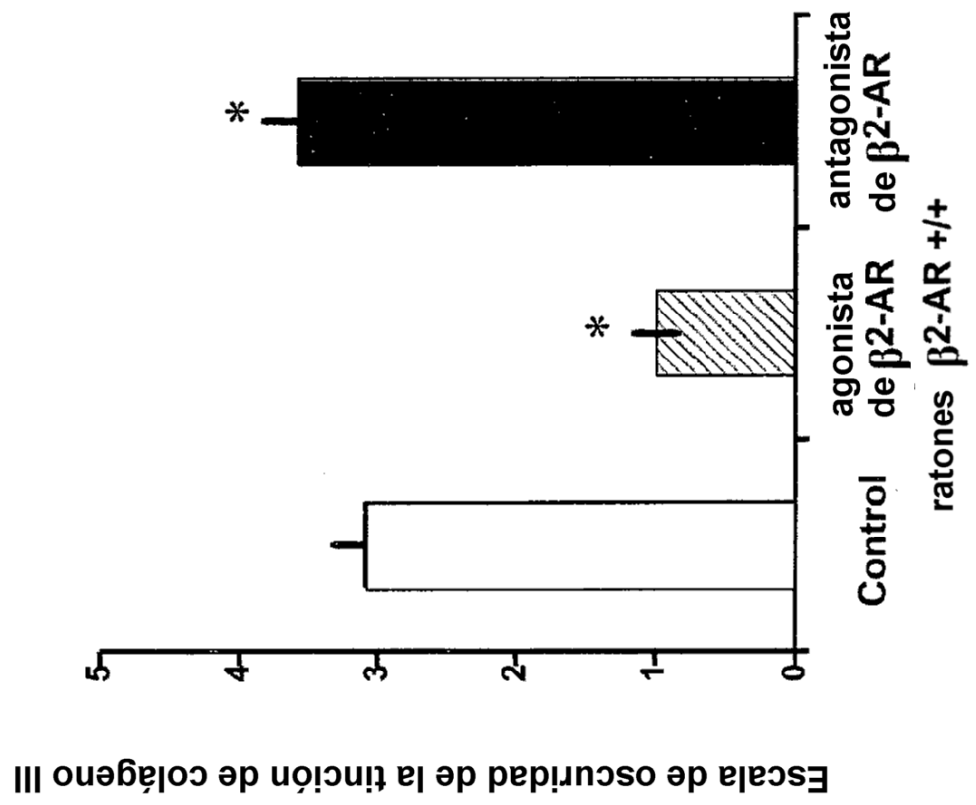


Figura 7



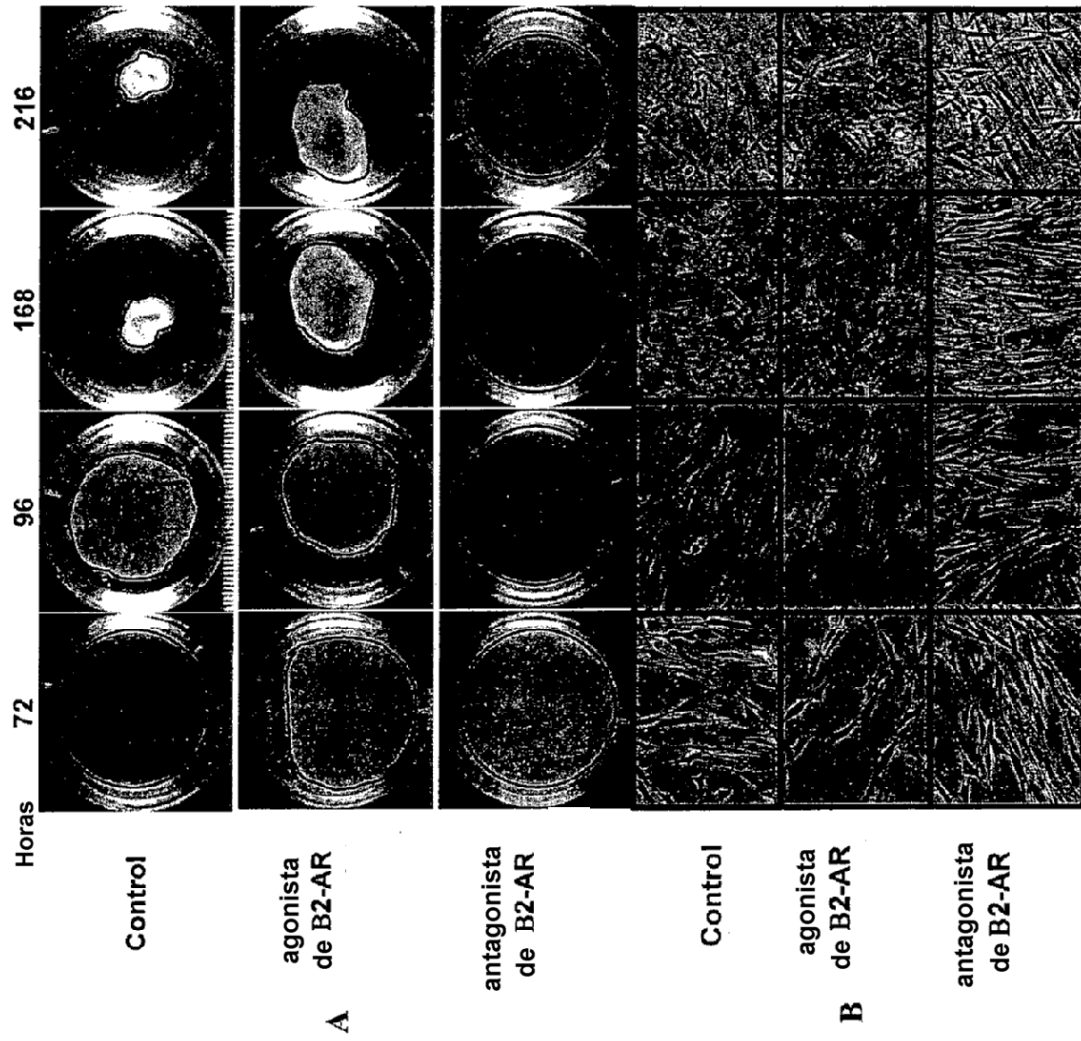


Figura 8

(2/2)

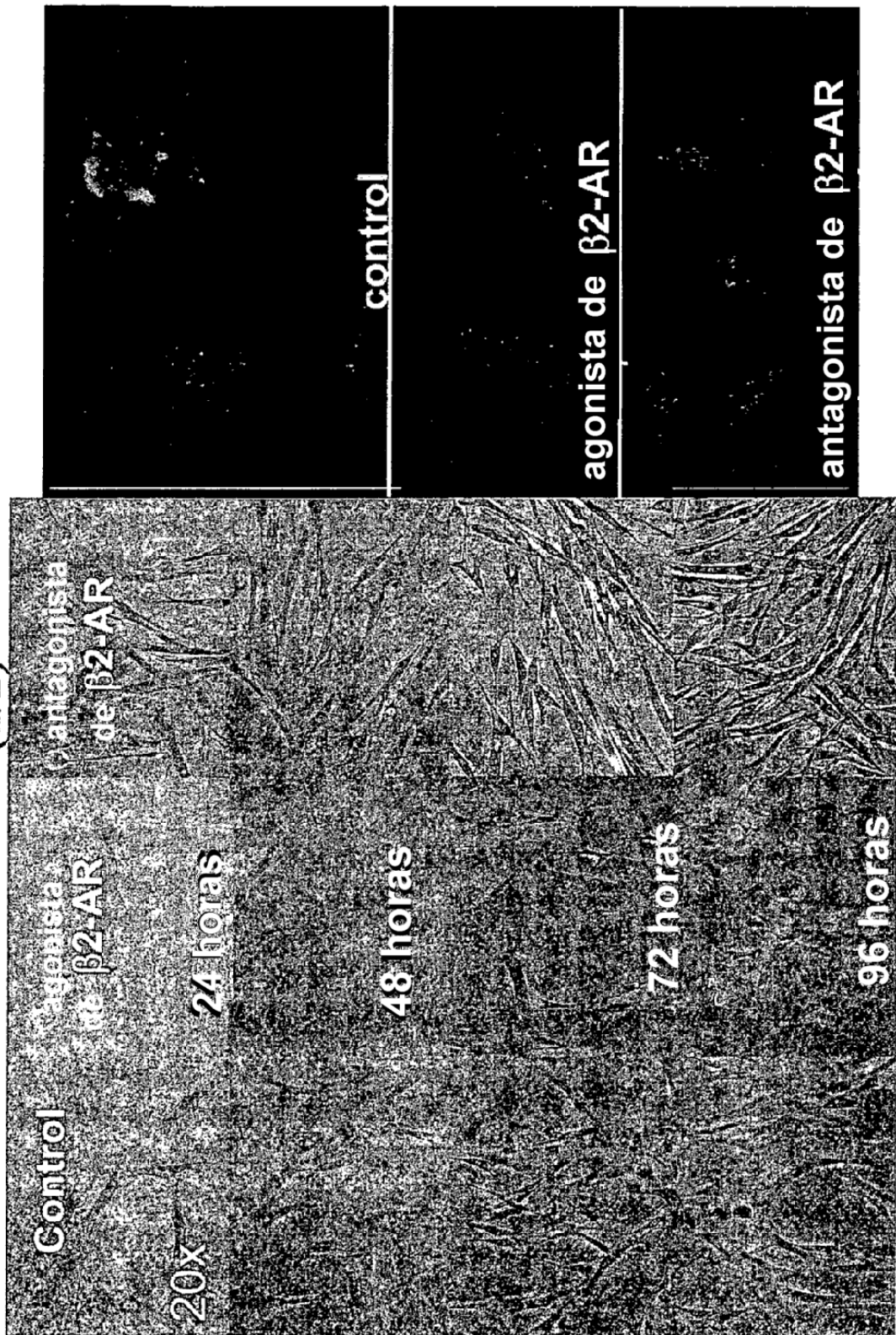


Figura 9

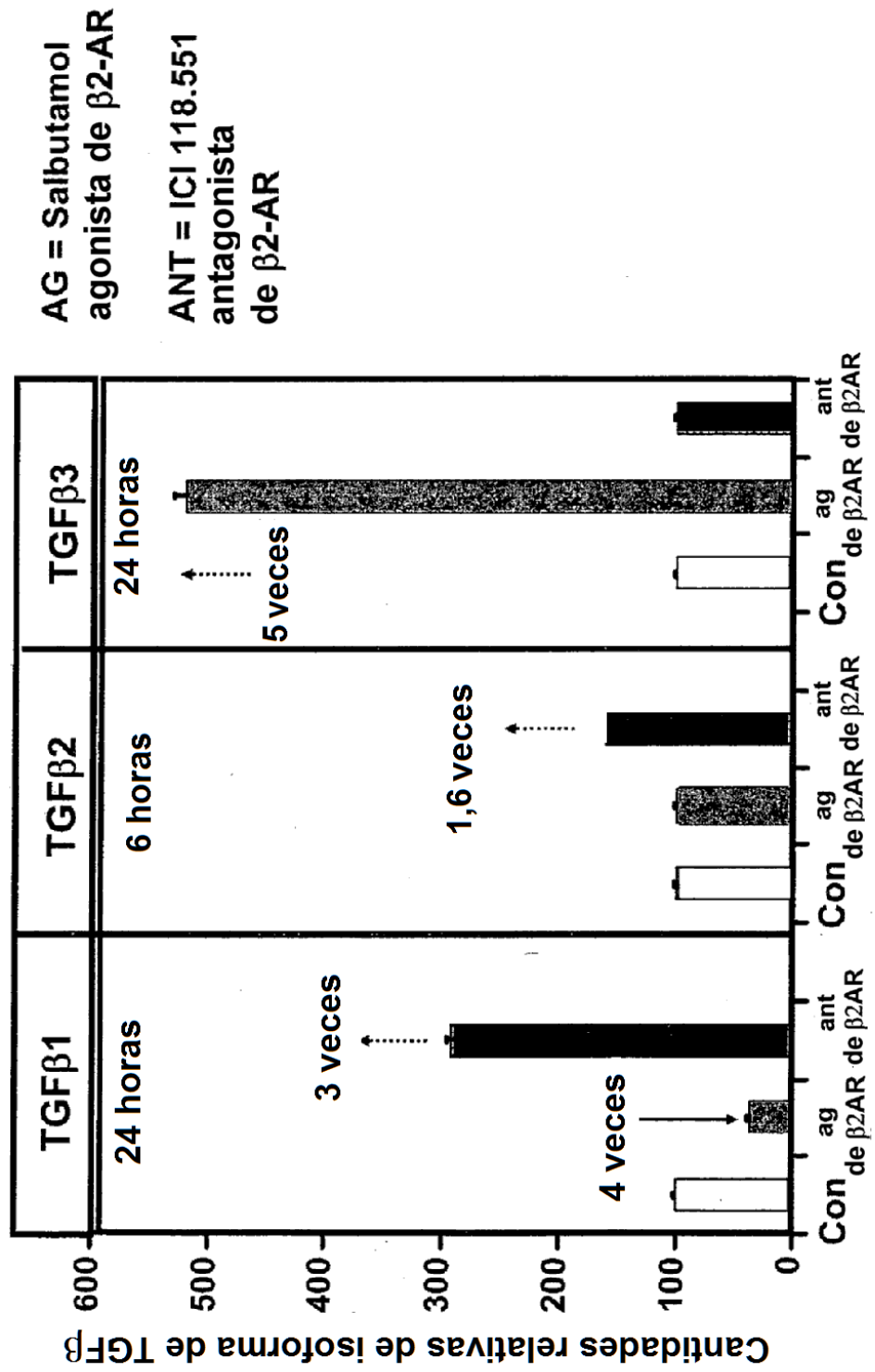


Figura 10

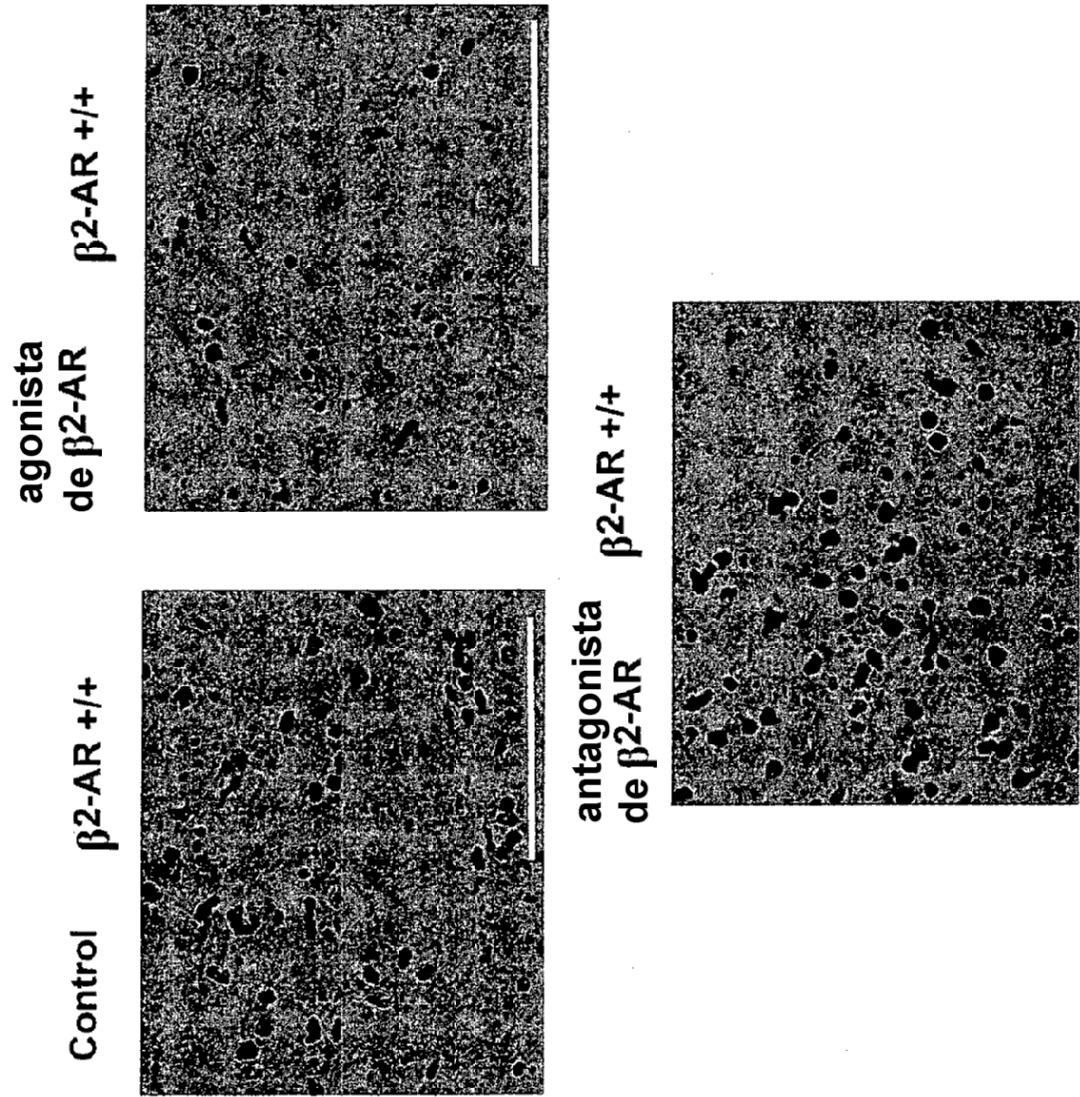


Figura 11

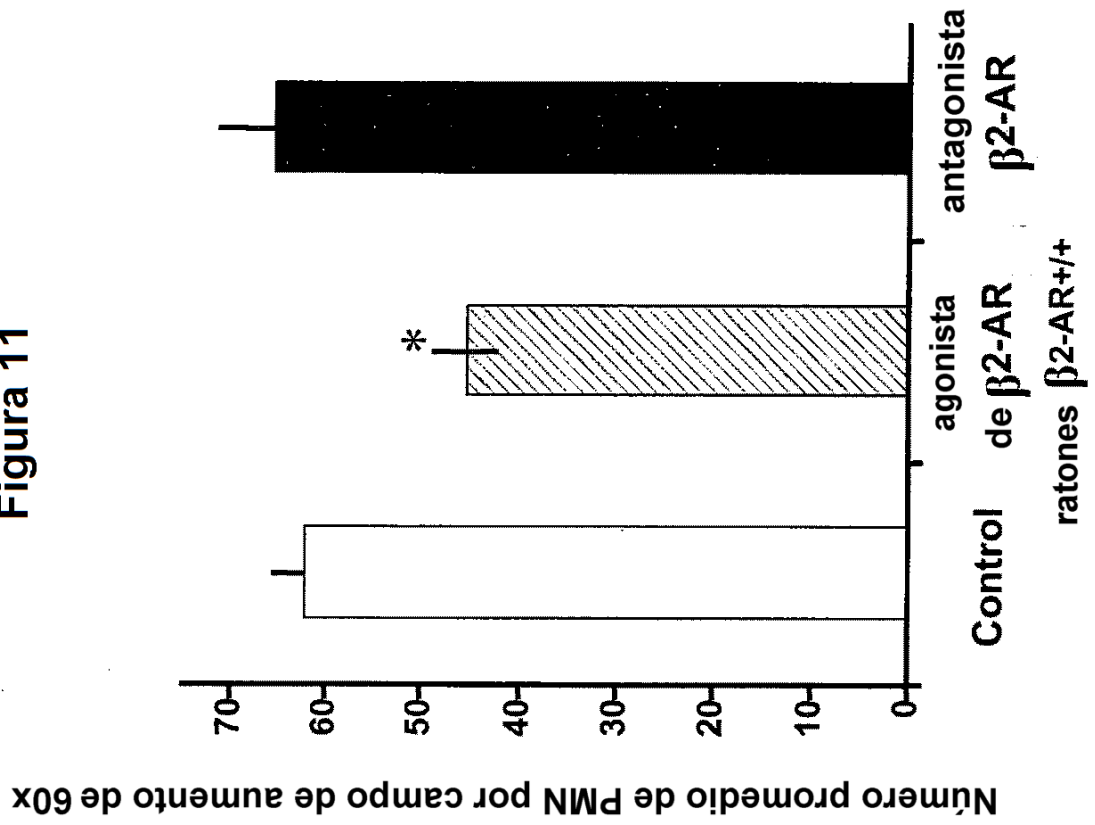


Figura 12

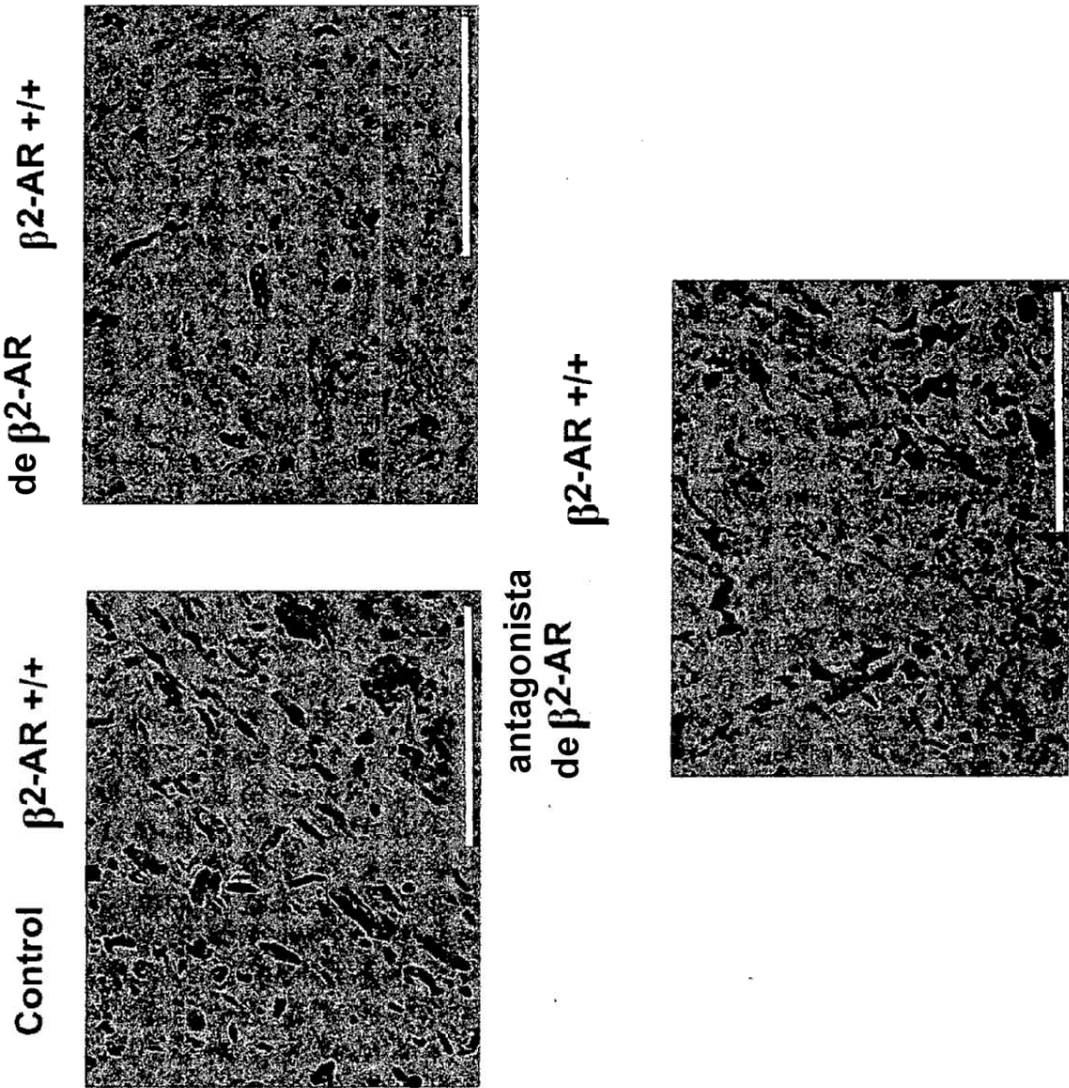


Figura 13

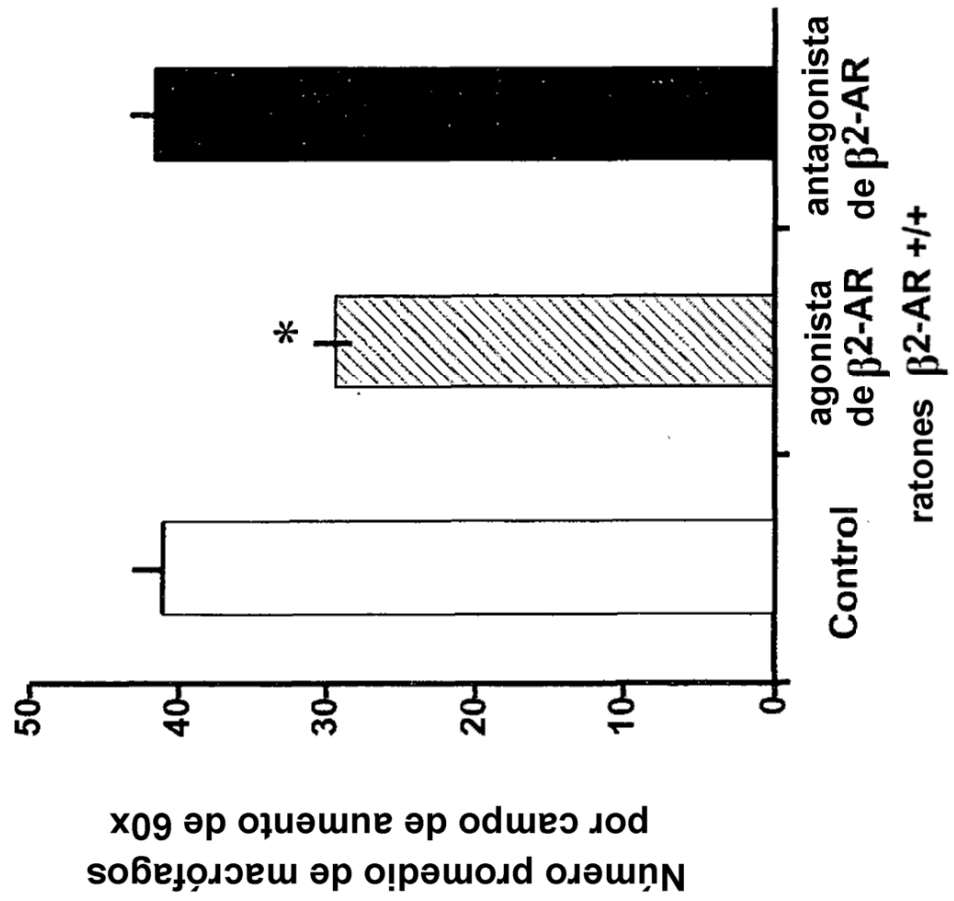


Figura 14

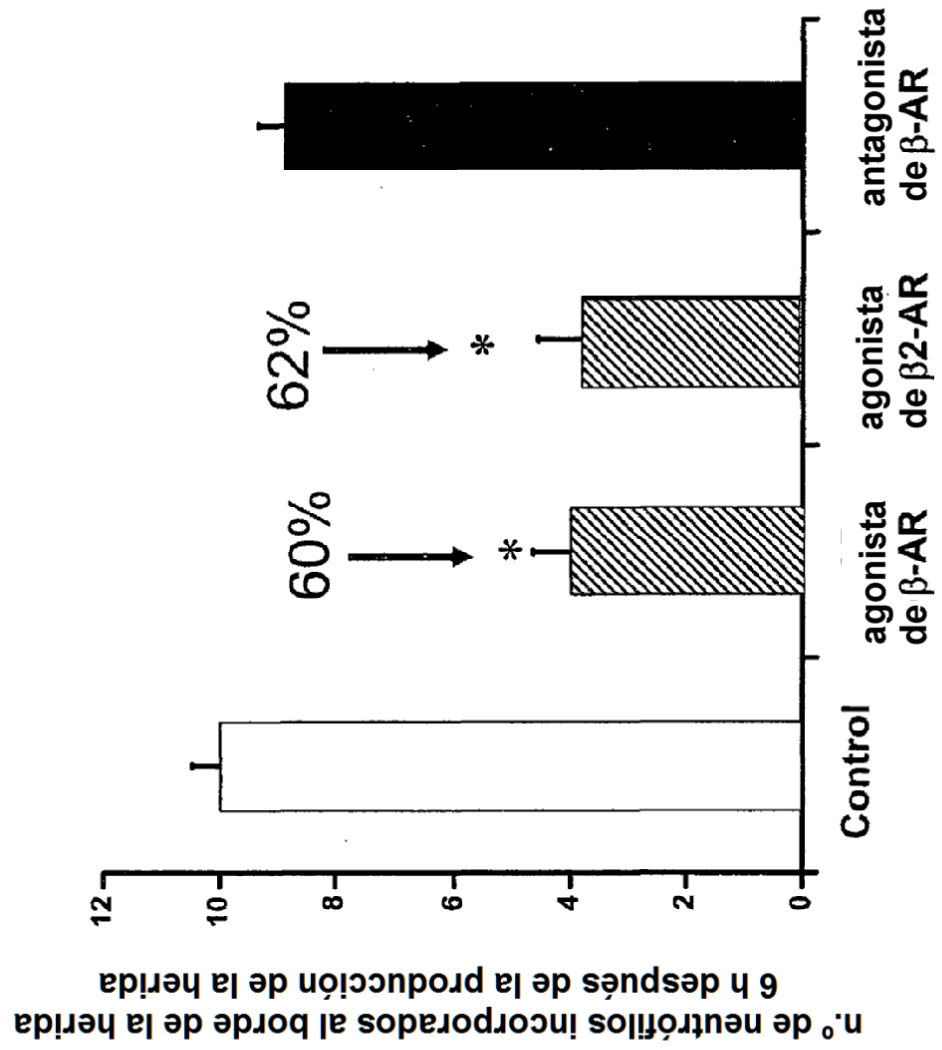


Figura 15

