(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 653 992**

(51) Int. CI.:

C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2014 PCT/EP2014/066342**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15018698**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2014 E 14744577 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 3030573**

(54) Título: **Dianas moleculares para la prevención y/o el tratamiento de la fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides**

(30) Prioridad:

05.08.2013 WO PCT/IB2013/001989

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2018

(73) Titular/es:

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (20.0%)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR;
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) (20.0%);
URGO RECHERCHE INNOVATION ET DÉVELOPPEMENT (20.0%);
UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (20.0%) y
ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE (20.0%)

(72) Inventor/es:

DUGAST-DARZACQ, CLAIRE;
NOIZET, MAÏTÉ y
DARZACQ, XAVIER

(74) Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

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

Dianas moleculares para la prevención y/o el tratamiento de la fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a al menos una diana molecular para la prevención y/o el tratamiento de la fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides. Además, la invención se refiere a un terapéutico innovador para la prevención o el tratamiento de la fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides y a un novedoso enfoque de terapia génica, que implica dicha diana molecular para la prevención y/o el tratamiento de dicha fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides. Adicionalmente, la invención se refiere a un método de prevención y/o tratamiento de la fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides utilizando dicho terapéutico o dicha terapia génica.

Estado de la técnica

La fibrosis es la formación en exceso de tejidos fibrosos o tejido cicatricial en un órgano o un tejido. La fibrosis es una respuesta patofisiológica común de los tejidos a una lesión crónica o inflamación a largo plazo. Hay muchos orígenes potenciales de esta fibrosis. Puede ser inducida por una enfermedad (heredada o no), por efectos secundarios de un tratamiento (por ejemplo radiación o quimioterapia), por un ambiente tóxico (por ejemplo fumar), o por una lesión. Puede afectar a diferentes órganos como la piel o los pulmones.

La fibrosis induce generalmente la insuficiencia del tejido del órgano que se ve afectado. El tejido fibrótico es similar a un tejido cicatricial, duro, grueso y rígido. A veces, también puede inflamarse. Por ejemplo, en el pulmón, la fibrosis da lugar a una falta de aliento, particularmente durante el ejercicio, y tos seca, debido a la expansión anormal del pulmón con fibrosis.

Algunos ejemplos de fibrosis son fibrosis pulmonar (pulmones), fibrosis quística (pulmón y sistema digestivo), enfermedad de Crohn (intestino), esclerodermia/esclerosis sistémica (pulmones o piel), artrofibrosis (rodilla, hombro, otras articulaciones), fibrosis cutánea con cicatrices hipertróficas o queloides.

Cuando el tejido afectado por este fenómeno es la piel, el proceso de cicatrización es principalmente el que se ve afectado.

La cicatrización natural se divide en tres fases secuenciales; cada fase se caracteriza por las actividades celulares específicas: la fase inflamatoria, la fase proliferativa y la fase de remodelación.

La primera fase, llamada la fase inflamatoria, comienza minutos después de la lesión. La ruptura de los vasos sanguíneos induce la formación de coágulos, compuestos principalmente de fibrina y fibronectina. El coágulo llena parcialmente la lesión y permite la migración de las células inflamatorias en la lesión. Las células inflamatorias son reclutadas para desbridar la herida. Las plaquetas secretan factores, tales como factores de crecimiento o citoquinas, que inducen el reclutamiento de células implicadas en la cicatrización (células inflamatorias tales como neutrófilos y macrófagos, fibroblastos y células endoteliales).

La segunda fase se llama la fase proliferativa y corresponde al desarrollo del tejido de granulación. Los fibroblastos migran a la zona de la herida, proliferan y forman una nueva matriz extracelular provisional mediante la secreción de proteínas de la matriz extracelular (MEC). Posteriormente, las células endoteliales migran para promover la neovascularización o la angiogénesis de la lesión. En el interior del tejido de granulación, los fibroblastos se activan y se diferencian en miofibroblastos, presentando propiedades contráctiles gracias a su expresión de alfa actina de músculo liso (similar a la de las células de músculo liso). Los miofibroblastos tienen un papel clave en la cicatrización, ya que proporcionan la contracción de la herida. Por último, los queratinocitos migran desde el borde de la herida, proliferan y se diferencian para reconstituir la epidermis.

La última fase del proceso de cicatrización aparece tras el cierre de la herida. Se corresponde con la remodelación del tejido de granulación. El tejido de granulación se reorganiza, el colágeno de tipo III se sustituye con colágeno de tipo I, puesto que la dermis normal está compuesta principalmente de colágeno de tipo I. Durante esta fase, los miofibroblastos de más se eliminan mediante apoptosis. La última fase de la cicatrización es larga. Un año después de la lesión, la cicatriz está remodelada; se vuelve menos roja y más fina.

Sin embargo, este proceso no sólo es complejo, sino que es frágil; es susceptible de interrupción o insuficiencia que conduce a la formación de heridas crónicas o no cicatrizantes o formación de cicatrices anormales. Los factores que pueden contribuir a esto incluyen enfermedades (tales como diabetes, enfermedad venosa o arterial), edad, infección o localización tisular.

Papel de los fibroblastos en la cicatrización

Los fibroblastos están implicados en el proceso de cicatrización, esto implica varias etapas de diferenciación de un fibroblasto quiescente a un fibroblasto movilizado que se va a transformar en un miofibroblasto y finalmente induce la apoptosis.

En la cicatrización normal, los fibroblastos se activan, y luego se diferencian en miofibroblastos que presentan propiedades contráctiles gracias a su expresión de alfa actina de músculo liso (aSMA). Los miofibroblastos son responsables del depósito de la matriz extracelular y del cierre de la herida al moverse más cerca de los bordes de la herida. En una cicatriz hipertrófica, la cicatrización de queloides o fibrosa, la actividad de los miofibroblastos persiste y conduce a la deformación del tejido, que es particularmente evidente, por ejemplo, en las cicatrices hipertróficas desarrolladas tras una lesión por quemaduras. El objetivo de la presente invención es mapear, en toda la escala del genoma, los diferentes genes que se activarán o desactivarán durante este proceso, y proporcionar así una firma molecular de una curación anormal que conduce a una cicatriz o fibrosis anormal.

Los tejidos conectivos representan una amplia variedad de estructuras físicas y diferentes funciones: tendones, cartílago, hueso, dermis, córnea, etc. Ya que los órganos y tejidos tienen funciones específicas (por ejemplo, funciones cutáneas son la protección, la sensación y la regulación del calor), los tejidos conectivos que constituyen estos tejidos y órganos tienen también funciones precisas proporcionadas por tipos celulares específicos. Por ejemplo, en la dermis papilar o reticular, se encuentran colágeno I, III y V, XIV, fibras elásticas, perlecano o SPARC. Por el contrario, colágenos tipo III, IX, X se encuentran asociados con agregano y sulfato de dermatano en los tendones.

Los fibroblastos son las principales células de los tejidos conectivos (o mesenquimales), en los que las células están rodeadas por la matriz extracelular (al contrario del epitelio en el que se articulan entre sí). Estos fibroblastos se activan en la cicatrización de los órganos dañados, ya que se proliferan, se diferencian en miofibroblastos, secretan colágenos y otras proteínas MEC específicas y fibras que componen el tejido conectivo del órgano, que conduce a la curación y reorganización del tejido.

Los miofibroblastos se definen como la fuente primaria de la excesiva deposición de proteínas MEC que se producen durante la fibrosis. Los miofibroblastos residentes surgen de una población de fibroblastos específicos de tejido que se proliferan y se someten a una activación en respuesta a una lesión, tal como es el caso en muchos órganos como la piel, los pulmones o el riñón.

Fibrosis, cicatrices hipertróficas y queloides

La fibrosis es una respuesta patofisiológica común de los tejidos a una lesión crónica. La fibrosis afecta a diferentes órganos como la piel o el pulmón. La fibrosis se caracteriza por una diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos y una acumulación excesiva de tejido conectivo. La fibrosis induce una pérdida de la función del órgano y, potencialmente, la insuficiencia del órgano.

Las cicatrices hipertróficas, queloides o fibrosas son resultado de la cicatrización anormal. Estas cicatrices se caracterizan por un depósito excesivo de proteínas MEC, especialmente colágeno. En estas heridas anormales, el tejido de granulación es hiperproliferativo, debido a un exceso de miofibroblastos («*Cellular and molecular pathology of HTS: basis for treatment*.» Armour A, Scott PG, Tredget EE. *Wound Repair Regen*. Sep-oct de 2007; 15 Supl. 1:S6-17. *Review. Erratum in: Wound Repair Regen*. Jul-ago de 2008; 16(4):582).

En la cicatrización normal, los fibroblastos se activan, y luego se diferencian en miofibroblastos que presentan propiedades contráctiles gracias a su expresión de alfa actina de músculo liso (aSMA). Los miofibroblastos son responsables del depósito de la matriz extracelular y del cierre de la herida al moverse más cerca de los bordes de la herida. En una cicatriz hipertrófica, la cicatrización queloide o fibrosa y la actividad de miofibroblastos persiste y conduce a la deformación del tejido, que es particularmente evidente, por ejemplo, en cicatrices hipertróficas desarrolladas tras una lesión por quemaduras.

Las cicatrices hipertróficas y queloides se caracterizan por el depósito de cantidades excesivas de colágeno que conducen a una cicatriz realzada (más intensa en cicatrices queloides que en las hipertróficas). Se forman con mayor frecuencia en los sitios de las espinillas, las perforaciones en el cuerpo, cortes y quemaduras.

Algunas cicatrices hipertróficas son cicatrices no funcionales, ya que limitan la función de la piel cuando se desarrollan. Generan una pérdida de movilidad de la zona de la cicatriz y las zonas vecinas, que pueden limitar completamente los movimientos (por ejemplo, el codo y la movilidad del brazo). En su mayoría, son resultado de quemaduras en zonas anatómicas específicas.

Por lo tanto, el tratamiento de la herida está especialmente adaptado a la herida en su etapa temprana si presenta un riesgo de desarrollar una cicatriz anormal o en su defecto no se cura correctamente. Al potenciar o manipular los factores que contribuyen a la cicatrización, puede ser posible por lo tanto corregir el proceso, reduciendo de este

modo la probable aparición de una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide. Si un tejido (de un órgano, por ejemplo) es susceptible a desarrollar una fibrosis, el tratamiento de este tejido en una etapa temprana es también de interés.

El documento WO 2009/085274 desvela métodos de tratamiento de la formación de cicatrices hipertróficas y queloides.

La presente invención puede mejorar la calidad de vida del paciente, asegurando que las nuevas heridas no se conviertan en fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides y las heridas existentes puedan ser tratadas de una manera que promueva activamente la curación y de paso que prevenga la formación de una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o queloide.

Objeto de la invención

En un aspecto, la presente descripción se refiere a un compuesto terapéutico que comprende:

- un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en HIC1, FOXS1, CREB5, IRF7, POU2F2, STAT4, TCF4, preferentemente TCF4, FOXS1, STAT4
  y/o
- un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en MAF, MEOX2, SIX2 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide.

La presente descripción se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un compuesto terapéutico como se ha definido anteriormente junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

La descripción también se refiere a un método de preparación de una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente, que comprende poner junto o en asociación dicho compuesto terapéutico con un portador o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método de tratamiento o prevención de una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide en un mamífero en el que dicho método comprende administrar a dicha fibrosis, cicatriz hipertrófica o queloide o tejido susceptible de desarrollar una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide un compuesto terapéutico que comprende:

- un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en HIC1, FOXS1, CREB5, IRF7, POU2F2, STAT4, TCF4, preferentemente TCF4, FOXS1, STAT4
  y/o
- un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en MAF, MEOX2, SIX2.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para el tratamiento de una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide o un tejido susceptible de desarrollar una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide en el que dicho kit comprende:

(a) al menos un compuesto terapéutico o composición como se ha definido anteriormente y

(b) al menos un vendaje para aplicarse a dicha herida.

La descripción también se refiere a una combinación terapéutica para el tratamiento de una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide o un tejido susceptible de desarrollar una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide que comprende:

(a)

- un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en HIC1, FOXS1, CREB5, IRF7, POU2F2, STAT4, TCF4, preferentemente TCF4, FOXS1, STAT4
  y/o
- un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en MAF, MEOX2, SIX2

y

b) al menos un terapéutico adicional.

En otro aspecto, la descripción se refiere al uso de:

- un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en HIC1, FOXS1, CREB5, IRF7, POU2F2, STAT4, TCF4, preferentemente TCF4, FOXS1, STAT4
y/o
- un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en MAF, MEOX2, SIX2

para el tratamiento de una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide o un tejido susceptible de desarrollar una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide, en el que dicho agente modula la diferenciación y/o la actividad de fibroblastos y miofibroblastos

Descripción detallada de la invención

Por consiguiente, en un aspecto de la descripción, se proporciona un compuesto terapéutico que comprende:

(a) un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en:

HIC1, FOXS1, CREB5, IRF7, POU2F2, STAT4, TCF4 preferentemente TCF4, FOXS1, STAT4
un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en MAF, MEOX2, SIX2

para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides.

En un aspecto de la invención, se proporciona un compuesto terapéutico que comprende un agente que inhibe la actividad del gen HIC1, en el que dicho agente se selecciona entre el grupo que consiste en ADN o ARN antisentido, ARNip, ARNph, TALENS o ribozimas, desnudos o en forma de vectores plasmídicos o virales, y anticuerpos, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide.

En una realización preferida de la invención, dicho compuesto terapéutico también comprende:

un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en E2F1, EGR2, GLI1, JUN, MYC, SMAD3, SMAD4, SOX9, SRF, preferentemente EGR2, SOX9
un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en ETS1, PPARG

para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides.

De hecho, los inventores han descubierto que estos genes estaban involucrados en el proceso de fibrosis y que su regulación negativa o regulación positiva sería útil para el tratamiento de la fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides.

De este modo, la invención implica un innovador enfoque de terapia génica y/o un innovador enfoque de terapia proteica.

Como se utiliza en la presente memoria, el “agente que inhibe la actividad de un gen” o “inhibidor” se refiere a un agente que puede regular negativamente dicho gen. Abarca agentes que actúan a nivel de la expresión génica, así como agentes que actúan en el nivel de la proteína, ya sea por disminución de la cantidad de proteína presente en una célula dada, o mediante la inhibición de la actividad de la proteína.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “agente que potencia la actividad de un gen” o “potenciador” se refiere a un agente que puede regular positivamente dicho gen. Abarca agentes que actúan a nivel de la expresión génica, así como agentes que actúan en el nivel de la proteína, ya sea mediante el aumento de la cantidad de proteínas presente en una célula dada, o por el aumento de la actividad de la proteína. También abarca agentes que actúan aguas arriba o aguas abajo de dicho gen o proteína en una vía de señalización.

En una realización de la divulgación, el terapéutico innovador comprende un inhibidor o potenciador de la expresión génica, este inhibidor o potenciador puede ser un ADN o ARN antisentido, ARNip, ARNph, ADNc, TALENS o ribozimas, desnudos o en forma de vectores plásmidicos y virales o un fármaco.

En una realización preferida de la divulgación, dicho compuesto terapéutico es un ARNip seleccionado entre el grupo que consiste en ARNip que tiene la secuencia como se expone en SEQ ID No: 11 a SEQ ID No: 74 y mezclas de los mismos:

Gen diana	Secuencia (5' --> 3')	SEQ ID No:
CREB5	CCGGCGAAGGGUGGUAGACGA	11
	AACAGUAUUCUGUAGGAUCUA	12
E2F1	UCGGAGAACUUUCAGAUCU	13
	GAGAAGUCACGCUAUGAGA	14
	GAGCAGAUGGUUAUGGUGA	15
	GAACAGGGCCACUGACUCU	16
EGR2	GAAGGCAUAAUCAAUAUUG	17
	CUACUGUGGCCGAAAGUUU	18
	GAAACCAGACCUUCACUUA	19
	GAGAAGAGGUCGUUGGAUC	20
FOXS1	AGGGCCAAUAAAGCCAUGUGA	21

	CUGGCUCUAGGACCUGAAGAA	22
GLI1	GCAAAUAGGGCUUCACAUA	23
	AGGCUCAGCUUGUGUGUAA	24
	GGACGAGGGACCUUGCAUU	25
	CAGCUAGAGUCCAGAGGUU	26
HIC1	GCACAGCAACGCAACCUCA	27
	GAGCUUCGGUGACAACCUG	28
	UGAUCAUCGUGGUGCAGAA	29
	GACCAUCGACCGUUUCUCU	30
IRF7	GCACAAGGUGUACGCGCUC	31
	CAACUUCCGCUGCGCACUG	32
	GCGCGCAUCUUCAAGGCCU	33
	CAGGCACGGACCAGACUGA	34
JUN	GAGCGGACCUUAUGGCUAC	35
	GAACAGGUGGCACAGCUUA	36
	GAAACGACCUUCUAUGACG	37
	UGAAAGCUCAGAACUCGGA	38
MYC	ACGGAACUCUUGUGCGUAA	39
	GAACACACAACGUCUUGGA	40
	AACGUUAGCUUCACCAACA	41
	CGAUGUUGUUUCUGUGGAA	42
SMAD3	CAACAGGAAUGCAGCAGUG	43
	GAGUUCGCCUUCAAUAUGA	44
	GGACGCAGGUUCUCCAAAC	45
	UUAGAGACAUCAAGUAUGG	46
SMAD4	GCAAUUGAAAGUUUGGUAA	47
	CCCACAACCUUUAGACUGA	48
	GAAUCCAUAUCACUACGAA	49

	GUACAGAGUUACUACUUAG	50
SOX9	GGAACAACCCGUCUACACA	51
	GAACAAGCCGCACGUCAAG	52
	GACCUUCGAUGUCAACGAG	53
	GGAAGUCGGUGAAGAACGG	54
SRF	UGAGACAGGCCAUGUGUAU	55
	GGACUGUGCUGAAGAGUAC	56
	GCACCAAGAGUGAAUGAUC	57
	GCACCAGUGUCUGCUAGUG	58
STAT1	GCACGAUGGGCUCAGCUUU	59
	CUACGAACAUGACCCUAUC	60
	GAACCUGACUUCCAUGCGG	61
	AGAAAGAGCUUGACAGUAA	62
STAT4	GAACUAAACUAUCAGGUAA	63
	GCAUGUAGCUGUGGUUAUU	64
	CAAUCUAGCUACAGUGAUG	65
	CUGCGAGACUACAAAGUUA	66
TCF4	GCACUUGCUUCGAUCUAUU	67
	GACAAAGAGCUGAGUGAUU	68
	GCACAGCUGUUUGGUCUAG	69
	CAACGGGACAGACAGUAUA	70
USF2	GCAAGACGGGAGCGAGUAA	71
	GGAGGGACAAGAUCAACAA	72
	GAAGAGCCCAGCACAACGA	73
	CAAAAUCCCUUCAGCAAUG	74

Estos ARNip inhiben la expresión de los genes diana.

En una realización de la divulgación, el agente que potencia la actividad de un gen es un ADNc.

Normalmente, la expresión del gen CREB5 puede ser potenciada mediante la administración del ADNc CREB5.

Lo mismo se aplica, *mutatis mutandis*, a todos los demás genes enumerados.

El ADNc se puede administrar o entregar a la fibrosis, cicatriz hipertrófica o queloide para tratarse en cualquier forma adecuada conocida por el experto en la materia. Puede ser entregado como ADN desnudo, utilizando vectores plasmídicos, vectores virales, o cualquier otro medio adecuado.

En otra realización de la divulgación, el terapéutico innovador comprende un inhibidor o potenciador de la proteína codificada por la función génica, este inhibidor o potenciador puede ser un agente de unión que se une, reversible o irreversiblemente, para inhibir o potenciar la función proteica tal como un anticuerpo o un agonista o antagonista proteico conocido, o sintetizado; o un agente que funciona aguas arriba o aguas abajo del mecanismo de señalización de la proteína para inhibir o potenciar la señalización de la proteína y así negar o potenciar los efectos de la expresión de la proteína en el tejido de la herida.

Dicho agente (inhibidor o potenciador) puede ser cualquier agente conocido en la técnica para actuar sobre una diana molecular dada.

Normalmente, el potenciador de PPARG se puede seleccionar entre el grupo que consiste en tiazolidinedionas, tales como rosiglitazona y pioglitazona (*Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. octubre de 2005; 5(5):377-86. *Role of PPAR-gamma agonist thiazolidinediones in treatment of pre-diabetic and diabetic individuals: a cardiovascular perspective*. Dumasia R, Eagle KA, Kline-Rogers E, May N, Cho L, Mukherjee D).

Normalmente, el inhibidor de PPARG puede ser G3335 (CAS 36099-95-3) (*Chembiochem*. enero de 2006; 7(1): 74-82. *The dipeptide H-Trp-Glu-OH shows highly antagonistic activity against PPARgamma: bioassay with molecular modeling simulation*. Ye F, Zhang ZS, Luo HB, Shen JH, Chen KX, Shen X, Jiang HL.).

El terapéutico de la invención sirve para su uso en el tratamiento o la prevención de la fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide. Estas fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides son preferentemente fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides en un mamífero, más preferentemente fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides en un ser humano.

Un anticuerpo para uso en la invención es más idealmente un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo humanizado.

En los aspectos anteriores y realizaciones de la invención, el terapéutico se formula para aplicación tópica, pero también puede ser formulado para administración oral, cutánea, transcutánea, transdérmica, intravenosa o cualquier aplicación conocida.

Alternativamente, en los aspectos anteriores de la invención, el terapéutico se formula para la aplicación en un vendaje o impregnación de un vendaje.

El terapéutico de la invención puede administrarse con un agente activo. Tal agente activo puede ser un antibiótico o agente antibacteriano, un antiséptico, un antiviral, un antifúngico, un analgésico, un agente antiinflamatorio, un agente cicatrizante, un agente queratolítico, un agente anestésico. Tales activos son bien conocidos por los expertos.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide que comprende un terapéutico de la invención junto con un portador farmacéutico aceptable.

Otros materiales activos también pueden estar presentes en la composición farmacéutica, como se considere apropiado o conveniente para la fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide o un tejido susceptible de desarrollar una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide que se está tratando.

El portador, o, en caso de haber más de uno presente, cada uno de los portadores, ha de ser aceptable en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor.

Las formulaciones incluyen las adecuadas para administración tópica, oral, rectal, nasal o cualquier administración conocida y pueden prepararse por cualesquiera métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia.

La composición se puede preparar al poner en asociación el terapéutico de la invención y el portador. En general, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente en asociación el agente activo con portadores líquidos o poner finamente en asociación el activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego si es necesario dando forma al producto. La invención se extiende a métodos para preparar una composición farmacéutica que comprende poner junto o en asociación un terapéutico de la invención con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Para la aplicación tópica a la piel, los compuestos de uso convencional se pueden constituir en una crema, pomada, gel, gelatina, solución o suspensión etc. Las formulaciones en crema o pomada que se pueden utilizar para la composición son formulaciones convencionales bien conocidas en la técnica.

Las formulaciones para la administración oral en la presente invención pueden presentarse como: cápsulas, sobres o comprimidos conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del agente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión del agente activo en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite; o como un bolo, etc.

Para composiciones para administración oral (p. ej., comprimidos y cápsulas), la expresión “portador aceptable” incluye vehículos tales como excipientes comunes, p. ej., agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona (Povidona), metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y almidón; materiales de relleno y portadores, por ejemplo almidón de maíz, gelatina, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, cloruro sódico y ácido algínico; y lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de sodio y otros estearatos metálicos, ácido esteárico de glicerol estearato, fluido de silicona, talco, ceras, aceites y sílice coloidal. Los agentes aromatizantes tales como menta, aceite de gaulteria, aroma de cereza y similares también se pueden utilizar. Puede ser deseable añadir un agente colorante para hacer que la forma de dosificación sea fácilmente identificable. Los comprimidos también pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica.

Adicionalmente, o alternativamente, el aspecto adicional de la descripción también, o alternativamente, comprende un método novedoso para la prevención y/o el tratamiento de la fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide cuyo método comprende:

administrar a dicha fibrosis, cicatriz hipertrófica o queloide:

un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en HIC1, FOXS1, CREB5, IRF7, POU2F2, STAT4, TCF4 preferentemente TCF4, FOXS1, STAT4

y/o

- un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en MAF, MEOX2 y SIX2.

La descripción también comprende un método innovador para la prevención y/o el tratamiento de la fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide cuyo método comprende además la administración a dicha fibrosis, cicatriz hipertrófica o queloide de:

- un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado entre E2F1, EGR2, GLI1, JUN, MYC, SMAD3, SMAD4, SOX9 y SRF preferentemente EGR2, SOX9
  y/o
- un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado entre ETS1, PPARG.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la invención, se proporciona un kit para la prevención y/o el tratamiento de la fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides, cuyo método comprende, en el que dicho kit comprende:

(a) al menos un terapéutico como se describe en la reivindicación 1; y

(b) al menos un dispositivo médico para aplicarse a dicha fibrosis, cicatriz hipertrófica o queloide o tejido susceptible de desarrollar una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide.

El término “dispositivo médico” incluye un instrumento, aparato, implante, reactivo *in vitro*, o artículo similar o relacionado que se utiliza para diagnosticar, prevenir o tratar una enfermedad u otras afecciones, y no logra sus fines a través de una acción química en o sobre el cuerpo (lo que haría un fármaco). Considerando que los productos medicinales (también llamados productos farmacéuticos) alcanzan su acción principal por medios farmacológicos, metabólicos o inmunológicos, los dispositivos médicos actúan por otros medios como medios físicos, mecánicos o térmicos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una combinación terapéutica para la prevención y/o el tratamiento de la fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides que comprenden un inhibidor o potenciador de la expresión génica y un inhibidor o potenciador de la actividad proteica.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un terapéutico para prevenir y/o tratar la fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides y un inhibidor o potenciador de la proteína, o un homólogo del mismo.

De acuerdo con un aspecto adicional de la descripción se proporciona el uso de un inhibidor o potenciador de la proteína, o un homólogo del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide o un tejido susceptible de desarrollar una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide.
De acuerdo con un aspecto adicional de la descripción se proporciona el uso de un inhibidor o potenciador de la proteína, o un homólogo del mismo, para tratar una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide o un tejido

susceptible de desarrollar una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide. El término “homólogo”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a secuencias de aminoácidos que tienen una secuencia al menos 50 % homóloga a la secuencia de aminoácidos de secuencia FOXS1, CREB5, E2F1, EGR2, ETS1, GLI1, HIC1, IRF7, JUN, MAF, MEOX2, MYC, POU2F2, PPARG, SIX2, SMAD3, SMAD4, SOX9, SRF, STAT4, TCF4 y que retienen la actividad biológica de FOXS1, CREB5, E2F1, EGR2, ETS1, GLI1, HIC1, IRF7, JUN, MAF, MEOX2, MYC, POU2F2, PPARG, SIX2, SMAD3, SMAD4, SOX9, SRF, STAT4, TCF4. Se prefiere que los homólogos sean al menos 75 % homólogos a la secuencia peptídica FOXS1, CREB5, E2F1, EGR2, ETS1, GLI1, HIC1, IRF7, JUN, MAF, MEOX2, MYC, POU2F2, PPARG, SIX2, SMAD3, SMAD4, SOX9, SRF, STAT4, TCF4 y, en orden creciente de preferencia, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % homólogos a la secuencia peptídica FOXS1, CREB5, E2F1, EGR2, ETS1, GLI1, HIC1, IRF7 JUN, MAF, MEOX2, MYC, POU2F2, PPARG, SIX2, SMAD3, SMAD4, SOX9, SRF, STAT4, TCF4.

El tratamiento de la fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide descrito en la presente memoria incluye la referencia a un uso humano o veterinario.

En las reivindicaciones siguientes y en la descripción precedente de la invención, excepto cuando el contexto requiera lo contrario para expresar un idioma o implicación necesaria, la palabra “comprende”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende” se utiliza en un sentido inclusive, es decir para especificar la presencia de las características indicadas pero no excluye la presencia o adición de características adicionales en diversas realizaciones de la invención.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención pueden ser como se describen en relación con cualquiera de los otros aspectos.

Otras características de la presente invención resultarán evidentes a partir de los siguientes ejemplos. En términos generales, la invención se extiende a cualquier aspecto innovador, o a cualquier combinación innovadora, de las características desveladas en la presente memoria descriptiva (incluyendo las reivindicaciones adjuntas y dibujos). De este modo, los rasgos, números enteros, características, compuestos o restos químicos descritos junto con un aspecto, realización o ejemplo de la invención han de entenderse para ser aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en la presente memoria, a menos que sean incompatibles con los mismos.

La identidad completa de los genes de acuerdo con la invención está disponible en la base de datos de CNIB (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), o es bien conocida por los expertos en la materia.

La presente invención se describirá ahora por medio de los siguientes ejemplos con referencia particular a las Figuras y a la Tabla, en las que:

Descripción de las figuras

Figura 1: Factores de transcripción clave en la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos

a) Explicación gráfica del análisis de una red de genes in silico
b) Tabla que representa los diferentes factores de transcripción identificados por el análisis bioinformático y de red.

Figura 2a: Representación gráfica de los niveles de ARNm αSMA evaluados mediante RT-qPCR. NHDFs fueron tratados con ARNip similado o ARNip dirigido contra diferentes ARNm (FOXS1, EGR2, SRF, SOX9, HIC1, STAT4, TCF4, MYC, JUN, IRF7, E2F1, GLI1, CREB5, STAT1) y sometidos simultáneamente o no al tratamiento con TGFβ1. RTqPCR se normalizó con TUBB y la condición (TGF-b) tratada con ARNip simulado se establece en uno. Los tratamientos de NHDFs con ARNip contra SRF, HIC1 o STAT4 dan lugar a una extensa muerte celular (*): no fue posible el análisis. Los tratamientos de NHDFs con ARNip contra STAT1 y USF2 representan un experimento de control, ya que estos factores no tienen ninguna acción sobre la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos.

Figura 2b: Representación gráfica del porcentaje de células diferenciadas evaluado por el porcentaje de células positivas alfa SMA después del tratamiento de NHDFs como se describe en a). Los tratamientos de NHDFs con ARNip contra SRF, HIC1 o STAT4 dan lugar a una extensa muerte celular (*): no fue posible el análisis. Los tratamientos de NHDFs con ARNip contra STAT1 y USF2 representan un experimento de control, ya que estos factores no tienen ninguna acción sobre la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos.

Figura 2c: Representación gráfica de los niveles de ARNm αSMA evaluados mediante RT-qPCR. Los fibroblastos dérmicos humanos primarios fueron tratados con ARNip simulado o ARnip dirigido contra diferentes ARNm (PPARG, MAF, MEOX2, SIX2, STAT1 o USF2). RTqPCR se normalizó con TUBB y la condición (TGF-b) tratada con ARNip simulado se establece en 1. Los tratamientos de NHDFs con ARNip contra STAT1 y USF2 representan un experimento de control, ya que estos factores no tienen ninguna acción sobre la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos.

Figura 3: Tiempo breve y prolongado después del tratamiento con TGFβ1 de FOXS1, EGR2, SRF, SOX9, HIC1, STAT4, TCF4, MYC, JUN, IRF7, E2F1, GLI1, CREB5. Para cada factor, la representación gráfica de los niveles de ARNm después de aumentar el tiempo de tratamiento de NHDF con TGFβ se evaluó mediante RT-qPCR.

Figura 4: Tiempo breve y prolongado después del tratamiento con TGFβ1 de PPARG, SIX2, MEOX2, MAF. Para cada factor, la representación gráfica de los niveles de ARNm después de aumentar el tiempo de tratamiento de NHDF con TGFβ se evaluó mediante RT-qPCR.

Figura 5: Representación gráfica de los niveles de ARNm de TCF4 (a), EGR2 (b), SOX9 (c), STAT4 (d), FOXS1 (e), PPARG (f), MAF (g), MEOX2 (h), y SIX2 (i) después del tratamiento con NHDF (donante A) durante 48 h (gris claro) o 72 h (gris oscuro), con ARnip simulado o ARNip dirigido contra diferentes ARNm FT (SOX9, EGR2, TCF4, o FOXS1) y tratados simultáneamente con TGF-β. Para todas las gráficas, la condición de ARNip simulado tratado con TGF-β (T+E) se estableció en un 100 % para cada momento del tratamiento (48 h y 72 h).

Tabla 1: gen para aumentar o disminuir para tratar y/o prevenir la fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides

Tabla 2: Secuencias de ARNip contra los genes diana

Ejemplo

En respuesta a una lesión, los fibroblastos migran a la herida donde se diferencian en miofibroblastos contráctiles que finalmente entrarán en apoptosis durante la fase de remodelación. Este proceso de diferenciación puede ser estudiado *ex-vivo* en condiciones de cultivo de tejidos en ambiente controlado, y por lo tanto se puede abordar la sucesión controlada de forma oportuna de diferentes patrones de expresión génica.

Materiales y métodos

Establecimiento de un modelo *ex vivo* de fibrosis, cicatriz hipertrófica o queloide

Los miofibroblastos representan los actores clave en la reconstrucción fisiológica de la piel después de la lesión y en la generación de las deformaciones del tejido patológico que caracterizan la fibrosis tal como cicatrices hipertróficas (Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G (2005) *Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. Wound Repair Regen* 13: 7-12).

Para estudiar los miofibroblastos involucrados en la generación de fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides, NHDF fueron cultivados en placas de cultivo recubiertas con colágeno en DMEM-F12 (Invitrogen), suplementado con SFB al 10 % (Invitrogen), 5 ng/ml de insulina y 1 ng/ml de b-FGF (PromoKine) y 10 ng/ml de TGF-O1 (Promocell), ya que TGF-O1 es conocido por inducir la expresión de αSMA en fibroblastos (Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G 13 (1993) *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. J Cell Biol*, julio de 1993, 122(1): 103-111).

La eficiencia de la diferenciación de fibroblastos se estimó mediante el análisis de la expresión del marcador de miofibroblastos alfa actina de músculo liso (αSMA).

Esta expresión αSMA se evaluó mediante RT-qPCR (niveles de ARNm) y por membrana Western (proteína).

La eficiencia de la diferenciación de fibroblastos se estimó mediante el análisis de la expresión del marcador de miofibroblastos alfa actina de músculo liso (αSMA).

Ensayo de inmunoelectrotransferencia

Las proteínas totales se extrajeron por el rascado de las células con tampón lisis (TRIS, NaCl, NP40, EDTA, IMDTT) y se incubaron 30 min en hielo. Para eliminar los restos celulares, las muestras se centrifugaron a 13.000 x g durante 10 min a 4 ºC y se almacenaron a -20 ºC hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó de acuerdo con el método BCA (Sigma). Cantidades iguales de proteína total (20 µg) se cargaron en gel de Bis-Tris al 10 % de NuPAGE (Invitrogen), se separaron por la migración a 150 V, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman) 1 hora a 30 V. A continuación, las membranas se tiñeron para αSMA (Abcam) y tubulina (Abcam). Las incubaciones fueron seguidas por anticuerpos secundarios IgG de cabra anti-conejo e IgG de cabra anti-ratón, respectivamente, conjugados con peroxidasa de rábano picante (PRP) (Promega). Las señales se detectaron mediante quimioluminiscencia ECL utilizando UptiLight SA WB Sustrate (Uptima, Interchim). Las bandas se digitalizaron con un escáner y la relación entre la densidad de todas las bandas de la misma membrana se calculó por software (ImageJ 1,43 u, 64 bits). La expresión de αSMA relativa se normalizó con el valor respectivo para tubulina.

Preparación de una muestra de ARN total

Después de cuatro días de experimento, los fibroblastos tratados se lisaron con el reactivo TRIzol (Invitrogen) y se almacenaron a -80 ºC. A continuación, el ARN se purificó utilizando cloroformo y se precipitó con isopropanol. El ARN total se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). La transcripción inversa de 500 ng de ARN total en ADNc se realizó con oligot dT (Invitrogen) utilizando SuperScript III RT (Invitrogen) y RNasa OUT (Invitrogen). El ADNc se almacenó a -20 ºC.

RT-PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se realizó utilizando 5 µl de 1:20 de ADNc diluido en el sistema LightCycler480 (Roche) utilizando Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas). Los cebadores directo e inverso fueron diseñados por Eurofins (MWG, αSMA directo: CTGTTTTCCCATCCATTGTG (SEQ ID NO:9), αSMA inverso: CCATGTTCTATCGGGTACTT (SEQ ID NO:10)) y una solución madre de 100 µM se almacenó a -20 ºC. Los pares de cebadores inversos y directos se utilizaron para cada reacción de RT-qPCR. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: una inicial a 95 ºC durante 10 minutos, seguido por 45 ciclos de 95 ºC durante 15 s, 58 ºC durante 30 s, 72 ºC durante 20 s. LightCycler 480 SW 1.5 se utilizó para evaluar las curvas de TM, para determinar el Cp y para aproximar la concentración relativa para cada reacción de amplificación.

Tratamiento de ARNip

La expresión del FT diferente se disminuyó por transfección transitoria de NHDF con ARNs pequeños de interferencia específicos. Al menos dos diferentes ARNip (Qiagen) o ARNips altamente específicos ON TARGET PLUS SmartPool (Thermo Scientific) se utilizaron para cada diana. NHDF se trataron con 10 nM de ARNip y 4 µl de reactivo INTERFERin (Polyplus, Ozyme), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y tratados simultáneamente con TGF-β1 y exudados durante 6 días. Para mantener una atenuación génica suficiente, una segunda transfección se realizó a las 48 h después de la primera. La eficiencia de la atenuación génica se evaluó 48 h después de la primera transfección.

Inmunofluorescencia de α-actina del músculo liso

Las células cultivadas en placas de cultivo recubiertas con colágeno, y tratadas como se ha descrito anteriormente, se fijaron con paraformaldehído al 4 % (PFA) en TFS durante 15 minutos y se permeabilizaron con Triton X-100 al 2,5 % (Euromedex, 2000-B) en TFS durante 3 minutos. Después de la saturación con ASB al 5 % en TFS, las células se tiñeron para α-SMA (Abcam, ab5694) y para el ADN (DAPI). Como anticuerpo secundario, se utilizó CyTM3 conjugado a anti conejo (GE Healthcare, PA43004). Las muestras se observaron con un objetivo de inmersión en aceite (Plan Flúor 40X/1.30 aceite, Nikon) en una Nikon ECLIPSE Ti (Nikon). Las imágenes digitales fueron tomadas con una cámara digital (Cool SNAP HQ^2, Photometrics) y software (MetaMorf 7.5.4.0). Para estimar el porcentaje de diferenciación de fibroblastos debido a los diferentes tratamientos, se determinó el número total de células por campo mediante DAPI, y miofibroblastos, fibroblastos diferenciados, se contaron utilizando la tinción α-SMA. Entonces, los ensayos de STUDENT (t-) y χ^2 se realizaron para evaluar la expresión diferencial de αSMA entre los fibroblastos no tratados (sin TGF-β) y los tratados.

Análisis de red

Con el fin de explicar los reguladores maestros del destino de fibroblastos después de cada tratamiento diferente, se ha realizado un análisis de red de genes tratando listados de expresión génica determinados después de un análisis de secuenciación profunda sec de ARNm del perfil génico de los fibroblastos tratados con TGF-β con el perfil génico de fibroblastos tratados sin TGFβ. En estos análisis y basándose en la suposición de que la disminución o el aumento de los genes interconectados es de importancia significativa más fuerte que un log FC significativo, se han utilizado listados de genes seleccionados solamente en base a su valor P y no en el valor de su log FC. Se ha realizado dos tipos de análisis: un “análisis regulador aguas arriba” de Ingenuity y un análisis DIRE (http://dire.dcode.org/). El “análisis regulador aguas arriba” de Ingenuity, dado el perfil particular de la expresión génica entre dos condiciones, consiste en la selección de posibles reguladores aguas arriba. El análisis DIRE se basa en la selección de los posibles elementos reguladores comunes entre los genes sobre la base de estos elementos de conservación durante la evolución. A partir de estos elementos identificados, DIRE es capaz de proporcionar un listado de reguladores maestros para un listado de genes co-regulados. A partir de esos dos análisis, y para cada listado analizado, se seleccionaron factores de transcripción (FTs) expresados en al menos una de las dos condiciones que se consideran en el listado en cuestión (es decir, el número de secuenciación es superior a veinte en al menos una de las dos condiciones). Luego, se comparó a fondo los dos conjuntos de análisis y se decidió mantener en los “listados reguladores clave” a los factores de transcripción que pertenecen a ambos análisis. Debido al posible error sistemático en estos dos análisis también se decidió rescatar a los factores de transcripción que pertenecen sólo a un análisis y no al otro, sino a los que presentan un patrón de genes diana muy interesante en un listado o en el otro. En conjunto, estos análisis de redes de genes permitieron proponer un listado de FTs que son los principales reguladores en uno destino de fibroblastos o en el otro destino (Fig. 1)

Ruta de la expresión génica tras la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos

Identificación de las principales dianas moleculares implicadas en la diferenciación de fibroblastos de fibroblastos primarios humanos en condiciones normales y patológicas

Se realizó un análisis de red de genes in silico para ilustrar los reguladores aguas arriba putativos de las diferentes rutas de expresión génica definidas previamente. Este enfoque fue original en el sentido de que se utilizó el análisis global de red de genes para identificar los posibles reguladores clave y no se tuvo en cuenta un cambio en la expresión de estos factores para seleccionarlos. Por ejemplo, se utilizó el programa DIRE (http://dire.dcode.org/) para identificar elementos reguladores potenciales conservados evolutivos en los diferentes listados de genes que permitió identificar factores de transcripción que podrían unirse potencialmente a estos elementos y por lo tanto regular estos conjuntos de genes. Veintitrés factores de transcripción fueron seleccionados a partir de este análisis.

Para priorizar el amplio estudio de los diferentes factores de transcripción (FTs), se realizó un estudio de tiempo de respuesta de FTs después de los diferentes tratamientos con fibroblastos. Se realizó un análisis breve (entre 30 min y 8 horas) y un análisis prolongado (entre 8 horas y 96 horas) de sus cambios en la expresión después de los distintos tratamientos (Fig. 3 y 4).

Se realizó un enfoque basado en ARNip exhaustivo para estudiar por una parte el papel de estos diferentes factores en la vía de diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos normales (Figuras 2).

La atenuación génica de ARNip de catorce de los posibles factores de transcripción clave identificados en el mismo inhibe la vía de diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos tal como se evaluó mediante el análisis de la expresión αSMA de TGFβ y NHDFs tratados con ARNip: GLI1, HIC1, TCF4, SOX9, STAT4 MYC, CREB5, IRF7, JUN, E2F1, EGR2, SRF, FOXS1 ya que su atenuación génica disminuyó al inhibir más o menos eficazmente la diferenciación de miofibroblastos (Fig. 2a-b-*c*). Curiosamente, a excepción de SOX9, FOXS1 y EGR2 cuya expresión está fuertemente y rápidamente regulada tras el tratamiento con TGFβ, los niveles de ARNm de los otros factores es constante durante el primer día o después del tratamiento con TGFβ y en general sin cambios durante los cuatro días de diferenciación. Esto indica que el mantenimiento de su expresión, pero no de su sobre-expresión es necesario para la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos.

La atenuación génica de ARNip de otros cuatro principales factores de transcripción potenciales identificados por el análisis in silico (MAF, SIX2, MEOX2 y PPARG) parecía inducir la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos en ausencia de TGFβ en el mismo grado que el obtenido con las células tratadas simuladas con TGFβ. En conjunto, estos resultados mostraron que con los enfoques de atenuación génica se fue capaz de reducir o inducir la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (Tabla 1).

Un análisis de red de genes in silico permitió identificar posibles reguladores clave del destino celular de fibroblastos, durante la diferenciación. Mediante la atenuación génica de los enfoques, se descubrió un fuerte efecto sobre la diferenciación de diecinueve de estos factores.

También se identificaron los factores que parecían desempeñar un papel, pero quizás no tan fuertemente como los descritos en el párrafo ya que su atenuación génica conduce a una disminución constante pero leve de la expresión αSMA. Estos factores son MYC, JUN, E2F1, IRF7 y CREB5.

Curiosamente, se demostró que la inactivación de algunos factores de transcripción conduce a un aumento de la diferenciación de fibroblastos *per se*. La disminución de ARNm PPARG conduce a un aumento de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos.

FOXS1 pertenece a la familia del factor de transcripción forkhead a menudo involucrado en los procesos de desarrollo tales como la morfogénesis y la diferenciación. Se ha demostrado que FOXS1 es de primordial importancia en el desarrollo del sistema vascular testicular. Además, FOXS1 se describió como un marcador neuronal sensorial temprano. En este caso, se muestra que la inactivación de FOXS1 conduce a un aumento de la diferenciación de miofibroblastos en ausencia de TGFβ.

MEOX2 ya ha sido descrito al implicarse en la vía de TGFβ ya que se identificó como un factor importante en el desarrollo del paladar hendido en ratones nuligénicos TGFβ3. Los experimentos en células de mioblastos C2C12 demostraron que MEOX2 también es importante para el desarrollo del músculo esquelético y la diferenciación. En este caso, se muestra que ARNip dirigido contra MEOX2 da lugar a una derivación del efecto exudado por los fibroblastos para ser capaces de diferenciarse en miofibroblastos.

En los linfocitos T, se ha demostrado que MAF era responsable de la inhibición de la expresión de IL22 mediante la neutralización de TGFβ. TGFβ y MAF tienen efectos antagonistas/opuestos sobre la expresión de IL21 en linfocitos T CD4(+). En la misma conexión, en este estudio, se implicó MAF como un inhibidor de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos en ausencia o presencia de exudado ya que su inactivación por ARNip da lugar a un aumento de la diferenciación de miofibroblastos. Por el contrario, durante la diferenciación de los condrocitos, una

forma larga de MAF interactúa y coopera con SOX9 para activar dianas corriente abajo. Este es otro ejemplo de las diferencias entre las diferenciaciones de miofibroblastos y condrocitos.

SIX2 ha estado involucrado en el mantenimiento de la pluripotencia en el riñón: en las células mesenquimales renales embrionarias que son capaces de suprimir la diferenciación y durante el desarrollo del riñón mantiene el reservorio progenitor. En este caso, en fibroblastos dérmicos, la invalidación de SIX2 conduce a una derivación del efecto exudado dominante en la señalización de TGFβ.

Interacciones reguladoras entre los factores de transcripción clave durante la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos

La expresión de ARNm TCF4 no se modificó después de la atenuación génica de SOX9, EGR2 o FOXS1 (Fig. 5) colocándose en la parte superior de la red de interacción regulatoria entre estos factores. La expresión EGR2, por el contrario, era en gran parte inhibida tras un tratamiento de ARNip contra TCF4 y SOX9 pero se mantuvo sin cambios tras el tratamiento contra FOXS1 (Fig. 5) colocándose después de TCF4 y SOX9 pero antes de FOXS1 en la red. El ARNm SOX9 se mantuvo prácticamente sin cambios tras la atenuación génica de TCF4 y FOXS1. Se colocó FOXS1 como una diana aguas debajo de SOX9. Por el contrario, SOX9 se regula positivamente tras la atenuación génica de EGR2 (Fig. 5). El ARNm de STAT4 se regula negativamente por la atenuación génica de TCF4, SOX9 y EGR2 (Fig. 5) colocándose como una diana aguas abajo de aquellos FT mientras que se mantuvo sin cambios tras el tratamiento de ARNip contra FOXS1 colocándose de antemano. Consistentemente, ARNm FOXS1 se regula negativamente tras el tratamiento de ARNip contra TCF4, SOX9 y EGR2 (Fig. 5) colocándose en el extremo de esta cascada. Globalmente, ARNm PPARG, MAF y MEOX2 se regula positivamente tras el tratamiento de ARNip contra TCF4, SOX9, EGR2 y FOXS1 (Fig. 5) consistente con su papel como antagonista en la diferenciación de fibroblastos. El nivel de ARNm SIX2 se mantuvo sin cambios tras la atenuación génica de EGR2 y FOXS1 (Fig. 5) pero se reguló positivamente de la misma manera por TCF4 y SOX9 consistente con una estrecha interconexión entre estos dos FT y sugiere la existencia de una señal equilibrada entre la diferenciación de agonistas SOX9 y TCF4 y el antagonista SIX2.

La identificación de factores de transcripción capaces de derivar la diferenciación es de gran importancia en la fibrosis, en una cicatriz hipertrófica o en un queloide. En este estudio, centrándose en los fibroblastos, por ningún medio se trata de disimular la importancia de otras células como macrófagos y neutrófilos en el proceso de curación de la piel, sino que voluntariamente se simplifica el contexto biológico para aportar una imagen más clara de la situación.

Conexión con el cáncer

Los miofibroblastos no sólo son células clave en la fibrosis, su importancia ha sido durante mucho tiempo demostrada en el cáncer también donde la presencia de miofibroblastos en el estroma como “fibroblastos asociados al cáncer” facilita el desarrollo de tumores y ha sido frecuentemente asociada con la inflamación, invasión celular, alto grado de neoplasia y mal pronóstico. Los miofibroblastos se enriquecen en el estroma del cáncer de próstata en comparación con la hiperplasia prostática benigna y asociada en el borde delantero de carcinomas. Producen MMP, citoquinas (IL-8, VEGF) y quimiocinas (CXCL12) para promover la proliferación del cáncer, la invasión tumoral y neo-angiogénesis. Como seguimientos alternativos terapéuticos, parece de primordial importancia dirigirse a las células del estroma (y entre ellas los miofibroblastos) en el cáncer para disminuir su capacidad para migrar, invadir y proliferar. Pero el caso del cáncer no es tan trivial; se ha sugerido que, como la inflamación está a menudo relacionada con el cáncer, la búsqueda de nuevas formas de eludir o inhibir la inflamación también podría ayudar a luchar contra el cáncer. Este extenso estudio sobre la diferenciación de los fibroblastos dependientes de TGFβ a miofibroblastos proporciona una gran cantidad de nuevos caminos para el descubrimiento de dianas terapéuticas. Sin embargo, a causa de la pro-fibrosis TGFβ doble y las actividades anti-inflamatorias, los terapéuticos que juegan con la inhibición o la re-aplicación de la acción de TGFβ deben de estar bien equilibrados ya que la inhibición de la fibrosis a través de la inhibición de la vía TGFβ también podría aumentar la susceptibilidad al cáncer.

La mejor comprensión de la diferenciación de fibroblastos normales a miofibroblastos es de gran importancia en el campo, ya que abre nuevas vías a nuevas terapias marcadores o dianas que se pueden utilizar en otras patologías importantes.

La fibrosis tisular (como fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis intersticial renal, fibrosis cardiovascular, cicatrices hipertróficas o queloides...) se atribuye principalmente a una activación excesiva de MEC que produce miofibroblastos por TGFβ1. Una mejor comprensión de la ruta de la expresión génica de fibroblastos a miofibroblastos es de gran interés en la comprensión de la fibrosis y la curación. Se ha demostrado que el exudado de heridas crónicas es capaz de prevenir y revertir la diferenciación de miofibroblastos dando nuevos signos de la reversibilidad de la diferenciación como ya se ha mostrado para el miofibroblasto derivado del hígado, riñón o célula estelar hepática (CEH). También se identificó los factores de transcripción cuya inactivación inhibe la diferenciación de miofibroblastos dependiente de TGFβ. Los miofibroblastos no sólo son células clave en la fibrosis, su importancia se ha demostrado en el cáncer también donde la presencia de miofibroblastos en el estroma como “fibroblastos asociados a cáncer” facilita el desarrollo de tumores y ha sido frecuentemente asociada con la inflamación, invasión

celular, alto grado de neoplasia y mal pronóstico. Los miofibroblastos se enriquecen en el estroma del cáncer de próstata en comparación con la hiperplasia prostática benigna y asociada en el borde delantero de carcinomas. Producen MMP, citoquinas (IL-8, VEGF) y quimiocinas (CXCL12) para promover la proliferación del cáncer, la invasión tumoral y la neo-angiogénesis. Como seguimientos alternativos terapéuticos, parece de primordial importancia dirigirse a las células del estroma (y entre ellas los miofibroblastos) en el cáncer para disminuir su capacidad para migrar, invadir y proliferar. Pero el caso del cáncer no es tan trivial; se ha sugerido que, como la inflamación está a menudo relacionada con el cáncer, la búsqueda de nuevas formas de eludir o inhibir la inflamación también podría ayudar a luchar contra el cáncer. El estudio sobre la diferenciación de los fibroblastos dependientes de TGFβ a miofibroblastos muestra una gran cantidad de nuevos caminos para el descubrimiento de dianas terapéuticas. Sin embargo, a causa de la pro-fibrosis TGFβ doble y las actividades anti-inflamatorias, los terapéuticos que juegan con la inhibición o la re-aplicación de la acción de TGFβ deben de estar bien equilibrados ya que la inhibición de la fibrosis a través de la inhibición de la vía TGFβ también podría aumentar la susceptibilidad al cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SDRI et al.

<120> Diana molecular para el tratamiento de la fibrosis

<130> BCT130255 QT

<160> 74

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 1
uucgaucuga ugaaguuuga a 21

<210> 2
<211> 21
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 2
cggcaggaga auggcaucag a 21

<210> 3
<211> 21
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 3
agcaugcgca cuuaugauau a 21

<210> 4
<211> 21
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 4
cccgcccguc cugugcucca a 21

<210> 5
<211> 21
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 5
uccggagaac aaucagauug a 21

<210> 6
<211> 21
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 6
gagggcgauc uugacaggaa a 21

<210> 7
<211> 21
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 7
caacgagaac uccaauucua a 21

<210> 8
<211> 21
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 8
cccgcugaau ggcagcggca a 21

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> cebador

<400> 9
ctgttttccc atccattgtg 20

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> cebador

<400> 10
ccatgttcta tcgggtactt 20

<210> 11
<211> 21
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 11
ccggcgaagg gugguagacg a 21

<210> 12
<211> 21
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 12
aacaguauuc uguaggaucu a 21

<210> 13
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 13
ucggagaacu uucagaucu 19

<210> 14
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 14
gagaagucac gcuaugaga 19

<210> 15
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 15
gagcagaugg uuaugguga 19

<210> 16
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 16
gaacagggcc acugacucu 19

<210> 17
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 17
gaaggcauaa ucaauauug 19

<210> 18
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 18
cuacuguggc cgaaaguuu 19

<210> 19
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 19
gaaaccagac cuucacuua 19

<210> 20
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 20
gagaagaggu cguuggauc 19

<210> 21
<211> 21
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 21
agggccaaua aagccaugug a 21

<210> 22
<211> 21
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 22
cuggcucuag gaccugaaga a 21

<210> 23
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 23
gcaaauaggg cuucacaua 19

<210> 24
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 24
aggcucagcu uguguguaa 19

<210> 25
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 25
ggacgaggga ccuugcauu 19

<210> 26
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 26
cagcuagagu ccagagguu 19

<210> 27
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 27
gcacagcaac gcaaccuca 19

<210> 28
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 28
gagcuucggu gacaaccug 19

<210> 29
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 29
ugaucaucgu ggugcagaa 19

<210> 30
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 30
gaccaucgac cguuucucu 19

<210> 31
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 31
gcacaaggug uacgcgcuc 19

<210> 32
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 32
caacuuccgc ugcgcacug 19

<210> 33
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 33
gcgcgcaucu ucaaggccu 19

<210> 34
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 34
caggcacgga ccagacuga 19

<210> 35
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 35
gagcggaccu uauggcuac 19

<210> 36
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 36
gaacaggugg cacagcuua 19

<210> 37
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 37
gaaacgaccu ucuaugacg 19

<210> 38
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 38
ugaaagcuca gaacucgga 19

<210> 39
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 39
acggaacucu ugugcguaa 19

<210> 40
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 40
gaacacacaa cgucuugga 19

<210> 41
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 41
aacguuagcu ucaccaaca 19

<210> 42
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 42
cgauguuguu ucuguggaa 19

<210> 43
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 43
caacaggaau gcagcagug 19

<210> 44
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 44
gaguucgccu ucaauauga 19

<210> 45
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 45
ggacgcaggu ucuccaaac 19

<210> 46
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 46
uuagagacau caaguaugg 19

<210> 47
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 47
gcaauugaaa guuugguaa 19

<210> 48
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 48
cccacaaccu uuagacuga 19

<210> 49
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 49
gaauccauau cacuacgaa 19

<210> 50
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 50
guacagaguu acuacuuag 19

<210> 51
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 51
ggaacaaccc gucuacaca 19

<210> 52
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 52
gaacaagccg cacgucaag 19

<210> 53
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 53
gaccuucgau gucaacgag 19

<210> 54
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 54
ggaagucggu gaagaacgg 19

<210> 55
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 55
ugagacaggc cauguguau 19

<210> 56
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 56
ggacugugcu gaagaguac 19

<210> 57
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 57
gcaccaagag ugaaugauc 19

<210> 58
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 58
gcaccagugu cugcuagug 19

<210> 59
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 59
gcacgauggg cucagcuuu 19

<210> 60
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 60
cuacgaacau gacccuauc 19

<210> 61
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 61
gaaccugacu uccaugcgg 19

<210> 62
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 62
agaaagagcu ugacaguaa 19

<210> 63
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 63
gaacuaaacu aucagguaa 19

<210> 64
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 64
gcauguagcu gugguuauu 19

<210> 65
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 65
caaucuagcu acagugaug 19

<210> 66
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 66
cugcgagacu acaaaguua 19

<210> 67
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 67
gcacuugcuu cgaucuauu 19

<210> 68
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 68
gacaaagagc ugagugauu 19

<210> 69
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 69
gcacagcugu uuggucuag 19

<210> 70
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 70
caacgggaca gacaguaua 19

<210> 71
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 71
gcaagacggg agcgaguaa 19

<210> 72
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 72
ggagggacaa gaucaacaa 19

<210> 73
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 73
gaagagccca gcacaacga 19

<210> 74
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

<220>
<223> ARNip

<400> 74
caaaaucccu ucagcaaug 19

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto terapéutico que comprende un agente que inhibe la actividad del gen HIC1, en el que dicho agente se selecciona entre el grupo que consiste en ADN o ARN antisentido, ARNip, ARNph, TALENS o ribozimas, desnudos o en forma de vectores plasmídicos o virales, y anticuerpos,
para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide.

2. Un compuesto terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:

- un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en E2F1, EGR2, GLI1, JUN, MYC, SMAD3, SMAD4 y SOX9, SRF, preferentemente EGR2, SOX9
y/o
- un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en ETS1 y PPARG.

3. Un compuesto terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho agente que inhibe la actividad del gen HIC1 es un ARNip elegido entre SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29.

4. Un compuesto terapéutico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en el que sirve para tratar una fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides en un mamífero o un tejido susceptible de desarrollar fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide.

5. Un compuesto terapéutico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en el que sirve para tratar una fibrosis, cicatrices hipertróficas o queloides en un ser humano o un tejido susceptible de desarrollar fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide.

6. Un compuesto terapéutico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en el que sirve para ser aplicado por vía tópica.

7. Un compuesto terapéutico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en el que sirve para ser aplicado a un vendaje o impregnado en un vendaje.

8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto terapéutico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

9. Un método de preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 que comprende llevar junto o en asociación dicho compuesto terapéutico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 con un portador o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

10. Un kit para tratar una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide o un tejido susceptible de desarrollar fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide, en el que dicho kit comprende:

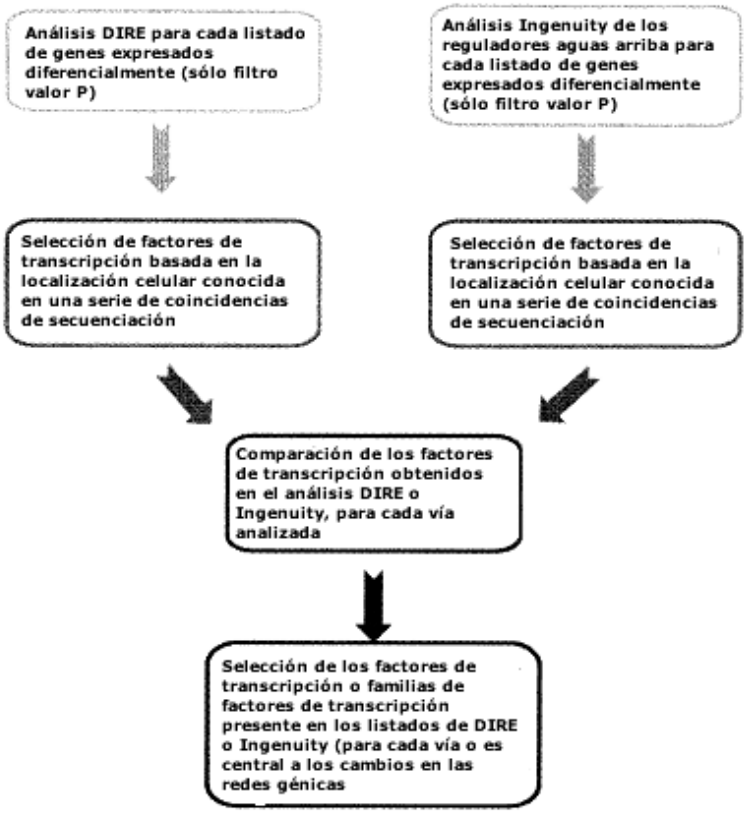
(a) al menos un compuesto terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una composición de acuerdo con la reivindicación 8 y
(b) al menos un vendaje para aplicarse a dicha fibrosis, cicatriz hipertrófica o queloide o tejido susceptible de desarrollar fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide.

11. Una combinación de terapéuticos para tratar una fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide o un tejido susceptible de desarrollar fibrosis, una cicatriz hipertrófica o un queloide que comprende:

(a) - un agente que inhibe la actividad del gen HIC1, en el que dicho agente se selecciona entre el grupo que consiste en ADN o ARN antisentido, ARNip, ARNph, TALENS o ribozimas, desnudos o en forma de vectores plasmídicos o virales, y anticuerpos, y
b) al menos un terapéutico adicional.

12. Un compuesto terapéutico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho agente modula la diferenciación y/o la actividad de fibroblastos y miofibroblastos.

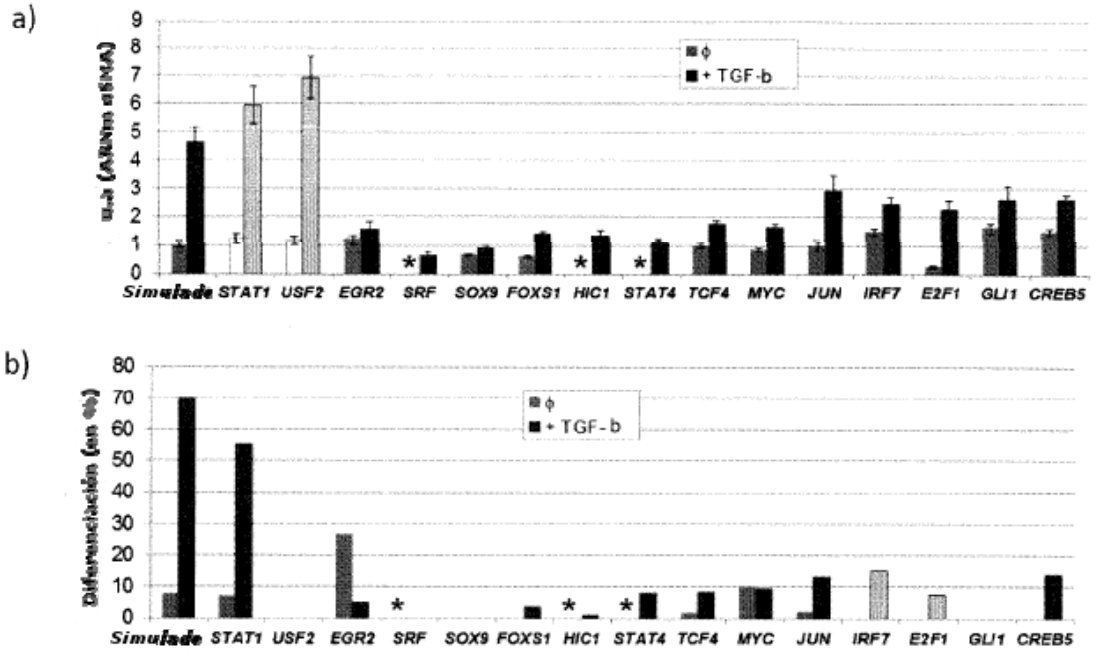
a)



b)

Símbolo	Nombre del gen en Entrez
CREB5	proteína 5 de unión al elemento sensible a AMPc
E2F1	factor 1 de transcripción E2F
EGR2	respuesta 2 del crecimiento temprano
ETS1	homólogo 1 del oncogén V-ets del virus E26 de la eritoblastosis (aviar)
FOXS1	caja S1 forkhead
GLI1	dedo 1 de cinc de la familia GLI
HIC1	hipermetilado en cáncer-1
IRF7	factor 7 regulador del interferón
JUN	oncogén jun
MAF	homólogo del oncogén del fibrosarcoma musculoaponeurótico v-maf (aviar)
MEOX2	caja homeótica 2 del mesénquima
MYC	homólogo del oncogén viral de la mielocitomatosis v-myc (aviar)
POU2F2	caja homeótica 2 de la clase 2 POU
PPARG	receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas
SIX2	caja homeótica 2 SIX
SMAD3	miembro 3 de la familia SMAD
SMAD4	miembro 4 de la familia SMAD
SOX9	caja 9 de SRY (región Y determinante del sexo)
SRF	factor de respuesta al suero (factor de transcripción de unión al elemento de respuesta al suero c-fos)
STAT1	transductor de la señal y activador de la transcripción 1 de 91 kDa
STAT4	transductor de la señal y activador de la transcripción 4
TCF4	factor de transcripción 4
USF2	factor 2 de la transcripción aguas arriba de interacción con c-fos

Figura 1


a)
ϕ
+ TGF-b
Simulado STAT1 USF2 EGR2 SRF SOX9 FOXS1 HIC1 STAT4 TCF4 MYC JUN IRF7 E2F1 GLI1 CREB5
b)
ϕ
+ TGF-b
Simulado STAT1 USF2 EGR2 SRF SOX9 FOXS1 HIC1 STAT4 TCF4 MYC JUN IRF7 E2F1 GLI1 CREB5

3/8

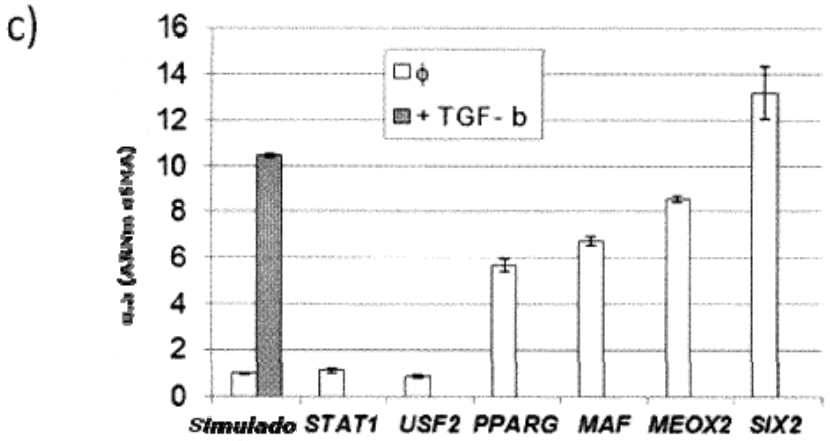

c)
ϕ
+ TGF-b
Simulado STAT1 USF2 PPARG MAF MEOX2 SIX2

Figura 2

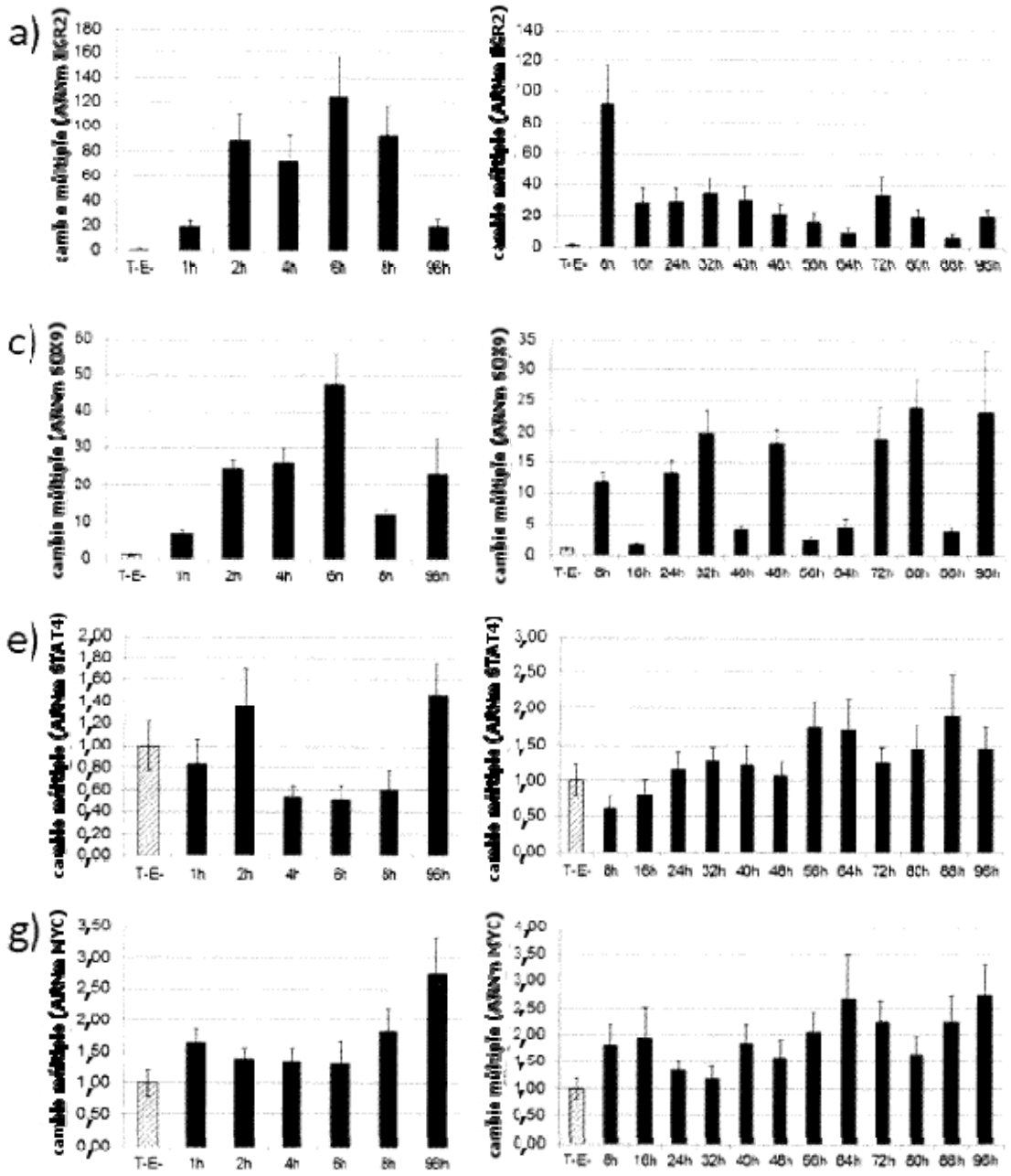

a)
cambio múltiple (ARNm IGR2)
T-E- 1h 2h 4h 6h 8h 96h
cambio múltiple (ARNm IGR2)
T-E- 8h 16h 24h 32h 40h 48h 56h 64h 72h 80h 88h 96h
c)
cambio múltiple (ARNm SOS9)
T-E- 1h 2h 4h 6h 8h 96h
cambio múltiple (ARNm SOS9)
T-E- 8h 16h 24h 32h 40h 48h 56h 64h 72h 80h 88h 96h
e)
cambio múltiple (ARNm STAT4)
T-E- 1h 2h 4h 6h 8h 96h
cambio múltiple (ARNm STAT4)
T-E- 8h 16h 24h 32h 40h 48h 56h 64h 72h 80h 88h 96h
g)
cambio múltiple (ARNm MYC)
T-E- 1h 2h 4h 6h 8h 96h
cambio múltiple (ARNm MYC)
T-E- 8h 16h 24h 32h 40h 48h 56h 64h 72h 80h 88h 96h

Figura 3

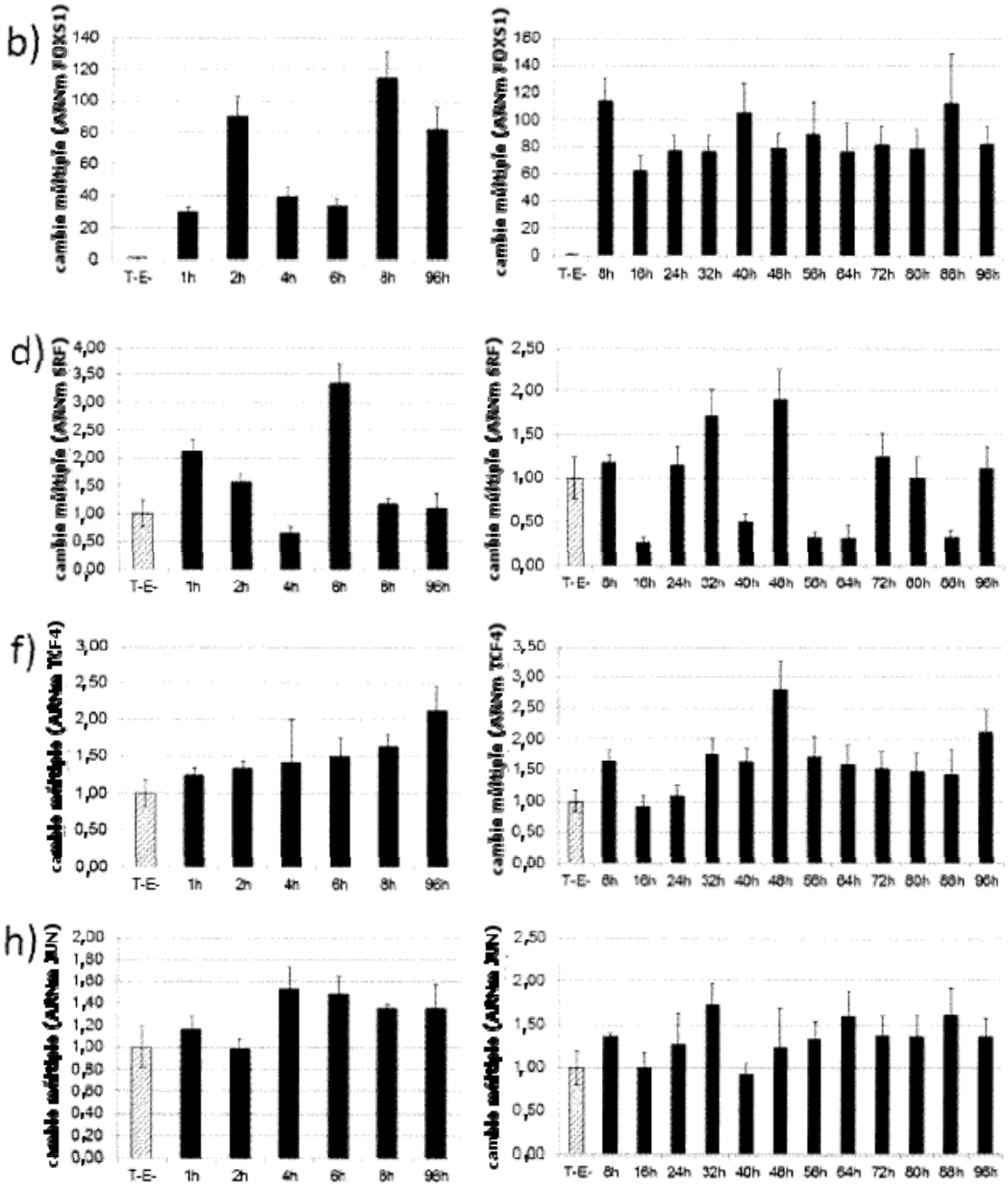

b)
cambio múltiple (ARNm FOXS1)
T-E- 1h 2h 4h 6h 8h 96h
cambio múltiple (ARNm FOXS1)
T-E- 8h 16h 24h 32h 40h 48h 56h 64h 72h 80h 88h 96h
d)
cambio múltiple (ARNm SRF)
T-E- 1h 2h 4h 6h 8h 96h
cambio múltiple (ARNm SRF)
T-E- 8h 16h 24h 32h 40h 48h 56h 64h 72h 80h 88h 96h
f)
cambio múltiple (ARNm TCF4)
T-E- 1h 2h 4h 6h 8h 96h
cambio múltiple (ARNm TCF4)
T-E- 8h 16h 24h 32h 40h 48h 56h 64h 72h 80h 88h 96h
h)
cambio múltiple (ARNm JUN)
T-E- 1h 2h 4h 6h 8h 96h
cambio múltiple (ARNm JUN)
T-E- 8h 16h 24h 32h 40h 48h 56h 64h 72h 80h 88h 96h

Figura 3

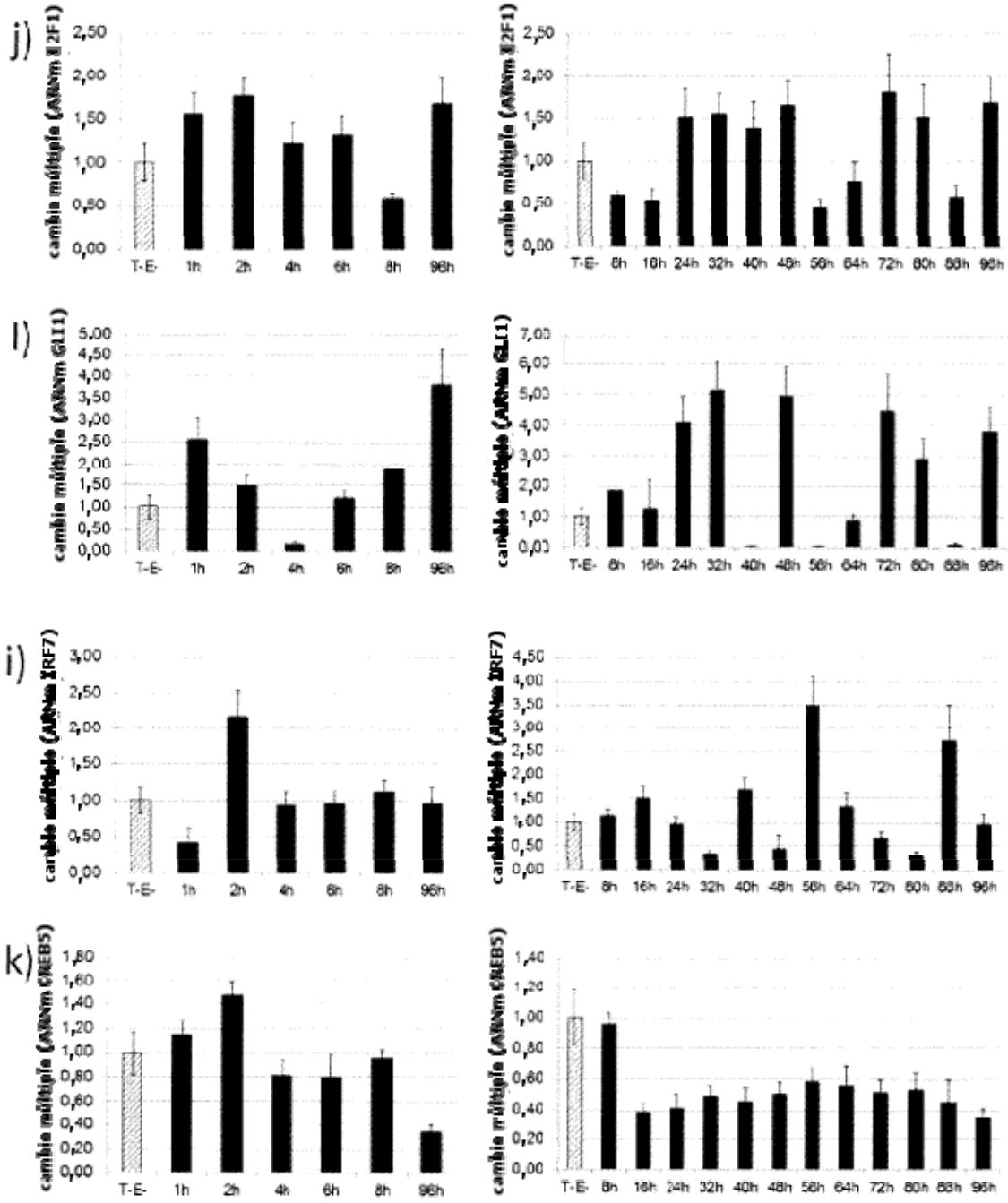

j)
cambio múltiple (ARNm E2F1)
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
T-E- 1h 2h 4h 6h 8h 96h
T-E- 8h 16h 24h 32h 40h 48h 56h 64h 72h 80h 88h 96h
l)
cambio múltiple (ARNm GLI1)
5,00
4,50
4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
i)
cambio múltiple (ARNm IRF7)
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
4,50
4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
k)
cambio múltiple (ARNm CREB5)
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00

Figura 3

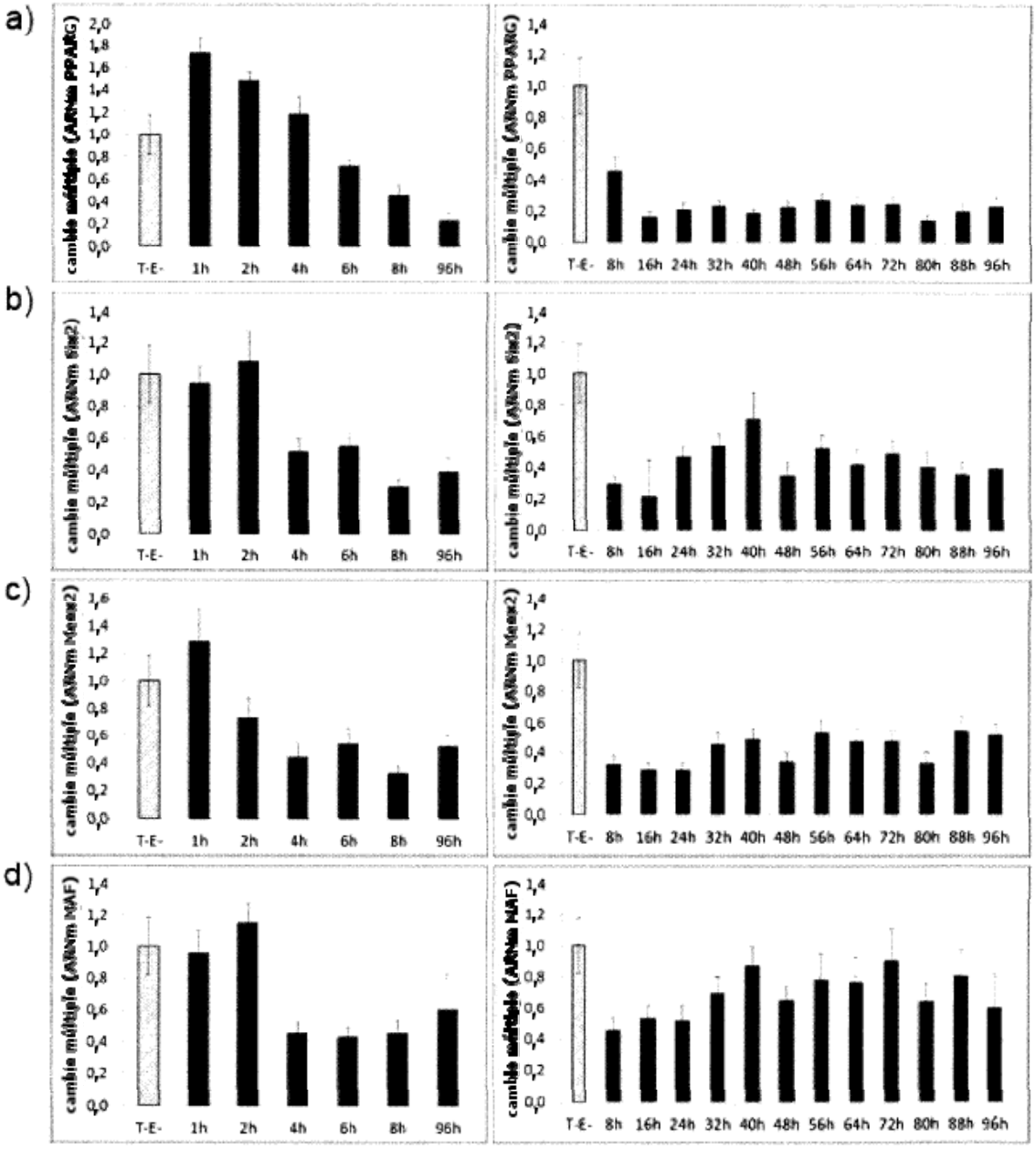


Figura 4

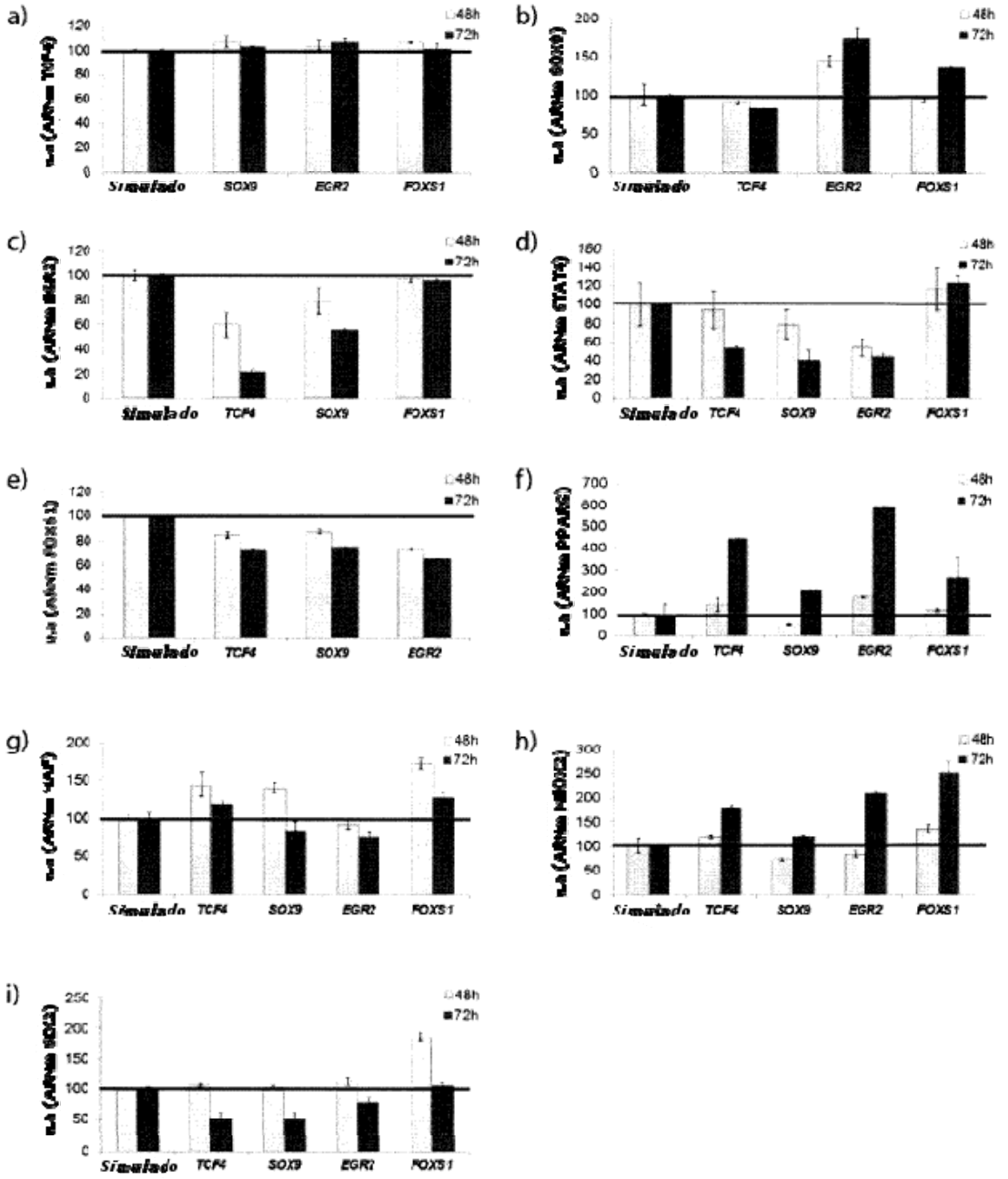


Figura 5

CREB5	disminuir
E2F1	disminuir
EGR2	disminuir
ETS1	aumentar
FOXS1	aumentar
GLI1	disminuir
HIC1	disminuir
IRF7	disminuir
JUN	disminuir
MAF	aumentar
MEOX2	aumentar
MYC	disminuir
POU2F2	disminuir
PPARG	aumentar
SIX2	aumentar
SMAD3	disminuir
SMAD4	disminuir
SOX9	disminuir
SRF	disminuir
STAT1	aumentar
STAT4	disminuir
TCF4	disminuir
USF2	disminuir

Tabla 1.

CREB5	CCGGCGAAGGGUGGUAGACGA	Q. SI04157174	11
	AACAGUAUUCUGUAGGAUCUA	Q. SI04141893	12
E2F1	UCGGAGAACUUUCAGAUCU	T, L-003259-00	13
	GAGAAGUCACGCUAUGAGA		14
	GAGCAGAUGGUUAUGGUGA		15
	GAACAGGGCCACUGACUCU		16
EGR2	GAAGGCAUAAUCAAUAUUG	T, L-006527-00	17
	CUACUGUGGCCGAAAGUUU		18
	GAAACCAGACCUUCACUUA		19
	GAGAAGAGGUCGUUGGAUC		20
FOXS1	AGGGCCAAUAAAGCCAUGUGA	Q. SI04152540	21
	CUGGCUCUAGGACCUGAAGAA	Q. SI00387527	22
GLI1	GCAAAUAGGGCUUCACAUA	T, L-003896-00	23
	AGGCUCAGCUUGUGUGUAA		24
	GGACGAGGGACCUUGCAUU		25
	CAGCUAGAGUCCAGAGGUU		26
HIC1	GCACAGCAACGCAACCUCA	T, L-008532-00	27
	GAGCUUCGGUGACAACCUG		28
	UGAUCAUCGUGGUGCAGAA		29
	GACCAUCGACCGUUUCUCU		30
IRF7	GCACAAGGUGUACGCGCUC	T, L-011810-00	31
	CAACUUCCGCUGCGCACUG		32
	GCGCGCAUCUUCAAGGCCU		33
	CAGGCACGGACCAGACUGA		34
JUN	GAGCGGACCUUAUGGCUAC	T, L-003268-00	35
	GAACAGGUGGCACAGCUUA		36
	GAAACGACCUUCUAUGACG		37
	UGAAAGCUCAGAACUCGGA		38
MAF	UUCGAUCUGAUGAAGUUUGAA	Q. SI00076048	1
	CGGCAGGAGAAUGGCAUCAGA	Q. SI03086069	2
MEOX2	AGCAUGCGCACUUAUGAUAUA	Q. SI04299421	3
	CCCGCCCGUCCUGUGCUCCAA	Q. SI04262174	4
MYC	ACGGAACUCUUGUGCGUAA	T, L-003282-00	39
	GAACACACAACGUCUUGGA		40
	AACGUUAGCUUCACCAACA		41
	CGAUGUUGUUUCUGUGGAA		42
PPAR γ	UCCGGAGAACAAUCAGAUUGA	Q. SI03115266	5
	GAGGGCGAUCUUGACAGGAAA	Q. SI00071673	6
SIX2	CAACGAGAACUCCAAUUCUAA	Q. SI00719313	7
	CCCGCUGAAUGGCAGCGGCAA	Q. SI04141095	8
SMAD3	CAACAGGAAUGCAGCAGUG	T, L-020067-00	43
	GAGUUCGCCUUCAAUAUGA		44
	GGACGCAGGUUCUCCAAAC		45
	UUAGAGACAUCAAGUAUGG		46
SMAD4	GCAAUUGAAAGUUUGGUAA	T, L-003902-00	47
	CCCACAACCUUUAGACUGA		48
	GAAUCCAUAUCACUACGAA		49
	GUACAGAGUUACUACUUAG		50
SOX9	GGAACAACCCGUCUACACA	T, L-021507-00	51
	GAACAAGCCGCACGUCAAG		52
	GACCUUCGAUGUCAACGAG		53
	GGAAGUCGGUGAAGAACGG		54
SRF	UGAGACAGGCCAUGUGUAU	T, L-009800-00	55
	GGACUGUGCUGAAGAGUAC		56
	GCACCAAGAGUGAAUGAUC		57
	GCACCAGUGUCUGCUAGUG		58
STAT1	GCACGAUGGGCUCAGCUUU	T, L-003543-00	59
	CUACGAACAUGACCCUAUC		60
	GAACCUGACUUCCAUGCGG		61
	AGAAAGAGCUUGACAGUAA		62
STAT4	GAACUAAACUAUCAGGUAA	T, L-011784-00	63
	GCAUGUAGCUGUGGUUAUU		64
	CAAUCUAGCUACAGUGAUG		65
	CUGCGAGACUACAAAGUUA		66
TCF4	GCACUUGCUUCGAUCUAUU	T, L-004594-00	67
	GACAAAGAGCUGAGUGAUU		68
	GCACAGCUGUUUGGUCUAG		69
	CAACGGGACAGACAGUAUA		70
USF2	GCAAGACGGGAGCGAGUAA	T, L-003618-00	71
	GGAGGGACAAGAUCAACAA		72
	GAAGAGCCCAGCACAACGA		73
	CAAAAUCCCUUCAGCAAUG		74

Tabla 2