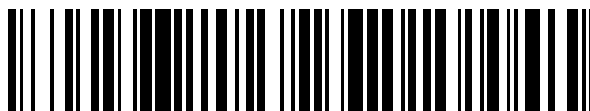


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 579**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2014** **PCT/EP2014/066344**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015** **WO15018699**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2014** **E 14744578 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018** **EP 3030574**

54 Título: **Dianas moleculares para el tratamiento de heridas, en particular heridas crónicas**

30 Prioridad:

05.08.2013 WO PCT/IB2013/001990

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

11.07.2018

73 Titular/es:

**URGO RECHERCHE INNOVATION ET
DÉVELOPPEMENT (20.0%)**

**42, rue de Longvic
21300 Chenove, FR;**

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (20.0%);**

UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (20.0%);

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (20.0%) y
ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE (20.0%)**

72 Inventor/es:

DUGAST-DARZACQ, CLAIRE;

NOIZET, MAÏTÉ;

DARZACQ, XAVIER y

SPILUZZINI HÉBERT, BÉATRICE

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 675 579 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

Dianas moleculares para el tratamiento de heridas, en particular heridas crónicas

5 **Sector de la técnica**

- La presente invención se refiere a al menos una diana molecular para curar o tratar heridas, en particular heridas crónicas y más preferentemente heridas crónicas no cicatrizantes. Además, la invención se refiere a un nuevo agente terapéutico para tratar heridas y a un nuevo enfoque de terapia génica, que implica dicha diana molecular para tratar heridas. Adicionalmente, la invención se refiere a un método para tratar heridas usando dicho agente terapéutico o dicha terapia génica.

Estado de la técnica

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

- La primera fase, llamada fase inflamatoria, comienza minutos después del daño. 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 dentro de la lesión. Las células inflamatorias se reclutan 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 de heridas (células inflamatorias tales como neutrófilos y macrófagos, fibroblastos y células endoteliales).

- 25 La segunda fase se llama fase proliferativa y corresponde al desarrollo del tejido de granulación. Los fibroblastos migran al área de la herida, proliferan y forman una nueva matriz extracelular provisional secretando proteínas de la matriz extracelular (ECM). A continuación, las células endoteliales migran para promover la neovascularización o la angiogénesis de la lesión. Dentro 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 de heridas ya que proporcionan la contracción de la herida. Finalmente, los queratinocitos migran desde el borde de la herida, proliferan y se diferencian para reconstituir la epidermis.

- 35 La última fase del proceso de cicatrización de heridas aparece después del cierre de la herida. Corresponde a la remodelación del tejido de granulación. El tejido de granulación se reorganiza, el colágeno tipo III se reemplaza por colágeno tipo I, ya que la dermis normal está compuesta principalmente de colágeno tipo I. Durante esta fase, los miofibroblastos en exceso se eliminan por apoptosis. La última fase de la cicatrización de heridas es larga. Un año después del daño, la cicatriz se remodela; se vuelve menos roja y más delgada.

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

45 **Heridas crónicas o no cicatrizantes**

- Las heridas crónicas son un problema de salud mundial, en parte debido a la falta de métodos adecuados de tratamiento. En 2010, más de 7 millones de personas en todo el mundo sufrieron heridas crónicas y el aumento anual proyectado es de al menos el diez por ciento.

- 50 Las heridas crónicas a veces son heridas no cicatrizantes. Los tipos comunes de heridas crónicas incluyen, pero sin limitación, úlceras venosas de la pierna, úlceras del pie diabético, úlceras por decúbito, úlceras arteriales de la pierna, aquellas de etiología mixta (venosa y arterial) o aquellas sin etiología conocida. También podemos encontrar heridas agudas que se vuelven crónicas ya que no cicatrizan correctamente.

- 55 Las heridas no cicatrizantes o las heridas crónicas son un desafío para el paciente, el profesional de la salud y el sistema de atención médica. Perjudican significativamente la calidad de vida de millones de personas e imponen una carga a la sociedad en términos de pérdida de productividad y de dinero para el cuidado de la salud.

- 60 La cicatrización de heridas es una vía dinámica que conduce a la restauración de la integridad y las funciones del tejido. Se produce una herida crónica o herida no cicatrizante cuando se altera el proceso reparativo normal. Al comprender la biología de la cicatrización de heridas, el médico puede optimizar la curación de heridas eligiendo el tratamiento adecuado.

- 65 En las heridas crónicas o no cicatrizantes, el proceso de cicatrización natural se altera y, por lo tanto, la cicatrización es prolongada, incompleta y, a veces, las heridas nunca se cierran. Se produce una herida crónica cuando algún

factor causa la alteración de las fases inflamatoria y proliferativa normales. Al mejorar o manipular los factores implicados en la cicatrización de heridas puede ser posible, por lo tanto, corregir el proceso, reduciendo, de este modo, la posible aparición de una herida crónica o acelerando su posterior reparación.

5 Papel de los fibroblastos en la cicatrización de heridas

Los fibroblastos están implicados en el proceso de cicatrización de heridas, esto implica varios pasos de diferenciación de fibroblastos quiescentes a fibroblastos movilizados que se transformarán en miofibroblastos y finalmente entrarán en apoptosis. En las heridas crónicas o no cicatrizantes, este proceso está mal regulado y los fibroblastos no pueden llevar a cabo la diferenciación de miofibroblastos y se encuentran en la herida como fibroblastos no funcionales, llamados fibroblastos pseudosenescentes (Telgenhoff D, Shroot B (2005) Cellular senescence mechanisms in chronic wound healing. Cell Death Differ 12: 695-698). El objetivo de la presente invención es mapear, a escala de genoma completo, los diferentes genes que necesitan ser activados o desactivados durante este proceso y, de este modo, facilitar el proceso de cicatrización de la herida.

Los fibroblastos humanos tienen la capacidad de entrar en un proceso fisiológico denominado senescencia, que permite un ciclo celular replicativo limitado y, por lo tanto, evita la pérdida de información genética. Se suele producir cuando una célula ya ha realizado varias rondas de replicación (llamada senescencia replicativa y dependiente de la longitud de los telómeros), pero también se puede producir en respuesta al estrés ambiental (Muller M (2009) Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. Antioxid Redox Signal 11: 59-98). Las células de senescencia se detienen en el ciclo celular pero mantienen la actividad metabólica (Telgenhoff D, Shroot B (2005) Cellular senescence mechanisms in chronic wound healing. Cell Death Differ 12: 695-698). Los fibroblastos de heridas crónicas pierden algunas de sus funcionalidades y, más particularmente, pierden parte o la totalidad de su función replicativa (Telgenhoff D, Shroot B (2005) Cellular senescence mechanisms in chronic wound healing. Cell Death Differ 12: 695-698). En una herida, los fibroblastos humanos también se asocian con una regulación positiva de APA-1, una proteína que induce la remodelación de la matriz, demostrando que el fenotipo de los fibroblastos de pseudo-senescencia no se indujo por atrición de los telómeros (Benanti JA, Williams DK, Robinson KL, Ozer HL, Galloway DA (2002) Induction of extracellular matrix-remodeling genes by the senescence-associated protein APA-1. Mol Cell Biol 22: 7385-7397). Por lo tanto, los fibroblastos senescentes en heridas crónicas aparecerían más particularmente debido a una inflamación crónica que a un acortamiento de los telómeros (Telgenhoff D, Shroot B (2005) Cellular senescence mechanisms in chronic wound healing. Cell Death Differ 12: 695-698). Martin et al., 1992, (Progress in Growth Factor Research, vol 4: 25-44) divulga el uso de factores de crecimiento añadidos de manera exógena en el tratamiento de heridas de la piel. La presente invención puede mejorar la calidad de vida de un paciente tratando heridas de una manera que promueva activamente la cicatrización.

Objeto de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones.

La presente descripción se refiere a un compuesto terapéutico que comprende:

- un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en MAF, MEOX2, SIX2 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes y/o
- un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SRF, STAT4, TCF4, FOXS1, GLI1, SOX9, preferentemente FOXS1, EGR2, SOX9, TCF4, STAT4 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes

para su uso en el tratamiento de heridas, preferentemente heridas crónicas.

La descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto terapéutico como se define anteriormente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica como se define anteriormente que comprende llevar dicho compuesto terapéutico conjuntamente o en asociación con un transportador o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para tratar una herida de mamífero, donde dicho método comprende: administrar a dicha herida un compuesto terapéutico que comprende:

- un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en MAF, MEOX2, SIX2 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes y/o
- un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SRF, STAT4, TCF4, FOXS1, GLI1, SOX9, preferentemente FOXS1, EGR2, SOX9, TCF4, STAT4 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes

La presente descripción también se refiere a un kit para tratar una herida, preferentemente una herida crónica, donde dicho kit comprende:

- (a) al menos un compuesto terapéutico o composición farmacéutica como se define anteriormente; y
- (b) al menos un apósito para aplicar a dicha herida.

En otro aspecto más, la descripción se refiere a una combinación terapéutica para tratar una herida, preferentemente una herida crónica, que comprende:

- a) un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en MAF, MEOX2, SIX2 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes y/o
 - un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SRF, STAT4, TCF4, FOXS1, GLI1, SOX9, preferentemente FOXS1, EGR2, SOX9, TCF4, STAT4 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes y
- b) al menos un agente terapéutico adicional.

- La presente descripción también se refiere al uso de un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en MAF, MEOX2, SIX2 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes y/o
- un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SRF, STAT4, TCF4, FOXS1, GLI1, SOX9, preferentemente FOXS1, EGR2, SOX9, TCF4, STAT4 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes para tratar una herida, preferentemente una herida crónica, donde dicho agente modula la diferenciación y/o 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:

- un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en MAF, MEOX2, SIX2 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes y/o
- un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SRF, STAT4, TCF4, FOXS1, GLI1, SOX9, preferentemente FOXS1, EGR2, SOX9, TCF4, STAT4 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes para su uso en el tratamiento de heridas, preferentemente heridas crónicas.

- Preferentemente, en la presente invención, dicho agente es uno que inhibe la actividad de al menos un gen elegido de MAF, MEOX2 y SIX2; o donde dicho agente es uno que potencia la actividad de al menos un gen elegido entre SOX9 y GLI1.

- En un aspecto de la invención, se proporciona un compuesto terapéutico que comprende un agente que inhibe la actividad del gen del factor de transcripción MAF, donde dicho agente se selecciona del grupo que consiste en ADN o ARN no codificante, ARNip, ARNhc, TALENS o ribozimas, ya sea desnudos o en forma de vectores plasmídicos o víricos, anticuerpos y trametinib, para su uso en el tratamiento de heridas crónicas.

En una realización preferida de la invención, dicha composición terapéutica también comprende al menos:

- (a) - un agente que inhibe la actividad de PPARG u homólogos del mismo que tienen al menos un 50 % de identidad con PPARG y/o
- (b) - un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en SMAD3, SMAD4 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes.

De hecho, los inventores de la presente invención han descubierto que estos genes estaban implicados en el proceso de cicatrización y que su regulación negativa o regulación positiva sería útil para el tratamiento de heridas, en particular de heridas crónicas.

Por lo tanto, la invención implica un nuevo enfoque de terapia génica y/o un nuevo enfoque de terapia con proteínas.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "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 a nivel de la proteína, ya sea disminuyendo la cantidad de proteína presente en una célula dada o inhibiendo la actividad de la proteína.

Tal como se usa en el presente documento, 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 a nivel de la proteína, ya sea aumentando la cantidad de proteína presente en una célula dada o aumentando la actividad de la proteína. También abarca agentes que actúan cadena arriba o cadena abajo de dicho gen o proteína en una ruta de señalización.

En una realización de la invención, el nuevo agente terapéutico comprende un inhibidor o potenciador de la expresión génica, este inhibidor o potenciador puede ser un ADN o un ARN no codificante, ARNip, ARNhc, ADNc, TALENS o ribozimas, ya sea desnudos o en forma de vectores plasmídicos y víricos o un fármaco.

En una realización preferida de la descripción, dicho compuesto terapéutico es un ARNip seleccionado del grupo que consiste en ARNip que tiene la secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 8 y mezclas de los mismos.

Típicamente, en la presente invención, la expresión del gen MAF se puede inhibir por los ARNip que tienen las secuencias como se establecen en la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO:1: 5'-UUCGAUCUGAUGAAGUUUGAA

SEQ ID NO:2: 5'-CGGCAGGAGAAUGGCAUCAGA

Típicamente, en la presente invención, la expresión del gen MEOX2 se puede inhibir por los ARNip que tienen las secuencias como se establecen en la SEQ ID NO: 3 y/o la SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO:3: 5'-AGCAUGCGCACUUAUGAUUAU

SEQ ID NO:4: 5'-CCCGCCCGUCCUGUGCUCCAA

Típicamente, en la presente invención, la expresión del gen PPARG se puede inhibir por los ARNip que tienen las secuencias como se establecen en la SEQ ID NO: 5 y/o la SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO:5: 5'-UCCGGAGAACAUCAGAUUGA

SEQ ID NO:6: 5'-GAGGGCGAUCUUGACAGGAAA

Típicamente, en la presente invención, la expresión del gen SIX2 se puede inhibir por los ARNip que tienen las secuencias como se exponen en la SEQ ID NO: 7 y/o la SEQ ID NO: 8.

SEQ ID NO:7: 5'-CAACGAGAACUCCAAUUCUAA

SEQ ID NO:8: 5'-CCCGCUGAAUGGCAGCGGCAA

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

Típicamente, la expresión del gen CREB5 se puede potenciar administrando el ADNc de CREB5.

Lo mismo se aplica mutatis mutandis para todos los otros genes enumerados.

El ADNc puede administrarse o suministrarse a la herida a tratar en cualquier forma adecuada conocida por el experto en la materia. Puede administrarse como ADN desnudo, usando vectores plasmídicos, vectores víricos o cualquier otro medio adecuado.

En otra realización, el nuevo agente terapéutico comprende un inhibidor o potenciador de la proteína codificada por la función del gen, este inhibidor o potenciador puede ser un agente de unión que se une, ya sea de forma reversible o irreversible, para inhibir o potenciar la función de la proteína tal como un anticuerpo o un agonista o antagonista de proteína conocido o sintetizado; o un agente que trabaja cadena arriba o cadena abajo del mecanismo de señalización de la proteína para inhibir o potenciar la señalización de la proteína y así anular 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.

Preferentemente, dicho agente es una molécula pequeña.

Preferentemente, se dirige la actividad de la proteína MAF para su inhibición. Más preferentemente, se inhibe la

proteína MAF por un antagonista de MAF, como trametinib. Trametinib es una molécula química comercializada por GlaxoSmithKline bajo el nombre Mekinist®.

Preferentemente, en otra realización de la descripción, se dirige la actividad de la proteína GLI1 para su activación. Más preferentemente, se usa un agonista de GLI1, más preferentemente Gant 61. Dicho compuesto también se conoce como 2,2'-[[dihidro-2-(4-piridinil)-1,3(2H,4H) -pirimidindil]bis(metileno)]bis[N, N-dimetilbencenamina. En otra realización, preferentemente, se dirige la actividad de la proteína SOX9 para su activación. Más preferentemente, se usa un agonista de SOX9, más preferentemente AM580. Dicho compuesto también se conoce como ácido 4 - [(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)carboxamido]benzoico.

Típicamente, el potenciador de PPARG puede seleccionarse del grupo que consiste en tiazolidinedionas, 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).

Típicamente, 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 agente terapéutico de la invención es para su uso en el tratamiento de heridas, más idealmente en heridas crónicas, preferentemente en heridas no cicatrizantes. Estas heridas son preferentemente heridas de mamíferos, más preferentemente heridas de seres humanos. Las heridas crónicas que se tratan preferentemente usando la invención son úlceras de pierna, úlceras del pie diabético, úlceras por presión.

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

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

Como alternativa, en los aspectos anteriores de la invención, el agente terapéutico se formula para la aplicación en un apósito o para impregnación de un apósito.

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

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de heridas que comprende un agente terapéutico de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También pueden estar presentes en la composición farmacéutica otros materiales activos, según se considere apropiado o aconsejable para la herida que se está tratando.

El vehículo, o, si hay más de uno presente, cada uno de los vehículos, debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el receptor.

Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración tópica, oral, rectal, nasal o cualquier administración conocida y pueden prepararse por cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia.

La composición se puede preparar poniendo en asociación el agente terapéutico de la invención y el vehículo. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el agente activo con vehículos líquidos o poniendo finamente en asociación el activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos y, a continuación, si es necesario, dando forma al producto. La descripción se extiende a métodos para preparar una composición farmacéutica que comprende llevar un agente terapéutico de la invención en conjugación o asociación con un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

Se pueden presentar las formulaciones para administración oral en la presente invención como: cápsulas, sobres o comprimidos que contienen, 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 en 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 (por ejemplo, comprimidos y cápsulas), la expresión "vehículo aceptable" incluye vehículos tales como excipientes comunes, por ejemplo aglutinantes, por ejemplo jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona (Povidona), metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y almidón; rellenos y vehículos, por ejemplo, almidón de maíz, gelatina, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, cloruro de sodio y ácido algínico; y lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de sodio y otros estearatos metálicos, estearato de glicerol ácido esteárico, fluido de silicona, ceras de talco, aceites y sílice coloidal. También se pueden usar agentes aromatizantes tales como menta, aceite de gaulteria, sabor a cereza y similares. Puede ser deseable agregar 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 nuevo método para tratar una herida de mamífero, típicamente una herida crónica, cuyo método comprende administrar a dicha herida

- un agente que inhibe la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en MEOX2, MAF, SIX2 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes y/o
- un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SRF, STAT4, TCF4, FOXS1, GLI1, SOX9, preferentemente FOXS1, EGR2, SOX9, TCF4, STAT4 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes.

La descripción también comprende un método nuevo para tratar una herida de mamífero, típicamente una herida crónica, cuyo método adicionalmente comprende administrar a dicha herida

- un agente que inhibe la actividad de PPARG u homólogos del mismo que tienen al menos un 50 % de identidad con PPARG y/o
- un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en SMAD3, SMAD4 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes.

De acuerdo con un aspecto adicional más de la invención, se proporciona un kit para tratar una herida, preferentemente una herida crónica, donde dicho kit comprende:

- (a) al menos un agente terapéutico como se describe anteriormente; y
- (b) al menos un dispositivo médico para aplicar a dicha herida

La expresión "dispositivo médico" incluye un instrumento, aparato, implante, reactivo in vitro o artículo similar o relacionado que se usa para diagnosticar, prevenir o tratar enfermedades u otras afecciones y no logra sus propósitos a través de acciones químicas dentro o sobre el cuerpo (que lo convertiría en una droga). Mientras que los medicamentos (también llamados productos farmacéuticos) logran 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 más de la descripción, se proporciona una combinación terapéutica para tratar una herida que comprende un inhibidor de MEOX2, MAF, SIX2 o potenciador de la expresión del gen CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SRF, STAT4, TCF4, SOX9, GLI1, FOXS1 preferentemente FOXS1, EGR2, SOX9, TCF4, STAT4 y un inhibidor de MEOX2, MAF, SIX2 o potenciador de la actividad de la proteína CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SRF, STAT4, TCF4, SOX9, GLI1, FOXS1, preferentemente FOXS1, EGR2, SOX9, TCF4, STAT4.

La invención también comprende una combinación terapéutica para tratar una herida, dicha combinación terapéutica comprende además un inhibidor de la expresión del gen PPARG o potenciador de la expresión de los genes SMAD3, SMAD4 y un inhibidor de PPARG o potenciador de la actividad de las proteínas SMAD3, SMAD4.

De acuerdo con un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un agente terapéutico para tratar una herida que comprende un inhibidor de proteína MEOX2, MAF, PPARG, SIX2 o un homólogo de las mismas o un potenciador de proteína CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SMAD3, SMAD4, SRF, STAT4, TCF4, SOX9, GLI1, FOXS1, preferentemente FOXS1, EGR2, SOX9, TCF4, STAT4 o un homólogo de las mismas.

La invención también comprende un agente terapéutico para tratar una herida que comprende además un inhibidor de la proteína PPARG, o un homólogo de la misma o un potenciador de proteína SMAD3, SMAD4 o un homólogo de las mismas.

De acuerdo con un aspecto adicional de la descripción, se proporciona el uso de un inhibidor de proteína MEOX2,

MAF, SIX2 o un homólogo de las mismas, en la fabricación de un medicamento para tratar una herida. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un inhibidor de MEOX2, MAF, SIX2 o un homólogo de los mismos, para tratar una herida.

- 5 La descripción proporciona además el uso de un inhibidor de la proteína PPARG, o un homólogo de la misma, en la fabricación de un medicamento para tratar una herida. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un inhibidor de PPARG o un homólogo del mismo, para tratar una herida.

10 El término "homólogo" como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de aminoácidos que tienen una secuencia al menos 50 % homóloga a la secuencia de aminoácidos de MEOX2, MAF, PPARG, SIX2 y que retienen la actividad biológica de las secuencias de MEOX2, MAF, PPARG, SIX2. Se prefiere que los homólogos sean al menos un 75 % homólogos a la secuencia peptídica de MEOX2, ETS1, MAF, PPARG, SIX2 y, en orden de preferencia creciente, al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % homólogos a la secuencia peptídica de MEOX2, MAF, PPARG, SIX2.

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la descripción, se proporciona el uso de un potenciador de proteína CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SRF, STAT4, TCF4, SOX9, GLI1, FOXS1, preferentemente FOXS1, EGR2, SOX9, TCF4, de STAT4 o un homólogo de las mismas, en la fabricación de un medicamento para tratar una herida.

20 De acuerdo con un aspecto adicional de la descripción, se proporciona el uso de un potenciador de SMAD3, SMAD4 o un homólogo de los mismos, para tratar una herida.

25 El término "homólogo" como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de aminoácidos que tienen una secuencia al menos 50 % homóloga a la secuencia de aminoácidos de CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SMAD3, SMAD4, SRF, STAT4, TCF4, SOX9, GLI1, FOXS1 y que retienen la actividad biológica de las secuencias CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SMAD3, SMAD4, SRF, STAT4, TCF4, SOX9, GLI1, FOXS1. Se prefiere que los homólogos sean al menos un 75 % homólogos a la secuencia peptídica de CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SMAD3, SMAD4, SRF, STAT4, TCF4, SOX9, GLI1, FOXS1 y, en orden de preferencia creciente, al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % homólogos a la secuencia peptídica de CREB5, E2F1, EGR2, HIC1, IRF7, JUN, MYC, SMAD3, SMAD4, SRF, STAT4, TCF4 SOX9 GLI1, FOXS1.

El tratamiento de una herida descrito en el presente documento incluye referencia a uso humano o veterinario.

35 En las reivindicaciones siguientes y en la descripción anterior de la invención, excepto cuando el contexto requiera lo contrario debido al lenguaje expreso o la implicación necesaria, la palabra "comprende", o variaciones como "comprende" o "que comprende" se usa en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características indicadas pero no para excluir la presencia o adición de características adicionales en diversas realizaciones de la invención.

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

45 Otras características de la presente invención se harán evidentes a partir de los siguientes ejemplos. En términos generales, la invención se extiende a cualquier característica nueva o cualquier combinación nueva, de las características descritas en esta memoria descriptiva (incluyendo las reivindicaciones y dibujos adjuntos). Por lo tanto, las características, enteros, rasgos, compuestos o restos químicos descritos en conjunto con un aspecto, realización o ejemplo particular de la invención deben entenderse aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento, a menos que sea incompatible con los mismos.

50 Además, a menos que se indique lo contrario, cualquier característica divulgada en el presente documento puede ser reemplazada por una característica alternativa que tenga el mismo o similar propósito.

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

55 Descripción de las figuras

Las leyendas de las figuras son las siguientes:

60 **Figura 1a:** Representación esquemática de los diferentes tratamientos aplicados al Fibroblasto Dérmico Humano Normal (NHDF)

Figura 1b: Representación gráfica de los niveles de ARNm de α SMA evaluados por RT-qPCR con los diferentes tratamientos

65 **Figura 2a:** Representación gráfica de los niveles de ARNm de α SMA evaluados por RT-qPCR. Se trataron los

NHDF con ARNip simulado o ARNip dirigidos contra diferentes ARNm (EGR2, SRF, HIC1, STAT4, TCF4, GLI1, JUN, IRF7, E2F1, MYC, CREB5, FOXS1, SOX9 o STAT1) y concomitantemente sometidos o no a tratamiento con TGFβ1. Se normalizaron las RTqPCR con TUBB y se estableció como uno el estado tratado con ARNip simulado (T-E-). Los tratamientos de NHDF con ARNip contra SRF, HIC1 o STAT4 conducen a una muerte celular extensa (*): no fue posible realizar ningún análisis.

Figura 2b: Representación gráfica del porcentaje de células diferenciadas evaluadas por el porcentaje de células alfa SMA positivas después del tratamiento de NHDF como se describe en a). Los tratamientos de NHDF con ARNip contra SRF, HIC1 o STAT4 conducen a una muerte celular extensa (*): no fue posible realizar ningún análisis.

Figura 2c: Representación gráfica de los niveles de ARNm de αSMA evaluados por RT-qPCR. Se trataron fibroblastos dérmicos humanos primarios con ARNip simulado o ARNip dirigidos contra diferentes ARNm (PPARG, MAF, MEOX2, SIX2, STAT1 o USF2). Se normalizaron las RTqPCR con TUBB y se estableció como 1 el estado tratado con ARNip simulado (T-E-).

Figura 2d: Representación gráfica de los niveles de ARNm de αSMA evaluados por RT-qPCR. Se trataron los NHDF con ARNip simulado o ARNip dirigidos contra diferentes ARNm (PPARG, MAF, MEOX2, SIX2, STAT1 or USF2) y concomitantemente tratados con CWF1 solo o en combinación con TGFβ1. Se normalizaron las RTqPCR con TUBB y se estableció como 1 el estado tratado con ARNip simulado (T-E-) (pero no se representa en este gráfico). Para ayudar a analizar el efecto de los diferentes ARNip, se añade el estado en la que se trataron las células con ARNip simulado y TGFβ1 y representa la diferenciación normal (barra de color gris claro en el histograma simulado).

Figura 2e: Representación gráfica de los niveles de ARNm de αSMA evaluados por RT-qPCR. Los NHDF se trataron como se describe en d) excepto por el tratamiento de exudado que se realizó con un exudado diferente de un paciente diferente que padecía una herida crónica (CWF2).

Figura 3: tiempo corto y largo después del tratamiento con TGFβ1 para EGR2, FOXS1, SOX9, SRF, STAT4, TCF4, MYC, JUN, IRF7, E2F1, CREB5 y GLI1. Para cada factor, representación gráfica de los niveles de ARNm después de aumentar el tiempo de tratamiento del NHDF con TGFβ evaluados mediante RT-qPCR.

Figura 4: Factores de transcripción clave en la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos

a) Explicación gráfica del análisis de la red de genes in silico

b) Tabla que representa los diferentes factores de transcripción identificados por bioinformática y análisis de redes.

Figura 5: tiempo corto y largo después del tratamiento con TGFβ1 para PPARG, MAF, MEOX2 y SIX2. Para cada factor, representación gráfica de los niveles de ARNm después de aumentar el tiempo de tratamiento del NHDF con TGFβ evaluados mediante RT-qPCR.

Figura 6: 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 48h (gris claro) o 72h (gris oscuro), con ARNip simulado o ARNip dirigidos contra ARNm de TF diferentes (SOX9, EGR2, TCF4 o FOXS1) y tratados concomitantemente con TGF-β. Para todos los gráficos, el ARNip simulado tratado con el estado TGF-β (T + E) se ajustó al 100 % para cada tiempo de tratamiento (48h y 72h).

Figura 7: Representación esquemática de los diferentes tratamientos con medicamentos aplicados al Fibroblasto Dérmico Humano Normal (NHDF) con exudados (a) o sin exudados (b).

Figura 8a: Representación gráfica de los niveles de ARNm de αSMA evaluados por RT-qPCR de NHDF tratados con Trametinib.

Figura 8b: Representación gráfica de los niveles de ARNm de αSMA, PI16 y ACTC1 evaluados por RT-qPCR de NHDF tratados con Trametinib en presencia de exudados.

Figura 9a: Representación gráfica de los niveles de ARNm de αSMA evaluados por RT-qPCR de NHDF tratados mediante Am580.

Figura 9b: Representación gráfica de los niveles de ARNm de αSMA, PI16 y ACTC1 evaluados por RT-qPCR de NHDF tratados con Am580 en presencia de exudados.

Figura 10: Representación gráfica de los niveles de ARNm de αSMA, GLI1, SOX9 y MAF evaluados por RT-qPCR de NHDF tratados con Gant 61.

Tabla 1: genes que se aumentan o disminuyen para tratar heridas, heridas no cicatrizantes o crónicas.

Tabla 2: secuencias de ARNip para cada gen 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 se puede estudiar *ex vivo* en condiciones de cultivo de tejidos controladas ambientalmente y, por lo tanto, se puede abordar a tiempo la sucesión controlada de diferentes patrones de expresión génica.

Materiales y procedimientos

Establecimiento de un modelo *ex vivo* de heridas crónicas

Cultivo celular de Fibroblasto Dérmico Normal y recolección de exudado

El NHDF, aislado de explantes humanos, se adquirió de Promocell. Se cultivaron NHDF en DMEM-F12 (Invitrogen), suplementado con FCS al 10 % (Invitrogen, 5 µg/ml de insulina y 1 ng/ml de b-FGF (PromoKine)).

Se reclutaron dos pacientes con úlceras mixtas para recolectar exudados. Para la selección del paciente, se decidió excluir cualquier otro factor de comorbilidad potencialmente implicado en la etiología de la herida: diabetes, arteriopatías periféricas, desnutrición. Se recolectaron los exudados a partir de terapia de presión negativa. Todos los exudados se centrifugaron a 1.500 x g durante 3 minutos para eliminar los residuos celulares. Se filtró y almacenó el sobrenadante a -80 °C hasta su uso. Se usaron alícuotas para determinar la concentración de proteína según el método BCA (Sigma).

Establecimiento de un modelo *ex vivo* de heridas crónicas

Para los experimentos, se privó a las células de insulina y b-FGF durante 48 horas. A continuación, las células se cultivaron en placas de cultivo recubiertas de colágeno en DMEM-F12, complementado con FCS al 10 %, 10 ng/ml de TGF-β1 (Promocell) durante 4 días. Se analizaron cuatro puntos para apreciar el efecto del exudado en la diferenciación de fibroblastos: células no tratadas (T-E-), fibroblastos tratados con TGF-β1 (T+E-), células tratadas con exudado (T-E+) y finalmente fibroblastos tratados con TGF-β1 y exudado al mismo tiempo (T+E+).

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

Ensayo de transferencia Western

Se extrajeron las proteínas totales raspando las células con tampón de lisis (TRIS, NaCl, NP40, EDTA, IMDTT) y se incubaron 30 minutos en hielo. Para eliminar los residuos celulares, se centrifugaron las muestras a 13.000 x g durante 10 min a 4°C y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se determinó la concentración de proteína según el método BCA (Sigma). Se cargaron cantidades iguales de proteína total (20 µg) al gel NuPAGE 10 % BIS-Tris (Invitrogen), se separaron por migración a 150 V y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Whatman) 1 hora a 30 V. A continuación, se tiñeron las membranas para αSMA (Abcam) y tubulina (Abcam). Se siguieron las incubaciones por anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de conejo y de cabra anti-IgG de ratón, respectivamente, conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Promega). Las señales se detectaron mediante quimioluminiscencia ECL utilizando sustrato UptiLight HS WB (Uptima, Interchim). Las bandas se digitalizaron con un escáner y se calculó la relación entre la densidad de todas las bandas de la misma transferencia mediante software (ImageJ 1.43u, 64-bit). La expresión relativa de αSMA se normalizó al valor respectivo para tubulina.

Preparación de Muestra de ARN Total

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

RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Se realizó la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) usando 5 µl de ADNc diluido a 1:20 en el sistema LightCycler480 (Roche) usando Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas). Se diseñaron los cebadores

directos e inversos para α SMA por Eurofins (MWG, α SMA directo: CTGTTTTCCCATCCATTGTG (SEC ID NO: 9), α SMA inverso: CCATGTTCTATCGGGTACTT (SEC ID NO: 10)) y se almacenó una solución madre de 100 μ M a -20°C. Se usaron los pares de cebadores directos e inversos para cada reacción RT-qPCR. Las condiciones de ciclo fueron las siguientes: una temperatura inicial de 95°C durante 10 minutos, seguida de 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 20 segundos. Se usó LightCycler 480 SW 1.5 para evaluar las curvas de TM, para determinar la Cp y para aproximar la concentración relativa para cada reacción de amplificación.

Tratamiento de ARNip

Inmunofluorescencia de α Actina de Músculo Liso

Las células cultivadas en placas de cultivo recubiertas de colágeno y tratadas como se describe previamente, se fijaron con paraformaldehído al 4 % (PFA) en PBS durante 15 minutos y se permeabilizaron con Triton X-100 al 2,5 % (Euromedex, 2000-B) en PBS durante 3 minutos. Después de la saturación con BSA al 5 % en PBS, las células se tiñeron para α -SMA (Abcam, ab5694) y para ADN (DAPI). Como anticuerpo secundario, se usó anti-conejo conjugado con CyTM3 (GE Healthcare, PA43004). Se observaron las muestras con un objetivo de inmersión en aceite (Plan Fluor 40X / 1.30 Oil, Nikon) en una Nikon ECLIPSE Ti (Nikon). Se tomaron imágenes digitales con una cámara digital (Cool SNAPHQ², 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 se contaron los miofibroblastos, fibroblastos diferenciados, usando la tinción de α -SMA. A continuación, se realizaron ensayos t de STUDENT y de χ^2 para evaluar la expresión diferencial de α SMA entre los fibroblastos no tratados (T-E-) y los tratados.

Análisis de Expresión de ARNm

Preparación de muestra de ARN total y síntesis de ADNc

Después de cuatro días de experimento, los fibroblastos tratados se separaron con reactivo de TRIzol (Invitrogen (Life Technologies), 15596-018) y se almacenaron a -80°C. A continuación, se purificó el ARN utilizando cloroformo y se precipitó con isopropanol. Se cuantificó el ARN total en el espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) y se evaluó su calidad en el ARN Nano Chips (bioanalizador Agilent 2100, Agilent, 5067-1511). La transcripción inversa de 500 ng de ARN total a ADNc se realizó con oligot dT (Invitrogen (Life technologies), 18418-020) usando SuperScript III RT (Invitrogen (Life technologies), 18080-085) y RNasa OUT (Invitrogen (Life technologies), 10777-019). El ADNc se almacenó a -20°C. Solo se usaron las muestras con un buen perfil de bioanalizador para el análisis por qPCR.

Análisis de red

Para esclarecer los reguladores principales del destino de fibroblastos después de cada tratamiento diferente, los inventores de la presente invención realizaron un análisis de red de genes que trata las listas de expresión génica determinadas después del análisis de secuenciación profunda de ARNm seq del perfil del gen TE- con el perfil del gen de T+E-, T+E+ y T-E+ 1. En estos análisis y basándose en el supuesto de que la disminución o el aumento de los genes interconectados es de mayor importancia que un Log FC significativo, los inventores de la presente invención han utilizado listas de genes seleccionados solo basándose en su valor P y no en el valor de su Log FC. Los inventores de la presente invención han llevado a cabo dos tipos de análisis: un "análisis de regulador cadena arriba" ingenuity y un análisis DIRE (<http://dire.dcode.org/>). El "análisis de regulador cadena arriba" Ingenuity, dado el perfil particular de expresión de genes entre dos condiciones, consiste en seleccionar reguladores potenciales cadena arriba. El análisis DIRE se basa en la selección de elementos reguladores comunes potenciales entre genes basándose en la conservación de estos elementos durante la evolución. A partir de estos elementos identificados, DIRE puede proporcionar una lista de reguladores principales para una lista de genes co-regulados. A partir de esos dos análisis, y para cada lista analizada, los inventores de la presente invención han seleccionado factores de transcripción (FT) expresados en al menos una de las dos condiciones consideradas en la lista (es decir, el número de secuenciación es superior a veinte en al menos una de las dos condiciones). A continuación, los inventores de la presente invención compararon profundamente los dos conjuntos de análisis y decidieron mantener en las "listas de reguladores clave" los factores de transcripción que pertenecen a ambos análisis. Debido a la posible parcialidad en estos dos análisis, los inventores de la presente invención también decidieron rescatar los factores de transcripción que pertenecen solo a un análisis y no al otro, pero presentan un patrón de genes diana muy interesante en una u otra lista. En total, estos análisis de redes de genes permitieron proponer una lista de FT que son reguladores clave en uno u otro destino de fibroblastos.

Para el modelo de herida crónica o no cicatrizante, se añadieron exudados de heridas crónicas a cultivos celulares (500 μ g/ml de proteínas totales de exudado). Los experimentos que se realizaron se representan en la Figura 1a): las células o no fueron tratadas (T-E -), o fueron tratadas con TGF β solo (T+E-), o con exudado solo (T-E+) o con TGF- β y exudado (T+E+) durante 4 días. Los ensayos descritos anteriormente se usaron para evaluar el nivel de diferenciación. Los exudados de heridas crónicas disminuyen la expresión de α SMA (ARNm, figura 1b). Esto indicó que los exudados de heridas crónicas inhiben claramente la diferenciación de los fibroblastos. Esto se correlaciona

con el hecho de que en las heridas crónicas, están presentes los fibroblastos no funcionales, también llamados fibroblastos pseudo-senescentes.

Ruta de Expresión Génica a partir de 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

Los inventores de la presente invención realizaron un análisis de red de genes in silico para esclarecer supuestos reguladores cadena arriba de las diferentes rutas de expresión génica definidas previamente. Este enfoque fue original en el sentido de que los inventores de la presente invención usaron un análisis global de redes de genes para identificar reguladores clave potenciales y los inventores de la presente invención no tuvieron en cuenta un cambio en la expresión de estos factores para seleccionarlos. Por ejemplo, los inventores de la presente invención usaron el programa DIRE (<http://dire.dcode.org/>) para identificar elementos reguladores potenciales conservados evolutivos en las diferentes listas de genes que permitieron esclarecer los factores de transcripción que potencialmente podrían unirse a estos elementos y así regular estos conjuntos de genes. Se seleccionaron veintitrés factores de transcripción a partir de este análisis.

Para priorizar el extenso estudio de los diferentes factores de transcripción (FT), los inventores de la presente invención llevaron a cabo un estudio de respuesta en el tiempo de los FT después de los diferentes tratamientos de fibroblastos. Los inventores de la presente invención hicieron un análisis a corto plazo (entre 30 min y 8 horas) y a largo plazo (entre 8 horas y 96 horas) de sus cambios en la expresión después de los diferentes tratamientos.

Los inventores de la presente invención llevaron a cabo un enfoque exhaustivo basado en ARNip para estudiar por un lado el papel de estos diferentes factores en la ruta de diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos normales y, por otro lado, en el destino celular de no diferenciación dependiente de exudados crónicos.

El ARNip atenuado de catorce de los factores de transcripción clave potenciales identificados en el mismo, inhibió la ruta de diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos según se evaluó mediante el análisis de la expresión de α SMA a partir de NHDF tratados con TGF β y ARNip: GLI1, HIC1, TCF4, SOX9, STAT4 MYC, CREB5, IRF7, JUN, E2F1, EGR2, SRF, SMAD3, FOXS1 como su inhibidor atenuado de la diferenciación de miofibroblastos en diversas extensiones (Fig. 2a-b). De manera muy interesante, excepto SOX9, FOXS1 y EGR2, cuya expresión se regula positivamente de manera fuerte y rápida con el tratamiento con TGF β , los niveles de ARNm de los otros factores son constantes durante el primer día, más o menos después del tratamiento con TGF β y, en general, sin cambios durante los cuatro días de diferenciación (Fig 3). Esto indica que es necesario el mantenimiento de su expresión pero no su sobreexpresión para la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos.

El ARNip atenuado de otros cuatro factores de transcripción clave potenciales identificados por el análisis in silico (MAF, SIX2, MEOX2 y PPARG) pareció inducir la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos en ausencia de TGF β en la misma medida que la obtenida con células transfectadas simuladas tratadas con TGF β . Aún más interesante es que la inducción de la diferenciación de miofibroblastos era antigua, incluso en presencia de exudados de heridas crónicas y era muy similar a la diferenciación obtenida en presencia de TGF β solo para células transfectadas simuladas. En ausencia de estos factores, los fibroblastos parecían capaces de eludir la acción dominante del exudado para diferenciarse en miofibroblastos. Los inventores de la presente invención también pueden aclarar que, excepto FOXS1, todos estos factores están ligeramente regulados por disminución excesiva después del tratamiento (Fig. 5), lo que confirma que su regulación negativa podría ser necesaria para la diferenciación.

En conjunto, estos resultados mostraron que con los enfoques de atenuación los inventores de la presente invención podían reducir la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos o inducir esta diferenciación incluso en un contexto de herida crónica (tabla 1).

Un análisis de red de genes in silico permitió identificar reguladores clave potenciales del destino de las células de fibroblastos durante la diferenciación en miofibroblastos o en un contexto de heridas crónicas. Mediante enfoques de atenuación, los inventores de la presente invención encontraron un fuerte efecto en la diferenciación de diecinueve factores. La fuerza de nuestro análisis proviene del enfoque imparcial para buscar el elemento de ADN común evolutivo conservado en las diferentes listas de genes (a través del programa DIRE) y de allí identificar supuestos reguladores de la transcripción cadena arriba, en lugar de observar las diferencias en los niveles de expresión de los factores de transcripción. Es muy probable que los inventores de la presente invención hayan pasado por alto esos reguladores del destino celular al observar solo su expresión diferencial.

Mediante enfoques de atenuación identificamos los factores de transcripción necesarios para la diferenciación normal de fibroblastos a miofibroblastos (Fig.2). Los inventores de la presente invención usaron la α SMA para seguir la diferenciación de miofibroblastos ya que es su mejor marcador ex vivo.

Los inventores de la presente invención también han identificado factores que parecen jugar un papel, pero tal vez

no de manera tan fuerte como los descritos en el párrafo anterior, ya que su atenuación conduce a una disminución consistente pero leve de la expresión de α SMA. Estos factores son MYC, JUN, E2F1, IRF7 y CREB5.

De manera muy interesante, los inventores de la presente invención mostraron que la inactivación de algunos factores de transcripción conduce a un aumento de la diferenciación de fibroblastos per se. La invalidación de algunos de estos factores podría incluso aumentar la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos en un contexto de herida crónica.

La atenuación del ARNm de PPARG conduce a un aumento de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (Fig. 2c-d), incluso en presencia de exudado crónico.

FOXS1 pertenece a la familia de factores de transcripción forkhead a menudo involucrada en procesos de desarrollo como morfogénesis y diferenciación. Se ha mostrado que FOXS1 es de importancia primaria en el desarrollo de la vasculatura testicular. Además, se describió FOXS1 como un marcador neuronal sensorial temprano. En el presente caso los inventores de la presente invención muestran que la inactivación de FOXS1 conduce a un aumento de la diferenciación de miofibroblastos en ausencia de TGF β .

Ya se ha descrito como implicado en la ruta de TGF β , ya que se identificó como un factor importante en el desarrollo del paladar hendido en ratones knockout TGF β 3. Los experimentos en células mioblásticas C2C12 mostraron que MEOX2 también es importante para el desarrollo y la diferenciación del músculo esquelético. En el presente caso, los inventores de la presente invención mostraron que los ARNip dirigidos contra MEOX2 conducen a un desvío del efecto del exudado por los fibroblastos para poder diferenciarse en miofibroblastos.

En linfocitos T, se ha mostrado que MAF era responsable de la inhibición de la expresión de IL22 neutralizando TGF β . TGF β y MAF tienen efectos antagonistas/opuestos sobre la expresión de IL21 en linfocitos T CD4 (+). En el mismo contexto, en este estudio, los inventores de la presente invención implicaron a MAF como un inhibidor de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos en ausencia o presencia de exudado ya que su inactivación por ARNip conduce a un aumento de la diferenciación de miofibroblastos (Fig. 2c-d). Por el contrario, durante la diferenciación de los condrocitos, una forma larga de MAF interactúa y coopera con SOX9 para activar las dianas cadena abajo. Este es otro ejemplo de las diferencias entre las diferenciaciones de miofibroblastos y condrocitos.

SIX2 ha estado involucrada en el mantenimiento de la pluripotencia en el riñón: en células de mesénquima renal embrionarias es capaz de suprimir la diferenciación y durante el desarrollo del riñón mantiene el grupo de progenitoras. En el presente caso, en fibroblastos dérmicos, la invalidación de SIX2 conduce a un desvío del efecto de exudado dominante sobre la señalización de TGF β (Fig. 2c-d).

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

La expresión del ARNm de TCF4 no se modificó después de la atenuación de SOX9, EGR2 o FOXS1 (figura 6) colocándolo en la parte superior de la red de interacción reguladora entre estos factores. Por el contrario, la expresión de EGR2 se inhibió en gran medida tras el tratamiento con ARNip contra TCF4 y SOX9, pero permaneció sin cambios tras el tratamiento contra FOXS1 (figura 6) colocándolo después de TCF4 y SOX9 pero antes de FOXS1 en la red. El ARNm de SOX9 permaneció sin cambios en gran medida con la atenuación de TCF4 y FOXS1. Los inventores de la presente invención colocaron FOXS1 como una diana cadena abajo de SOX9. Por el contrario, SOX9 está regulado positivamente tras la atenuación de EGR2 (Fig. 6). El ARNm de STAT4 está regulado negativamente por la atenuación de TCF4, SOX9 y EGR2 (Fig. 6) colocándolo como un diana cadena abajo de los FT mientras que permanecía inalterado con ARNip de FOXS1 poniéndolo de antemano. Consistentemente, el ARNm de FOXS1 se regula negativamente con tratamiento con ARNip de TCF4, SOX9 y EGR2 (figura 6) colocándolo al final de esta cascada. Globalmente, los ARNm de PPARG, MAF y MEOX2 se regularon positivamente tras el tratamiento con ARNip contra TCF4, SOX9, EGR2 y FOXS1 (Fig 6) consistentes con su papel como antagonistas en la diferenciación de fibroblastos. El nivel de ARNm SIX2 no se modificó tras la atenuación de EGR2 y FOXS1 (Fig. 6) pero se reguló positivamente de la misma manera por TCF4 y SOX9, consistentes con una estrecha interconexión entre estos dos FT y sugiriendo la existencia de una señal equilibrada entre los agonistas de diferenciación SOX9 y TCF4 y el antagonista SIX2.

La identificación de los factores de transcripción capaces de eludir el efecto de los exudados de heridas crónicas es de gran importancia en el campo de la herida crónica ya que proporciona una nueva visión de las dianas que pueden utilizarse en el tratamiento de heridas crónicas tales como las úlceras de la pierna. En este estudio, centrándose en fibroblastos, de ninguna manera los inventores de la presente invención trataron de disimular la importancia de otras células como neutrófilos y macrófagos en el proceso de cicatrización de la piel, pero los inventores de la presente invención simplificaron voluntariamente el contexto biológico para obtener una imagen más clara de la situación.

Efectos de los fármacos en la diferenciación de fibroblastos

Los inventores de la presente invención han probado varias concentraciones de fármacos para definir al menos un

rango de concentraciones óptimas para observar un efecto sobre las células: en ausencia y en presencia de TGF- β , los inventores de la presente invención esperaban observar para algunas de las drogas un aumento de la diferenciación o una inhibición de la diferenciación.

- 5 Para estas pruebas, los inventores de la presente invención evaluaron la expresión de diferentes genes: α SMA, PI16 (WO2013 / 144348) y ACTC1 (marcadores para la diferenciación, regulados positivamente en células de miofibroblastos frente a fibroblastos), en presencia o no de exudados.

Trametinib

- 10 Muy curiosamente, los inventores de la presente invención pueden ver que en presencia de Trametinib entre 1 y 4 nM se observa un aumento del nivel basal de α SMA en los fibroblastos no tratados (Figura 8a).

- 15 De manera interesante, Trametinib puede aumentar el marcador de miofibroblastos α SMA incluso en presencia de exudado, así como en la expresión de PI16 y ACTC1 (otros 2 genes mostraron una regulación al positiva en la diferenciación) (Figura 9b). Trametinib podría evitar el efecto negativo dominante del exudado en la diferenciación y, por lo tanto, podría ser de gran interés terapéutico. Se describió Trametinib como un gen antagonista de MAF por lo que estos resultados concuerdan completamente con los experimentos de ARNip donde se mostró que la inhibición de la expresión de MAF podría iniciar la diferenciación.

Am580

- 20 Am580 utilizado a una concentración 5 nM es capaz de aumentar la diferenciación en presencia de TGF β (Figura 9a). Am580 es capaz de potenciar el efecto de TGF β sobre los fibroblastos y aumentar la diferenciación como se sigue con 3 marcadores regulados positivamente tras la diferenciación (α SMA, PI16 y ACTC1). Además, en presencia de exudado, Am580 puede eliminar el efecto negativo del exudado sobre la diferenciación, como se muestra con el aumento de α SMA y PI16, en el estado en que se añadieron a las células TGF β beta, exudado y Am580, en contraste con el mismo estado sin Am580.

- 25 Se ha mostrado que Am580 tiene un efecto agonista sobre SOX9; estos resultados confirmaron el experimento de ARNip ya que muestra que la inhibición de SOX9 (por tratamiento con ARNip) conduce a una inhibición completa de la diferenciación. En este caso se muestra que tratar las células con un agonista de Sox9 produce el efecto opuesto.

Gant 61

- 35 Gant 61 usado a una concentración 4 μ M puede aumentar la diferenciación como se muestra por la regulación positiva de α -SMA (Figura 10). Sorprendentemente, Gant 61 puede regular positivamente la expresión de GLI1, sin embargo, se informa que Gant61 es un inhibidor de GLI1 (Stanton, Benjamin Z., et al., 2010. Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. Molecular bioSystems. 6(1): 44-54.) Además, Gant 61 indujo el aumento del ARNm de SOX9 y la disminución del ARNm de MAF.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SDRI et al.

- 45 <120> Diana molecular para el tratamiento de heridas, en particular heridas crónicas

<130> BCT130245 QT

<160> 74

- 50 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

- 55 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNip

- 60 <400> 1
uucgaucuga ugaaguuuga a 21

<210> 2

- 65 <211> 21

<212> ARN

<213> Artificial
 <220>
 <223> ARNip
 5
 <400> 2
 cggcaggaga auggcaucag a 21
 <210> 3
 10 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> ARNip
 <400> 3
 agcaugcgcga cuuaugauau a 21
 20 <210> 4
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> ARNip
 <400> 4
 30 cccgcccguc cugugcucca a 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> ARNip
 <400> 5
 40 uccggagaac aaucagauug a 21
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ARN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> ARNip
 50 <400> 6
 gagggcgauc uugacaggaa a 21
 <210> 7
 <211> 21
 55 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ARNip
 60 <400> 7
 caacgagaac uccaauucua a 21
 <210> 8
 65 <211> 21
 <212> ARN

<213> Artificial
 <220>
 <223> ARNip
 5
 <400> 8
 cccgcugaau ggcagcggca a 21
 <210> 9
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 9
 ctgtttccc atccattgtg 20
 20 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 10
 ccatgttcta tcgggtactt 20
 30 <210> 11
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> ARNip
 <400> 11
 40 ccggcgaagg gugguagacg a 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> ARN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> ARNip
 50 <400> 12
 aacagauuuc uguaggauca a 21
 <210> 13
 <211> 19
 55 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ARNip
 60 <400> 13
 ucggagaacu uucagaucu 19
 <210> 14
 65 <211> 19
 <212> ARN

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
5		
	<400> 14	
	gagaagucac gcuaugaga	19
10		
	<210> 15	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
15		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 15	
	gagcagaugg uuaugguga	19
20		
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
25		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 16	
	gaacagggcc acugacucu	19
30		
	<210> 17	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
35		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 17	
	gaaggcauaa ucaauauug	19
40		
	<210> 18	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 18	
	cuacuguggc cgaaaguuu	19
50		
	<210> 19	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
55		
	<220>	
	<223> ARNip	
60		
	<400> 19	
	gaaaccagac cuucacuuu	19
65		
	<210> 20	
	<211> 19	
	<212> ARN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
5	<400> 20	
	gagaagaggu cguuggauc	19
10	<210> 21	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 21	
	agggccaaua aagccaugug a	21
20	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 22	
30	cuggcucuag gaccugaaga a	21
	<210> 23	
	<211> 19	
	<212> ARN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
40	<400> 23	
	gcaaaauaggg cuucacaua	19
	<210> 24	
	<211> 19	
45	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
50	<400> 24	
	aggcucagcu uguguguaa	19
	<210> 25	
55	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> ARNip	
	<400> 25	
	ggacgaggga ccuugcauu	19
65	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> ARN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
5	<400> 26 cagcuagagu ccagagguu	19
10	<210> 27 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
15	<220> <223> ARNip	
20	<400> 27 gcacagcaac gcaaccuca	19
25	<210> 28 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
30	<220> <223> ARNip	
35	<400> 28 gagcuucggu gacaaccug	19
40	<210> 29 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
45	<220> <223> ARNip	
50	<400> 29 ugaucaucgu ggugcagaa	19
55	<210> 30 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
60	<220> <223> ARNip	
65	<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	
5	<400> 32 caacuuccgc ugcgcacug	19
10	<210> 33 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
15	<220> <223> ARNip	
	<400> 33 gcgcgcaucu ucaaggccu	19
20	<210> 34 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> ARNip	
30	<400> 34 caggcacgga ccagacuga	19
35	<210> 35 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip	
40	<400> 35 gagcggaccu uauggcuac	19
45	<210> 36 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip	
50	<400> 36 gaacaggugg cacagcuua	19
55	<210> 37 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
60	<220> <223> ARNip	
	<400> 37 gaaacgaccu ucuaugacg	19
65	<210> 38 <211> 19 <212> ARN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
5	<400> 38	
	ugaaagcuca gaacucgga	19
10	<210> 39	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 39	
	acggaacucu ugugcguaa	19
20	<210> 40	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 40	
	gaacacacaa cgucuugga	19
30	<210> 41	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 41	
40	aacguuagcu ucaccaaca	19
	<210> 42	
	<211> 19	
	<212> ARN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
50	<400> 42	
	cgauguuguu ucuguggaa	19
	<210> 43	
	<211> 19	
55	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
60	<400> 43	
	caacaggaau gcagcagug	19
	<210> 44	
65	<211> 19	
	<212> ARN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
5		
	<400> 44	
	gaguucgccu ucaauauga	19
10		
	<210> 45	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
15		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 45	
	ggacgcaggu ucuccaaac	19
20		
	<210> 46	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
25		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 46	
	uuagagacau caaguaugg	19
30		
	<210> 47	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
35		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 47	
	gcaauugaaa guuugguaa	19
40		
	<210> 48	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 48	
	cccacaaccu uuagacuga	19
50		
	<210> 49	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
55		
	<220>	
	<223> ARNip	
60		
	<400> 49	
	gaauccauau cacuacgaa	19
65		
	<210> 50	
	<211> 19	
	<212> ARN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
5	<400> 50 guacagaguu acuacuuag	19
10	<210> 51 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
15	<220> <223> ARNip	
	<400> 51 ggaacaaccc gucuacaca	19
20	<210> 52 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> ARNip	
	<400> 52 gaacaagccg cacgucaag	19
30	<210> 53 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220> <223> ARNip	
40	<400> 53 gaccuucgau gucaacgag	19
45	<210> 54 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> ARNip	
50	<400> 54 ggaagucggu gaagaacgg	19
55	<210> 55 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
60	<220> <223> ARNip	
	<400> 55 ugagacaggc cauguguau	19
65	<210> 56 <211> 19 <212> ARN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
5		
	<400> 56	
	ggacugugcu gaagaguac	19
10		
	<210> 57	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
15		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 57	
	gcaccaagag ugaaugauc	19
20		
	<210> 58	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
25		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 58	
	gcaccagugu cugcuagug	19
30		
	<210> 59	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
35		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 59	
	gcacgauggg cucagcuuu	19
40		
	<210> 60	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 60	
	cuacgaacau gaccuauuc	19
50		
	<210> 61	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
55		
	<220>	
	<223> ARNip	
60		
	<400> 61	
	gaaccugacu uccaugcgg	19
65		
	<210> 62	
	<211> 19	
	<212> ARN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
5		
	<400> 62	
	agaaagagcu ugacaguaa	19
10		
	<210> 63	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
15		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 63	
	gaacuaaacu aucagguaa	19
20		
	<210> 64	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
25		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 64	
	gcauguagcu gugguuauu	19
30		
	<210> 65	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
35		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 65	
	caaucuagcu acagugaug	19
40		
	<210> 66	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45		
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 66	
	cugcgagacu acaaaguua	19
50		
	<210> 67	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
55		
	<220>	
	<223> ARNip	
60		
	<400> 67	
	gcacuugcuu cgaucuaau	19
65		
	<210> 68	
	<211> 19	
	<212> ARN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
5	<400> 68	
	gacaaagagc ugagugauu	19
10	<210> 69	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 69	
	gcacagcugu uuggucuag	19
20	<210> 70	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 70	
	caacgggaca gacaguaua	19
30	<210> 71	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 71	
	gcaagacggg agcgaguua	19
40	<210> 72	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 72	
	ggagggacaa gaucaacaa	19
50	<210> 73	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> ARNip	
60	<400> 73	
	gaagagccca gcacaacga	19
65	<210> 74	
	<211> 19	
	<212> ARN	

<213> Artificial

<220>

<223> ARNip

5

<400> 74

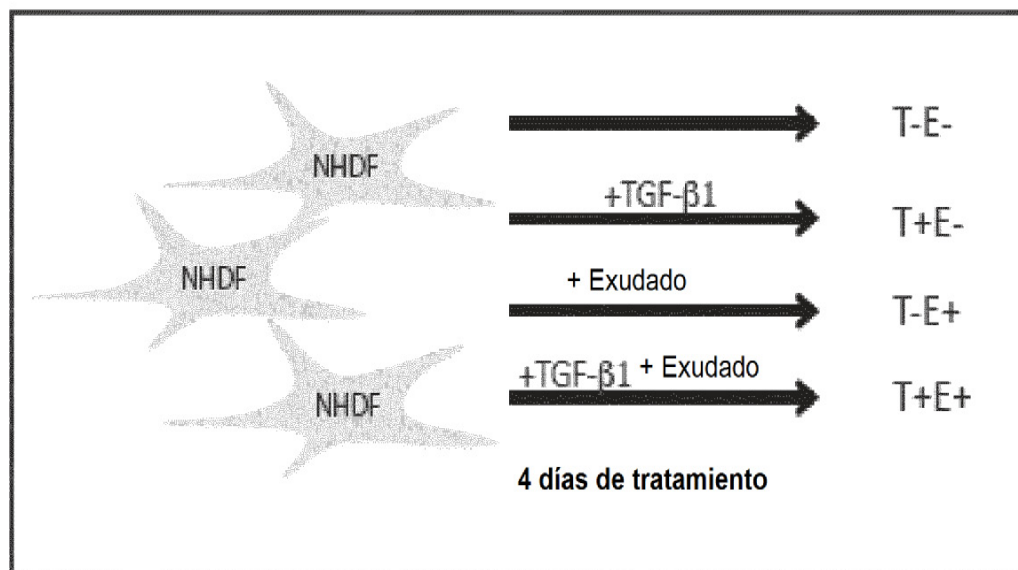
caaaaucccu ucagcaaug

19

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto terapéutico que comprende un agente que inhibe la actividad del gen del factor de transcripción MAF, donde dicho agente se selecciona del grupo que consiste en ADN o ARN no codificante, ARNip, ARNhc, TALENS o ribozimas, ya sea desnudos o en forma de vectores plasmídicos o víricos, anticuerpos y trametinib, para su uso en el tratamiento de heridas crónicas.
2. Un compuesto terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente:
 - un agente que inhibe la actividad de PPARG u homólogos del mismo que tienen al menos un 50 % de identidad con PPARG y/o
 - un agente que potencia la actividad de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en SMAD3, SMAD4 y homólogos de los mismos que tienen al menos un 50 % de identidad con dichos genes.
3. Un compuesto terapéutico para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el que dicho agente es un ARNip elegido de la SEC ID NO: 1 y la SEC ID NO: 2.
4. Un compuesto terapéutico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde es para tratar heridas de mamíferos.
5. Un compuesto terapéutico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde es para tratar úlceras venosas, úlceras diabéticas o úlceras por presión.
6. Un compuesto terapéutico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde es para tratar heridas de seres humanos.
7. Un compuesto terapéutico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde es para aplicación tópica.
8. Un compuesto terapéutico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde es para la aplicación a un dispositivo médico o para la impregnación en un dispositivo médico.
9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto terapéutico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
10. Un kit para tratar una herida crónica, donde dicho kit comprende:
 - (a) al menos un compuesto terapéutico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una composición de acuerdo con la reivindicación 9; y
 - (b) al menos un apósito para aplicar a dicha herida.
11. Una combinación terapéutica para tratar una herida crónica, que comprende:
 - a) un agente que inhibe la actividad del gen MAF de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y
 - b) al menos un agente terapéutico adicional.
12. Un compuesto terapéutico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho agente modula la diferenciación y/o actividad de fibroblastos y miofibroblastos.

a)



b)

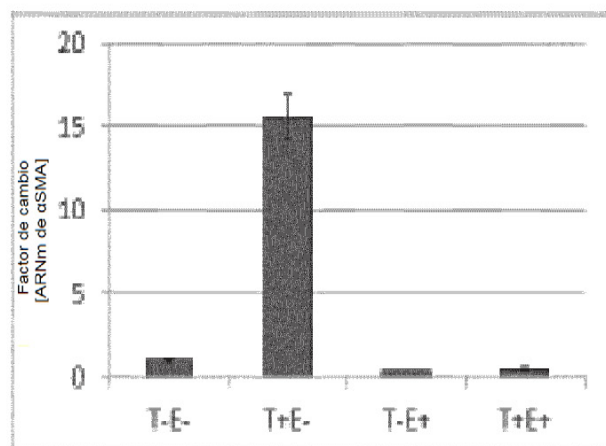
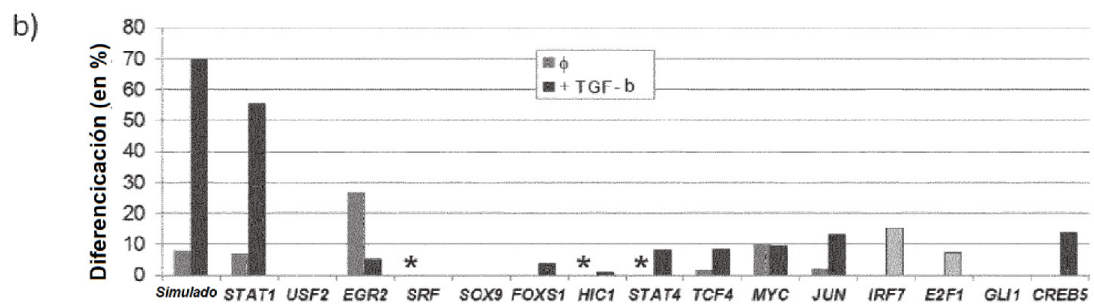
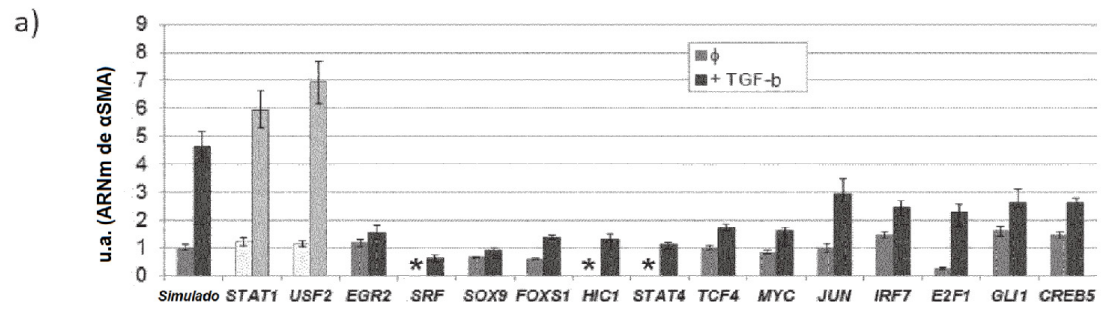
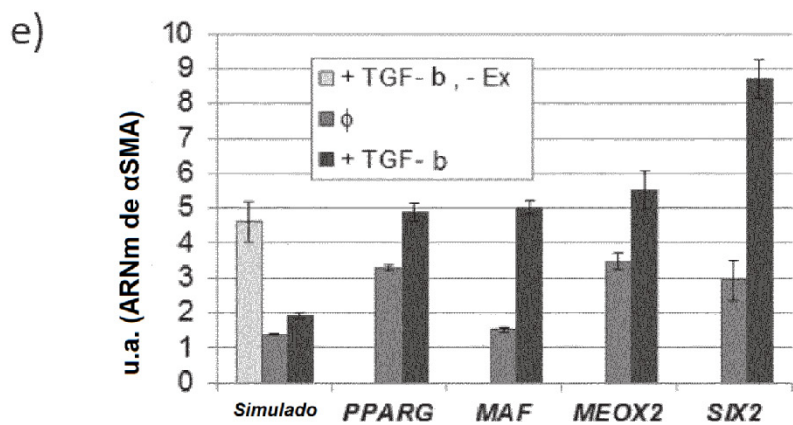
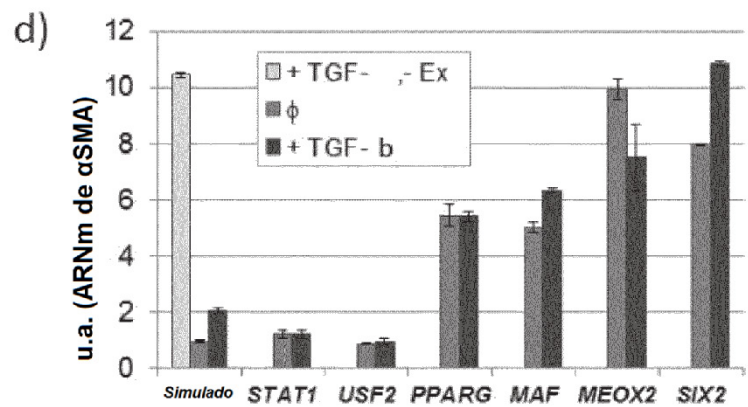
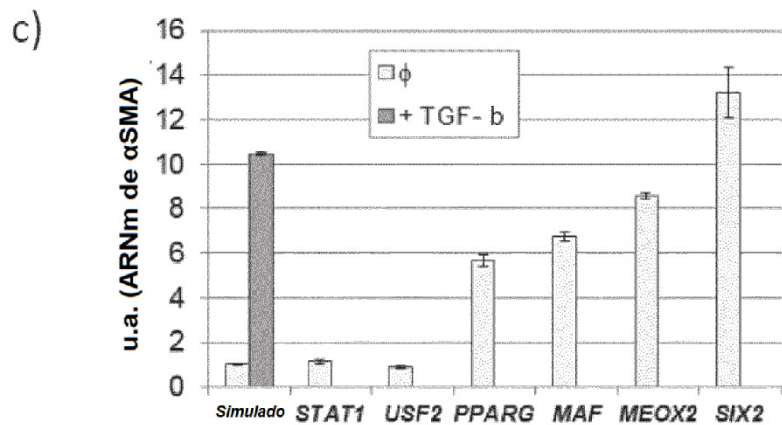


Figura 1



Figuras 2a) y 2b)



Figuras 2c) 2d) y 2e)

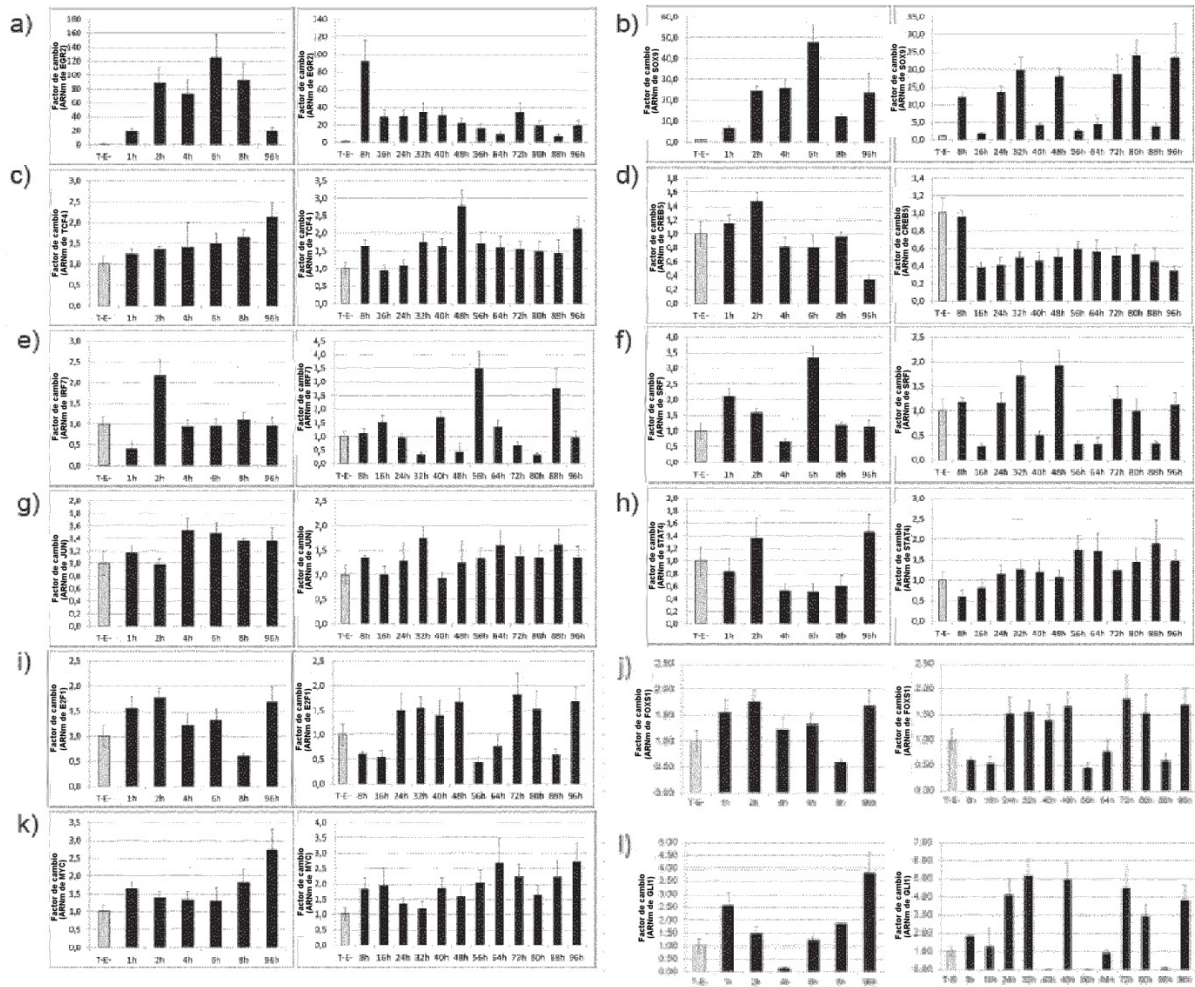
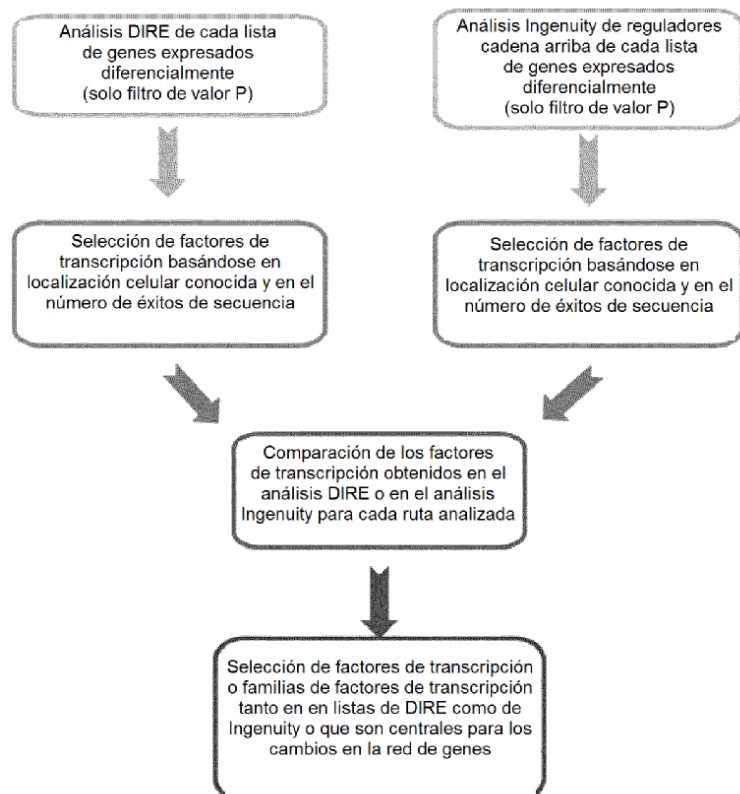


Figura 3

a)



b)

Símbolo	Introduzca el nombre del gen
CREB5	cAMP_responsive_element_binding_protein_5
E2F1	E2F_transcription_factor_1
EGR2	early_growth_response_2
ETS1	v-ets_erythroblastosis_virus_E26_oncogene_homolog_1_(avian)
FOXS1	forkhead_box_S1
GLI1	GLI_family_zinc_finger_1
HIC1	hypermethylated_in_cancer_1
IRF7	interferon_regulatory_factor_7
JUN	jun_oncogene
MAF	v-maf_musculoaponeurotic_fibrosarcoma_oncogene_homolog_(avian)
MEOX2	mesenchyme_homeobox_2
MYC	v-myc_myelocytomatosis_viral_oncogene_homolog_(avian)
POU2F2	POU_class_2_homeobox_2
PPARG	peroxisome_proliferator-activated_receptor_gamma
SIX2	SIX_homeobox_2
SMAD3	SMAD_family_member_3
SMAD4	SMAD_family_member_4
SOX9	SRY_(sex_determining_region_Y)-box_9
SRF	serum_response_factor_(c-fos_serum_response_element-binding_transcription_factor)
STAT1	signal_transducer_and_activator_of_transcription_1_91kDa
STAT4	signal_transducer_and_activator_of_transcription_4
TCF4	transcription_factor_4
USF2	upstream_transcription_factor_2_c-fos_interacting

Figura 4

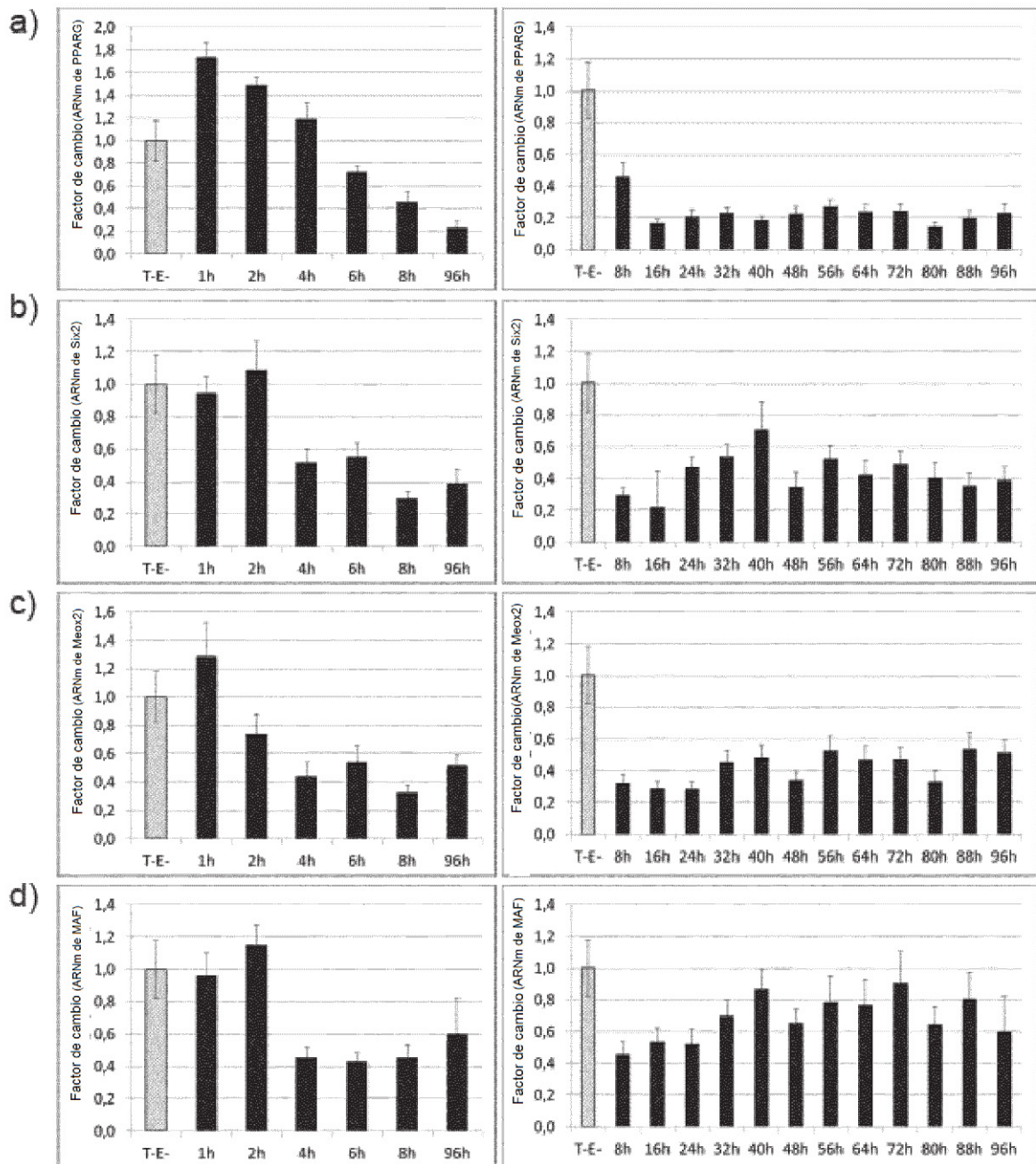


Figura 5

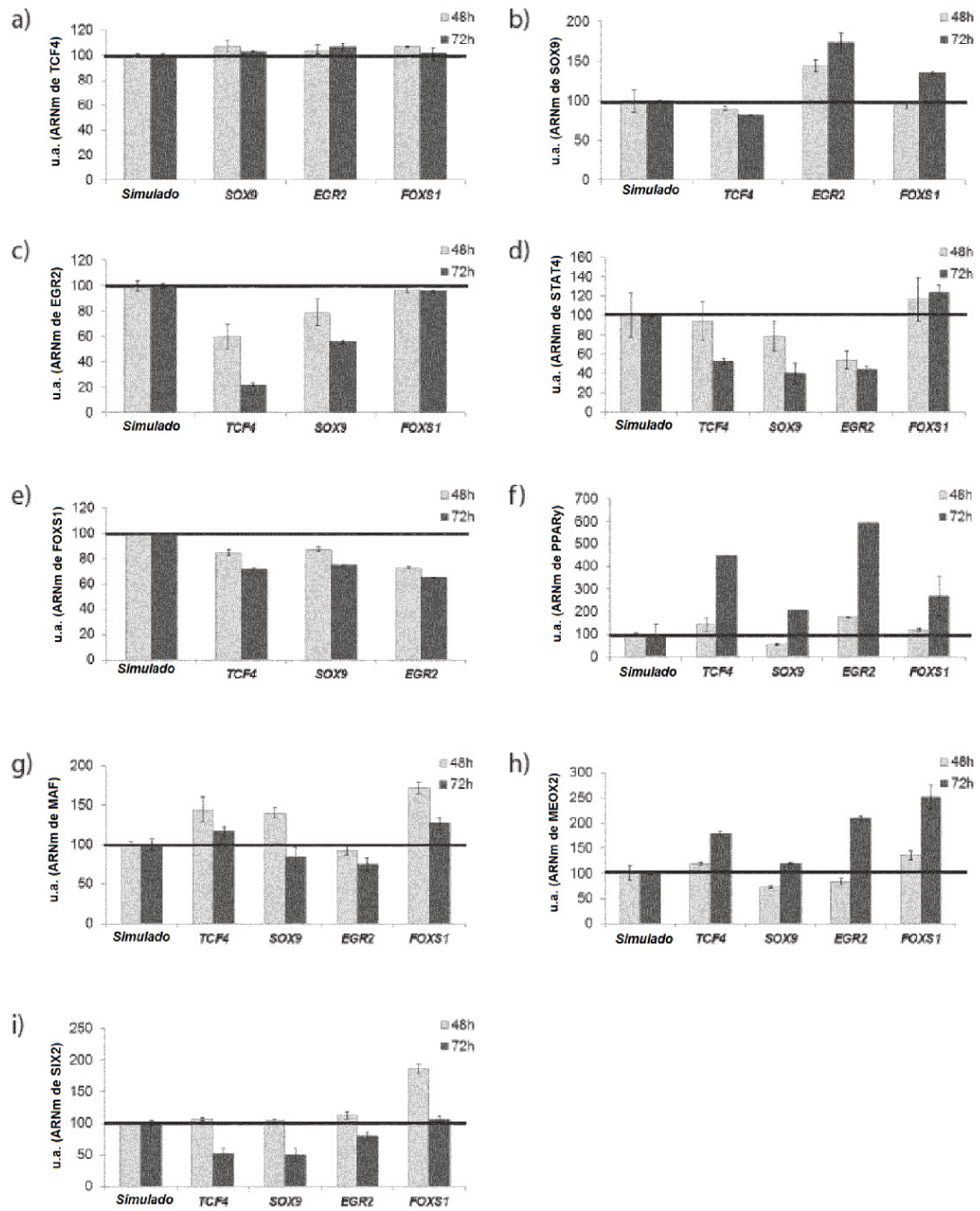
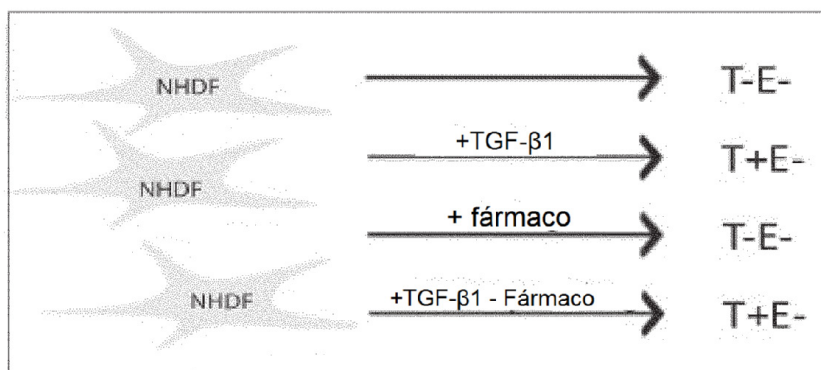


Figura 6

a)



b)

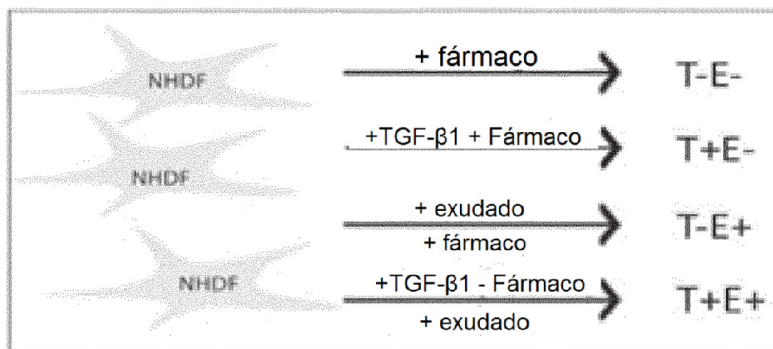
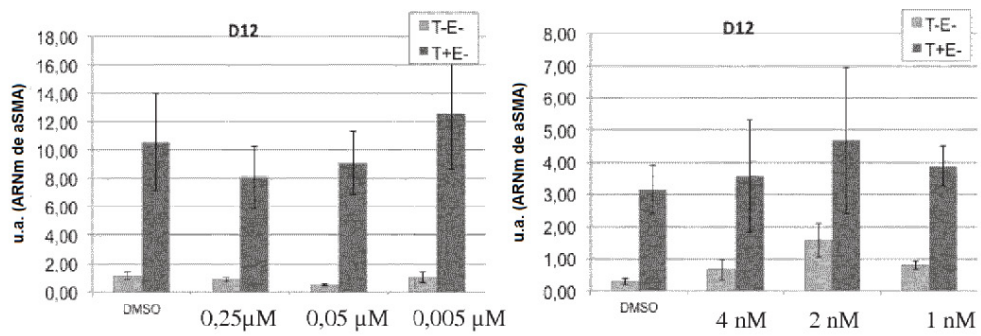


Figura 7

a)



b)

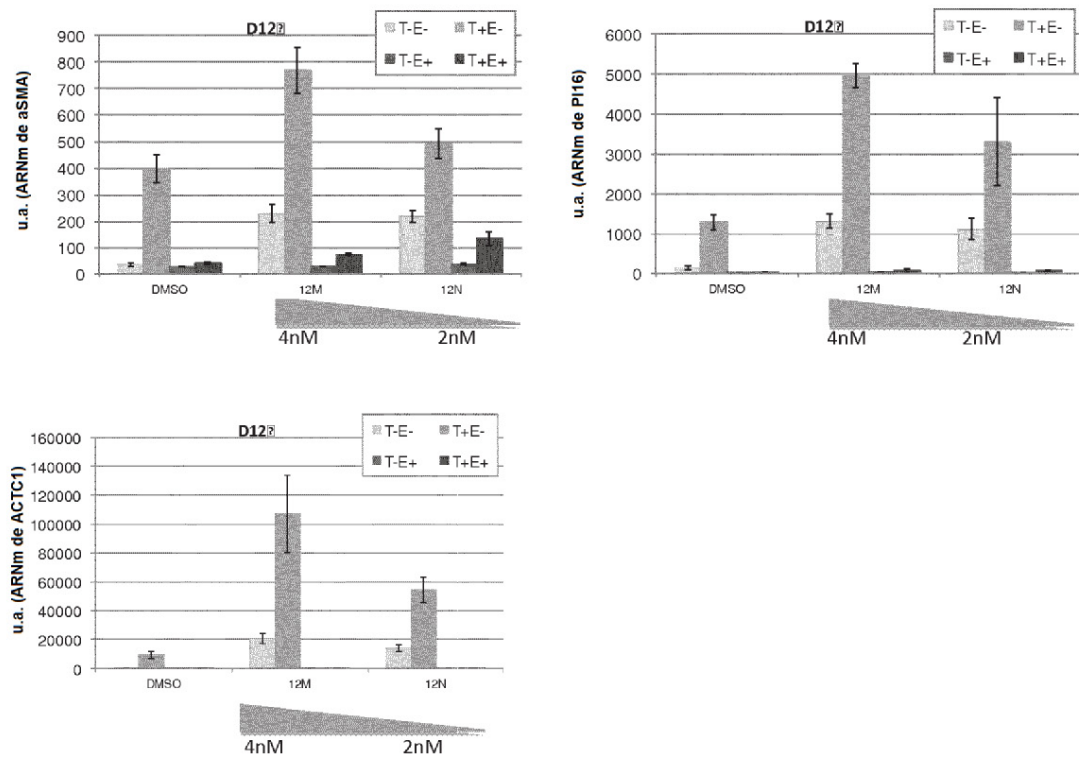
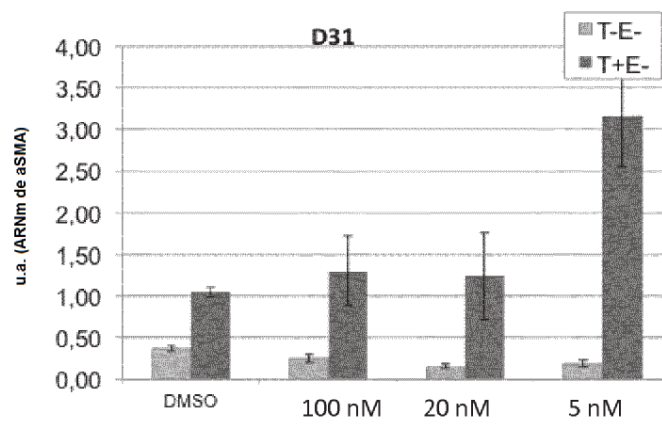


Figura 8

a)



b)

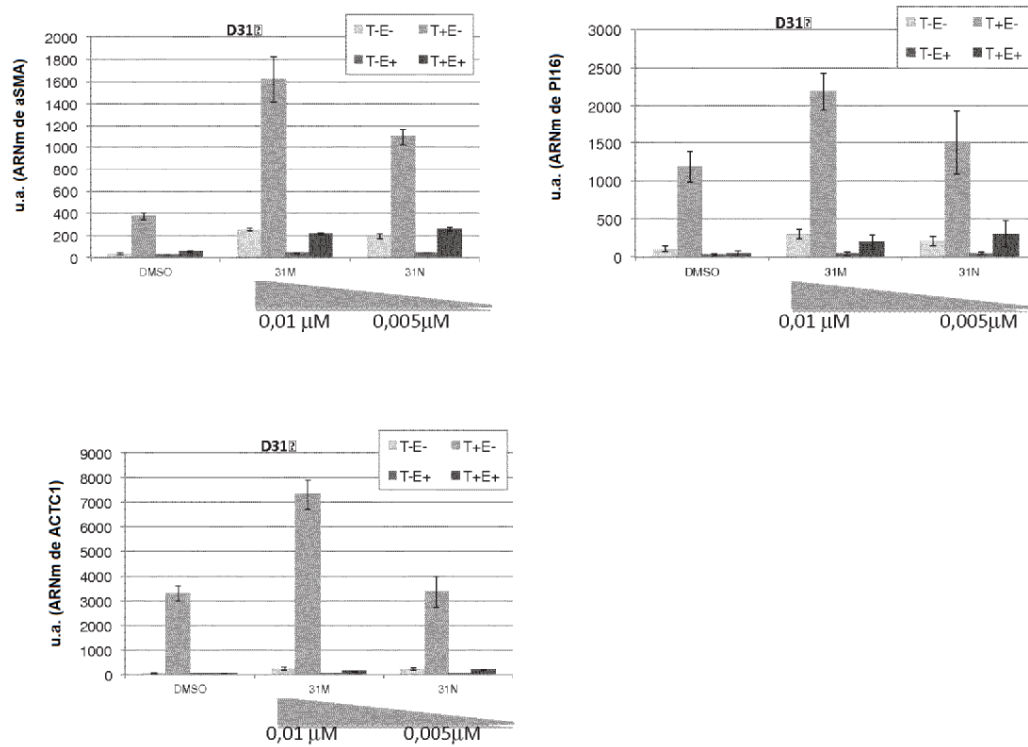


Figura 9

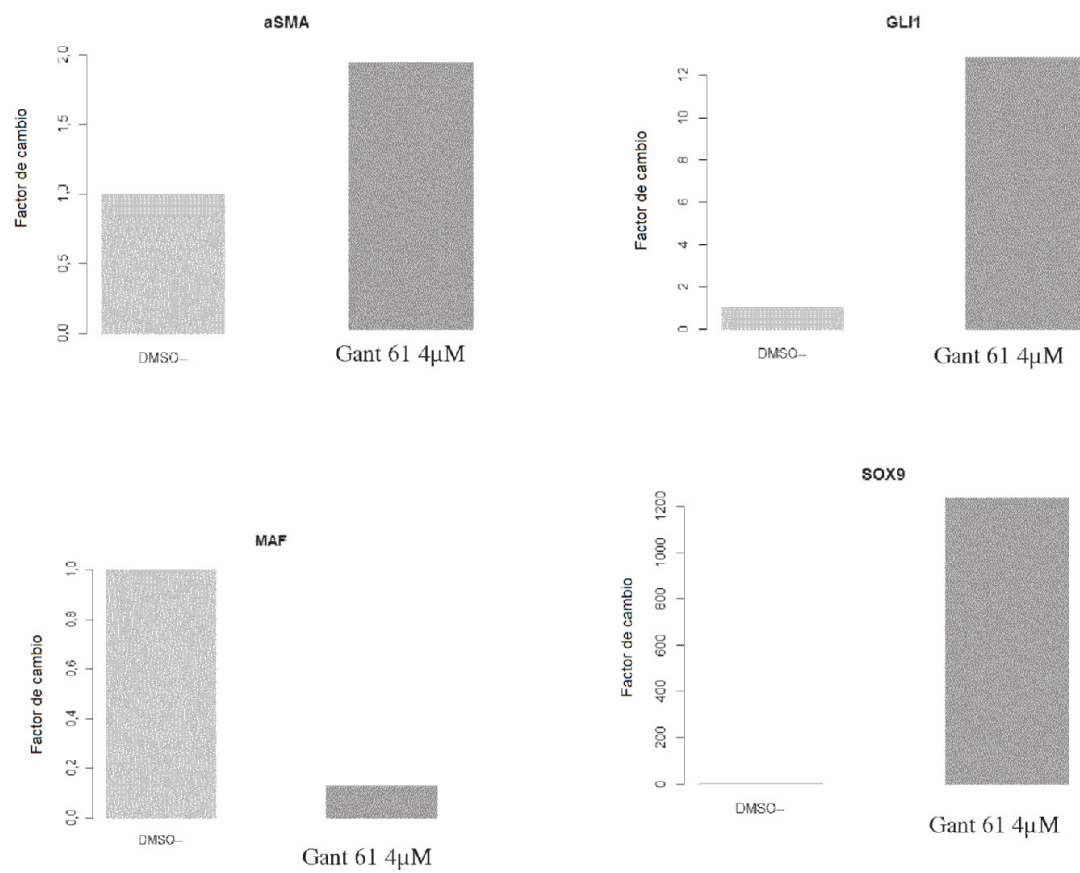


Figura 10

Símbolo	Herida
CREB5	Aumentar
E2F1	Aumentar
EGR2	Aumentar
ETS1	Disminuir
FOXS1	Aumentar
GLI1	Aumentar
HIC1	Aumentar
IRF7	Aumentar
JUN	Aumentar
MAF	Disminuir
MEOX2	Disminuir
MYC	Aumentar
PPARG	Disminuir
SIX2	Disminuir
SOX9	Aumentar
SMAD3	Aumentar
SMAD4	Aumentar
SRF	Aumentar
STAT4	Aumentar
TCF4	Aumentar

Tabla 1

CREB5	CCGGCGAAGGGUGGUAGACGA	Q, SI04157174	11
	AACGUAUUCUGUAGGAUCUA	Q, SI04141893	12
E2F1	UCGGAGAACUUCAGAUUCU	T, L-003259-00	13
	GAGAAGUCACGCUAUGAGA		14
	GAGCAGAUUGUUAUGGUGA		15
	GAACAGGGCCACUGACUCU		16
EGR2	GAAGGCAUAAUCAAUUG	T, L-006527-00	17
	CUACUGUGGCCGAAAGUUU		18
	GAAACCAGACCUUCACUUA		19
	GAGAAGAGGUCGUUGGAUC		20
FOXSI	AGGGCCAAUAAAGCCAUGUGA	Q, SI04152540	21
	CUGGCUCUAGGACCUGAAGAA	Q, SI00387527	22
GLI1	GCAAAUAGGGCUUCACAU	T, L-003896-00	23
	AGGCUCAGCUUGUGUGUAA		24
	GGACGAGGGACCUUGCAUU		25
	CAGCUAGAGUCCAGAGGUU		26
HIC1	GCACAGCAACGCAACCUC	T, L-006532-00	27
	GAGCUUCGGUGACAACCUG		28
	UGAUCAUUGGUGCAGAA		29
	GACCAUCGACCGUUCUCU		30
IRF7	GCACAAGGUGUACGCGCUC	T, L-011810-00	31
	CAACUUCGCGUGCGCACUG		32
	GCGCGCAUCUUAAGGCCU		33
	CAGGCACGGACACAGUGA		34
JUN	GAGCGGACCUUAGGCUAC	T, L-003268-00	35
	GAACAGUGGCACAGCUUA		36
	GAAACGACCUUCUAGACG		37
	UGAAAGCUCAGAACUCGGA		38
MAF	UUCGAUCUGAUGAAGUUUGAA	Q, SI00076048	1
	CGGCAGGAGAAUGGCAUCAGA	Q, SI03086069	2
MEOX2	AGCAUGCGCACUUAUGAUUA	Q, SI04299421	3
	CCCGCCCGUCCUGUGCUCAA	Q, SI04262174	4
MYC	ACGGAACUCUUGUGCGUAA	T, L-003282-00	39
	GAACACACAACGUCUUGGA		40
	AACGUUAGCUUACCAACA		41
	CGAUGUUGUUUCUGUGGAA		42
PPAR γ	UCCGGAGAACAAUCAGAUUGA	Q, SI03115266	5
	GAGGGCGAUCUUGACAGGAAA	Q, SI00071673	6
SIX2	CAACGAGAACUCCAAUUCUAA	Q, SI00719313	7
	CCCGCUGAAUUGGCAGCGCAA	Q, SI04141095	8
SMAD3	CAACAGGAAUGCAGCAGUG	T, L-020067-00	43
	GAGUUCGCCUUCAAUUGA		44
	GGACGACGGUUCUCCAAAC		45
	UUAGAGACAUCAAGUAUGG		46
SMAD4	GCAAUUGAAAGUUUGGUAA	T, L-003902-00	47
	CCCACAACCUUAGACUGA		48
	GAUCCAUUACACUACGAA		49
	GUACAGAGUUAUACUUAAG		50
SOX9	GGAACAACCCGUCUACACA	T, L-021507-00	51
	GAACAAGCCGCACGUCAAG		52
	GACCUUCGAGUCAACGAG		53
	GGAAGUCGGUGAAGAACGG		54
SRF	UGAGACAGGCCAUGUGUAU	T, L-009800-00	55
	GGACUGUGCUGAAGAGUAC		56
	GCACCAAGAGUGAAUGAUC		57
	GCACCAUGUGUCUAGUG		58
STAT1	GCACGAUGGGCUCAGCUUU	T, L-003543-00	59
	CUACGAACAUAGCCUAUC		60
	GAACCUGACUUCUAGCGG		61
	AGAAAGAGCUUGACAGUAA		62
STAT4	GAACUAAACUACAGGUAA	T, L-011784-00	63
	GCAUGUAGCUGUGGUUAUU		64
	CAUUCUAGCUACAGUGAUG		65
	CUGCGAGACUACAAAGUUA		66
TCF4	GCACUUGCUUCGAUCUUAU	T, L-004594-00	67
	GACAAAGAGCUGAGUGAUU		68
	GCACAGCUGUUUGGUCUAG		69
	CAACGGGACAGACAGUUA		70
USF2	GCAAGACGGGAGCGAGUAA	T, L-003618-00	71
	GGAGGGACAAGAUCAACAA		72
	GAAGAGCCCAGCACACGA		73
	CAAAAUCCUUCAGCAAUG		74

Tabla 2