

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 204**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2011 PCT/EP2011/069147**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12056044**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2011 E 11779628 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2632446**

54 Título: **Tratamiento de la enfermedad de Dupuytren**

30 Prioridad:

10.08.2011 GB 201113718

01.11.2010 GB 201018362

30.10.2010 GB 201018325

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2019

73 Titular/es:

**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED
(100.0%)**

**Buxton Court, 3 West Way, Botley
Oxford OX2 0JB, GB**

72 Inventor/es:

**NANCHAHAL, JAGDEEP y
MIDWOOD, KIM SUZANNE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 715 204 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

Tratamiento de la enfermedad de Dupuytren

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al tratamiento de trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos tales como fibromatosis y, en particular, enfermedad de Dupuytren. En particular, se refiere a una composición o agente terapéutico o a una combinación de tales composiciones o agentes terapéuticos para el tratamiento, profilaxis o prevención de la progresión de trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos, especialmente, la enfermedad de Dupuytren, al uso de tal composición/agente terapéutico o combinación de composiciones/agentes terapéuticos para el tratamiento, profilaxis o prevención de la progresión de trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos, especialmente, la enfermedad de Dupuytren y a un método de tratamiento de trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos, especialmente, la enfermedad de Dupuytren.

Antecedentes de la invención

15 La enfermedad de Dupuytren, que se conoce de forma alternativa como fibromatosis palmar (o en su estado de enfermedad establecido contracción de Dupuytren), es una enfermedad asociada con la formación de materiales de matriz extracelulares tales como colágeno sobre el tejido conectivo de la mano (la fascia palmar) que provoca su engrosamiento y acortamiento con el efecto físico de provocar que los dedos se curven, más comúnmente el dedo anular y el dedo meñique.

20 La enfermedad de Dupuytren afecta aproximadamente al 5 % de la población caucásica blanca. La manifestación más común es la contracción por flexión progresiva de los dedos de la mano, dando como resultado una función significativamente afectada. Afecta tanto a varones como a mujeres, pero la incidencia es superior en varones.

Las causas de la enfermedad de Dupuytren no son bien conocidas y la enfermedad subyacente no es curable en la actualidad.

25 El tratamiento de la enfermedad de Dupuytren han sido tradicionalmente técnicas quirúrgicas invasivas. Principalmente, el tratamiento ha implicado la escisión quirúrgica del tejido ofensivo. En enfermedades graves o recurrentes, la escisión quirúrgica puede combinarse con la escisión de la piel palmar subyacente y renovar el defecto cutáneo con un injerto cutáneo de espesor completo. La cirugía se sigue típicamente por una prolongada rehabilitación, que dura normalmente 3 meses y se han dado a conocer complicaciones en hasta el 20 % de los casos. Tal corrección quirúrgica es el pilar principal de tratamiento de la enfermedad en fase tardía cuando se han desarrollado cambios secundarios en tendones y articulaciones. Una intervención quirúrgica menos invasiva es la fasciotomía con aguja en la que las bandas fibrosas (contracciones) en el tejido conectivo se dividen usando el sesgo de la aguja.

35 La escisión enzimática del tejido afectado ha sido el foco de desarrollo para reducir la invasividad asociada con la cirugía y mejorar el tiempo de recuperación. Este enfoque ha llevado a ensayos de colagenasa. Una colagenasa bacteriana, colagenasa clostridial, ha sido concedida aprobada por la FDA como Xiaflex™ a Pfizer y Auxilium. los documentos USRE39941, US5589171 y US6086872 describen el uso de colagenasa bacteriana para la escisión enzimática de tejido conectivo en el tratamiento de la enfermedad de Dupuytren. Las colagenasas bacterianas tienen determinados inconvenientes: por ejemplo, carecen de escisión no selectiva de diversos materiales de colágenos que incluyen colágeno tipo IV asociado con vasos sanguíneos; y, en el caso de Xiaflex™, posibles reacciones alérgicas e potencial inmunogenicidad; y su administración puede causar hemorragias mientras que una actividad prolongada de colagenasa limita la dosis que puede administrarse localmente debido al riesgo de efectos colaterales según se dispersa el fármaco.

45 El documento WO 2010/102202 describe una colagenasa recombinante sensible a la temperatura novedosa en la que la actividad se observa a una temperatura significativamente por debajo de la corporal, pero que resulta comparativamente inactiva a temperatura corporal. De este modo, se puede tratar el síndrome de Dupuytren mediante la administración de tal colagenasa recombinante a bajas temperaturas, lo que se reivindica restringe la duración de la actividad, aumenta la posible dosis local y reduce los efectos colaterales relacionados con la colagenasa.

50 Hasta la fecha, las terapias de colagenasa han aparecido relativamente eficaces en el tratamiento de la contracción de la articulación de la metacarpofalángica, mientras que la corrección de articulaciones interfalángicas proximales ha sido mucho menos satisfactoria. Además, como con las intervenciones quirúrgicas, se espera su reaparición, pero en el caso de ensayos de colagenasa temprana, que implican el corte enzimático del cordón, la reaparición es elevada, especialmente para enfermedades que afecta la articulación interfalángica proximal.

Otros tratamientos no quirúrgicos que se han propuestos incluyen la aplicación de crema de vitamina E aplicada como terapia tópica, terapia ultrasónica y terapia de radiación de baja dosis (para ralentizar la progresión de la enfermedad de fase temprana), tal como rayos X y terapia de haz de electrones.

5 La mayoría de investigaciones para el tratamiento de la enfermedad de Dupuytren se han centrado en la detección de la predisposición a Dupuytren (por ejemplo, el documento US-A-2004/0161761) y sobre las matrices extracelulares producidas, lo que ha resultado en los tratamientos a base de colagenasa. Ha habido muy pocas pruebas concluyentes sobre los potenciales tratamientos obtenidos a partir de estudios en la trayectoria bioquímica de la enfermedad de Dupuytren.

10 El documento WO-A-2005/07419 describe composiciones y métodos que se refieren a afecciones asociadas con movilidad reducida o pérdida de función y articulación que surge de tejido cicatrizal y tejidos anormales asociados con quemaduras, isquemia, trastorno metabólico, lesiones, intervenciones quirúrgicas. Se incluye una gran lista de afecciones y tipos de compuestos con formulaciones de paclitaxel ejemplificadas.

15 Khanna y col. en 'Infliximab may be effective in the treatment of steroid-resistant eosinophilic fasciitis: report of three cases', Rheumatology, 49(6), pág.1184-1188, describe tres casos en los que los pacientes con síntomas establecidos de EF son tratados, después de una terapia con esteroides, con infliximab con una reducción en los síntomas mostrados.

Permanece la necesidad de una intervención terapéutica novedosa en el tratamiento y/o prevención de (por ejemplo, progresión de) la enfermedad de Dupuytren y otros trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos.

20 Los presentes inventores han encontrado que la administración de un antagonista del TNF- α es sorprendentemente eficaz por sí mismo o en combinación con otro tratamiento de Dupuytren en la prevención de la progresión de la enfermedad de Dupuytren de fase temprana y la reversión de la enfermedad de Dupuytren de fase tardía así como la reducción de la reaparición de la enfermedad.

PROBLEMA A RESOLVER POR LA INVENCION

25 Permanece la necesidad de mejoras en el tratamiento de la enfermedad de Dupuytren y otros trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos, en particular, fibromatosis y enfermedades similares que incluyen y se seleccionan preferentemente de fibromatosis plantar (o enfermedad de Ledderhose), capsulitis adhesiva (hombro congelado) y enfermedad de Peyronie (fibromatosis del pene).

30 Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición y método para el tratamiento o profilaxis (por ejemplo, prevención de la progresión o reaparición) de una o más de enfermedad de Dupuytren, fibromatosis plantar, capsulitis adhesiva y enfermedad de Peyronie.

Sumario de la invención

35 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno fibroproliferativo musculoesquelético de estado de enfermedad temprana, comprendiendo la composición una cantidad terapéutica, profiláctica o eficaz en la inhibición de la progresión de un antagonista del TNF- α , en donde el trastorno se caracteriza por la presencia de indicaciones de enfermedad, pero en ausencia de contracción significativa.

40 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona el uso de un antagonista del TNF- α en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno fibroproliferativo musculoesquelético de estado de enfermedad temprana, en donde el trastorno se caracteriza por la presencia de indicaciones de enfermedad, pero en ausencia de contracción significativa.

VENTAJAS DE LA INVENCION

45 Las composiciones y métodos de la presente invención permiten la ralentización o detención de la progresión de Dupuytren (y otras fibromatosis y enfermedades similares). Tiene ventajas particulares en que Dupuytren de estado de enfermedad temprana (y otras fibromatosis y enfermedades similares) pueda prevenirse su progresión a una enfermedad de estado establecido y evitar la intervención quirúrgica y el tiempo de recuperación asociado.

Las composiciones y métodos de la presente invención permiten el tratamiento, prevención e inhibición de la progresión de adhesiones musculoesqueléticas tales como capsulitis adhesiva y adhesión de tendón (tal como adhesión de la articulación interfalángica proximal en enfermedad de Dupuytren de estado de enfermedad establecido).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra imágenes de nódulos y cordón de una vista intraoperativa;

La Figura 2 es un diagrama que muestra una distribución de células ricas en α -SMA en tejido escindido de distintas partes de tejido de Dupuytren enfermo;

- 5 La Figura 3 es una fotografía de un Monitor de Fuerza de Cultivo usado en experimentos *in vitro* para evaluar el comportamiento contráctil de células en una matriz de colágeno tridimensional;

La Figura 4 muestra gráficos de contracción frente a tiempo para distintos cultivos celulares (en un Monitor de Fuerza de Cultivo de Figura 3) durante un período de 24 horas;

- 10 La Figura 5 es un diagrama que muestra la tasa media de contracción de células de derivación de tejido distinto de pacientes con Dupuytren;

La Figura 6 son gráficos de la tasa media de contracción de células de distinto tejido de pacientes con Dupuytren, la cantidad de ARN mensajero, la cantidad y distribución intracelular de la proteína α actina del músculo liso (α -SMA);

La Figura 7 muestra imágenes de células inflamatorias (macrófagos, CD68, mastocitos, triptasa de mastocitos) en el nódulo y cordón de Dupuytren;

- 15 La Figura 8 muestra imágenes de secciones de muestras de cordón de Dupuytren teñidas para α -SMA y RAGE;

La Figura 9 muestra imágenes de secciones de muestras de piel de pacientes con Dupuytren teñidas para RAGE y que muestran una distribución diferencial en piel no palmar y palmar;

La Figura 10 proporciona diagramas que muestran el análisis FACS de células que derivan de fibroblastos de piel nodular, no palmar y palmar para la expresión de RAGE;

- 20 La Figura 11 proporciona diagramas que muestran el análisis FACS de células que derivan de conjuntos emparejados de piel no palmar y palmar para la expresión de RAGE;

La Figura 12 proporciona un diagrama de contractilidad de fibroblastos dérmicos de piel palmar tratados con TNF- α , HMGB1 o TGF- β 1;

- 25 La Figura 13 es un diagrama que muestra la contractilidad de células derivadas de nódulos de pasaje primario (de un paciente con Dupuytren) y en presencia o ausencia de anti-TNF-a.

La Figura 14 es un diagrama que muestra la contractilidad de fibroblastos dérmicos palmares expuestos a AGE

La Figura 15 es un diagrama que muestra la producción de TNF- α a partir de monocitos humanos expuestos a determinados DAMP. LPS es un PAMP, que se muestra como control positivo.

- 30 La Figura 16 es un diagrama que muestra la producción de TNF- α a partir de monocitos humanos expuestos a determinados DAMP en presencia de determinados bloqueadores de receptores.

La Figura 17 es un diagrama que muestra la producción de TNF- α a partir de células de médula ósea murina en presencia de S100 A8 a su vez en células que tienen deficiencia de TLR-4 y deficiencia de MyD88.

La Figura 18 es un diagrama que muestra la producción de TNF- α a partir de monocitos humanos expuestos a determinado DAM solo y en combinación con LPS.

- 35 La Figura 19 es un esquema del mecanismo propuesto de la función del traumatismo y Alarminas en la patogénesis de la enfermedad de Dupuytren.

La Figura 20 es un diagrama de inducción plegada en la contracción de fibroplastos cuando se exponen a sobrenadante de monocitos estimulados con AGE, con o sin anti-TNF-a.

- 40 La Figura 21 es un diagrama que muestra la contractilidad de fibroblastos dérmicos palmares y respuesta a la dosis de TGF- β 1.

La Figura 22 es un diagrama que muestra que los fibroblastos dérmicos palmares de pacientes con enfermedad de Dupuytren expuestos a TNF- α se vuelven más contráctiles mientras que los fibroblastos dérmicos no palmares no lo hacen.

5 La Figura 23 es un diagrama que muestra una dosis relacionada con la inhibición de la contractilidad de células de nódulos de Dupuytren expuestos a antagonista de TNF- α .

La Figura 24 es una imagen que muestra células de un nódulo de Dupuytren en un gel de colágeno tridimensional expuesto solo a anticuerpo IgG de control teñido con faloidina y que muestra alineación en el eje de tensión.

Las Figuras 24b y 24c son imágenes que muestran células de un nódulo de Dupuytren teñido con faloidina y α -SMA respectivamente, tratadas con un antagonista de TNF- α , que muestra pérdida de alineación en el eje de tensión.

10 La Figura 25 es un esquema de una función propuesta de glicación avanzada de productos finales, lesión y alarminas en la patogénesis de trastornos fibroproliferativos, destacando la función fundamental del TNF- α en la trayectoria común final.

Descripción detallada de la invención

15 La invención proporciona un tratamiento mejorado de un trastorno fibroproliferativo musculoesquelético, especialmente, enfermedad de Dupuytren (u otra fibromatosis y enfermedad similar tal como fibromatosis plantar, capsulitis adhesiva y enfermedad de Peyronie), que comprende la administración a un paciente que lo necesita, que muestra síntomas de estado de enfermedad temprana, una cantidad terapéutica, profiláctica o de inhibición de la progresión de un antagonista del TNF- α . Además, la invención proporciona, mediante la administración de un antagonista del TNF- α a un paciente que tiene o que muestra síntomas de desarrollo de enfermedad de Dupuytren, la prevención de la manifestación y/o progresión de la enfermedad, opcionalmente como una terapia complementaria (o simultánea) a una principal intervención quirúrgica (por ejemplo, una fasciotomía o fasciectomía) o principal tratamiento terapéutico (por ejemplo, una degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión, tal como una metaloproteinasa o colagenasa de matriz). Aún más, la invención proporciona, mediante la administración de un antagonista del TNF- α a un paciente, la prevención de la reaparición de la enfermedad como una terapia complementaria a la principal intervención quirúrgica o tratamiento terapéutico de la enfermedad establecida.

20 Los trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos se caracterizan por una producción excesiva o incontrolada de matriz extracelular en asociación con una estructura musculoesquelética, a menudo asociada con la contracción en una enfermedad de etapa tardía. Como se ha mencionado anteriormente, los trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos incluyen trastornos de fibromatosis. (Las expresiones "trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos" y "enfermedad de fibromatosis" se pueden usar indistintamente en el presente documento, cuando el contexto lo permita). La presente invención está relacionada con el tratamiento y, en particular, la inhibición de la progresión y reaparición (por ejemplo, después de un tratamiento principal mediante cirugía o terapia) de tales enfermedades. En particular, la presente invención se refiere a enfermedades seleccionadas entre enfermedad de Dupuytren, fibromatosis plantar, capsulitis adhesiva y enfermedad de Peyronie, especialmente, la enfermedad de Dupuytren. El resto del presente documento describirá composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos en general, con referencia específica a la enfermedad de Dupuytren. cuando el contexto lo permita, se entenderá que la divulgación se puede leer también con la generalidad de otras enfermedades especificadas en lugar de la enfermedad de Dupuytren.

30 Se cree que la eficacia de los antagonistas del TNF- α en los tratamientos de la presente invención se debe a la dependencia en el TNF- α de la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, que se entiende que son principales responsables de la actividad contráctil e inducción de generación de matriz extracelular incontrolada en la enfermedad de Dupuytren (y otras enfermedades de fibromatosis). Los inventores han demostrado esta dependencia del TNF- α y han identificado los antagonistas de TNF- α como terapéutica viable (al contrario de las enseñanzas de Goldberg y col., J Invest Dermatol. noviembre de 2007; 127(11): 2645-2655, que mostraba la supresión del TNF- α de diferenciación de miofibroblastos).

40 El consenso clínico actual es que los nódulos clínicos son los precursores de la enfermedad de Dupuytren establecida. La enfermedad de Dupuytren aparece en personas con una predisposición genética y factores de riesgo adicionales de manifestación de la enfermedad de Dupuytren incluyen traumatismo local, malos hábitos de vida (por ejemplo, fumar y beber alcohol y una dieta pobre), enfermedad de hígado y diabetes. La enfermedad establecida presenta una contracción por flexión que puede presentarse típicamente como una contracción de las articulaciones metacarpofalángicas (MCPJ) solo, menos frecuentemente contracción de las articulaciones interfalángicas proximales (PIPJ) solo y a menudo ambas. Un ensayo clínico de fase III de fasciotomía enzimática que usa colagenasa bacteriana dio a conocer que (Hurst y col., N. Engl J. Med, 2009, 361, 968-979) el 77 % de las contracciones MCPJ se trataron eficazmente (hasta dentro de 5° de extensión completa) en comparación con el 40

% de contracciones PIPJ. Un ensayo de fase más temprana (Badalamente y col., J Hand Surg Am, 2007, 32, 767-774) mostró tasas de reaparición del 57 % en pacientes con contracciones PIPJ en un seguimiento de 2 años.

5 Numerosos estudios han demostrado que la presencia de miofibroblastos es simultánea con una enfermedad temprana y activa y que tales células están implicadas en la generación o deposición de matriz extracelular (ECM) proliferativa y, en particular, deposición de colágeno. El TGF- β 1 lleva al desarrollo del fenotipo de miofibroblastos. Los miofibroblastos también se cree que son los responsables del comportamiento contráctil. Los miofibroblastos expresan característicamente α actina del músculo liso (α -SMA), que es la isoforma de la actina típica de las células del músculo liso vasculares. Se cree que la α -SMA es la proteína responsable de la contractilidad de los miofibroblastos y es el marcador más fiable para los miofibroblastos.

10 Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención comprende preferentemente una composición y un método para el tratamiento y, más preferentemente inhibiendo o deteniendo la progresión o reaparición de, trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos, tales como enfermedad de fibromatosis, especialmente, la enfermedad de Dupuytren, mediante la administración a un paciente una cantidad terapéutica, profiláctica o de inhibición de la progresión de un antagonista del TNF- α . Preferentemente, la administración es administración local
15 (por ejemplo, mediante inyección en o adyacente al tejido afectado).

La invención comprende una composición y un método para el tratamiento de trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos de estado de enfermedad temprana, especialmente enfermedad de Dupuytren de estado de enfermedad temprana, mediante la administración a un paciente que presenta enfermedad de estado temprana, por ejemplo, antes de la presencia de un cordón palpable, una cantidad eficaz de un antagonista del TNF- α .

20 De acuerdo con la primera realización, se puede administrar una composición que comprende un antagonista del TNF- α a un paciente para evitar la progresión de la enfermedad (a un estado de enfermedad establecido) y contracción por flexión resultante. Preferentemente, el método comprende la administración local (por ejemplo, mediante inyección) directamente en el/los nódulo(s) clínico(s). En una realización preferida, el método comprende además administrar al paciente, preferentemente de forma local (y más preferentemente directamente al/los
25 nódulo(s) clínico(s) identificado(s)), una degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión, que es preferentemente una degradación de colágeno, empobrecimiento o agente de escisión y puede ser, por ejemplo, metaloproteinasa de matriz (MMP) y/o una colagenasa (pero puede ser, por ejemplo, una MMP o colagenasa que se regula positivamente o un agente inductor). Se cree que la metaloproteinasa o colagenasa de matriz pueden interrumpir el colágeno y la matriz extracelular local al/los nódulo(s) clínico(s) potenciando, de este
30 modo, el acceso de antagonista del TNF- α administrado a los focos fibróticos proliferativas y, de este modo, aumentar la eficacia del tratamiento. Se cree que la administración de antagonista del TNF- α de este modo puede considerarse tratamiento profiláctico o de detención o inhibición de la progresión. De acuerdo con esta realización, el tratamiento principal es el antagonista del TNF- α al cual es complementario la degradación de la matriz extracelular o agente de escisión.

35 En una realización preferente que implica el tratamiento combinado de un paciente que presenta trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos de estado de enfermedad temprana, especialmente, la enfermedad de Dupuytren, con un antagonista del TNF- α y una degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión (por ejemplo, metaloproteinasa y/o colagenasa de matriz), el antagonista del TNF- α y la degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión (por ejemplo, colagenasa) se puede administrar de forma
40 simultánea o secuencial, junto o por separado. Preferentemente, tanto el antagonista del TNF- α como la degradación de matriz extracelular, el empobrecimiento o agente de escisión (por ejemplo, colagenasa) se administran localmente, por ejemplo, mediante inyección. Opcionalmente, se pueden administrar simultáneamente, por ejemplo, administrando una composición que comprende tanto antagonista del TNF- α como colagenasa (por ejemplo, mediante solución inyectable) o aplicando dos composiciones separadas al mismo tiempo. Como
45 alternativa, el antagonista del TNF- α y la degradación de matriz extracelular, el empobrecimiento o agente de escisión (por ejemplo, colagenasa) se administran separadamente. Cuando se administra separadamente, se pueden administrar en cualquier orden en un espaciado de tiempo adecuado. Preferentemente, cuando se administra separadamente la degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión (por ejemplo, colagenasa) se administra, en primer lugar, seguido del antagonista del TNF- α , que puede administrarse en
50 un tiempo adecuado después del antagonista del TNF- α , por ejemplo, no menos de 5 minutos y preferentemente dentro de 48 horas, más preferentemente 24 horas, todavía más preferentemente dentro de 6 horas y lo más preferentemente dentro de 15 minutos a 3 horas.

Preferentemente, el antagonista del TNF- α y la degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión se administran simultáneamente para el tratamiento de trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos de estado de enfermedad temprana. Preferentemente, se proporciona una composición para su administración local
55 (por ejemplo, solución inyectable, composición de liberación prolongada o implante) para tratar trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos de estado de enfermedad temprana, preferentemente, enfermedad de Dupuytren, cuya composición comprende una cantidad eficaz de un antagonista del TNF- α (o configurada para liberar una cantidad eficaz de un antagonista del TNF- α si, por ejemplo, la composición es una composición de

liberación prolongada) opcionalmente en combinación con una degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión (preferentemente una metaloproteinasa y/o colagenasa de matriz) preferentemente en una cantidad complementaria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Preferentemente, de acuerdo con esta realización, el antagonista del TNF- α se proporciona en una cantidad eficaz para inhibir la progresión de la enfermedad sin inducir complicaciones sistémicas. Opcionalmente, por lo tanto, el antagonista del TNF- α se proporciona en una cantidad para reducir la actividad de miofibroblastos en tejido de nódulos clínicos en al menos un 10 %, preferentemente al menos el 30 %, más preferentemente al menos el 50 %, todavía más preferentemente al menos el 75 % y lo más preferentemente al menos el 90 %, como se indica, por ejemplo, una población de células de miofibroblastos positiva de α -SMA promedio en tejido de nódulo clínico de al menos un 10 %, preferentemente al menos el 30 %, más preferentemente al menos el 50 %, todavía más preferentemente al menos el 75 % y lo más preferentemente al menos el 90 %, cuya reducción de actividad o reducción de población celular es preferentemente observable a las 48 h, más preferentemente 24 h, desde su administración. Preferentemente, una cantidad eficaz de antagonista del TNF- α es aquella que da como resultado una reducción en el tamaño del nódulo clínico (por ejemplo, al menos un 20 % o incluso al menos un 50 %, reducción en tamaño, medido mediante grado de protrusión o grado lateral o longitudinal) en hasta dos semanas después de su administración. La eficacia del tratamiento con antagonista del TNF- α es observable preferentemente por una reducción completa en la progresión de la enfermedad.

20 Preferentemente el antagonista del TNF- α puede administrarse en una cantidad que se encuentra en el intervalo de 0,01 a 0,5 de la dosis indicada (o se indicaría) para el tratamiento sistémico de artritis reumatoide (por ejemplo, por referencia a la autorización de comercialización o aprobación de la FDA), preferentemente de 0,05 a 0,2 y, más preferentemente, de 0,095 a 0,15 de la dosis. Preferentemente, el antagonista del TNF- α se selecciona de uno o una combinación de Infliximab, Adalimumab, Certolizumab pegol, Golimumab o Etanercept y lo más preferentemente el antagonista del TNF- α es Certolizumab pegol, que se administra preferentemente en una cantidad de 1 a 100 mg, preferentemente de 5 a 50 mg y lo más preferentemente de 10 a 40 mg, por ejemplo, como una inyección en el/los nódulo(s) clínico(s). Cuando se proporciona más de una inyección (por ejemplo, dos nódulos clínicos distintos), la dosis se divide preferentemente de modo que la dosis total proporcionada se encuentra en el intervalo anterior.

30 Preferentemente, de acuerdo con esta realización, una degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión, por ejemplo, se proporciona una metaloproteinasa y/o colagenasa de matriz, en una cantidad complementaria de antagonista del TNF- α , mediante la cual se refiere a una cantidad eficaz para potenciar la eficacia del antagonista del TNF- α . En cualquier caso, se prefiere que la degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión (por ejemplo, metaloproteinasa o colagenasa de matriz) se proporciona en una cantidad de hasta 1 mg. Preferentemente, la degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión (por ejemplo, metaloproteinasa o colagenasa de matriz) se administra en una cantidad significativamente por debajo de la dosis de (por ejemplo, de 0,01 a 0,5 veces) la degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión (por ejemplo, metaloproteinasa o colagenasa de matriz) que se requeriría para conseguir una fasciotomía enzimática en fibromatosis de estado de enfermedad establecida. Preferentemente, la degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión (por ejemplo, metaloproteinasa o colagenasa de matriz) se proporciona en una cantidad de 0,01 a 0,5 mg, más preferentemente de 0,05 a 0,2 mg.

40 La degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión, por ejemplo, la metaloproteinasa o colagenasa de matriz, puede ayudar al antagonista del TNF- α a acceder a la masa celular, así como ayudar en la desagregación de la matriz extracelular del nódulo clínico.

45 Se puede utilizar cualquier antagonista del TNF- α conocido en la implementación de la invención, una amplia de los cuales se conoce y desvela en la técnica. El antagonista del TNF- α es preferentemente un antagonista del TNF- α humano. Opcionalmente, el antagonista del TNF- α puede ser un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo; un anticuerpo monoclonal quimérico (tal como un anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino); un anticuerpo monoclonal humano completo; un anticuerpo monoclonal humano recombinante; un fragmento de anticuerpo humanizado; un antagonista del TNF- α soluble, incluidos agentes de bloqueo del TNF- α de molécula pequeña tales como talidomida o análogos de los mismos o inhibidores del PDE-IV; un receptor del TNF o una proteína de fusión de receptor del TNF, por ejemplo, un receptor del TNF p55 o p75 soluble o una proteína de fusión del receptor del TNF.

Opcionalmente, el antagonista del TNF- α es un fragmento funcional o proteína de fusión que comprende un fragmento funcional de un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, de los tipos mencionado anteriormente, tal como un Fab, F(ab')₂, Fv and preferentemente Fab. Preferentemente un fragmento está pegilado o encapsulado (por ejemplo, para estabilidad y/o liberación prolongada).

55 Opcionalmente, el antagonista del TNF- α se proporciona como un anticuerpo bi-funcional (o biespecífico) o fragmento de anticuerpo bifuncional (o biespecífico). El anticuerpo de antagonista del TNF- α bifuncional o fragmento del mismo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, un anticuerpo monoclonal quimérico (tal como un anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino, un anticuerpo

monoclonal humano completo, un anticuerpo monoclonal humano recombinante, un fragmento de anticuerpo humanizado. Cuando el antagonista del TNF- α comprende un fragmento o porción de anticuerpo bifuncional, es preferentemente un fragmento bifuncional F(ab')₂ o ScFv divalente, por ejemplo, un di-ScFv en tándem biespecífico. En cualquier caso, el anticuerpo bifuncional (o biespecífico) o fragmento del mismo puede comprender como un dominio variable (por ejemplo, porción de unión a antígeno) un antagonista del TNF- α (por ejemplo, una porción de antagonista del TNF- α de Infliximab, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab o Etanercept) y como el otro dominio variable (por ejemplo, porción de unión a antígeno) un segundo dominio variable distinto del antagonista del TNF- α . Opcionalmente, el segundo dominio variable puede comprender un inhibidor de la movilidad de anticuerpo, que puede ser, por ejemplo, una matriz extracelular, por ejemplo, colágeno, aglutinante o antagonista. De este modo, se puede administrar una dosis más alta de antagonista del TNF- α puesto que el anticuerpo o fragmento del mismo será autolocalizante, minimizando la absorción sistémica y, de este modo, los efectos colaterales sistémicos. Opcionalmente, el segundo dominio variable puede comprender un antagonista DAMP (tal como un antagonista para 100A8 y/o S100A9, por ejemplo, como se describe en el documento US-B-7553488) o un inhibidor AGE (por ejemplo, siendo dominios variables del anticuerpo de antagonista DAMP o anticuerpo inhibidor de AGE). Métodos para la producción de anticuerpos bifuncionales y fragmentos de anticuerpo bifuncionales son conocidos en la técnica, cuyos métodos pueden aplicarse al presente fin.

Preferentemente, el antagonista del TNF- α se selecciona de aquellos en los que la administración (por ejemplo, administración local, tal como inyección en el nódulo o cordón clínico) provocan una irritación en el sitio de administración manifestada como una hinchazón local palpable, rojez y pruritos en menos del 40 % de los pacientes, preferentemente menos del 20 % y más preferentemente menos del 10 %.

El antagonista del TNF- α se puede seleccionar, por ejemplo, entre uno o una combinación de Infliximab, Adalimumab, Certolizumab pegol, Golimumab o Etanercepto fragmento funcional del mismo. Más preferentemente, el antagonista del TNF- α es Certolizumab pegol, puesto que provoca baja reacción en el sitio de inyección y dolor.

Resulta particularmente ventajoso de acuerdo con la presente invención minimizar la inflamación, irritación y dolor asociados con la administración puede que la irritación local puede limitar la aceptabilidad del paciente y además la inflamación local puede llevar a la reaparición de la enfermedad. En una realización, el antagonista del TNF- α puede administrarse con o antes de una degradación de matriz extracelular (MEC) o agente de escisión (por ejemplo, colagenasa) mediante la cual la respuesta inflamatoria a la degradación de MEC puede minimizarse, reduciendo, de este modo, las probabilidades de reaparición inducida por el tratamiento.

La degradación de matriz extracelular (MEC), empobrecimiento o agente de escisión puede ser cualquier agente adecuado capaz de degradarse, escindirse o provocar o inducir la degradación o escisión de la matriz extracelular, que incluye fibronectina y colágeno. Por ejemplo, la degradación de MEC o agente de escisión puede ser una enzima de degradación de MEC o un regulador positivo de la expresión enzimática de degradación de la MEC (por ejemplo, relaxina). Preferentemente la degradación de la MEC o agente de escisión es una metaloproteinasa o colagenasa de matriz, más preferentemente una colagenasa, tal como una colagenasa bacteriana (por ejemplo, colagenasa clostridial), colagenasa humana o humanizada o colagenasa mutante o recombinante o metaloproteinasa de matriz recombinante (por ejemplo, metaloproteinasa de matriz recombinante I, preferentemente metaloproteinasa de matriz recombinante I). Preferentemente, la colagenasa depende del tiempo o temperatura o está fotodinámicamente activada o desactivada, para permitir que se administren dosis locales superiores sin efectos colaterales sistémicos o de larga duración. Opcionalmente, es una Catespina-L o un mutante o recombinante de la misma. Ejemplos de colagenasa adecuada para su uso en la presente invención incluyen aquellos descritos en: Los documentos GB-A-2323530, US 5589171, USRE39941, US6086272 y WO-A-2010/102262 (y para enfermedad establecida opcionalmente en las cantidades que se describen en los mismos, la divulgación de los cuales de colagenasas y cantidades y modos de administración se incorporan en el presente documento por referencia).

Por estado de enfermedad temprana se refiere a que los síntomas de la enfermedad están presentes, por ejemplo, marcadores histológicos o más particularmente nódulos clínicos en tejido, pero hay ausencia de, por ejemplo, cordón palpable o contracción significativa. Por enfermedad de Dupuytren de estado de enfermedad temprana, se refiere a que los síntomas de la enfermedad de Dupuytren están presentes, por ejemplo, marcadores histológicos o más particularmente nódulos clínicos en tejido palmar y/o digital, pero hay ausencia de contracción por flexión significativa (por ejemplo, al menos 5°), por ejemplo, cordón palpable).

Por estado de enfermedad establecido, se refiere a que los nódulos clínicos están presentes, el cordón palpable está presente y la contracción es evidente. Por enfermedad de Dupuytren de estado de enfermedad establecido, se refiere a que los nódulos clínicos están presentes sobre la palma y los dedos de la mano y la contracción por flexión es evidente (por ejemplo, al menos 5°).

Las etapas histológicas variantes de la enfermedad de Dupuytren se han categorizado en la literatura, de forma más concisa por Rombouts (J Hand Surg Am, 14, 644-652, 1989) y autores más tardíos, en tres etapas distintas: 1) una etapa proliferativa con alta celularidad y la presencia de figura mitóticas; 2) una etapa fibrocelular caracterizada por una alta celularidad pero sin figuras mitóticas y la presencia de red de reticulina; y 3) una etapa fibrosa con pocas

células separadas por amplias agrupaciones de fibras de colágeno. Etapa 1) la enfermedad se cree que está correlacionada con un estado de enfermedad temprano tal como se ha descrito anteriormente (es decir, la presencia de nódulos pero sin contracción) y las etapas de Dupuytren 2) y 3) se cree que están correlacionadas con nuestro Estado de Enfermedad Establecido (caracterizado por contracción digital). Los presentes inventores han encontrado
5 que durante un estado de enfermedad establecido temprano, se recogen miofibroblastos en los nódulos y cordones establecidos, especialmente, en relación con las articulaciones del MCP y PIP y estas conducen a la progresión de contracciones por flexión del dedo de la mano.

Por nódulo clínico, se refiere a un nódulo palmar o digital evidente como un bulto subcutáneo palpable.

10 Por nódulo histológico (o histopatológico), se refiere a una colección de células (principalmente células de miofibroblastos con algunas células inflamatorias tales como macrófagos y mastocitos) típicamente en un patrón en vórtice y la cual puede variar desde pequeños focos de células a colecciones más grandes de células, pero no clínicamente palpable.

15 Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se cree que el/los nódulo(s) clínicamente palpable(s) inicial(es) son el centro de proliferación de fibroblastos en la progresión de enfermedades, pero que se formarán numerosos nódulos histológicos en diversos emplazamiento en la palma y/o dedos de la mano que contribuirán en última instancia a la formación del cordón, contracción y contractura por flexión.

Cuando se usa "nódulo" en el presente documento pueden ser nódulos clínicos o histológicos (o ambos) como resultará evidente a partir del contexto.

20 De acuerdo con dos realizaciones alternativas específicas a Dupuytren, una primera realización puede referirse a una composición y método para el tratamiento de la enfermedad de Dupuytren caracterizada por contracciones de la articulación de menos de 20° y una segunda realización se pueden referir a una composición y un método para el tratamiento de la enfermedad de Dupuytren caracterizada por contracciones de la articulación de al menos 20°. La contracción de 20° se identifica como una fase de transición, puesto que en una contracción de menos de 20°, muchos pacientes escogen detener la progresión de la enfermedad sin querer someterse a ninguna cirugía puesto
25 que su movilidad y uso operativo de la mano es aún en gran medida adecuado, mientras que superior a 20°, muchos pacientes encuentran que la cirugía u otra terapia de empobrecimiento de colágeno (tal como fasciotomía enzimática) es esencial para recuperar la función completa de la mano.

30 Las investigaciones de los inventores revelan TNF- α como diana terapéutica óptica para enfermedad de Dupuytren temprana (es decir, estado de enfermedad temprana). En la enfermedad de Dupuytren de estado de enfermedad establecido, una combinación ideal es una metaloproteinasa de matriz tal como colagenasa con un antagonista del TNF- α para inhibir la reaparición, que se asocia típicamente con la fasciotomía enzimática.

35 Como se ha mencionado anteriormente, los miofibroblastos están implicados en dos modos en el desarrollo de trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos y, en particular, enfermedad de Dupuytren. Son responsables de la producción de matriz extracelular o deposición y comportamiento contráctil. Se cree que la actividad de los miofibroblastos está medida por α -SMA, que se sobre expresa en células de miofibroblastos activas. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, los presentes inventores han encontrado que el TNF- α está involucrado en la actividad de miofibroblastos en la enfermedad de Dupuytren de al menos dos modos - en primer lugar, reduciendo la actividad del miofibroblasto; y, en segundo lugar, potenciando la producción o atracción de miofibroblastos.

40 El antagonista del TNF- α puede proporcionarse en múltiples administraciones durante un periodo extendido (o continuo) para prevenir o inhibir la progresión o reaparición de la enfermedad. Cuando se necesita evitar la reaparición, se puede proporcionar tratamiento intermitente mediante, por ejemplo, la administración de una baja dosis quincenal, mensual o cada seis meses. Como alternativa, se puede proporcionar tratamiento continuo mediante un implante o parche de liberación prolongada o intermitente retardada de bajas dosis. Como alternativa,
45 se pueden iniciar dosis repetidas mediante síntomas de progresión de la enfermedad en estado de enfermedad temprana y pueden comprender una combinación de degradación de matriz extracelular o agente de escisión (por ejemplo, una metaloproteinasa o colagenasa de matriz) y un tratamiento de antagonista del TNF- α (por ejemplo, consistente con la primera realización descrita anteriormente).

50 En una realización de la invención, se puede prevenir, inhibir o detener la progresión de enfermedad de estado temprano (por ejemplo, enfermedad de Dupuytren) a un estado de enfermedad establecido, mediante la administración local de un antagonista del TNF- α .

Preferentemente, el antagonista del TNF- α se puede administrar separadamente o simultáneamente en combinación con o complementariamente con una metaloproteinasa de matriz y/o colagenasa. Una colagenasa, especialmente una colagenasa foto receptiva o dependiente de la temperatura, se puede administrar para el efecto local de aumentar el efecto de inhibición de la progresión de la enfermedad por antagonista del TNF- α potenciando el acceso

a los sitios de tratamiento escindiendo la formación de matriz extracelular de fase temprana. Una colagenasa dependiente de la temperatura es una que (típicamente una colagenasa recombinante o mutante) tiene una actividad de colagenasa dependiente de la temperatura y típicamente es activa a baja temperatura corporal, por ejemplo, a 25 °C e inferior, permitiendo, de este modo, que dosis extremadamente altas de colagenasa actúen muy localmente (por ejemplo, inyectado en el sitio de la enfermedad a, digamos 20 °C sin tener ninguna acción sistémica y otros efectos colaterales asociados con la longevidad de la acción). El antagonista de TNF- α tiene un efecto beneficioso adicional puesto que reducirá la inflamación en el sitio del nódulo y, de este modo, reducirá el desarrollo y reagrupación de otros miofibroblastos.

La composición y método de la presente invención puede utilizar cualquier medio adecuado de administración, que es, preferentemente, local. En particular, el antagonista del TNF- α debe administrarse localmente, por ejemplo, aplicándose directamente en una incisión quirúrgica durante la cirugía, mediante inyección (preferentemente directamente en el/los nódulo(s) clínico(s) y/o tejido del cordón), mediante liberación de una gragea de liberación prolongada y/o retardada o dispositivo que puede implantarse en o cerca del sitio de la enfermedad o una formulación en parche de liberación prolongada y/o retardada, mediante aplicación tópica o cualquiera otra vía adecuada. Se formula de forma adecuada preferentemente una composición y comprende típicamente la dosis requerida de antagonista del TNF- α junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Formulaciones para la administración parenteral pueden comprender típicamente una preparación acuosa estéril del principio activo, que es preferentemente isotónico con la sangre del receptor. Formulaciones para la administración intraarticular pueden estar en forma de una preparación acuosa estéril del principio activo. Formulaciones adecuadas para la administración tópica pueden incluir preparaciones líquidas y semilíquidas tales como linimentos, lociones y aplicaciones; emulsiones de aceite en agua y agua en aceite tales como cremas, ungüentos o pastas; y soluciones y suspensiones.

En un aspecto adicional, se proporciona una formulación para la aplicación tópica frecuente, por ejemplo, diaria, periódica u ocasional (preferentemente, diaria), en la zona del trastorno fibroproliferativo musculoesquelético (por ejemplo, las manos y, en particular, las palmas y los dedos de las manos, en el caso de la enfermedad de Dupuytren) para su uso, por ejemplo, por pacientes de estado de enfermedad temprana o post-operatorio para la inhibición de la progresión o reparación de la enfermedad, la formulación comprende un antagonista del TNF- α adecuado para la administración tópica (por ejemplo, seleccionado de tales antagonistas del TNF- α definidos anteriormente) y un excipiente adecuado. La formulación puede proporcionarse como una crema o una loción, un parche o un guante medicado (en el que el guante está impregnado para la liberación del principio activo desde la superficie interna). Preferentemente, la formulación comprende antagonista del TNF- α en una concentración para su administración mediante aplicación tópica de una baja dosis, tal como de 0,001 a 0,05, preferentemente de 0,001 a 0,01, de la dosis sistémica del antagonista del TNF- α . Opcionalmente, la formulación comprende adicionalmente un antagonista de DAMP y/o un inhibidor de AGE.

Opcionalmente, las composiciones y métodos de la presente invención pueden comprender adicionalmente principios activos adicionales que pueden ser eficaces en el tratamiento o progresión-inhibición de trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos tales como enfermedad de Dupuytren. Por ejemplo, la terapia de combinación o co-administración simultánea o complementaria de un antagonista del TNF- α y un agente de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular, tal como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C o VEGF-D o un agente que codifica dicho VEGF o un fragmento funcional del mismo (tal como se describe en el documento WO-A-2004/082705), cuya combinación es preferentemente una combinación (o composición) de retraso del desarrollo para su uso junto con la cirugía o fasciotomía enzimática o de aguja. De forma adicional o alternativa tal método o composición tal como se describe en el presente documento comprende adicionalmente un activador de PPAR γ (tal como pioglitazona) para reducir las poblaciones de miofibroblastos locales al sitio de la enfermedad (y potenciar la actividad del antagonista del TNF- α).

En el tratamiento de trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos y, preferentemente, enfermedad de Dupuytren, se proporciona un aspecto adicional de una composición para su uso en tal tratamiento que comprende una metaloproteinasa o colagenasa de matriz (o regulador positivo de metaloproteinasa o colagenasa de matriz) en combinación con un regulador negativo de la actividad de miofibroblastos y/o un inhibidor de la producción (o diferenciación) de miofibroblastos cada uno preferentemente en cantidades terapéuticas adecuadas de acuerdo con la respectiva realización tal como se ha descrito anteriormente. El regulador negativo de la actividad de miofibroblastos preferente y/o inhibidor de la producción (o diferenciación) de miofibroblastos es el antagonista del TNF- α .

Por adhesiones musculoesqueléticas, se refiere a un subconjunto de trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos en los que se forma exceso de tejido fibrótico o tejido cicatrizal adyacente o en asociación con un tendón, músculo, articulación, ligamento o fascia provocando una adhesión. Ejemplos de tales adhesiones musculoesqueléticas incluyen fibrosis periarticular (por ejemplo, sobre la articulación interfalángica proximal) y capsulitis adhesiva. Preferentemente, de acuerdo con este aspecto, se proporciona una composición y tratamiento de una afección seleccionado de fibrosis periarticular (por ejemplo, de la articulación interfalángica proximal),

adhesiones espinales (por ejemplo, postquirúrgica) y capsulitis adhesiva.

5 En una realización particular, hay un método para la prevención de la reparación de la enfermedad de Dupuytren que comprende la administración (por ejemplo, postcirugía, post-fasciotomía por aguja o después o en asociación con fasciotomía enzimática) de un antagonista del TNF- α al/los nódulo(s) y/o cordón y la administración de un antagonista del TNF- α al tejido adyacente a la articulación interfalángica proximal, mediante la cual el tratamiento simultáneo puede conseguir evitar la aparición de la enfermedad de Dupuytren (y la contracción digital) y la reducción en la formación y persistencia de tejido cicatrizal fibrótico sobre la articulación. Se considera que la eficacia de, por ejemplo, un tratamiento con colagenasa, de la enfermedad de Dupuytren (que padece de una alta tasa de reaparición especialmente sobre la articulación interfalángica proximal) se potenciará mediante co-terapia con un antagonista del TNF- α (u otro agente para la desactivación de miofibroblasto y/o inhibición de la producción de miofibroblasto) mediante la administración del mismo a los nódulos clínicos y/o tejido de cordón y a tejido subcutáneo (por ejemplo, tejido cicatrizal fibrótico) adyacente a la articulación interfalángica proximal.

Para la capsulitis adhesiva (u hombro congelado), preferentemente el tratamiento comprende uno o ambos de un antagonista del TNF- α y un inhibidor de AGE o antagonista de DAMP.

15 En una realización alternativa en cada uno de los anteriormente mencionados aspectos y realizaciones, una producción de TNF- α o inhibidor de actividad se puede usar en lugar de o junto con un antagonista del TNF- α .

20 La composición puede formularse para la administración a y/o adyacente al tejido afectado (por ejemplo, mediante inyección, deposición, durante la cirugía o preferentemente mediante aplicación tópica) mediante las cuales las dosis en los intervalos descritos anteriormente con respecto a los trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos (por ejemplo, enfermedad de Dupuytren) se consigue/proporciona. También se incluyen formulaciones tópicas y combinaciones tal como se ha descrito anteriormente.

A continuación, la invención se describirá e ilustrará con mayor detalle, sin limitación, haciendo referencia a los siguientes Ejemplos.

Ejemplos

25 Se llevaron a cabo los siguientes estudios para comprender mejor la progresión de la enfermedad de Dupuytren. Se tomó tejido de nódulos y cordones de pacientes con Dupuytren y se comparó con tejido palmar sin enfermedad de los mismos pacientes. Los estudios se llevaron a cabo en un monitor de fuerza de cultivo desarrollado para asegurar que las poblaciones de miofibroblastos puedan controlarse en un entorno más afín al presente en el tejido enfermo (en línea con lo que se indica en Verjee y col., J Hand Surg Am, 34, 1785-1794 and J Cell Physiol 224, 681-690). A continuación se describen cuatro ejemplos - El Ejemplo 1 se refiere a la presencia, distribución y comportamiento de células de miofibroblastos en tejido enfermo; El Ejemplo 2 se refiere a la función de la inflamación en la enfermedad de Dupuytren; El Ejemplo 3 examina los productos finales de glicación avanzada en Dupuytren; y el Ejemplo 4 examina la función de DAMP en Dupuytren.

Ejemplo 1

35 Se recogieron sobre 100 muestras de pacientes con Dupuytren para examinar su distribución de miofibroblastos. Nuestros datos sobre >100 cordones de Dupuytren muestran que en la mayoría de pacientes, los miofibroblastos se concentran en nódulo, ubicados en la palma y al nivel de las articulaciones afectadas (véase, Figura 1). De acuerdo con la Figura 1, los nódulos ricos en miofibroblastos se ubican en las proximidades de las articulaciones de los dedos. La Figura 1 muestra: A: vista intraoperativa del cordón de Dupuytren, con una ubicación de la articulación interfalángica proximal (PIPJ; 1) marcada; B: Fotomicrográfico de baja magnificación de sección histológica teñido para α actina de músculo liso. Una colección de células ricas en α -SMA en un nódulo se ubica en las proximidades del PIPJ; C: Visión de alta magnificación de zona nodular, que muestra células positivas de α -SMA (miofibroblastos).

45 De más de 100 cordones analizados, más del 60 % contenía nódulos. Aunque había una remarcada heterogeneidad, los nódulos eran muy celulares, con aproximadamente 2,5 miles de células por mm² dispuestas en verticilos. De media, el 99 % de las células eran α -SMA positivas. En zonas perinodulares, había menos células, aproximadamente 800 por mm² y, en promedio, un tercio eran α -SMA positivas.

50 La Figura 2 muestra que los nódulos son la mayoría celulares y son ricos de células positivas de α -SMA. La examinación de 24 muestras de pacientes con Dupuytren mediante microscopía electrónica mostró que la reaparición clínica no estaba con la edad del paciente en la aparición, duración o gravedad de la enfermedad. Se observaron nódulos histológicos tan frecuentemente en muestras de tanto enfermedad primaria como de reaparición (dos tercios de cordones en cada caso) y también no hubo una diferencia significativa en la contracción digital entre la enfermedad primaria y la de reaparición. Además, no hubo ninguna diferencia en la zona de superficie nodular entre muestras de dermofasciectomía primaria, fasciectomía primaria, fasciectomía secundaria o dermofasciectomía

después de una enfermedad de reaparición ($p=0,5$). Una patogénesis similar en tanto enfermedad primaria como de reaparición es probable y la nodularidad es improbable que se regule negativamente después de la anterior cirugía. De hecho, el movimiento aumentado después de la cirugía inicial puede facilitar la diferenciación y persistencia de miofibroblastos. Es posible que tejido de Dupuytren no escindido residual después de una fasciotomía o fasciectomía y dermofasciectomía cortafuegos, puede servir como un desencadenante para su reaparición. La persistencia de miofibroblastos puede explicar las elevadas tasas de reaparición observadas después de la fasciotomía quirúrgica posterior o inyección de colagenasa. Por lo tanto, un elemento clave de prevención de enfermedad de reaparición puede ser regular negativamente los miofibroblastos restantes.

El 95 % (36/38) de los nódulos se encontraban en las proximidades del PIPJ y también se observaron nódulos sobre el MCPJ en los solos dos casos marcados intraoperativamente para el MCPJ y un caso marcado para el DIPJ. En la enfermedad temprana o activa, la tensión puede actuar intermitentemente sobre el tejido de Dupuytren como extensión activa del PIPJ ofrece resistencia frente a la fascia palmar espesada y contraída. La tensión aumentada detectada por células puede promover la diferenciación de miofibroblastos a través de la reagrupación de α -SMA para tensionar las fibras y la formación de sitio de unión especializado bajo control estricto del TGF- β 1. Esto, a su vez, lleva a la generación de una fuerza mayor. Un nódulo celular densamente empaquetado podría entonces ejercer teóricamente una fuerza suficiente para promover o sostener la contracción digital. Las células entonces remodelan la matriz circundante en una configuración más acortada. La deformidad de flexión aumentada resultante alteraría su función y el movimiento reducido en la articulación llevaría, a su vez, a una reducción en la tensión detectada por los miofibroblastos nodulares. Es posible que con contracciones digitales avanzadas, una tensión reducida a través de la extensión de articulación activa limitada pueda llevar a la apoptosis de miofibroblastos, mediante la cual los nódulos ricos en miofibroblastos no persistirían. Esto puede explicar la progresión desde cordones nodulares a no nodulares y también explicaría por qué los pacientes con cordones no nodulares tenían tendencia a tener deformidades de flexión más graves. Por tanto, la agregación de miofibroblastos en nódulos en las proximidades de las articulaciones puede llevar a la contracción digital y con el remodelado de la matriz posteriores resultaría en el acortamiento de la fascia afectada. Finalmente, la deformidad de flexión fija se desarrolla llevando a un entorno mecánico alterado con pérdida de tensión, apoptosis de miofibroblastos y, de este modo, podría explicar los cordones no nodulares residuales. Se puede concluir que el fenotipo de miofibroblastos depende de la tensión en la matriz circundante.

El monitor de fuerza de cultivo (MFC) utilizado y las condiciones de cultivo se muestran en la Figura 3: (A) Se fusionaron geles de colágeno sembrados rectangulares y se suspendieron en el medio, atados entre dos barras de flotación una de las cuales se mantiene inmóvil mientras que la otra se une a un transductor de fuerza. (B) Fuerzas tensionales generadas por células en el gel de colágeno se detecta mediante el transductor de fuerza y se registran datos en directo cada 15 segundos proporcionando una salida continua de fuerza (dinas, 1×10^5 N) generada. (C) Después de una contracción de 24 horas, se recogen los geles y se procesan para ARNm de α -SMA, proteína e inmunofluorescencia. (D) Se sembraron rutinariamente células en geles con un enrejado de colágeno de relación de alto aspecto, aunque también se usaron enrejados de relación de bajo aspecto (E) en experimentos para comparar los efectos de menos cepa sobre la contractilidad celular.

Cordones escindidos quirúrgicamente se biseccionaron y medio procesaron para el cultivo celular, mientras que la superficie de corte de la otra mitad en espejo se procesó para identificar muestra con nódulos ricos en α -SMA (condensación de células) mediante inmunohistoquímica. La cuantificación posterior mediante inmunofluorescencia demostró un promedio del 35 % de células expresó fibras de tensión de α -SMA en histología confirmó muestras nodulares, en comparación con un 10 % de fibras de tensión de α -SMA en muestras no nodulares. Aunque esto no constituye una población homogénea de miofibroblastos, este método de muestreo de células ricas en α -SMA representa una significativa mejora sobre estudios previos, que han dado a conocer un promedio de entre el 9,7 % y 15 % de células positivas para α -SMA aisladas de nódulos clínicos y no histológicamente definidos. Se encontró que del 1-4% de fibroblastos dérmicos tenían fibras de tensión positivas para α -SMA.

La Figura 4 muestra la contracción isométrica de geles de colágeno mediante fibroblastos dérmicos y células derivadas de nódulos de Dupuytren. Se sembraron geles de colágeno con 1,5 millones de fibroblastos no palmares (A), fibroblastos palmares (B) o células derivadas de nódulos de Dupuytren (C), se cultivaron durante 24h en el MFC y se cuantificación la contracción de la fuerza isométrica en tiempo real. Los datos mostrados representan experimentos por triplicado usando células derivadas de un paciente. Los fibroblastos dérmicos en enrejados de colágeno con población de fibroblastos (FPCL) en nuestro MFC alcanzó un plateau, mientras que células derivadas de nódulos continuaron contrayéndose de un modo dependiente a la dosis durante un periodo de ensayo de 24 horas.

La Figura 5 muestra que las células aisladas de nódulos tenían una tasa mucho mayor de contracción medida como tasa promedio de contracción entre 6 y 24 horas en el MFC en comparación con fibroblastos dérmicos palmares y no palmares. Una alta contractilidad es una de las características de los miofibroblastos y es la responsable de la contracción digital en la enfermedad de Dupuytren.

En la figura 6, se muestra que la contractilidad de células derivadas de nódulos de Dupuytren se regula mediante

5 cambios post-transcripcionales en α -SMA: (A) [tasa de contracción (dinas(h)) Fuerza isométrica en geles de colágenos con miofibroblastos derivados de nódulos (nódulo), fibroblastos dérmicos (PS) palmares y no palmares (NPS) durante 24 horas (\pm SEM). Después de 24 h (B) se comparó ARNm de α -SMA con RPLPO mediante RT-pcr, (C) ARNm de α -SMA en comparación con GAPDH y (D) proteína de α -SMA en comparación con vimentina. Se llevaron a cabo experimentos por triplicado y los datos se muestran como la mediana (\pm SEM) de un total de 3 muestras de pacientes emparejadas nodulares y no nodulares distintas.

10 Después de cosechar FPCL después de una contracción de 24 horas en el MFC, se realizaron comparaciones entre los niveles de ARNm de α -SMA, expresión de proteínas de α -SMA y localización de proteínas de α -SMA mediante inmunofluorescencia en los tipos celulares emparejados. No se observaron diferencias en los niveles de ARNm de α -SMA entre células derivadas de nódulos y fibroblastos dérmicos, aunque se observaron aproximadamente niveles de proteínas de α -SMA 3 veces superiores en células derivadas de nódulos en comparación con fibroblastos dérmicos emparejados. Además, mediante el uso de inmunofluorescencia encontramos que en los fibroblastos dérmicos, α -SMA se distribuyó típicamente en un "halo" dentro del citoplasma perinuclear, mientras que en células derivadas de nódulos, se localizó frecuentemente α -SMA en fibras de tensión por todos los procesos celulares hasta los sitios de unión de matriz celular, tal como puede observarse en la Figura 6E.

20 También se cultivaron células sobre portaobjetos de vidrio durante 24 horas, se fijaron y a continuación se marcaron con inmunofluorescencia usando anticuerpos de α -SMA (rojo), faloidina (verde) y DAPI (azul). Nuestros datos de inmunofluorescencia demuestran que los fibroblastos palmares y no palmares cuando se cultivan en monocapa adquirieron un fenotipo de protomiofibroblastos, con la expresión del α -SMA citosólico *de novo*. Por el contrario, se observaron miofibroblastos significativamente más diferenciados con α -SMA incorporado en fibras de tensión en células derivadas de nódulos. No se habían dado a conocer anteriormente estas diferencias observadas entre células de piel derivadas de nódulos palmares y no palmares de muestras emparejadas. Examinamos simultáneamente los niveles de proteínas de α -SMA, la localización de proteínas y los niveles de ARNm en células aisladas del mismo paciente. Nuestros hallazgos sugieren que cambios post-transcripcionales en α -SMA se producen en células genéticamente emparejadas para mediar el fenotipo celular de miofibroblastos de Dupuytren.

Ejemplo 2 - Función de la inflamación en la enfermedad de Dupuytren

A continuación, se examinaron los nódulos para la presencia de otros tipos celulares, específicamente células inflamatorias. Encontramos que había presentes grandes números de tanto macrófagos como mastocitos en nódulos pero no en regiones no nodulares de los cordones.

30 La Figura 7 muestra células inflamatorias del nódulo de Dupuytren y el cordón. Se tiñeron en serie secciones de cordones digitales para α -SMA, macrófagos positivos de CD68 y triptasa de mastocitos. Las imágenes son representativas de 15 muestras de pacientes.

35 Cuantificamos sistemáticamente el número de células inflamatorias observadas por todo el tejido del cordón de Dupuytren escindido en 10 muestras de pacientes. Para cada región se recontó (nódulo, cordón distal al nódulo y cordón no nodular), el número total de células, el número de células positivas para α -SMA y células teñidas para elastasa de neutrófilos, triptasa de mastocitos, linfocitos T positivos para CD3, linfocitos T positivos para CD 4, macrófagos positivos de CD68 (magnificación x20) (Tabla 1).

40 **Tabla 1. Cuantificación de número células totales:** Células positivas para α -SMA, Linfocitos T positivos para CD3, Linfocitos T positivos para CD4, macrófagos positivos para CD68 y células positivas para triptasa de mastocitos y elastasa de neutrófilos por todo el cordón de Dupuytren escindido. Nódulos, cordón distal con respecto a nódulo y cordón no nodular se analizaron (presentados como recuento medio (\pm SDEV) por mm²) Seis campos de visión se recontaron dentro de cada región.

Tinción para IHC	Mediana de nódulos	SDEV	Mediana de cordón distal a nódulo	SDEV	SDV mediana de cordón no nodular	
Células totales	1515	181	416	104	504	163
α -SMA	1493	199	12	8	8	7
Elastasa de neutrófilos	2	1	0	1	0	0
Linfocitos T positivos de CD3	220	99	2	2	1	2

Tinción para IHC	Mediana de nódulos	SDEV	Mediana de distal a nódulo	SDEV	SDV mediana de cordón no nodular	
Linfocitos T positivos de CD4	2	1	0	0	0	0
Macrófagos positivos de CD68	282	54	1	1	1	1
Triptasa de mastocitos	48	11	1	1	0	1

Estos datos muestran que los macrófagos positivos de CD68, linfocitos T para CD3 y células positivas de triptasa de mastocitos eran comunes dentro de nódulos celulares y escasas dentro del tejido del cordón. Se observaron células positivas de elastasa de neutrófilos y linfocitos T positivos para CD4 infrecuentemente en tejido de Dupuytren. Los nódulos de Dupuytren contenían numerosos mastocitos, que son una fuente rica de TNF- α (Krishnaswamy y col., 2006). Mientras que el tejido nodular de Dupuytren está poblado con miofibroblastos altamente contráctiles, la presencia de células inflamatorias sugiere que la inflamación puede ser importante en la patogénesis de la enfermedad. En cordón no nodular, casi no se observaron células inflamatorias y también resulta de interés que prácticamente no había células teñidas positivas para elastasa de neutrófilos ni en cordón nodular ni en no nodular. Esto es al contrario que a la inflamación durante la curación de una herida, cuando se observan comúnmente neutrófilos y están implicados en la limpieza de restos y bacterias y la iniciación de contracción de la herida dependiente de miofibroblastos. Sin embargo, es importante destacar que mientras que las muestras de cordón digital contienen nódulos, no reflejan necesariamente los procesos en las etapas más tempranas de la enfermedad.

Ejemplo 3 - Productos finales de glicación avanzada y su receptor

Examinamos la distribución de RAGE en tejido de Dupuytren y piel tanto palmar como no palmar. Encontramos tinción abundante para RAGE en nódulos de Dupuytren, donde se colocalizó con los miofibroblastos (véase Figura 8). Se biseccionaron longitudinalmente muestras de cordón digital y se fijaron en formalina. Se tomaron secciones histológicas desde la superficie cortada del cordón y se tiñeron secciones en serie para anticuerpos (A, C) α -SMA y (B, D) RAGE. Escala de barras tal como se muestra. Las imágenes son representativas de 15 muestras de pacientes. RAGE se colocaliza con una distribución de α -SMA en nódulos de Dupuytren.

También encontramos una tinción aumentada para RAGE en las capas superficiales de la epidermis en piel palmar en comparación con piel no palmar y la tinción de FACS mostró expresión RAGE significativamente superior por fibroblastos dérmicos de piel palmar en comparación con piel no palmar. Véase la figura 9.

Se fijaron muestras de piel no palmar y palmar en formalina. Se tiñeron secciones histológicas para RAGE. (A, C) Piel no palmar y (B, D) piel palmar. Se muestra escala de barras. Las imágenes son representativas de 6 muestras de pacientes emparejadas. La Figura 9 ilustra la distribución diferencial de RAGE dentro de piel no palmar y palmar.

También demostramos que células derivadas de nódulos expresan niveles superiores de superficie celular RAGE que fibroblastos dérmicos emparejados. Células derivadas de nódulos, fibroblastos palmares y no palmares (1×10^4 células por experimento) se tiñeron con anticuerpo RAGE, se marcaron fluorescentemente y se evaluó la intensidad de fluorescencia media mediante análisis de FACS. (Figura 10 A, C) Niveles de expresión RAGE de superficie celular en células derivadas de nódulos en comparación con fibroblastos dérmicos emparejados. (B, D) Niveles de expresión RAGE de superficie celular en células no nodulares en comparación con fibroblastos dérmicos emparejados. Se muestran los resultados en A y B para 4 pacientes nodulares emparejados y muestras no nodulares (\pm SEM). * representa $p=0,01$. (E) Rastro de intensidad fluorescente de RAGE que muestra células derivadas de nódulos, fibroblastos no palmares, fibroblastos palmares y control de isotipos a partir de 1 muestra de paciente emparejada nodular representativa y (F) de 1 muestra de paciente emparejada no nodular representativa. Véase la figura 10.

Demostramos que la expresión de superficie celular RAGE es superior en fibroblastos palmares que en no palmares. Se tiñeron fibroblastos (1×10^4) de piel palmar y no palmar emparejada con anticuerpo RAGE, se marcaron fluorescentemente y se analizó la intensidad de fluorescencia media mediante FACS. Los niveles de expresión de RAGE de superficie celular eran consistentemente superiores en fibroblastos palmares que en fibroblastos no palmares. Se muestran datos de 8 muestras de pacientes emparejadas. Véase la figura 11.

En un experimento adicional para investigar el efecto de AGE sobre la formación de miofibroblastos, se sembraron geles de colágeno con $1,5 \times 10^4$ de fibroblastos palmares y se cultivaron durante 24 h en ausencia (PS solo) o presencia de albúmina de suero bovino (BSA) (15 μ g/ml), o AGE-BSA (150 μ g/ml) durante períodos variantes y se cuantificó la

contracción de fuerza isométrica en el monitor de fuerza de cultivo. Los datos se muestran como +/-SEM a partir de experimentos por triplicado con muestras de 3 pacientes distintos en la Figura 14. Resulta evidente a partir de la Figura 14 que la contractilidad de fibroblastos dérmicos palmares no se ve afectada cuando se expone a AGE.

5 Seguimos investigando si los productos finales de glicación avanzada también actúan a través de células inflamatorias y en otros sistemas han mostrado llevar a la liberación de citoquinas proinflamatorias (Uribarri y col., 2005). Los geles de colágenos sembrados con fibroblastos palmares se cultivaron durante 24 h con sobrenadantes de monocitos (M) estimulados con AGE-(100 µg/ml) en ausencia o presencia de anti TNF-α (10 µg/ml) y se cuantificó la contracción de fuerza isométrica. Los experimentos se realizaron por duplicado. De forma interesante, el sobrenadante de los monocitos humanos co-cultivados con AGE estimularon la contracción de fibroblastos palmares de un modo dependiente de TNF-α (Figura 20).
10

Ejemplo 4

Examinamos el efecto de adición de HMGB1 exógeno a fibroblastos palmares. Geles de colágenos sembrados con fibroblastos palmares se cultivaron durante 24 h en ausencia (PS solo) o presencia de TNF-α (1ng/ml), o HMGB1 (1 ng/ml) o TGF-β1 (10 ng/ml) y se cuantificó la contracción de fuerza isométrica (utilizando la técnica de monitor de fuerza de cultivo, tal como se describe en Verjee y col., Hand Surg Am, 34, 1785-1794, 2009 and Verjee y col., J Cell Physiol, 2010). Se muestran datos del experimento en la FIGURA 12 como +/-SD a partir de experimentos por triplicado (excepto HMGB1 que es duplicado).
15

Mientras que había una tendencia hacia la contracción aumentada resultante de HMGB1, no fue estadísticamente significativa (Figura 12). Nuestros datos mostraron una contractilidad de fibroblastos palmares aumentada significativa (P=0,0001) con 10ng/ml TGF-β1 en comparación con fibroblastos palmares no tratados.
20

Encontramos que monocitos humanos expuestos a S100A8 y en algún grado a S100A9 (otras Alarminas) produjeron TNF-α de un modo dependiente de la dosis, como se ilustra en Figura 15. Como se puede observar en la Figura 15, S100A8 es más activo que S100A9 y S100A12 dentro del intervalo sometido a ensayo. LPS, un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) se muestra como control positivo.

25 Los receptores conocidos para S100A8 son el receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE) y los receptores tipo Toll 2 y 4. Monocitos humanos a 1×10^5 /ml se incubaron en 10 % de FCS con S100 A8 humano a 0,5 µg/ml con la adición de cualquier anticuerpo a TLR4, TLR2 o controles de isotipos (no se muestra) o RAGE soluble (sRAGE) durante 14 horas. Se determinaron los niveles TNF-α mediante ELISA. Hemos encontrado que el receptor predominante para unir S100A8 en monocitos que llevan a la producción de TNF-α es TLR-4 y no RAGE o TLR-2 (Figura 16).
30

Hemos confirmado que S100A8 se une predominantemente a TLR-4 y que la señalización intracelular que lleva a la producción de TNF-α por monocitos es completamente dependiente de la proteína MyD88 adaptora comparando el efecto de S100A8 murino sobre la producción de TNF-α por células de médula ósea derivadas de ratones deficientes de TLR-4 o MyD88 con células de médula ósea de animales C57B1/6 de tipo silvestre (Figura 17). En la figura 17, TNF-α producido por células de médula ósea murinas de tipo silvestre, ratones TLR4^{-/-} y MyD88^{-/-} cuando se exponen a S100A8 murino se midió mediante ELISA.
35

Es más complicado mostrar *in vitro* que HMGB1 también actúa sobre monocitos que lleva a la liberación de citoquinas proinflamatorias. Esto se debe a que el *in vivo* actúa junto con otros ligandos de TLR y el HMGB1 altamente purificado solo no lleva a la producción de TNF-α por los monocitos *in vitro* (Figura 18). Nuestro experimento, cuyos resultados se muestran en la Figura 18, implicaban monocitos humanos a 1×10^5 /ml incubados en un 10 % de FCS con HMGB1 o LPS solo o juntos en concentraciones que se muestran durante 14 horas. Se determinaron los niveles TNF-α mediante ELISA. Se encontró que el HMGB1 solo no estimula la producción de TNF-α por monocitos pero es activo en combinación con LPS.
40

La Figura 19 muestra un esquema del mecanismo propuesto de la función del traumatismo y alarminas en la patogénesis de la enfermedad de Dupuytren. Tal como se puede observar, el traumatismo (101) provoca lesión celular (103) y la consiguiente liberación de alarminas (105) tal como S100A8, que se une a TLR-4 (107) en una célula inflamatoria tal como un macrófago (109) provocando que se produzcan citoquinas proinflamatorias tales como TNF-α (113) señaladas a través de Myd88 (111). El TNF-α puede entonces unirse a TNFR (115) sobre el precursor de fibroblastos (117) dando como resultado la formación de miofibroblastos (119).
45

50 Ejemplo 5

Se trataron células cultivadas del primer pasaje de un nódulo de Dupuytren (que comprendía células de miofibroblasto), usando el monitor de fuerza de cultivo descrito anteriormente, con un anticuerpo TNF-α humano monoclonal (cultivo de IgG₁ monoclonal n.º 1825, como disponible a partir de R&D Systems de Canada) en una

cantidad de 10 µg/ml. En comparación con un cultivo de control de tales células de pasaje primario, se encontró que células tratadas con anti-TNF-α a las 24 horas se contraían en una cantidad superior al 30 % menos que el control (que se cree que se corresponde con la desactivación de miofibroblastos eficaz superior al 30 % en comparación con el control). Esto se muestra en la Figura 13, en la que el gradiente (o tasa de contracción; en dinas/h) durante 24 horas se ilustra para cada una de las células de control de las células tratadas con anticuerpos de TNF-α.

Esto muestra directamente que las células de miofibroblastos cultivadas a partir de un clínico de un paciente con enfermedad de Dupuytren tienen actividad reducida (por ejemplo, comportamiento contráctil reducido y/o abundancia reducida) cuando se trata con un antagonista de TNF-α, incluso sobre solo 24 horas. Puesto que el efecto del antagonista de TNF-α sobre los miofibroblastos en la situación clínica continuará y el régimen terapéutica en un paciente puede implicar aplicaciones repetidas, se cree que este experimento muestra que la actividad de miofibroblastos puede gestionarse eficazmente, reduciendo, de este modo, la progresiones y/o inhibiendo la reaparición de trastornos fibroproliferativos musculoesqueléticos y, en particular, enfermedad de Dupuytren mediante la aplicación local de un antagonista de TNF-α en el sitio de la enfermedad.

Fuimos capaces de confirmar que la adición de fibroblastos palmares humanos de TGF-β1 en un enrejado de colágeno en condiciones isoméricas potenció la contractilidad (véase la figura 21). Los geles de colágenos sembrados con fibroblastos palmares se cultivaron durante 24 h en ausencia (PS solo) o presencia de TGF-β1 (10 ng/ml). Los datos se muestran como +/-SD a partir de experimentos por triplicado usando células de 3 pacientes.

A continuación, comparamos el efecto de TNF-α sobre la tasa de contracción en piel palmar y piel no palmar de un paciente con Dupuytren. Los geles de colágenos sembrados con fibroblastos palmares se cultivaron durante 24 h en ausencia (PS o NPS solo) o presencia de TNF-α (1 ng/ml). Los datos se muestran como +/-SD a partir de experimentos por triplicado usando células de 3 pacientes para piel palmar y piel no palmar de un paciente (** p=0,0012, ns = no significativo). Encontramos contracción significativamente potenciada en el monitor de fuerza de cultivo (Figura 22) cuando se añade TNF-α a los fibroblastos de piel palmar. Sin embargo, no hubo cambio, ni una ligera reducción, en la tasa de contracción cuando se añadió TNF-α a fibroblastos dérmicos no palmares también obtenidos a partir de pacientes que padecía dermofasciectomía de enfermedad de Dupuytren. Resulta interesante destacar que la enfermedad de Dupuytren solo afecta a las palmas de las manos y raramente a las plantas de los pies o túnica albugínea del pene (enfermedad de Peyronie).

La siguiente cuestión clave era si la contractilidad de los miofibroblastos en la enfermedad de Dupuytren podría invertirse mediante la adición de anti-TNF-α de un modo dependiente de la dosis. Los geles de colágeno sembrados con 1,5 millones de miofibroblastos/fibroblastos de Dupuytren se cultivaron dura 24 h en presencia de anti TNF-α (antihumano murino R&D Systems, MAB2010) y se cuantificó la contracción de fuerza isométrica. Se llevaron a cabo experimentos en triplicado usando células a partir de 5 pacientes no seleccionados consecutivos. No hubo efecto con anticuerpo de control de isotipos o con 0,1 µg/ml de anti TNF-α. Los valores representan ± SEM de mediana. En la figura 23 se muestran los resultados. Además de anti-TNF-α en un intervalo de dosis de 1-10 µg/ml con respecto a miofibroblastos a partir del cordón de Dupuytren reguló negativamente su contracción en el monitor de fuerza de cultivo de un modo dependiente de la dosis (Figura 23).

A continuación evaluamos el efecto del anti-TNF-α sobre la morfología de miofibroblastos. Todas las células en los genes no tratados o los expuesto al anticuerpo de control de isotipos de IgG se conformaron por rotación y se alinearon en el eje de máxima tensión (Fig 24a). Sin embargo, en los geles tratados con 10 µg/ml de anti-TNF-α, muchas de las células mostraron una morfología estrellada, sin ninguna alineación con respecto a la dirección de tensión (Fig 24b,c).

Para los experimentos de la Figura 24, los geles de los experimentos que se muestran en la Fig 23 se fijaron en 3 % de paraformaldehído y se marcaron inmunofluorescentemente usando anticuerpos de actina de músculo liso (rojo), faloidina (verde) y DAPI (núcleos-azul). La Figura 24a muestra células de un gel expuesto a anticuerpo de IgG de control de isotipos. Las Figuras 24b y c muestran células de un gel expuesto a 10 µg/ml de anticuerpo anti-TNF-α teñido con faloidina y anticuerpo a α actina de músculo liso respectivamente. Las imágenes originales se fotografiaron a x100.

La Figura 25 ilustra un esquema de una función propuesta de glicación avanzada de productos finales, lesión y alarminas en la patogénesis de trastornos fibroproliferativas, destacando la función fundamental del TNF-α en la trayectoria común final. De este modo, TNF-α es una diana terapéutica clave tanto para enfermedad de Dupuytren temprana como para prevenir la reaparición después de un tratamiento con colagenasa.

Estos Ejemplos ilustran hallazgos iniciales que potencian la comprensión de material de nódulos de Dupuytren y comportamiento contráctil especialmente referido a la función y comportamiento de miofibroblastos activos. Estos hallazgos implican TNF-α en actividad de miofibroblastos así como DAMP y AGE, con ayuda del hallazgo de que los antagonistas de TNF-α, Los antagonistas de DAMP y/o inhibidores de AGE pueden usarse para prevenir o inhibir la aparición o progresión de la enfermedad desde una enfermedad de estado temprano hasta enfermedad de estado

establecido y prevenir o inhibir la reaparición de la enfermedad en enfermedad establecido cuando los pacientes han sido sometidos a un tratamiento correctivo principal.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno fibroproliferativo musculoesquelético de estado de enfermedad temprana, comprendiendo la composición una cantidad terapéutica, profiláctica o eficaz en la inhibición de la progresión de un antagonista del TNF- α , en donde el trastorno se **caracteriza por** la presencia de indicaciones de enfermedad, pero en ausencia de contracción significativa.
2. Una composición tal como se reivindica en la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los síntomas de enfermedad son la presencia de nódulos histológicos y/o la presencia de nódulos clínicos.
- 10 3. Una composición tal como se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el trastorno fibroproliferativo musculoesquelético es una enfermedad de fibromatosis.
4. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el trastorno fibroproliferativo musculoesquelético se selecciona entre enfermedad de Dupuytren, fibromatosis plantar, enfermedad de Peyronie y adhesiones musculoesqueléticas.
- 15 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4, para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde las adhesiones musculoesqueléticas se seleccionan entre capsulitis adhesiva y adhesiones de tendón.
6. Una composición tal como se reivindica en una cualquiera de las anteriores reivindicaciones para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el trastorno fibroproliferativo musculoesquelético es la enfermedad de Dupuytren.
- 20 7. Una composición tal como se reivindica en la reivindicación 6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el trastorno se **caracteriza por** una contracción de articulación de menos de 20°.
8. Una composición tal como se reivindica en una cualquiera de las anteriores reivindicaciones para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es para su aplicación local al sitio de la enfermedad o sitio de manifestación de síntomas de la misma.
- 25 9. Una composición tal como se reivindica en una cualquiera de las anteriores reivindicaciones para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un antagonista del TNF- α y una degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión.
10. Una composición tal como se reivindica en la reivindicación 9 para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la degradación de matriz extracelular, empobrecimiento o agente de escisión es una metaloproteinasas de matriz y/o una colagenasa.
- 30 11. Una composición tal como se reivindica en una cualquiera de las anteriores reivindicaciones para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuya composición se formula para su inyección directamente en el tejido enfermo.
12. Una composición tal como se reivindica en la reivindicación 11 para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, cuya composición es para su inyección directamente en nódulos.
- 35 13. Una composición tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, cuya composición se formula para su aplicación tópica.
14. Una composición tal como se reivindica en una cualquiera de las anteriores reivindicaciones para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el antagonista del TNF- α se selecciona entre uno o más de Infliximab, Adalimumab, Certolizumab pegol, Golimumab o Etanercept.

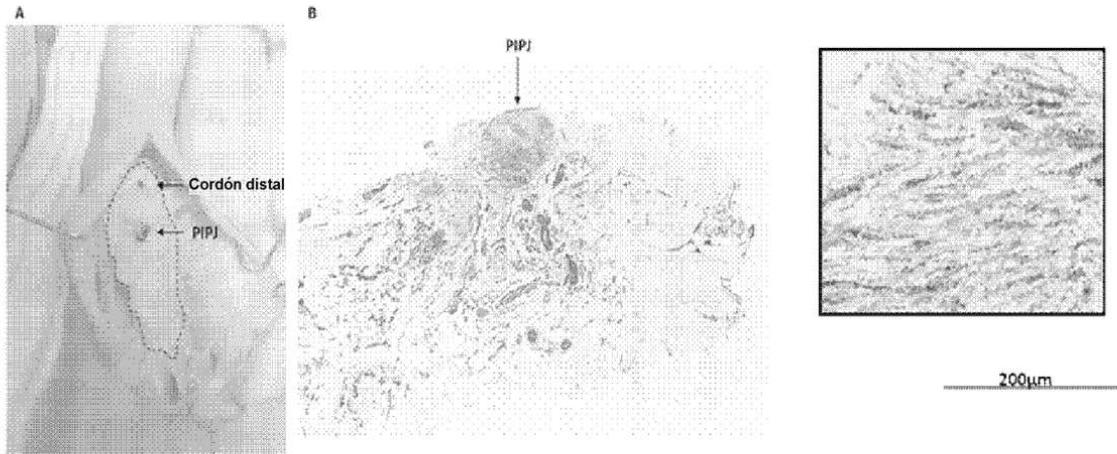


Figura 1

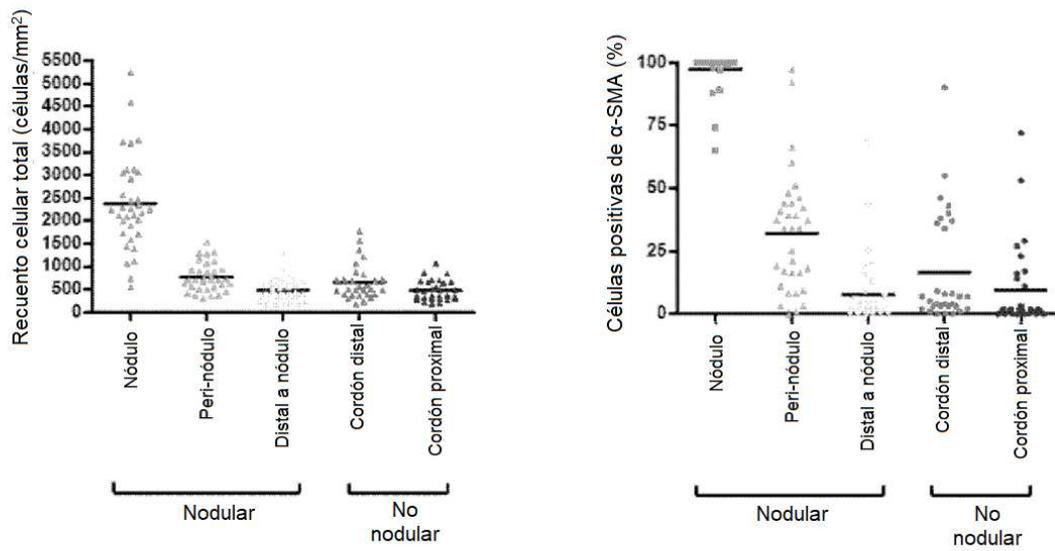


Figura 2

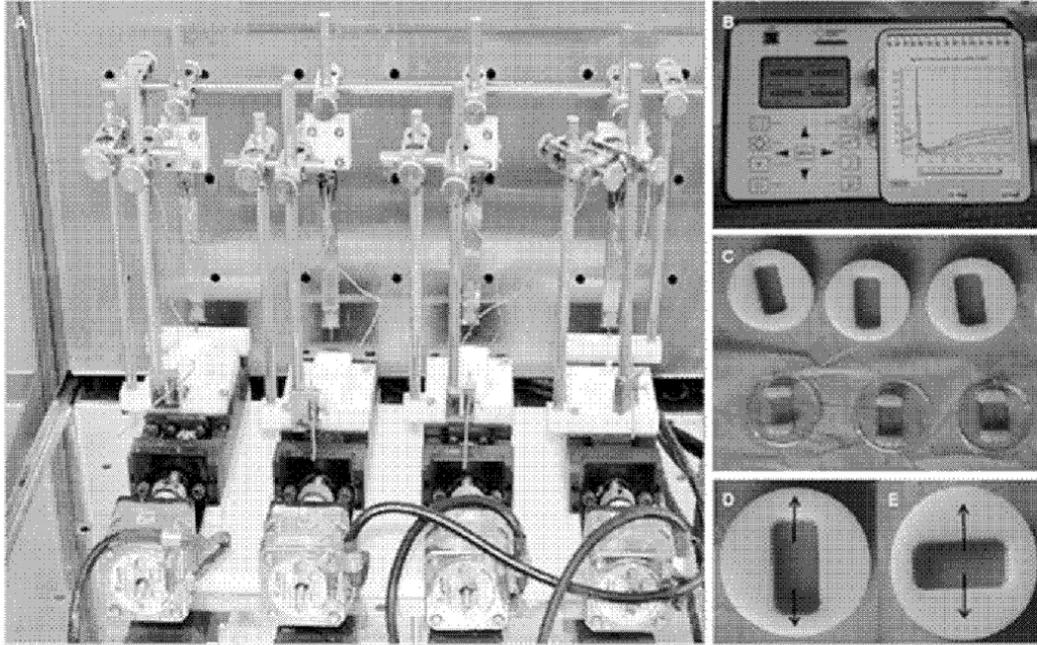


Figura 3

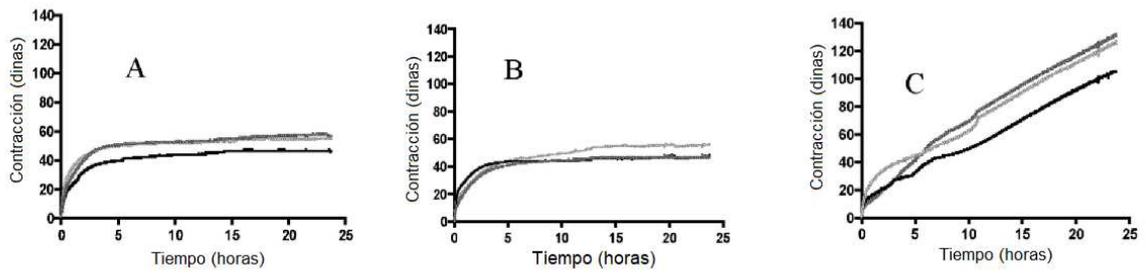


Figura 4

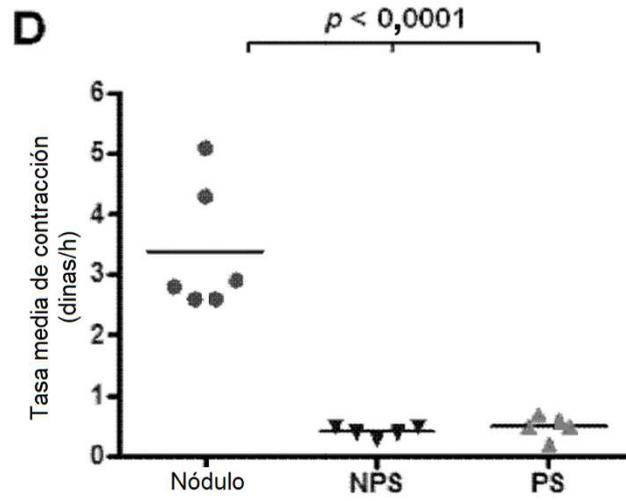


Figura 5

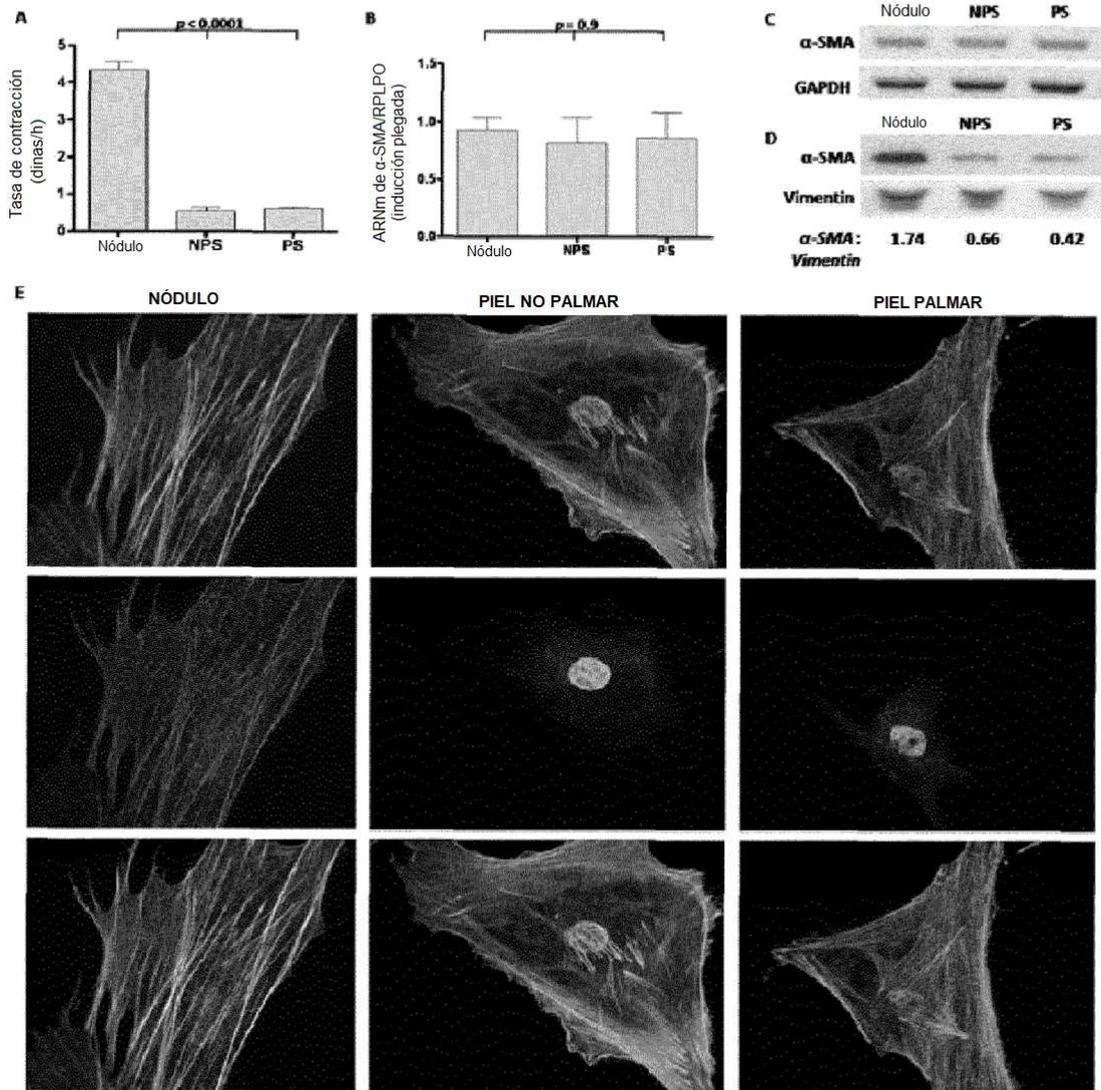


Figura 6

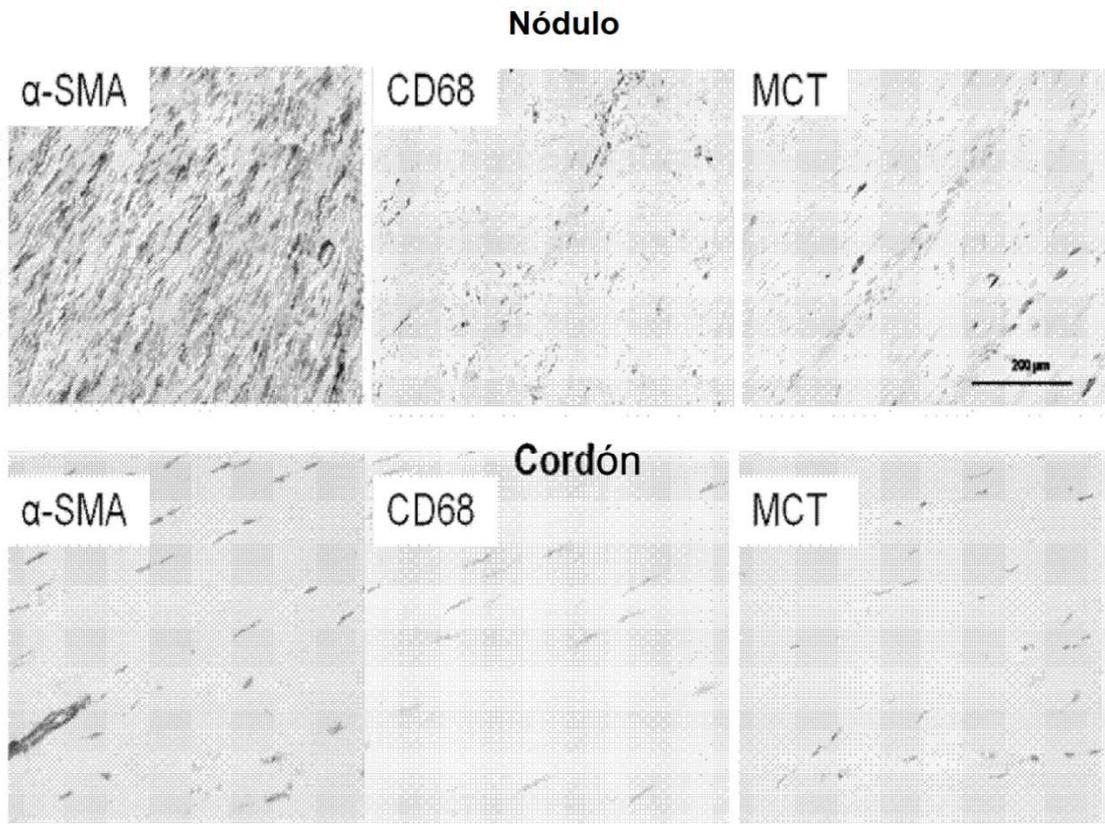


Figura 7

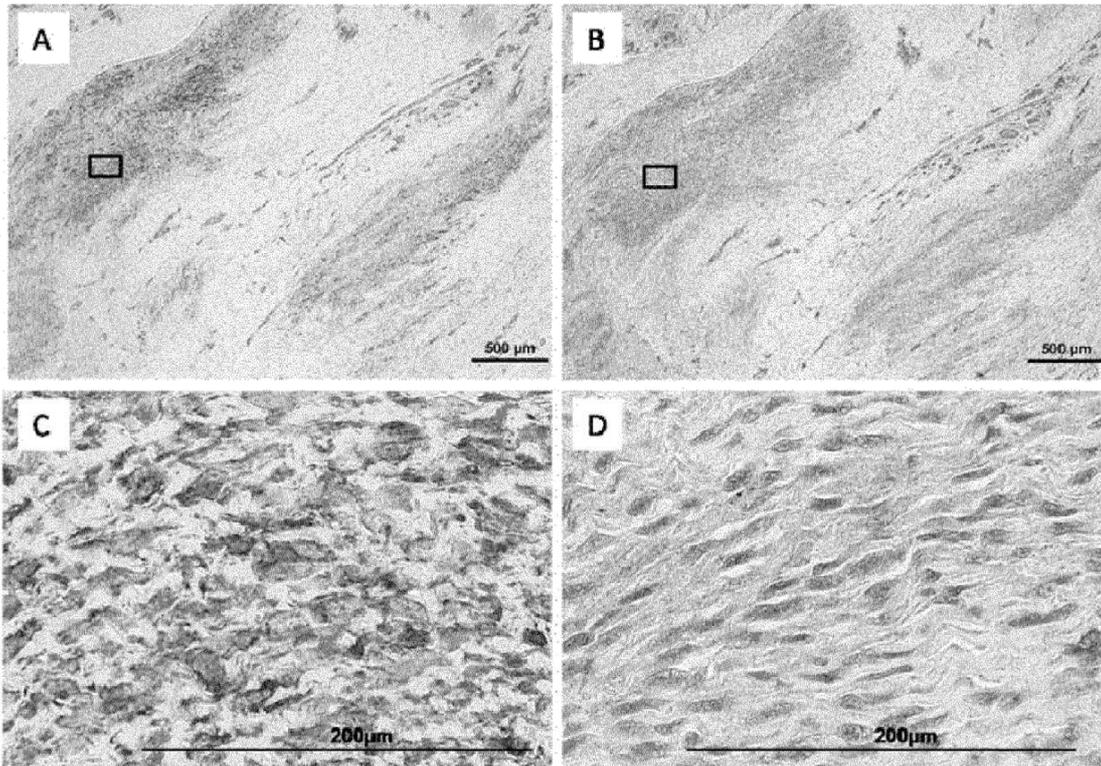


Figura 8

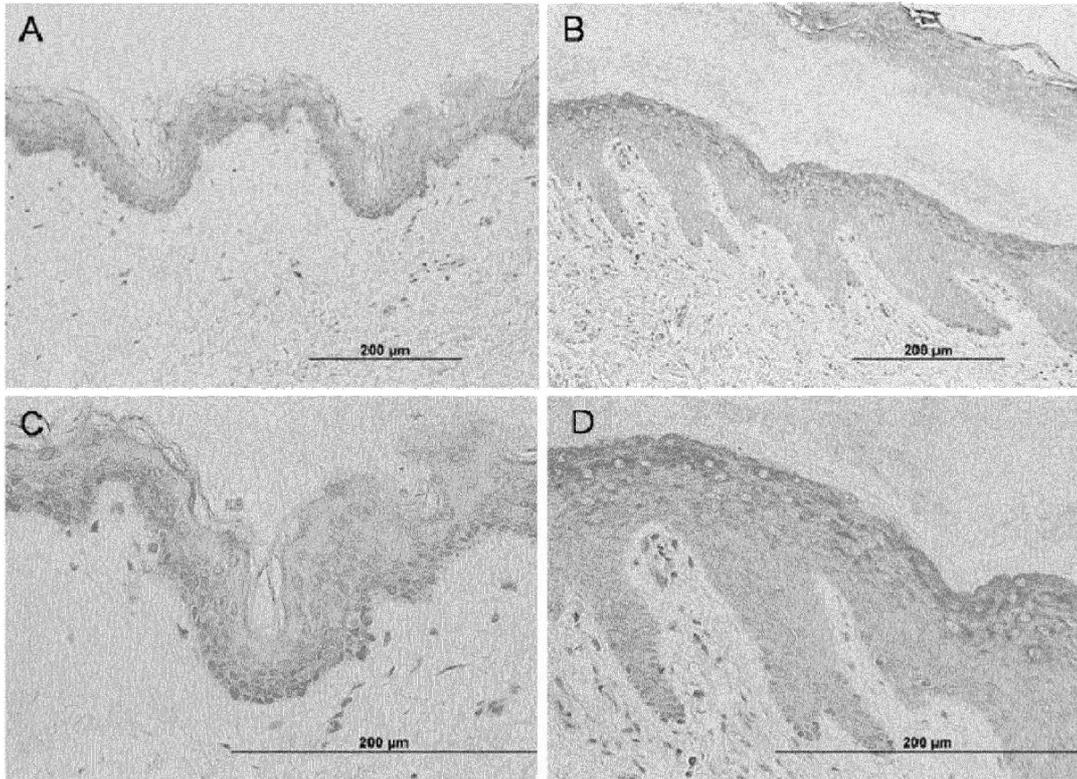


Figura 9

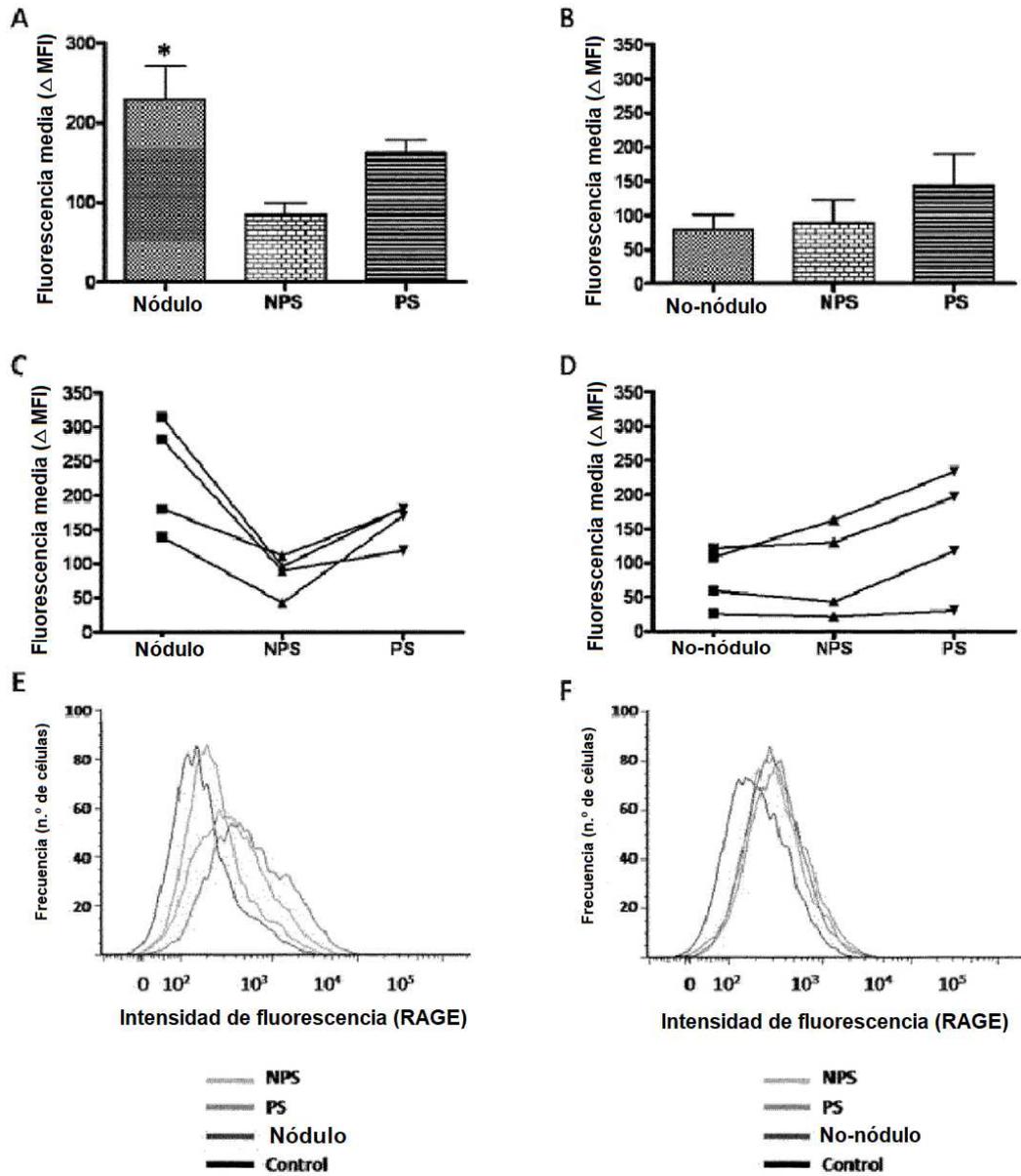


Figura 10

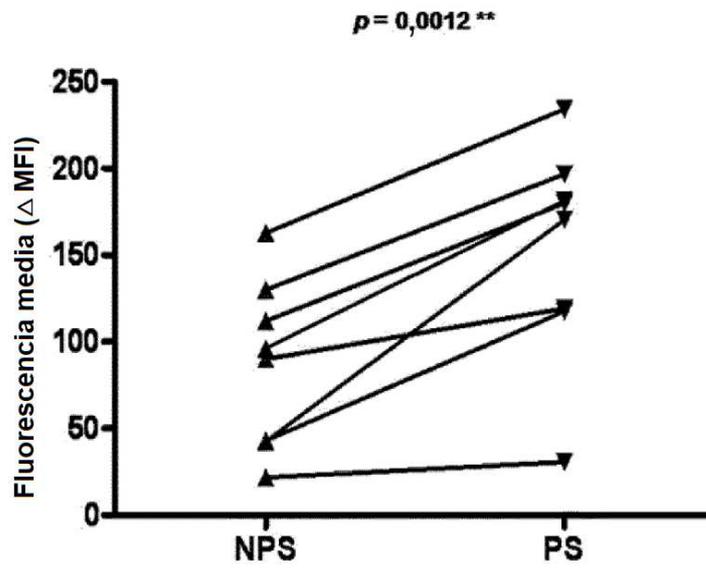


Figura 11

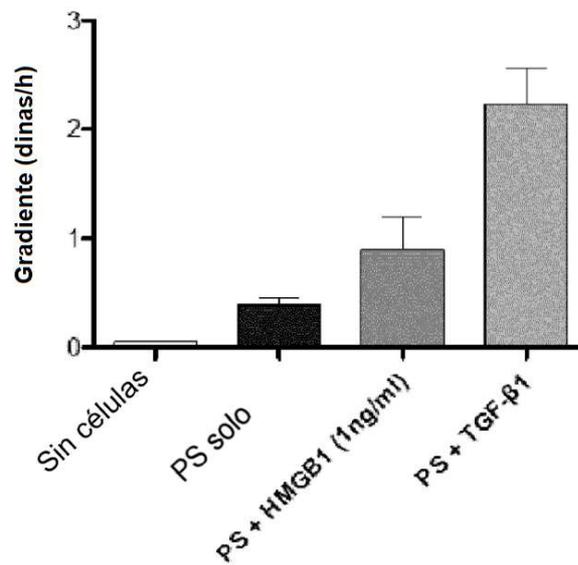


Figura 12

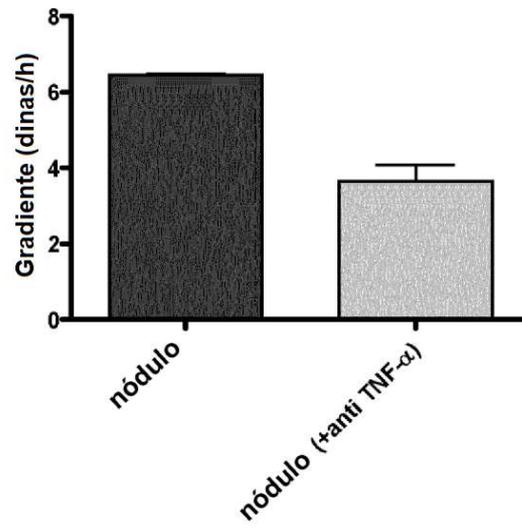


Figura 13

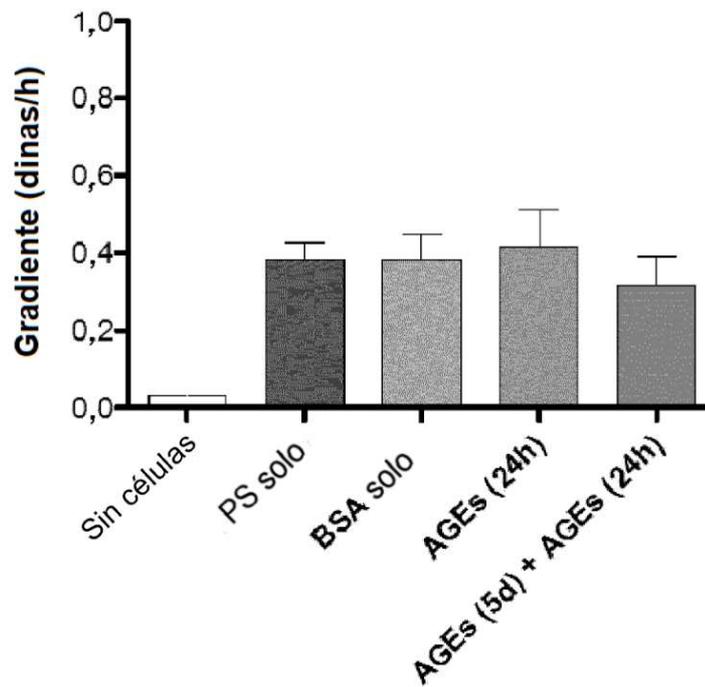


Figura 14

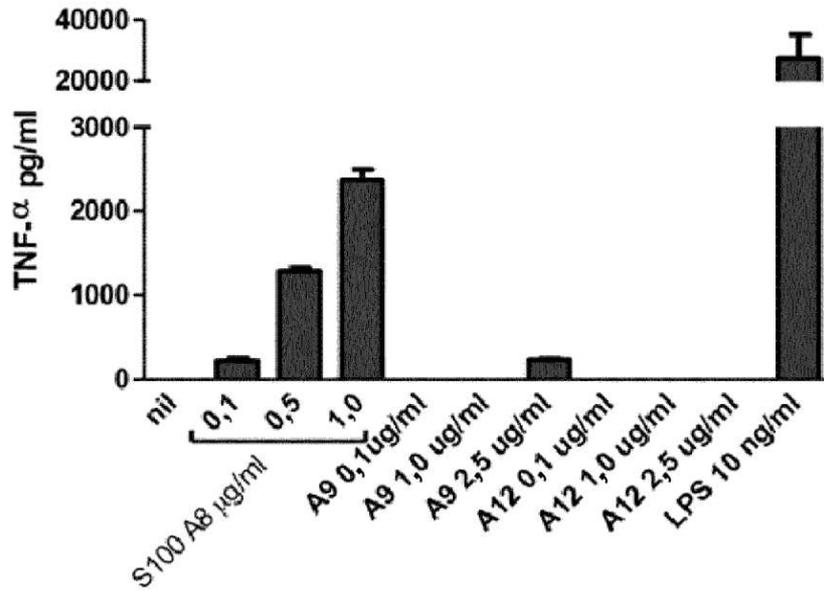


Figura 15

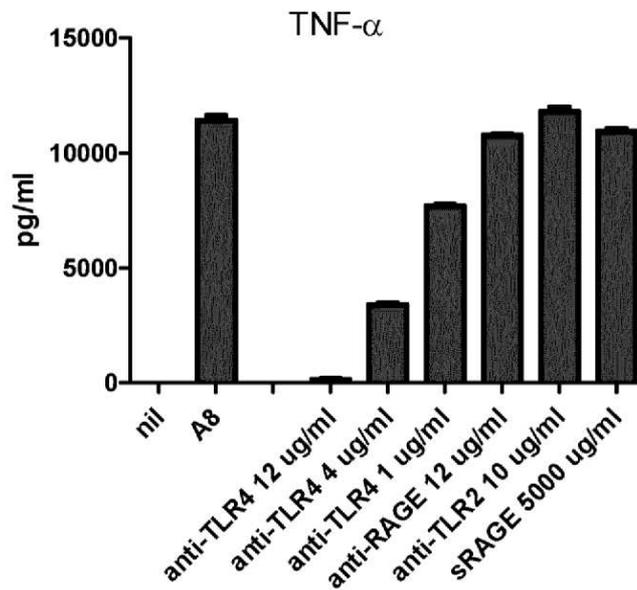


Figura 16

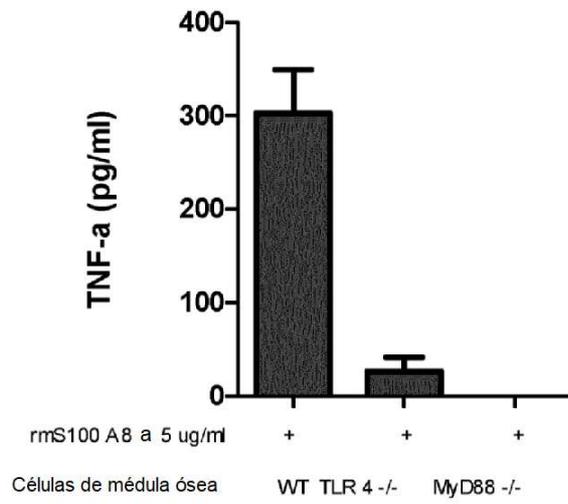


Figura 17

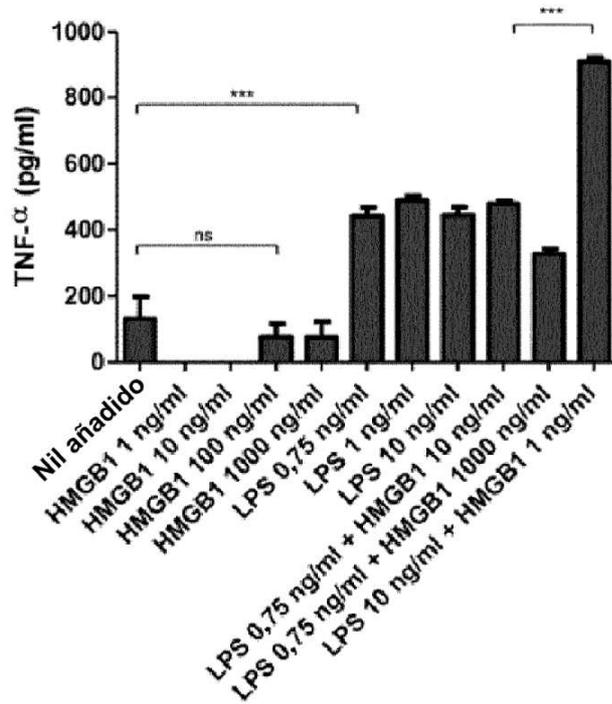


Figura 18

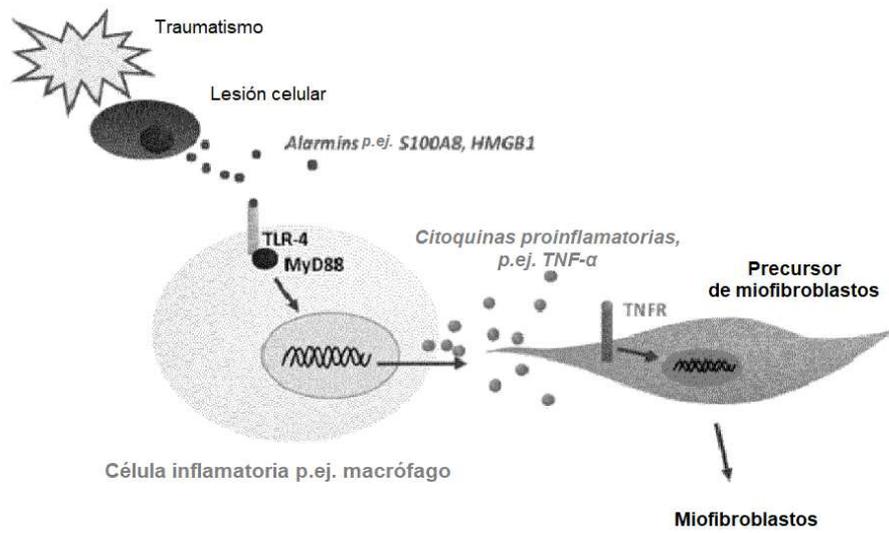


Figura 19

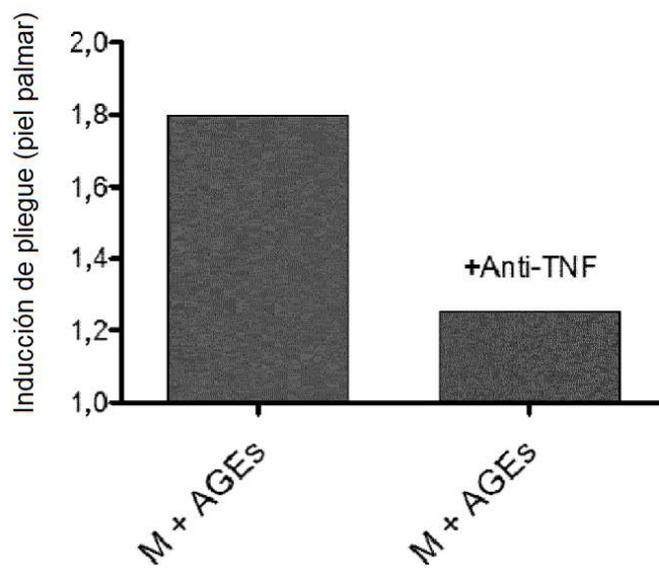


Figura 20

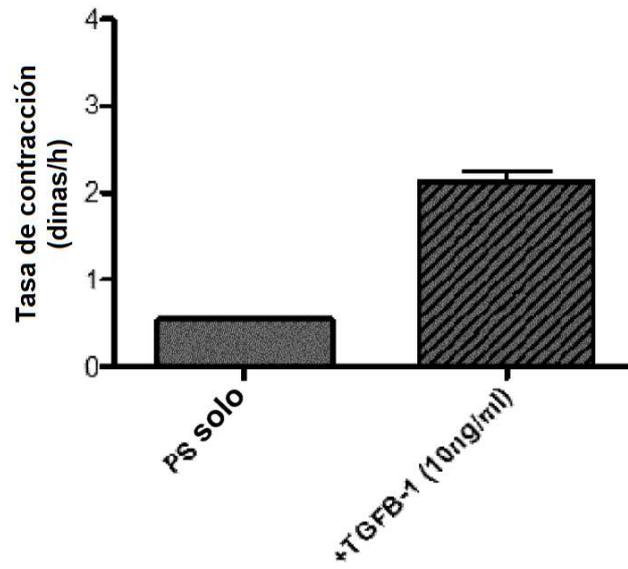


Figura 21

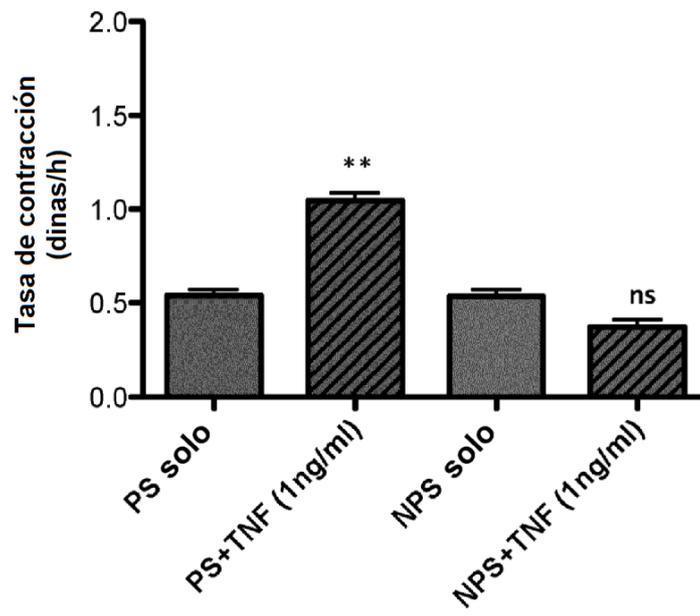


Figura 22

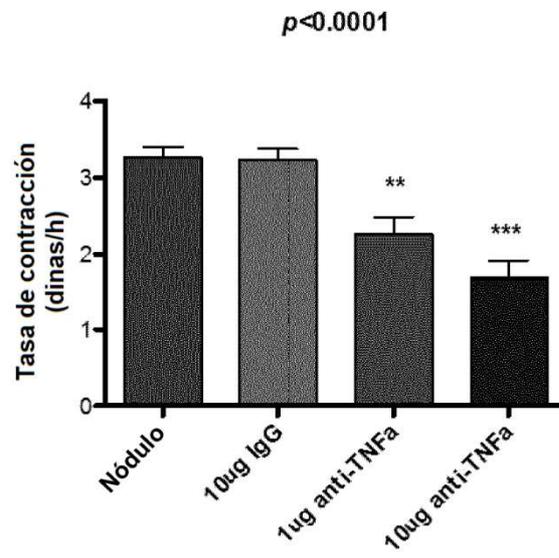


Figura 23

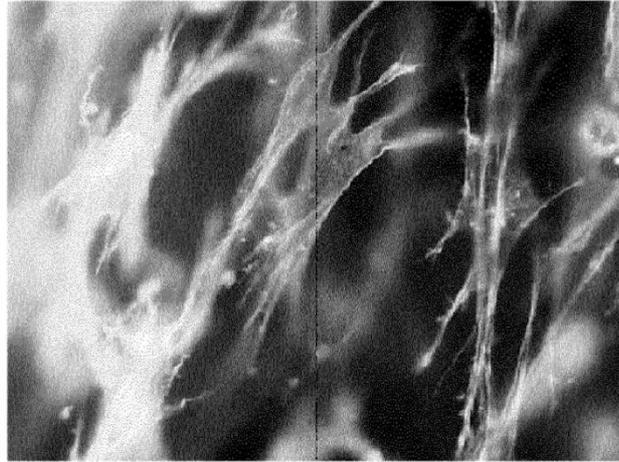


Figura 24 (a)

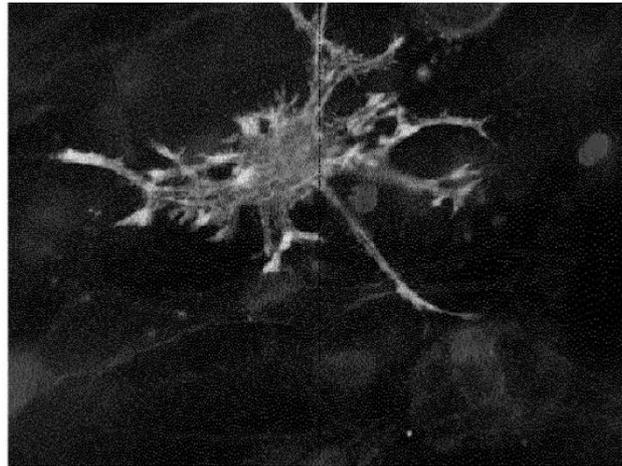


Figura 24 (b)

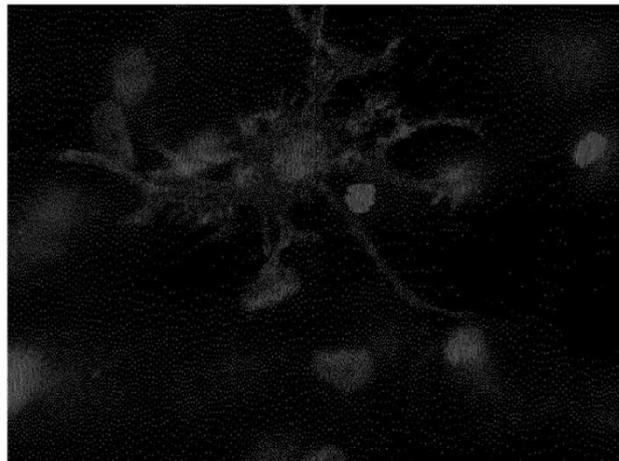


Figura 24 (c)

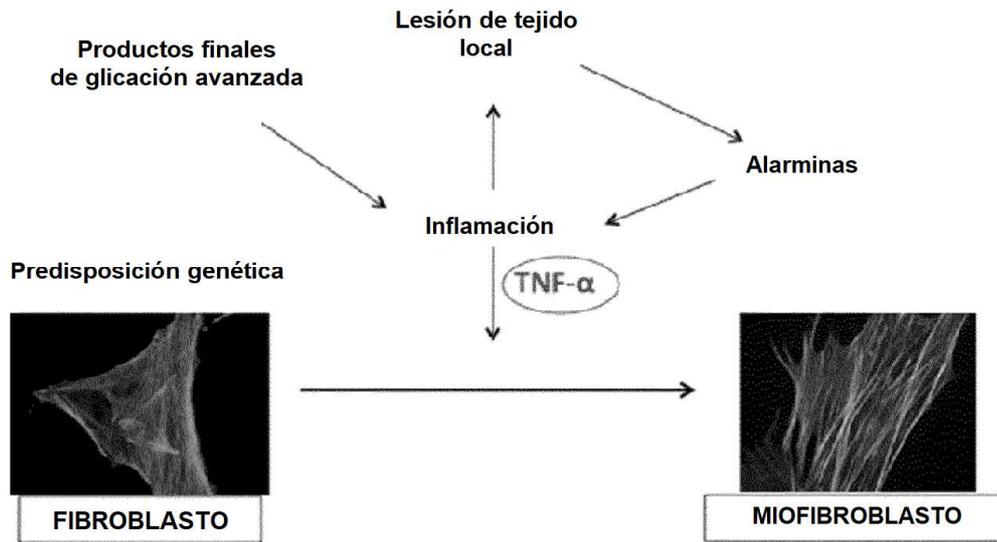


Figura 25