

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 028 665**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 8/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2021 PCT/EP2021/059923**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2021 WO21209607**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2021 E 21717933 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2025 EP 4135745**

54 Título: **SCD83 para la cicatriz de las heridas, el crecimiento del pelo y el cuidado de la piel y el pelo**

30 Prioridad:

16.04.2020 EP 20169899

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2025

73 Titular/es:

**FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT
ERLANGEN-NÜRNBERG (100.00%)
Schlossplatz 4
91054 Erlangen, DE**

72 Inventor/es:

**STEINKASSERER, ALEXANDER;
ZINSER, ELISABETH y
ROYZMAN, DMYTRO**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 028 665 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

SCD83 para la cicatriz de las heridas, el crecimiento del pelo y el cuidado de la piel y el pelo

Se proporcionan aquí formas solubles específicas de un miembro de la familia de proteínas CD83 (sCD83) para su uso en el cierre de heridas cutáneas, incluidas las heridas difíciles de cicatrizar de ancianos, diabéticos o pacientes bajo medicación inmunosupresora. Se proporciona además dicho sCD83 para su uso en el crecimiento terapéutico del cabello después de estrés físico/medicación y/o enfermedad, y procedimientos cosméticos no terapéuticos para la aceleración del crecimiento del cabello y para el cuidado del cabello que comprenden la aplicación tópica de dicho sCD83.

Antecedentes de la invención

Las lesiones no son sólo un acontecimiento doloroso, sino que también alteran la función protectora de la barrera cutánea y aumentan la susceptibilidad a las infecciones. Por lo tanto, una rápida cicatrización de las heridas es crucial para mantener la integridad física de la piel. Sin embargo, se ha descrito que el envejecimiento y las condiciones de salud dificultan las capacidades regenerativas del tejido cutáneo, por ejemplo, la diabetes mellitus (Swift, M.E. et al., *J Invest Dermatol* 117:1027-1035 (2001); Goodson, W.H.3rd and Hung, T.K., *J Surg Res* 22:221-227 (1977)). El tabaquismo y la desnutrición contribuyen a las complicaciones en la cicatrización de heridas (Janis, J.E. y Harrison, B., *Plast Reconstr Surg* 133:199e-207e (2014)). Además, la cicatrización de las heridas se ve afectada negativamente por la medicación con fármacos inmunosupresores y esteroides glucocorticoides, utilizados en los trasplantes o en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios. Por último, la radioterapia conduce a una reparación ineficaz de la herida, prolongando así la fase de dolor y susceptibilidad (Guo, S. y Dipietro, L.A., *J Dent Res* 89:219-229 (2010)). Así pues, mejorar la cicatrización de las heridas es de gran interés médico para evitar molestias y complicaciones posinvasivas.

Desde el punto de vista mecánico, la cicatrización de heridas es un acontecimiento multifactorial complejo, que puede dividirse en cuatro fases principales: (I) hemostasia, (II) inflamación, (III) reepitelización y (IV) remodelación, que se caracterizan por composiciones celulares y perfiles de expresión de citoquinas distintos (Eming, S.A. et al., *Sci Transl Med* 6:265sr266 (2014)). En caso de lesión, las plaquetas atenúan el flujo sanguíneo por medio de la coagulación e inducen la fase inflamatoria mediante la liberación de gránulos a (Zarbock, A. et al., *Blood Rev* 21:99-111 (2007)). Los neutrófilos, los macrófagos clásicamente activados y los linfocitos son reclutados al lugar de la lesión para esterilizar la zona de la herida y promover la inflamación. Las citocinas proinflamatorias son los reguladores clave y dominan dentro del tejido de la herida, ya que la depleción de varias citocinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF α e IL-6) durante la cicatrización de heridas da lugar a una resolución deficiente de las heridas cutáneas (Ritsu, M. et al., *J Dermatology & Dermatologic Surgery* 21:14-19 (2017); Lin, Z.Q. et al., *J Leukoc Biol* 73:713-721 (2003)). Tras la estimulación RTT y la fagocitosis de células apoptóticas (principalmente neutrófilos), los macrófagos experimentan un cambio fenotípico hacia macrófagos activados alternativamente (MAA) reparadores de tejidos y/o tolerogénicos (Daley, J.M. et al., *J Immunol* 174:2265-2272 (2005)). Los mediadores antiinflamatorios como la IL-10 y los factores de crecimiento como el TGF- β y el VEGF, liberados por los MAA, desempeñan un papel crucial en la transición hacia la tercera fase, es decir, la fase de proliferación (Mosser, D.M. y Edwards, J.P., *Nat Rev Immunol* 8:958-969 (2008)). La secreción de VEGF induce y estabiliza tanto la angiogénesis como la linfangiogénesis para garantizar un suministro suficiente de nutrientes y compuestos celulares (por ejemplo, queratinocitos y fibroblastos) para restaurar el tejido dañado mediante una mayor migración y proliferación. La cicatrización de la herida se completa cuando se restablece la integridad y la función del tejido dentro de la fase de remodelación.

De forma análoga a las heridas cutáneas, las lesiones epiteliales intestinales que se observan habitualmente en pacientes que padecen enfermedades inflamatorias intestinales (EII), como la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC), provocan estrés físico al romper la homeostasis inmunitaria intestinal e inducir una inflamación intestinal grave. Actualmente se asume que en estas patologías el desencadenante inicial de la pérdida de integridad de la barrera intestinal son factores ambientales (Gálvez, J., *ISRN Inflamm* 2014, 928461 (2014); Kiesler, P. et al., *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1:154-170 (2015)). Además, está bien documentado que la invasión de organismos luminales o sus productos en la mucosa desencadenan una inflamación crónica y recurrente del tracto gastrointestinal (GI) impulsada por citoquinas efectoras (Gálvez, J., *ISRN Inflamm* 2014, 928461 (2014); Kiesler, P. et al., *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1:154-170 (2015); Nenci, A. et al., *Nature* 446:557-561 (2007); Friswell, M. et al., *Gut Liver* 4:295-306 (2010)). Una amplia investigación también reveló que una de las razones es un defecto en la regulación mucosa de los procesos pro y antiinflamatorios como respuesta a componentes desconocidos de la microflora normal (Gálvez, J., *ISRN Inflamm* 2014, 928461 (2014)). Durante el curso de la inflamación, las células inmunitarias infiltrantes siguen dañando el tejido inflamado, ya que son más susceptibles a los antígenos bacterianos que los macrófagos y las células epiteliales residentes (Nenci, A. et al., *Nature* 446:557-561 (2007); Sartor, R.B., *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3:390-407 (2006); Reaves, T.A. et al., *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(Suppl 1): 191-198 (2005)). Además, los factores microbianos y la alteración de las funciones de las células epiteliales pueden favorecer estas respuestas inmunológicas excesivas. Por lo tanto, el concepto patogénico de la EII ha cambiado de la clásica enfermedad autoinmune a un complejo trastorno de barrera de carácter progresivo y disruptivo (Kiesler, P. et al., *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1:154-170 (2015); Neurath, M., *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14:688 (2017)).

La cicatrización de las heridas intestinales implica varios acontecimientos coordinados en el tiempo que se inician inmediatamente después de la lesión de la mucosa. Pocos minutos después de la lesión, se produce un paso necesario

y crucial para la cicatrización de heridas, la denominada restitución epitelial. Este proceso estimula la migración de las células epiteliales intestinales (CEIs) hacia el tejido lesionado y, por tanto, actúa independientemente de los procesos de proliferación celular (Neurath, M.F., *Mucosal Immunol* 7:6-19 (2014)). Dentro del proceso de restitución epitelial, varias moléculas tales como el factor de crecimiento transformante α (TGF- α), la interleucina-1 beta (IL-1 β), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el interferón gamma (IFN- γ) (Dignass, A.U. y Podolsky, D.K., *Gastroenterology* 105:1323-1332 (1993)) así como las GTPasas de la familia Rho (Hall, A., *Biochem Soc Trans* 33:891- 895 (2005)), ya se ha identificado que tienen un efecto regulador beneficioso al promover la expresión de TGF- β en las CEI (Neurath, M.F., *Mucosal Immunol* 7:6-19 (2014)). Curiosamente, los procesos reguladores posteriores de la proliferación y diferenciación de las CEI dependen en gran medida de moléculas tales como la IL-6, el TNF- α y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), ya que estos mecanismos deben controlarse estrictamente. Esta fase siguiente comienza horas o días después de la disrupción inicial y es esencial para el cierre de la herida mucosa. En este sentido, diferentes factores de crecimiento y citocinas, como la IL-6 y la IL-22, así como los ligandos de los receptores tipo Toll (RTT), son suficientes para impulsar la proliferación, expansión y supervivencia celular en las CEI por medio de la inducción de factores de transcripción (FT) específicos, mientras que las citocinas proinflamatorias, tales como el IFN- γ y los TNF, son esenciales para contrarrestar estas cascadas de señalización. Además, múltiples estudios han identificado diferentes RTT, tales como TLR2, TLR4 y TLR9, como reguladores decisivos de la cicatrización de heridas (Jin, F.Y. et al., *Cell* 88:417-426 (1997)).

La molécula CD83, antes solo conocida como un marcador de maduración expresado en células dendríticas (CD) maduras, ha revelado propiedades inmunomoduladoras prometedoras en el contexto de la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunes y modelos de trasplante (Royzman, D. et al., *Front Immunol* 10:633 (2019); Zinser, E. et al., *J Exp Med* 200:345-351 (2004); Ge, W. et al., *Transplantation* 90:1145-1156 (2010); Lan, Z. et al., *Transplantation* 90:1286-1293 (2010); WO04/046182).

En la actualidad, se ha descrito que varios tipos de células inmunitarias, incluidas las células T y B, las células T reguladoras (Tregs), los macrófagos y otras, expresan CD83 (Li, Z. et al., *Front Immunol* 10:1312 (2019), y Grosche, L. et al., *Front Immunol* doi: 10.3389/fimmu.2020.00721 (2020)), que al parecer es crucial para la función celular. Por ejemplo, Doebbele et al. han informado de que la expresión de CD83 es esencial para el desarrollo y la estabilidad de las Treg y que los ratones con una knockout condicional de CD83 específica de Treg ven obstaculizada su función tolerogénica y proporcionan más bien un medio inflamatorio (Doebbele, M. et al., *JCI Insight* 3 (2018)). En las DC, la ausencia de CD83 dio lugar a un aumento significativo de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD25 y OX40L y, posteriormente, a una mayor activación de las células T (Wild, A.B. et al., *JCI Insight* 4 (2019)). Cabe destacar que ambos modelos de ratón revelaron una gravedad EAE agravada junto con una resolución retardada de la neuroinflamación (Doebbele, M. et al., *JCI Insight* 3 (2018); Wild, A.B. et al., *JCI Insight* 4 (2019)). Sin embargo, el mecanismo o mecanismos subyacentes seguían siendo desconocidos hasta que Horvatinovitsch et al. describieron que sCD83 se une al complejo MD2-TLR4 y representa un socio de interacción para sCD83 en PBMC. Esta interacción, a largo plazo, inhibe la cascada de señalización proinflamatoria mediada por RTT e induce un entorno antiinflamatorio alternativo (Horvatinovich, J.M. et al., *J Immunol* 198:2286- 2301 (2017)). Curiosamente, tras la administración de sCD83, la expresión de IL-6 se induce fuertemente en los monocitos, que como se ha mencionado anteriormente es crucial para las heridas cutáneas. Además, Bock et al. demostraron que la aplicación sistémica, y terapéuticamente aún más importante, también tópica de sCD83 mejora la aceptación de órganos en modelos de trasplante de alto riesgo en un mecanismo mediado por Treg-unaIDO (Bock, F. et al., *J Immunol* 191:1965-1975 (2013)). De hecho, los trasplantes suelen ir acompañados de graves daños y heridas en los tejidos, cuyas complicaciones pueden afectar enormemente al curso de la aceptación y la cicatrización. La medicación con inmunosupresores previene el rechazo de órganos, por un lado, pero conduce a un deterioro de la cicatrización de las heridas, por otro, lo que afecta a la aceptación y la función del trasplante a largo plazo (Roine, E. et al., *Transplant Proc* 42:2542-2546 (2010)). En este contexto, los documentos US2011/0182903 y WO2013/006505 desvelan el uso de sCD83, mientras que en el documento WO2013/006505 la sCD83 es una proteína de fusión Fc-CD83, y anticuerpos CD83, respectivamente, para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. El documento WO2013/006505, en sus Ejemplos 1-9, también describe el efecto antiinflamatorio de una proteína de fusión Fc-CD83 y de proteínas sCD83 en el contexto de enfermedades autoinmunes. Además de los supuestos efectos beneficiosos en experimentos de trasplante, en los que se informó de que la CD83 soluble induce DC tolerogénicas que previenen, por ejemplo, el rechazo de aloinjertos cardíacos, y el tratamiento de enfermedades autoinmunes, el objetivo de este estudio era dilucidar el potencial terapéutico de la sCD83 en relación con la cicatrización de heridas mediante el uso de dos modelos de ratón. Esto incluía (i) el modelo de colitis inducida por DSS y (ii) estudios sobre lesiones cutáneas inducidas mecánicamente.

Además, se aportan datos sobre el impacto del sCD83 en la regeneración capilar. Aunque la caída del cabello no es un trastorno potencialmente mortal, puede afectar notablemente a la calidad de vida del paciente y se asocia a una mayor prevalencia de ansiedad y depresión (Baghestani, S. et al., *Dermatol Reports* 7:6063 (2015)). El efluvio puede dividirse en una variedad de afecciones médicas y desencadenantes, por ejemplo, alopecia cicatricial, alopecia androgenética, alopecia areata y algunas más (Phillips, T.G. et al., *Am Fam Physician* 96:371-378 (2017)). La forma más prevalente de caída del cabello (alopecia androgenética) está asociada a una predisposición genética y a un desequilibrio hormonal, que posteriormente dan lugar a una fase acortada de crecimiento del cabello (anágena), mientras que la duración de la telógena (quiescencia del folículo piloso) es bastante prolongada, reduciéndose así la longitud del cabello con cada ciclo piloso ((Ellis, J.A. et al., *Expert Rev Mol Med* 4:1-11 (2002); Courtois, M. et al., *Skin*

Pharmacol 7:84-89 (1994)). Además, la medicación fuerte, tal como la quimioterapia y los inmunosupresores (por ejemplo, el metotrexato) causan efluvios graves en un gran número de pacientes (Trueb, R.M., *Skin Therapy Lett* 15:5-7 (2010); Lukasik, A. et al., *Pol Merkur Lekarski* 46:77-79 (2019)).

5 Hasta la fecha, el tratamiento médico de la caída del cabello se limita a dos fármacos aprobados por la FDA, es decir, minoxidil y finasterida (Lee, S.W. et al., *J Drugs Dermatol* 17:457-463 (2018)), con unas ventas anuales de 860 millones de dólares en 2019 para el minoxidil (<https://www.marketwatch.com/Dress-release/at-47-cacir-minoxidil-market-size-is-exDected-to-reach-1130-million-bv-2024-2019-04-29>). Se hipotetiza que los efectos del minoxidil se basan en sus propiedades vasodilatadoras mejoradas y en la inducción de VEGF en las células de la papila dérmica, que posteriormente aumentan la vascularización local y el suministro de nutrientes (Messenger, A.G. y Rundegren, J., *Br J Dermatol* 150:186-194 (2004)). Por el contrario, la administración de finasterida aumenta la relación anágena/telógena, invirtiendo la abreviación de la fase anágena en pacientes con alopecia (Shapiro, J., y Kaufman, K.D., *J Investig Dermatol Symp Proc* 8:20-23 (2003)). Mecánicamente, la finasterida impide la formación de dihidrotestosterona, al antagonizar selectivamente la esteroide-5 α -reductasa tipo 2 (Finn, D.A. et al., *CNS Drug Rev* 12:53-76 (2006)). En este sentido, el papel de la dihidrotestosterona es muy controvertida, ya que estimula el crecimiento del vello de la zona facial y genital, mientras que favorece la caída del cabello en el cuero cabelludo en pacientes con una sensibilidad de los folículos pilosos determinada genéticamente (Urysiak-Czubatka, I. et al., *Postepy Dermatol Alergol* 31:207-215 (2014)). La reducción de dihidrotestosterona por medio de finasterida ralentiza la progresión de la alopecia androgenética masculina junto con un recrecimiento parcial del vello en dos tercios de los pacientes varones (Van Neste, D. et al., *Br J Dermatol* 143:804-810 (2000)). Sin embargo, según varios estudios, la terapia con finasterida se asocia a efectos secundarios graves como disfunción eréctil, infertilidad masculina y ginecomastia (Traish, A.M. et al., *J Sex Med* 8:872-884 (2011); Ramot, Y. et al., *Int J Trichology* 1:27-29 (2009)). Sin embargo, ambos medicamentos (minoxidil y finasterida) requieren una administración de por vida y no revierten por completo el efluvio precedente, sino que previenen una mayor calvicie, si es que la medicación tiene éxito.

Sumario de la invención

25 La presente invención se define en las reivindicaciones.

La cicatrización de las heridas, tanto cutáneas como intestinales, es un proceso sumamente delicado y multifactorial, en el que ligeras alteraciones pueden provocar un retraso en el cierre de la herida, la formación de cicatrices o fibrosis. En general, la cicatrización de heridas puede dividirse en cuatro fases principales: hemostasia, inflamación, reepitelización y remodelación, cada una de ellas caracterizada por un perfil celular y de citocinas único, respectivamente. En particular, la medicación mediante, por ejemplo, corticosteroides o productos biológicos inhibidores de las citocinas, tales como las terapias con anticuerpos anti IL-6 y anti TNF α , suprimen la respuesta inflamatoria y afectan negativamente a la progresión del cierre de la herida, provocando molestias y una mayor vulnerabilidad a las infecciones. Por lo tanto, es obligatorio aplicar estrategias terapéuticas nuevas y más eficaces para el cuidado de las heridas. En claro contraste con los agentes inmunosupresores utilizados habitualmente, la molécula sCD83 soluble (sCD83) tiene propiedades inmunomoduladoras y ha demostrado ser muy eficaz en numerosos modelos de trasplante, incluidos los trasplantes renales, cutáneos, cardíacos y de córnea de alto riesgo, sin efectos adversos destacables hasta la fecha. En este caso, la administración de sCD83 indujo un entorno inmunomodulador, caracterizado por la inducción de células T reguladoras (Tregs), de forma dependiente de la indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO). Dado que, entre otras células, las Tregs desempeñan un papel crucial en los procesos de cicatrización de heridas, investigamos el papel de sCD83 durante estos eventos. Sorprendentemente, aquí demostramos por primera vez que la administración sistémica y, sobre todo, tópica de sCD83 favorece/mejora la cicatrización de heridas en un modelo preclínico de herida cutánea. Además, mediante el uso del modelo de colitis inducida por DSS,

podríamos mejorar la cicatrización de heridas también en este modelo específico de cicatrización de heridas intestinales. En ambos casos, el cierre de la herida se aceleró significativamente en los ratones tratados con sCD83-. Mecánicamente, en los animales tratados con sCD83, la expresión temporal de citoquinas proinflamatorias, por ejemplo IL-1 β , IFN γ , IL-17A y TNF α , aumentó fuertemente durante la fase de inflamación, y se redujo en fases posteriores, lo que se correlaciona con una mejor cicatrización de la herida. Curiosamente, la composición celular de la piel reveló una mayor acumulación de linfocitos B y T en las heridas cutáneas de los ratones tratados con sCD83, que, como se ha señalado, contribuyen a una mayor supervivencia y proliferación celular de, por ejemplo, los fibroblastos, durante la fase de reepitelización y remodelación. Así pues, los datos que se presentan a continuación sientan las bases para futuras opciones de tratamiento de, por ejemplo, heridas de difícil cicatrización de ancianos, diabéticos o pacientes bajo medicación inmunosupresora mediante la aplicación de sCD83. Los datos aportan además la promoción del crecimiento del pelo tras el estrés físico y/o la depilación mediante la aplicación de sCD83 sistémico, y también mediante su aplicación tópica. La invención proporciona así: (1) Una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas CD83 consistente en el dominio extracelular de la proteína CD83 con los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2 (en lo sucesivo denominada "proteína sCD83" o "sCD83"), un derivado funcional de dicha proteína sCD83 con hasta 10 aminoácidos unidos al extremo C o N de dicha proteína sCD83 y/o con hasta 10 aminoácidos de dicha proteína sCD83 sustituidos, una forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o una forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83, para su uso en el cierre de heridas cutáneas;

(2) una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas CD83 consistente en el dominio extracelular de la proteína CD83 con los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2 (proteína sCD83), un derivado funcional que tiene hasta 10 aminoácidos unidos al C- o N-terminal de dicha proteína sCD83 y/o que tiene hasta 10 aminoácidos de dicha sCD83 sustituidos, una forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o una forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83, para su uso en el crecimiento terapéutico del cabello después de estrés físico/medicación y/o enfermedad;

(3) una composición que comprende una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas CD83 consistente en el dominio extracelular de la proteína CD83 con los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2 (proteína sCD83), un derivado funcional de dicha proteína sCD83 que tiene hasta 10 aminoácidos unidos al C- o N-terminal de dicha proteína sCD83 y/o que tiene hasta 10 aminoácidos de dicha proteína sCD83 sustituidos, una forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o una forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 para su uso en el crecimiento terapéutico del cabello después de estrés físico/medicación y/o enfermedad; y (4) un procedimiento cosmético no terapéutico para la aceleración del crecimiento del cabello y para el cuidado del cabello, procedimiento que comprende aplicar sistémica o tópicamente una composición que comprende una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas CD83 que consiste en el dominio extracelular de la proteína CD83 con los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2 (proteína sCD83), un derivado funcional de dicha proteína sCD83 que tiene hasta 10 aminoácidos unidos al C- o N-terminal de dicha proteína sCD83 y/o que tiene hasta 10 aminoácidos de dicha proteína sCD83 sustituidos, una forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o una forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 a la piel o pelo humano o animal.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 - La cicatrización de heridas cutáneas se potencia en ratones tratados sistémicamente con sCD83: (A) Las lesiones de la herida se indujeron mediante el uso de punzones de 6 mm y el área de la herida se evaluó con un calibrador en los puntos temporales indicados. (B) El porcentaje de cierre de la herida se fijó relativamente al valor del día 0, con sCD83 y simulacro $n > 12$. (C) La expresión de vimentina se analizó el día 3 y el día 6 por medio de WB y se cuantificó en relación con los controles de p-actina mediante el uso de ImageJ con $n > 10$ para cada grupo (lado izquierdo). Bandas representativas de vimentina y p-actina de un análisis por WB de muestras de piel del día 6 tratadas con sCD83 y con simulacro (lado derecho). (D) Análisis citométricos de flujo de la composición celular dentro de los márgenes de la herida el día 3 y el día 6 con $n=3$ para cada grupo. Los datos se presentan como media \pm SEM y se analizaron estadísticamente por medio de ANOVA bidireccional (B) y Mann-Whitney (C) y prueba t múltiple no apareada (D). Los asteriscos marcan diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$). La ausencia de asteriscos indica que no hay significación estadística.

Figura 2 - sCD83 modula la fase inflamatoria y de cicatrización de heridas: Se aisló el ARN del tejido de la herida en los puntos temporales indicados y se utilizó para los análisis qPCR. $n > 5$ para cada grupo. Los datos se presentan como media \pm SEM y se analizaron estadísticamente por medio de ANOVA bidireccional. Los asteriscos marcan diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$). La ausencia de asteriscos indica que no hay significación estadística.

Figura 3 - La aplicación tópica de sCD83 induce la cicatrización local de heridas: Las lesiones de la herida se fijaron con punzones de 6 mm y los diámetros se midieron con un calibre en los puntos temporales indicados. (A+B) El porcentaje de cierre de la herida se estableció en relación con el valor del día 0, con cada grupo $n = 10$. (C) Análisis histológicos representativos de muestras del día 7. (D) Los análisis Western blot de las matrices sCD83-hidrogel tras 10 días a 4 °C, demuestran la estabilidad de la proteína sCD83. Los datos se presentan como media \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante ANOVA bidireccional (B). Los asteriscos marcan diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$). La ausencia de asteriscos indica que no hay significación estadística.

Figura 4 - La cicatrización de heridas intestinales se acelera en ratones tratados con sCD83 durante la fase de recuperación de la colitis inducida por DSS: (A) Porcentaje medio de pérdida de peso durante un período de 22 días. Se muestra un experimento representativo de cuatro independientes. (B) Medición de la longitud del colon en cm los días 9, 16 y 22. Se muestra la media \pm SEM; grupo PBS $n = 13 / 11 / 8$, grupo sCD83 $n = 13 / 9 / 8$, grupo control $n = 8 / 4 / 4$ ratones por grupo (días 9, 16, 22); datos agrupados de cuatro experimentos independientes. Evaluación de la gravedad de la colitis y de la inflamación intestinal en los días 9, 16 y 22 por medio de (C) endoscopia de alta resolución; grupo PBS $n = 13 / 8 / 8$, grupo sCD83 $n = 13 / 7 / 8$, grupo control $n = 8 / 4 / 4$ ratones por grupo; Media \pm SEM; (D, E) evaluación de secciones de tejido de colon teñidas con H&E; grupo PBS $n = 13 / 11 / 8$, grupo sCD83 $n = 13 / 9 / 8$, grupo control $n = 8 / 4 / 4$ ratones por grupo; Media \pm SEM. Análisis estadístico (B, C, E): ANOVA unidireccional ordinario, prueba de comparación múltiple de Tukey; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

Figura 5 - El tratamiento con sCD83 de ratones afectados por DSS acelera su recuperación por medio de una respuesta inflamatoria mejorada y un proceso de cicatrización intestinal más rápido: Se aisló ARN de tejido de colon en (A) día 9 y (B) día 16 para el análisis de transcritos de genes específicos, incluyendo Ifng, Il1b, Il16, Tnfa, Cox2, Ccl2, Chil3, y 1117a mediante el uso de qPCR en tiempo real. Se muestra la media \pm SEM; grupo PBS $n = 13 / 11$, grupo sCD83 $n = 13 / 9$, grupo control $n = 8 / 4$ ratones por grupo (día 9 / 16); datos agrupados de cuatro experimentos independientes; los datos se normalizan a HPRT y se relativizan a la media del grupo control. Análisis estadístico:

ANOVA unidireccional ordinario, prueba de comparación múltiple de Tukey; los valores atípicos significativos se determinaron mediante la prueba R

5 Figura 6 - El recrecimiento del pelo aumenta en los ratones tratados con sCD83: (A) Imágenes representativas de ratones tratados con sCD83- (n = 4) y con simulacro (n = 5). (B) Cuantificación del área calva en relación con el área dorsal total de los ratones representados mediante ImageJ. Los datos se ilustran como media \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante Mann Whitney.

El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0,05$. OUT procedimiento ($Q = 0,1\%$), si es necesario.

10 Figura 7 - Las Tregs desempeñan un papel fundamental en el recrecimiento del pelo inducido por sCD83: (A) Se realizaron análisis microscópicos por medio de la técnica CMEL (Eckhardt, J. et al., J Histochem Cytochem 61:125-133 (2013)) para evaluar las células CD4+/Foxp3+ Treg y (B) análisis qPCR (sCD83 n = 10 y simulación n=9), mediante el uso de biopsias de piel dorsal, 31 días después de la depilación. Los datos se presentan como media \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante Mann Whitney. Los asteriscos marcan diferencias estadísticamente significativas ($*p < 0,05$).

15 Figura 8 - El recrecimiento del pelo aumentó en los ratones tratados con sCD83 durante la cicatrización de la herida cutánea: Antes de inducir las lesiones de la herida, se eliminó el pelo dorsal por medio de depilación. Las heridas se infligieron con punzones de biopsia cutánea de 8 mm. El aumento del recrecimiento del pelo en los ratones tratados con sCD83 está representado por el color oscuro de la piel en el día 7, como se resume en el esquema de crecimiento del pelo (a la izquierda). La cuantificación de la pigmentación de la piel se realizó mediante el uso del software ImageJ y el complemento de medición RBG. Un valor RBG bajo representa un tono de piel más oscuro.

20 Figura 9 - sCD83 promueve el crecimiento del pelo en la transición telógena a anágena: Se depiló el pelo de la piel dorsal en ratones tratados con sCD83 y con simulacro y se registraron imágenes el día 14. Los círculos rojos resaltan la zona de pelo claro en los ratones simulados, que no está presente en el grupo sCD83 (parte superior). La cuantificación de la densidad capilar se realizó mediante el uso del software ImageJ y el complemento de medición RBG. El denso vello dorsal cubre la pálida piel murina en los ratones tratados con sCD83, como representa el menor valor de RBG (parte inferior).

30 Figura 10 - aumenta el número de pestañas tras la administración tópica: Para evaluar el efecto del sCD83 en el crecimiento de las pestañas, se aplicaron 7 μ g de sCD83 por vía tópica tres veces al día durante dos semanas. Se aplicó un volumen análogo de PBS como control. El día 14 se retiraron los párpados y dos investigadores independientes determinaron el número de pestañas (sCD83 n=9 y simulacro n = 14). Los datos se presentan como media \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante Mann Whitney. Los asteriscos marcan la diferencia estadísticamente significativa, en la que ** representa un valor $p < 0,01$.

35 Figura 11 - Diagrama de flujo de la producción y purificación de sCD83 a partir de cultivos en matraces de P. pastoris: Se cultivó una sola colonia de P. pastoris transformada en N6HIS-sCD83-pPIC9K en un medio de complejo de glicerol tamponado durante 72 h. A continuación, se transfirieron las células a un medio de expresión de complejo de metanol tamponado durante 72 h más.

40 El día 6, los sobrenadantes del cultivo se recogieron por centrifugación y filtración para la posterior purificación de sCD83 marcada con His por medio de cromatografía de afinidad Ni-NTA. sCD83 se eluyó en 12 ml de amortiguador de elución y se almacenó o.n. a 4 °C. Al día siguiente, se llevó a cabo el procedimiento de desalación por medio de purificación HiPrep y se eliminaron las contaminaciones de endotoxinas mediante sistemas vivapure. Por último, la proteína se filtró estérilmente y el rendimiento proteico se determinó por el procedimiento BCA. Los alícuots de sCD83 se almacenaron a - 80 °C.

Figura 12 - Vector de expresión pPIC9K: Secuencias funcionales y elementos del vector de expresión pPIC9K utilizado en el Ejemplo 3.

45 Figura 13 - El progreso de la cicatrización de la herida cutánea es significativamente mayor en los ratones tratados sistémicamente con sCD83 en comparación con los ratones tratados con la proteína de fusión sCD83-Fc. Resultados del ejemplo 4: Los ratones fueron tratados sistémicamente con una dosis diaria de 100 μ g de sCD83 fusionada al extremo N-terminal de la región Fc de la IgG1 humana (denominada sCD83-Fc; Creative Biomart - CD83-150H; (cuadrado; n = 10), sCD83 (triángulo; n = 10) o solución salina (bala; n = 12). El área de la herida se midió en los días 0, 3 y 6 mediante el uso de un calibrador, y el cierre de la herida se determinó para los días 3 y 6 en relación con el valor del día 0. Los datos se muestran como media con valores individuales \pm SEM. La significación estadística se evaluó mediante ANOVA de dos vías. Los asteriscos marcan diferencias estadísticamente significativas ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ y $****p < 0,0001$), mientras que "ns" indica que no hay significación estadística.

Descripción detenida de la invención

55 Según el aspecto (1) de la invención, se utiliza una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas CD83 para la cicatrización de heridas. La proteína CD83 es una proteína sCD83 como la descrita en el documento WO 04/046182

mencionado anteriormente, es decir, una proteína sCD83 que consta de los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO: 2, incluyendo derivados de las proteínas sCD83 que tengan hasta 10 aminoácidos unidos al C- o N-terminal de la proteína sCD83 y/o proteínas que tengan hasta 10 aminoácidos, preferentemente de uno a cinco aminoácidos, de la sCD83 sustituidos. En particular, tales proteínas sCD83 incluyen proteínas sCD83 que tienen

5 secuencias adicionales unidas a su extremo C o N, por ejemplo, pueden utilizarse aquellas que llevan parte de un dominio transmembrana en su extremo C o que llevan en su extremo N un péptido funcional corto (Gly-Ser-Pro-Gly).

De manera similar, los ácidos nucleicos o vectores que codifican estas proteínas sCD83 pueden utilizarse para la cicatrización de heridas (no forma parte de la presente invención). En particular, las secuencias de ADN que comprenden los nucleótidos 58 a 432, más preferentemente 58 a 435 de SEQ ID NO: 1 puede utilizarse.

10 El término "forma soluble" de la familia de proteínas CD83 se utiliza aquí para definir una molécula proteinácea que tiene al menos una porción del dominio extracelular de un miembro de la familia de proteínas CD83 pero no tiene una secuencia de aminoácidos capaz de anclar dicha molécula a la membrana de una célula en la que se expresa. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD83 humana, así como la secuencia de aminoácidos de CD83, se describen en Zhou, L.J. et al. (1992) J. Immunol. 149(2):735-742 (número de acceso Genbank Z11697) y se

15 proporcionan en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente.

Aparte de la sCD83 humana con los residuos de aminoácidos 20 a 144 de la SEQ ID NO:2, la sCD83 puede derivarse de otros miembros de la familia de proteínas CD83, siempre que difieran en 10 aminoácidos o menos de la CD83 humana con los residuos de aminoácidos 20 a 144 de la SEQ ID NO:2. Tales CD83 incluyen la proteína HB15 de ratón que está codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:3 y está representada por la secuencia de

20 aminoácidos proporcionada en SEQ ID NO:4, (número de acceso Genbank NM_009856 (Berchthold et al.)).

Pueden obtenerse otros miembros naturales de la familia de proteínas CD83 hibridando un ácido nucleico que comprenda, por ejemplo, la totalidad o la porción extracelular de la región codificante CD83 humana o la región codificante HB15 de ratón con varias fuentes de ácidos nucleicos (ADN genómico, ADNc, ARN) de otros animales, preferentemente mamíferos, o de otros tejidos del mismo organismo.

25 La hibridación se relaciona con la unión entre secuencias complementarias de ácido nucleico (por ejemplo, sentido/antisentido, siARN). Como es sabido por los expertos en la técnica, la T_m (temperatura de fusión) se relaciona con la temperatura a la que la unión entre secuencias deja de ser estable. Como se utiliza aquí, el término "hibridación selectiva" se relaciona con la hibridación en condiciones moderadamente estrictas o altamente estrictas, que pueden distinguir secuencias nucleotídicas relacionadas con CD83 de secuencias no relacionadas.

30 En las reacciones de hibridación de ácidos nucleicos, las condiciones utilizadas para alcanzar un determinado nivel de rigurosidad variarán en función de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se hibriden. Por ejemplo, la longitud, el grado de complementariedad de la secuencia, la composición de la secuencia (por ejemplo, el contenido de GC frente a AT) y el tipo (por ejemplo, ARN frente a ADN) de las regiones de hibridación pueden tenerse en cuenta a la hora de seleccionar condiciones de hibridación particulares. Una consideración adicional es si uno de los ácidos

35 nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, en un filtro.

En general, la estabilidad de un híbrido de ácido nucleico disminuye a medida que disminuye el ion sodio y aumenta la temperatura de la reacción de hibridación. Un ejemplo de reacción de hibridación de moderada rigurosidad es el siguiente: 2 x SSC/0,1 SDS a unos 37 °C o 42 °C (condiciones de hibridación); 0,5 x SSC/0,1% SDS a temperatura ambiente (condiciones de lavado de baja rigurosidad); 0,5 x SSC/0,1% SDS a unos 42 °C (condiciones de lavado de rigurosidad moderada). Un ejemplo de condiciones de hibridación de alta rigurosidad es el siguiente: 2 x SSC/0,1% SDS aproximadamente a temperatura ambiente (condiciones de hibridación); 0,5 x SSC/0,1% SDS aproximadamente a temperatura ambiente (condiciones de lavado de baja rigurosidad); 0,5 x SSC/0,1% SDS aproximadamente a 42 °C (condiciones de lavado de rigurosidad moderada); y 0,1 x SSC/0,1% SDS aproximadamente a 65 °C (condiciones de alta rigurosidad).

45 Normalmente, las condiciones de lavado se ajustan para alcanzar el grado de rigurosidad deseado. Así, la rigurosidad de la hibridación puede determinarse, por ejemplo, lavando en una condición particular, por ejemplo, en condiciones de baja rigurosidad o en condiciones de alta rigurosidad, o mediante el uso de cada una de las condiciones, por ejemplo, durante 10-15 min cada una, en el orden indicado anteriormente, repitiendo cualquiera o todos los pasos indicados. Las condiciones óptimas para la hibridación selectiva variarán en función de la reacción de hibridación

50 concreta de que se trate, y pueden determinarse empíricamente.

Una vez que se ha clonado un ácido nucleico que codifica una proteína CD83 natural, el dominio extracelular puede determinarse comparando el dominio extracelular de moléculas CD83 conocidas con el de la secuencia CD83 clonada. Una forma soluble de una proteína CD83 natural dada puede expresarse entonces de forma recombinante mediante el uso de las técnicas aquí descritas. Por ejemplo, puede producirse un ácido nucleico que codifique una forma soluble

55 de CD83, insertarse en un vector y transformarse en células hospedadoras procariotas o eucariotas mediante técnicas bien conocidas descritas en la presente memoria descriptiva y conocidas además en la técnica (Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989).

Así, al clonar en sistemas bacterianos, pueden utilizarse promotores constitutivos como T7 y similares, así como promotores inducibles como pi, del bacteriófago X, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac). Cuando se clona en sistemas celulares de mamíferos, pueden utilizarse promotores constitutivos como SV40, R.SV, CMV, incluido CMV-IE, y similares, o promotores inducibles derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, el promotor de la metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, la repetición terminal larga del virus del tumor mamario de ratón; el promotor tardío del adenovirus). También pueden utilizarse promotores producidos por medio de ADN recombinante o técnicas sintéticas para facilitar la transcripción de las secuencias de ácido nucleico de la invención.

Pueden diseñarse sistemas de expresión en mamíferos que utilicen virus recombinantes o elementos virales para dirigir la expresión. Por ejemplo, cuando se utilizan vectores de expresión de adenovirus, el ácido nucleico de interés puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Como alternativa, puede utilizarse el promotor 7.5K del virus vaccinia.

De particular interés son los vectores basados en el virus del papiloma bovino (VPB) que tienen la capacidad de replicarse, como elementos extracromosómicos. Poco después de la entrada de un vector extracromosómico en células de ratón, el vector se replica hasta alcanzar entre 100 y 200 copias por célula. Dado que la transcripción del ADNc insertado no requiere la integración del plásmido en el cromosoma del huésped, se produce un alto nivel de expresión. Estos vectores pueden utilizarse para la expresión estable incluyendo un marcador seleccionable en el plásmido, tal como el gen neo, por ejemplo. Alternativamente, el genoma retroviral puede modificarse para su uso como vector capaz de introducir y dirigir la expresión del ácido nucleico de interés en células huésped. También puede lograrse una expresión de alto nivel mediante el uso de promotores inducibles, incluidos, entre otros, el promotor de la metalotioneína RA y los promotores del choque térmico.

En levadura, pueden utilizarse varios vectores que contengan promotores constitutivos o inducibles, por ejemplo pPIC9K. Puede utilizarse un promotor constitutivo de levadura como ADH o LEU2 o un promotor inducible como GAL. Alternativamente, los vectores que facilitan la integración de secuencias de ácido nucleico extrañas en un cromosoma de levadura, a través de la recombinación homóloga, por ejemplo, son conocidos en la técnica y pueden utilizarse.

Un ácido nucleico de interés que codifica una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas CD83 para su uso según la presente invención puede insertarse en un vector de expresión para expresión in vitro (por ejemplo, usando ensayos de transcripción/traducción in vitro o kits disponibles comercialmente), o puede insertarse en un vector de expresión que contiene una secuencia promotora que facilita la transcripción y/o traducción en procariontes o eucariotas (por ejemplo, una célula de insecto) por medio de transferencia de un ácido nucleico apropiado a una célula adecuada. Una célula en la que puede propagarse un vector y transcribirse su ácido nucleico, o expresarse el polipéptido codificado, se denomina en la presente memoria descriptiva "célula huésped".

El término también incluye cualquier progenie de la célula huésped en cuestión. Además, un ácido nucleico de interés según la presente invención puede insertarse en un vector de expresión para su expresión in vivo para terapia génica somática. Con estos vectores, por ejemplo, vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de expresión de plásmidos, los ácidos nucleicos de la invención se expresan tras la infección/introducción del vector en células específicas como células inmunitarias, células madre, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, así como queratinocitos y otras.

Las células huésped incluyen microorganismos tales como bacterias, levaduras, insectos y mamíferos. Por ejemplo, bacterias transformadas con vectores de expresión de ácido nucleico bacteriófago recombinante, ácido nucleico plásmido o ácido nucleico cósmido que contengan un ácido nucleico de interés; levaduras transformadas con vectores de expresión de levadura recombinante que contengan un ácido nucleico de interés; sistemas celulares vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, Ti) que contengan un ácido nucleico de interés; sistemas celulares de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contengan un ácido nucleico de interés; o sistemas celulares animales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, virus vaccinia) que contengan un ácido nucleico de interés, o sistemas celulares animales transformados diseñados para una expresión estable.

Para la expresión a largo plazo de las formas solubles de los miembros de la familia de proteínas CD83 en células huésped, se prefiere la expresión estable. Así, mediante el uso de vectores de expresión que contengan orígenes virales de replicación, por ejemplo, las células pueden transformarse con un ácido nucleico de interés controlado por elementos de control apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras/ potenciadoras, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación). Opcionalmente, el vector de expresión también puede contener un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable o identificable que confiere resistencia a una presión selectiva, permitiendo así que las células que tienen el vector sean identificadas, cultivadas y expandidas. Alternativamente, el marcador seleccionable puede estar en un segundo vector que se cotransfecta en una célula huésped con un primer vector que contiene un polinucleótido de invención.

Pueden emplearse varios sistemas de selección, entre ellos el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple, el gen de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y los genes de la adenina fosforribosiltransferasa en células

tk-, hgprt o aprt, respectivamente. Además, la resistencia a los antimetabolitos puede utilizarse como base de la selección para el dhfr, que confiere resistencia al metotrexato; el gen gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; el gen de la neomicina, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418; y el gen de la higromicina, que confiere resistencia a la higromicina. Se han descrito genes seleccionables adicionales, a saber, trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano; hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina; y ODC (ornitina descarboxilasa), que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-onitina, DFMO.

Tal y como se utiliza aquí, el término "transformación" significa un cambio genético en una célula tras la incorporación de ADN exógeno a la célula. Así, una "célula transformada" es una célula en la que (o una progenie de la misma) se ha introducido una molécula de ADN mediante técnicas de ADN recombinante.

La transformación de una célula huésped con ADN puede llevarse a cabo por medio de técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, cuando la célula huésped es una eucariota, los procedimientos de transformación del ADN incluyen, por ejemplo, coprecipitados de fosfato cálcico, procedimientos mecánicos convencionales tales como la microinyección, la electroporación, la inserción de un plásmido encapsulado en liposomas y vectores virales. Las células eucariotas también pueden cotransformarse con secuencias de ADN que codifican un ácido nucleico de interés, y una segunda molécula de ADN extraña que codifica un fenotipo seleccionable, como las descritas en la presente memoria descriptiva. Otro procedimiento consiste en utilizar un vector viral eucariota, tal como el virus simio 40 (SV40) o el virus del papiloma bovino, para infectar o transformar transitoriamente células eucariotas y expresar la proteína.

Tras la transformación, la forma soluble de CD83 puede aislarse y purificarse de acuerdo con los procedimientos convencionales. Por ejemplo, el lisado preparado a partir de un huésped de expresión (por ejemplo, bacterias) puede purificarse mediante CLAP, cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad u otra técnica de purificación. También pueden obtenerse proteínas sustancialmente puras mediante síntesis química mediante el uso de un sintetizador de péptidos (por ejemplo, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA; Modelo 430A o similar).

Además, la proteína sCD83 para uso en el aspecto (1) de la presente invención puede ser una estructura dimérica o trimérica de la forma soluble de CD83 como se describe en WO04/046182 y Heilingloh, C.S. et al., JMB J Mol Biol. 429(8): 1227-1243 (2017), respectivamente. Preferentemente, la estructura dimérica o trimérica es un homodímero/trímero. La dimerización/trimerización puede conseguirse por medio de la formación de uno o más enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína presentes en la forma monomérica de la proteína CD83 soluble (que están presentes en aa 12, 27, 35, 100, 107, 129, 163 en SEQ ID NO:2), o por medio de una molécula enlazadora bifuncional (por ejemplo, una diamina, un compuesto de ácido dicarboxílico o similar) que conecte partes funcionales iguales o diferentes (por ejemplo, grupos carboxilo, grupos amino, grupos hidroxilo, grupos mercapto) dentro de la proteína CD83 soluble. p. ej., una diamina, un compuesto de ácido dicarboxílico o similar) que conecta partes funcionales iguales o diferentes (por ejemplo, grupos carboxilo, grupos amino, grupos hidroxilo, grupos mercapto) dentro de la forma monomérica de la proteína CD83 soluble. Esto último también incluye el uso de enlazadores polipeptídicos (por ejemplo, a partir de pequeños residuos de aminoácidos polares como -[(Gly)_xSer]_y- (en el que x es, por ejemplo, 3 o 4 e y es, por ejemplo, 1 a 5)) para producir estructuras diméricas o triméricas que pueden producirse directamente mediante técnicas recombinantes. Particularmente preferente es un homodímero (tal como un homodímero que comprende los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2 o 1 a 130 de SEQ ID NO:8) conectado por medio de un enlace disulfuro entre el quinto residuo de cisteína del CD83 soluble (es decir, el residuo de cisteína correspondiente a aa 129 en SEQ ID NO:2 y aa 114 en SEQ ID NO:8).

La proteína sCD83 para uso en la presente invención también incluye derivados de formas solubles de miembros de la familia de proteínas CD83 según la invención como se ha mencionado anteriormente en los que se ha añadido, suprimido, sustituido, insertado o invertido uno o más aminoácidos siempre que estos derivados sigan siendo solubles como se ha definido anteriormente y sean capaces de exhibir una función curativa. También incluye variantes de empalme de los compuestos CD83 mencionados anteriormente.

Las adiciones particularmente preferidas son aquellas en las que la proteína CD83 soluble tal como se define anteriormente tiene uno o más residuos de aminoácidos derivados del dominio intracelular vecino en su C-terminal, preferentemente la proteína CD83 soluble comprende los residuos de aminoácidos 20 a 145 de SEQ ID NO:2; o tiene secuencias funcionales unidas a su N-terminal, preferentemente secuencias funcionales de hasta 10 residuos de aminoácidos, y más preferentemente lleva en el N-terminal los aminoácidos adicionales Gly-Ser-Pro-Gly, o 6HIS.

Cuando se sustituye uno o más aminoácidos de una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas CD83, se prefiere que el uno o más aminoácidos estén sustituidos de forma conservadora. Por ejemplo, las sustituciones conservadoras incluyen sustituciones en las que residuos de aminoácidos alifáticos tales como Met, He, Vai, Leu o Ala se sustituyen entre sí. Asimismo, los residuos de aminoácidos polares pueden sustituirse entre sí, tales como Lys y Arg, Glu y Asp o Gin y Asn. Las mutaciones de sustitución particulares de la proteína sCD83 para su uso en la invención son aquellas, en las que la proteína sCD83 es una proteína CD83 monomérica en la que uno o más de los residuos de cisteína se han sustituido por residuo(s) de aminoácido corto(s) y/o polar(es) igual(es) o diferente(s), tal como se describe en el documento WO04/046182. Preferiblemente los residuos de aminoácidos pequeños y/o polares se seleccionan entre serina, alanina, glicina, valina, treonina, preferentemente es serina. Además, se prefiere que se haya

sustituido un residuo de cisteína, más preferentemente el quinto residuo de cisteína. Lo más preferente es que la proteína CD83 soluble comprenda los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2, donde el residuo de cisteína en la posición 129 ha sido sustituido por un residuo de serina, o los residuos de aminoácidos 1 a 130 de SEQ ID NO: 10. Estas moléculas monoméricas definidas revisten especial importancia para la aplicación farmacéutica.

5 De acuerdo con la invención, los derivados de una proteína CD83 también incluyen derivados en los que uno o más de los aminoácidos de la misma tienen una cadena lateral alterada. Tales polipéptidos derivatizados incluyen, por ejemplo, los que comprenden aminoácidos en los que los grupos amino libres forman hidrocloruros de amina, grupos p-tolueno sulfonilo, grupos carbenzoxi; los grupos carboxilo libres forman sales, ésteres metílicos y etílicos; grupos hidroxilos libres que forman derivados O-acil o O-alquilo, así como derivados naturales de aminoácidos, por ejemplo, 10 4-hidroxiprolina, para la prolina, 5-hidroxilisina para la lisina, homoserina para la serina, ornitina para la lisina. También se incluyen los derivados de aminoácidos que pueden alterar el enlace covalente, por ejemplo, el enlace disulfuro que se forma entre dos residuos de cisteína y que produce un polipéptido ciclizado.

Una proteína sCD83 o un derivado de la misma puede tener un patrón de glicosilación nativo de una molécula CD83 o un patrón de glicosilación alterado, o puede no estar glicosilada, siempre que estas moléculas sean solubles como se ha definido anteriormente y sean capaces de mostrar una función de cicatrización de heridas y/o promover el 15 recrecimiento del cabello.

En una realización preferida, el sCD83 para uso en la presente invención consiste en aminoácidos 20 a aminoácidos 144, más preferentemente aminoácidos 20 a 145, de la proteína CD83 humana según se representa en SEQ ID NO:2 o aminoácidos 1 a 130 de SEQ ID NO:8.

20 El sCD83 para su uso en la presente invención puede consistir en los aminoácidos 22 a 135 de la proteína HB15 de ratón tal como se representa en SEQ ID NO:4.

La sCD83 para uso en la presente invención puede ser una sCD83 humana que consiste en los aminoácidos 8 a 133 de la proteína N6HIS-sCD83 preparada según el Ejemplo 3 a continuación y según se representa en SEQ ID NO: 12.

25 Los ácidos nucleicos para su uso en la cicatrización de heridas (que no forman parte de la presente invención) pueden estar en forma de ADN (ácido desoxirribonucleico) que contiene las bases adenina, timina, guanina y citosina o ARN (ácido ribonucleico) que contiene las bases adenina, uracilo, guanina y citosina o mezclas de ambos.

Cuando la molécula de ácido nucleico para su uso en la cicatrización de heridas se deriva de la proteína CD83 humana, la porción de la región codificante es preferentemente del nucleótido 58 al 432 de la secuencia en SEQ ID NO:1. Alternativamente, la porción de la región codificante va del nucleótido 58 al 435 de la secuencia en SEQ ID NO: 1.

30 Cuando la molécula de ácido nucleico para su uso en la invención se deriva de la proteína HB15 de ratón, la porción de la región codificante es preferentemente de aproximadamente el nucleótido 76 a 418 de la secuencia en SEQ ID NO:3.

Un ácido nucleico que codifica una proteína para su uso según la invención puede insertarse en un vector. El término "vector" se relaciona con un plásmido, virus u otro vehículo conocido en la técnica que puede manipularse mediante 35 la inserción o incorporación de un polinucleótido. Dichos vectores pueden utilizarse para la manipulación genética (es decir, "vectores de clonación") o para transcribir o traducir el polinucleótido insertado ("vectores de expresión"). Por lo general, un vector contiene al menos un origen de replicación para su propagación en una célula y un promotor. Los elementos de control presentes en un vector de expresión, incluidos los elementos de control de la expresión descritos en la presente memoria descriptiva, se incluyen para facilitar la transcripción y traducción adecuadas (por ejemplo, 40 señal de empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traducción del ARNm dentro del marco y codones de parada). El término "elemento de control" pretende incluir, como mínimo, uno o más componentes cuya presencia puede influir en la expresión, y también puede incluir componentes adicionales, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de fusión asociadas.

45 La proteína sCD83 para su uso en la cicatrización de heridas del aspecto (1) de la invención también incluye una "composición médica" con la sCD3 para su uso en la cicatrización de heridas. Tal composición médica puede comprender - aparte de la proteína sCD83 - sales, amortiguadores, portadores, excipientes farmacéuticamente aceptables. También puede comprender uno o más compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

50 La proteína sCD83 o la composición médica con dicha sCD83 para su uso en la cicatrización de heridas del aspecto (1) de la invención comprende, pero no se limita a, la administración sistémica de la sCD83 para el cierre acelerado de heridas cutáneas, incluyendo heridas de difícil cicatrización de ancianos, diabéticos o pacientes bajo medicación inmunosupresora o corticosteroide. También comprende la administración tópica, preferentemente en forma de una solución de sCD83 a base de gel, para el cierre de heridas de lesiones cutáneas, incluidas heridas localmente restringidas, heridas crónicas (heridas difíciles de curar de ancianos, diabéticos o pacientes bajo medicación inmunosupresora o corticosteroide) y heridas inducidas por trasplantes.

55 La discusión proporcionada en la presente memoria descriptiva se aplica igualmente a la proteína sCD83, forma dimérica o trimérica, y/o derivado funcional de la misma, y a la composición que comprende tal proteína sCD83, para

su uso en el crecimiento terapéutico del cabello de los aspectos (2) y (3) de la invención. El crecimiento terapéutico del cabello comprende aplicaciones sistémicas o tópicas de sCD83 tras estrés físico/medicación, enfermedad y/o depilación. Cualquiera de las proteínas sCD83 definidas anteriormente puede utilizarse para aplicaciones tópicas y sistémicas, para aplicaciones sistémicas. La "composición" para uso en el crecimiento terapéutico del cabello puede comprender - aparte de la proteína sCD83, o derivado de la misma, o ácidos nucleicos que la codifiquen - sales, tampones, portadores, excipientes farmacéuticamente aceptables. También puede comprender uno o más compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

Lo expuesto anteriormente se aplica igualmente al procedimiento cosmético no terapéutico para la aceleración del crecimiento del cabello y para el cuidado del cabello del aspecto (4) de la invención, que comprende la aplicación sistémica o tópica de una composición que comprende la proteína sCD83 sobre la piel o el cabello humano o animal. La "composición" utilizada en el procedimiento del aspecto (45) puede comprender - aparte de la proteína sCD83, o derivado de la misma - sales, tampones, portadores y excipientes cosmética/dermatológicamente o farmacéuticamente aceptables, respectivamente. La invención se explica con más detalle por medio de los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Ratones: Se adquirieron ratones hembra C57BL/6 (8-10 semanas de edad) a Charles River Laboratories (Sulzfeld) y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos de acuerdo con las directrices institucionales y nacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Diseño experimental del modelo de cicatrización de heridas: En el día 0, se anestesiaron ratones CD57BL/6 hembra de 8 a 10 semanas de edad y se les indujeron heridas con punzones de 6 mm (pfm medicals). Estas muestras de piel se utilizaron como control del día 0 para los análisis posteriores. En estos experimentos in vivo se incluyeron dos grupos de tratamiento, a saber: (I) proteína sCD83 (II) proteína de fusión sCD83-Fc. Se administró i.p. una dosis diaria de 100 pg de sCD83, 100 pg de sCD83 fusionado al N-terminal de la región Fc de IgG1 humana (denominado sCD83-Fc; Creative Biomart - CD83-150H) o el volumen correspondiente de PBS desde el día 0 hasta el día 7. Antes de puntuar, se retiró la escara y se determinó la superficie de la herida mediante un calibre (longitud y anchura). Las biopsias se obtuvieron mediante sacabocados de 8 mm (pfm medicals) alrededor de la zona de la herida anterior los días 3, 6, 7 y 12, respectivamente, y las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% (PFA) para análisis histológicos, se congelaron en nitrógeno líquido para la extracción de proteínas o se almacenaron en RNA later (Thermo Fisher Scientific) a -80 °C para posteriores análisis de ARN. Para la aplicación tópica de sCD83, se eliminó el vello dorsal por medio de depilación para garantizar una deposición uniforme de la proteína sCD83 estabilizada con hidrogel. Para ello, se anestesió a los ratones, se les retiró la escara y se les aplicó diariamente 50 pg de sCD83-hidrogel.

Diseño experimental del modelo de colitis inducida por DSS: Los ratones hembra C57BL/6, con una edad de 8 a 10 semanas, se dividieron aleatoriamente en tres grupos: grupo control, grupo PBS y grupo sCD83. Cada grupo se subdividió en un máximo de tres grupos más que representaban los distintos momentos de los análisis, es decir, el día 9, el día 16 y el día 22. Los síntomas se indujeron administrando agua del grifo que contenía un 3% de DSS durante 5 d. Además, en los grupos sCD83, cada ratón recibió una inyección intraperitoneal (i.p.) de 100 pg sCD83/d durante 6 d. Por su parte, en los grupos PBS los ratones recibieron inyecciones i.p. de 100 pl PBS/d estériles. El seguimiento clínico incluyó la medición diaria del peso corporal, tras alcanzar los distintos puntos temporales de los análisis, un seguimiento videoendoscópico de alta resolución de la actividad de la colitis en los ratones anestesiados, y la medición de la longitud del colon tras la eutanasia veterinaria de los animales. Se disecaron los animales para utilizar los mLN y el colon para análisis posteriores. Para ello, se fijó una sección de aproximadamente 1 cm de la parte distal del colon en PFA al 4% para la tinción con hematoxilina y eosina (HE), y se evaluó al microscopio óptico. Para el análisis de los parámetros inflamatorios y antiinflamatorios a nivel de ARNm, se congeló un pequeño trozo del segmento de colon subsiguiente, así como los mLN, en solución RNA later mediante el uso de nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80 °C.

Evaluación de la puntuación endoscópica: La gravedad de la colitis se evaluó mediante el uso de un endoscopio en miniatura para la monitorización del colon de alta resolución, como se ha descrito anteriormente (Becker, C. et al., Nat Protoc 1:2900-2904 (2006); Becker, C. et al., Gut 54:950-954 (2005)) y la ayuda del Dr. E. Martini (Departamento de Medicina 1, Hospital Universitario de Erlangen). Se analizó la consistencia de las heces de los ratones, la translucidez de la pared del colon, la vascularidad, la granularidad y el depósito de fibrina. La puntuación global de la gravedad endoscópica osciló entre un mínimo de 0 y un máximo de 15 y se determinó sumando las puntuaciones individuales de los parámetros individuales, cada una de ellas clasificada de 0 a 3. Los animales de control con una puntuación endoscópica global comprendida entre 0 y 3 se consideraron sanos.

Preparación del hidrogel: Los hidrogeles de sCD83 se prepararon por medio de la adición de hidroxietilcelulosa al 4% (p/v) (Natrosol® 250 HX Pharm; Caelo) a soluciones de sCD83. La hidroxietilcelulosa se dispersó en la superficie de las soluciones acuosas sCD83 y se dejó gelificar durante la noche. Las muestras simuladas (PBS) se prepararon de forma idéntica. Además, también podrían utilizarse potenciadores de la penetración química (PPQ). Extracción de células de biopsias cutáneas: Se aislaron biopsias de 8 mm en los días 3 y 6, se cortaron en trozos pequeños con un

bisturí quirúrgico y se transfirieron a un tubo de 1,5 ml que contenía 1 ml de DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific), y se mezclaron con Liberase TL (Sigma Aldrich) en una concentración final de 0,26 WU/ml. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y 700 rpm en un incubador con agitación. Después, la suspensión se filtró a través de un colador de células de 70 µm mediante el uso de la parte posterior de un émbolo de jeringa de 5 ml. El colador se enjuagó con 5 ml de DMEM/F12 y el flujo se centrifugó durante 5 min (300 g a 4 °C). Tras un lavado adicional con 5 ml de PBS (5 min, 300 g a 4 °C), el pellet se resuspendió en 1 ml de PBS, se filtró a través de un colador celular de 35 µm y se utilizó para la posterior tinción de superficie para citometría de flujo.

Aislamiento de proteínas a partir de tejido cutáneo: Las proteínas se aislaron a partir de biopsias de piel murina, que se cortaron con un bisturí quirúrgico en pequeños trozos. A continuación, el tejido cutáneo se transfirió a tubos de lisis innuSPEED W (Analytic Jena), se trató con 40 mg/ml de amortiguador de lisis (10% de glicerina, 2 mM de EDTA, 137 mM de NaCl, 50 mM de Tris, 0,5% de NP40, PMSF, NaFIM, NasVCU) y se trituró mediante el uso del SpeedMill PLUS (Analytic Jena), hasta homogeneizar el tejido. Después, los lisados se centrifugaron (16.000 g, 3 min, 4 °C) y se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 ml. Tras una segunda etapa de centrifugación (16.000 g, 20 min, 4 °C), se recogieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteínas mediante BCA siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific).

Análisis de Western blot: Los lisados de proteínas se desnaturalizaron en amortiguador Laemmli reductor (95 °C, 5 min), se separaron por medio de SDS PAGE al 10 % y se cubrieron con una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare). La membrana se bloqueó en 1x Rotiblock (Carl Roth) y posteriormente se cubrió con los siguientes anticuerpos primarios: conejo-anti-Vimentina (clon D21H3, Cell Signaling) y ratón-anti-[3-Actina (clon AC-74, Sigma), diluidos 1:1000 en 1x Rotiblock e incubados durante la noche a 4 °C. Después se lavaron las membranas y se añadió el anticuerpo secundario marcado con HRP apropiado (diluido 1:5000 en 1x Rotiblock). A continuación, se lavaron las membranas y se añadió el anticuerpo secundario marcado con HRP apropiado (diluido 1:5000 en 1x Rotiblock). Las señales se detectaron con el reactivo ECL Prime Detection (GE Healthcare) y se cuantificaron digitalmente con el programa ImageJ.

Citometría de flujo: Las muestras celulares de biopsias cutáneas se centrifugaron durante 3 min (500 g a 4 °C) y el sedimento celular se resuspendió en 50 µl de PBS (suplementado con 1 mM de EDTA), que contenía anticuerpos acoplados con fluorescencia contra CD45 (PerCP (clon 30-F11)), CD3 (BV421 (clon 17A2), CD11b (PE-Cy7 (clon MI/70), B220 (PE (clon RA3-6B2), F4/80 (FITC (clon BM8), Ly6C (APC-Cy7 (clon HK1.4), Ly6G (APC (clon 1A8) y VIVO/MUERTO Fixable Aqua MUERTO Cell stain (Thermo Fisher Scientific). Todos los anticuerpos (excepto B220, de BD) se adquirieron en BioLegend. Tras incubar durante 30 min a 4 °C, las células se lavaron con 500 µl de PBS (500 g, 3 min a 4 °C), se resuspendieron en 100 µl de PBS y se evaluaron con un citómetro de flujo FACSCantoII (BD).

Extracción de ARN, síntesis de ADNc y análisis de qPCR (para el ejemplo 1): Las biopsias se recogieron y almacenaron en RNA later (Thermo Fisher Scientific) a -80 °C. Para el aislamiento del ARN, las muestras se descongelaron suavemente en hielo y se homogeneizaron en 400 µl de amortiguador RLT (suplementado con 1% de p-mercaptoetanol), mediante el uso de innuSPEED Lysis Tube I y SpeedMill PLUS (ambos de AnalytikJena). Después de tres pasos de homogeneización, cada uno de 20 s con 5 min de enfriamiento a -20 °C, la suspensión se centrifugó durante 3 min a 16.000 g y el sobrenadante se recogió para la extracción de ARN mediante el uso del RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante.

La síntesis de ADNc se realizó de acuerdo con el manual del kit de síntesis de ADNc de primera cadena (Thermo Fisher). La proteína ribosómica L4 se utilizó como gen de mantenimiento. La reacción y la cuantificación se realizaron con el CFX96 Touch (Bio-Rad). Las secuencias de nucleótidos de los pares de cebadores murinos figuran en la tabla siguiente.

Nombre	Hacia adelante (SEQ ID NO)	Inverso (SEQ ID NO)
IL-17A	TCCAGAAGGCCCTCAGACTA (13)	AGCATC1 1 C1 CGACCCTGAA (14)
FoxP3	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT (15)	CCTTGCCI 1 ICICATCCAGGA (16)
RANKL	CAGCCATTTGCACACCTCAC (17)	CCCGATGTTTCATGATGCCG (18)
TNF-a	GTGATCGGTCCCCAAAGGG (19)	CCAGCTGCTCCTCCACTTG (20)
IL-1p	TGCCACCI 1 1 IGACAGTGATG (21)	ATGTGCTGCTGCGAGATTTG (22)
Rpl4	GCTGAACCCCTACGCCAAGA (23)	TCTCGGATTTGGTTGCCAGT (24)
IFN-γ	GCTTTGCAGC1 C1 1 CCTCAT (25)	GTCACCATCC IIII GCCAGT (26)
IL-10	CCAAGCCTTATCGGAAATGA (27)	IIII CACAGGGGAGAAATCG (28)
TGFp	TGGAGCAACATGTGGAACCTA (29)	AGACAGCCACTCAGGCATATC (30)
IFN-γ	GCTTTGCAGCI 1 CCTCAT (31)	GTCACCATCC111 1 GCCAGT (32)
IL-6	ACAAAGCCAGTCCTTCAGAG (33)	GAGCATTGGAAATTGGGGTAGG (34)
Cox2	GCTGTACAAGCAGTGGCAAA (35)	CCCCAAAGATAGCATCTGGA (36)
CCL2	GAGAGCTACAAGGATCACC (37)	GATCTCATTTGGTTCCGATCC (38)

Chi3	GACTTGCGTGACTATGAAGC (39)	TGAATATCTGACGGTTCTGAGG (40)
VEGF	ACATTGGCTCACTTCCAGAAACA (41)	GGTTGGAACCGGCATCTTTATC (42)
IPLS	GGCC IIIi ACC 1 FTCACGGTG (43)	TACGGCATTGTGGCTTCTCAA (44)

Histología: Para la preparación de muestras de tejido de piel y colon para histología

5 Para los análisis, se obtuvieron biopsias de piel en forma de sacabocados de 8 mm (pfm medicals) alrededor de la zona de la antigua herida los días 3, 6 y 7, respectivamente, y las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% (PFA) para los análisis histológicos. Las muestras de colon pequeño se prepararon cortando aproximadamente 0,5 cm de la parte distal del colon, después se fijaron en PFA al 4% a temperatura ambiente durante toda la noche y se lavaron en PBS. Después, se sometieron a un proceso de deshidratación por medio de concentraciones crecientes de alcohol y a una última etapa de incubación con acetona. A continuación, las muestras colónicas se embebieron en parafina y se prepararon secciones de tejido cortando rebanadas de 1 pm a 5 pm de espesor con el micrótomo, se colocaron en portaobjetos revestidos, se secaron y se almacenaron a temperatura ambiente para posteriores procedimientos de tinción.

El procedimiento de tinción histológica de las estructuras tisulares del colon y de las muestras de piel con hematoxilina y eosina de Mayer (H&E) se realizó del siguiente modo:

15 Para la eliminación completa de la parafina, las secciones se incubaron inicialmente a 60 °C durante toda la noche y posteriormente se lavaron en xilol (2 veces durante 2-5 min). A continuación, las secciones se sometieron a un proceso de rehidratación por medio de concentraciones decrecientes de alcohol y a una etapa final de lavado. Para la tinción de las estructuras tisulares basófilas, las secciones se incubaron en hematoxilina recién filtrada, seguida de la incubación en solución de eosina-g (1 g de eosina en 100 ml de agua VE y 1 gota de ácido acético glacial), para teñir las estructuras tisulares eosinofílicas. Después de cada paso de tinción, las secciones se enjuagaron en agua corriente del grifo, para eliminar el exceso de colorante. Por último, las secciones se deshidrataron, se montaron en entellan (Merck) y se endurecieron durante la noche.

25 Evaluación de la tinción de H&E: El grado de daño tisular intestinal se evaluó mediante secciones colónicas teñidas con H&E. Se analizaron bajo el microscopio óptico tres secciones colónicas consecutivas en relación con parámetros específicos clínicamente relevantes. Los parámetros considerados fueron los siguientes: engrosamiento de la pared del colon, destrucción de la arquitectura del tejido intestinal, destrucción del epitelio de la mucosa, infiltración de leucocitos y agotamiento de las células caliciformes. Los diferentes parámetros se evaluaron mediante apreciación óptica y los 4 primeros parámetros se clasificaron entre 0 y 3, mientras que el agotamiento de las células caliciformes se clasificó entre 0 y 1. La puntuación histológica global se determinó sumando las puntuaciones individuales de cada parámetro.

30 Análisis estadístico: Todos los datos se expresan como media \pm SEM. La significación estadística se calculó por medio de la prueba t múltiple no apareada ($n = 3$) o la prueba U de Mann-Whitney ($n > 3$) para la distribución no paramétrica. Los datos agrupados se analizaron por medio de ANOVA de una o dos vías. Todos los cálculos se realizaron con GraphPad Prism 7 (GraphPad). Los valores $p < 0,05$ se consideraron significativos.

35 Montaje experimental para los experimentos de crecimiento del cabello: Se adquirieron ratones hembra C57BIV6 (7 semanas de edad) a Charles River Laboratories (Sulzfeld) y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos de acuerdo con las directrices institucionales y nacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

40 Eliminación mediante afeitado: Se eliminó el pelo dorsal del cuello de ratones C57BL/6 de 7 w de edad hembra mediante el uso de una maquinilla de afeitar. Se aplicó una dosis diaria de 100 pg de sCD83 i.p. desde el día 1 durante un periodo de cuatro semanas. Al final del experimento, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron biopsias de piel dorsal con sacabocados de 8 mm.

Eliminación por depilación: Se eliminó por depilación el pelo dorsal del cuello de ratones C57BL/6 de 7 w de edad. Se aplicó una dosis diaria de 100 pg de sCD83 i.p. cada dos días, desde el día 2 hasta el día 14. Al final del experimento, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron biopsias de piel dorsal con sacabocados de 8 mm.

45 Análisis de pestañas: sCD83 (7,5 pg) se administró tópicamente en gotas tres veces al día en ratones C57BL/6 hembra de 7 w de edad, durante un periodo de 14 días. Después del día 14, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los párpados fueron retirados y almacenados en EtOH al 70% para la cuantificación del número de pestañas mediante el uso de un microscopio.

50 Extracción de ARN, síntesis de ADNc y análisis de oPCR (para el ejemplo 2): Las biopsias se recogieron y almacenaron en RNA later (Thermo Fisher Scientific) a -80 °C. Para el aislamiento del ARN, las muestras se descongelaron suavemente en hielo y se homogeneizaron en 400 pl de amortiguador RLT (suplementado con 1% de g-mercaptoetanol) mediante el uso de innuSPEED Lysis Tube I y SpeedMill PLUS (ambos de AnalytikJena). Tras tres etapas de homogeneización, cada uno de 20 s con 5 min de enfriamiento a -20 °C, la suspensión se centrifugó durante

3 min a 16.000 g y se recogió el sobrenadante para la extracción de ARN con el RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) según el protocolo del fabricante. La síntesis de ADNc se realizó de acuerdo con el manual del First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). La proteína ribosómica L4 se utilizó como gen de mantenimiento. La reacción y la cuantificación se realizaron con un CFX96 Touch (Bio-Rad). Las secuencias de nucleótidos de los pares de cebadores son las indicadas en la sección correspondiente.

Cartografía multiepitopo-ligando (CMEL): La técnica histológica CMEL se ha aplicado como se ha descrito anteriormente (Eckhardt, J. et al., *J Histochem Cytochem* 61:125-133 (2013)). Brevemente, las biopsias de piel de 6 mm se almacenaron en Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura) a -80 °C. Se prepararon portaobjetos de 5 pm mediante el uso del dispositivo Cryotome™ y la etapa de fijación se realizó en acetona durante 10 min a -20 °C. Se dejó secar la muestra, antes de eliminar el tissue-tek® residual con EtOH al 70% y se rodeó la muestra de tejido con un anillo de silicona y se lavó en PBS. El procedimiento de tinción se realizó mediante el uso de anticuerpos acoplados con fluorescencia contra Foxp3 (PE), CD4 (PE), CD3e (FITC), CD45 (FITC) y citoqueratina-14 (FITC). El yoduro de propidio se utilizó como marcador VIVO-MUERTO. Los datos se adquirieron con un microscopio de fluorescencia de campo amplio invertido y se evaluaron con el software Image J.

Ejemplo 1

A. La administración sistémica de sCD83 favorece la cicatrización de heridas cutáneas: Se indujeron heridas en ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad mediante el uso de punzones de biopsia de piel de 6 mm y se evaluó el área de la herida con un calibre los días 0, 3, 6, 7 y 12. El porcentaje de cierre de la herida se determinó en relación con el valor inicial del día 0. Los ratones tratados con sCD83 (i.p.) mostraron un cierre de la herida significativamente mayor en los días 3 y 6 en comparación con los controles simulados (Fig. 1 A y B). Estas evaluaciones ópticas fueron respaldadas por análisis Western blot específicos de vimentina y una cuantificación posterior (en relación con el control p-actina). Como se muestra en la Fig. 1 C (lado izquierdo), la reconstitución de la vimentina se aceleró en los ratones tratados con sCD83, lo que se asocia a una reparación tisular avanzada y al cierre de la herida. Además, la vimentina es considerada como una reguladora de la proliferación de fibroblastos y de la diferenciación de queratinocitos (Cheng, F. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E4320-4327 (2016)), ambos componentes celulares esenciales de la fase de remodelación.

Los análisis de la composición celular dentro de la zona de la herida en los días 3 y 6 por medio de citometría de flujo (Fig. 1 D) revelaron que los granulocitos neutrófilos representan la fracción mayoritaria de células CD45+ en los ratones tratados con sCD83- y con simulacro. Notoriamente, los neutrófilos desempeñan un papel crucial durante la cicatrización de heridas por tres medios: (I) la eliminación de restos, (II) la secreción de factores de crecimiento (por ejemplo, VEGF-A) y (III) la transición hacia la resolución de la inflamación, que está mediada por la inducción de MAA y la posterior producción de citoquinas antiinflamatorias, como la IL-10 (Wang, J., *Cell Tissue Res* 371:531-539 (2018)). La aplicación de sCD83 no tuvo ningún impacto detectable en la distribución celular el día 3. Sin embargo, la disminución del número de células neutrófilas de los ratones tratados con sCD83 se aceleró ligeramente el día 6 en comparación con los controles simulados (Fig. 1 D; día 6). Por el contrario, las muestras del día 6 de ratones sCD83 revelaron un número significativamente mayor de linfocitos B, que no eran detectables en el día 3. De acuerdo con los datos comunicados por Sirbulescu et al., la presencia de células B maduras contribuye positivamente a acelerar la cicatrización de heridas agudas y crónicas (Sirbulescu, R.F. et al., *Wound Repair Regen* 25:774- 791 (2017)). Asimismo, las frecuencias de células T aumentaron significativamente en las biopsias de heridas de los ratones tratados con sCD83. Por último, se detectó una tendencia al aumento de las frecuencias de monocitos y macrófagos en las biopsias de heridas del día 6 de los ratones tratados con sCD83 (Fig. 1 D).

Curiosamente, aunque no se detectaron diferencias en los niveles celulares de las muestras del día 3 de los ratones tratados con sCD83 y con simulacro, los análisis de ARN revelaron una modulación de numerosas citoquinas relacionadas con la cicatrización de heridas (Fig. 2). Las citocinas proinflamatorias, como la IL-1(3 y la TN Fa, aumentaron notablemente en los ratones tratados con sCD83 dentro de la fase inflamatoria en el día 3. Además, el VEGF aumentó ligeramente el día 3. Por el contrario, la expresión de IL-10 alcanzó su máximo el día 6 en los ratones tratados con sCD83, acelerando así la transición hacia la resolución de la inflamación y la fase de proliferación. Estos datos apoyan aún más nuestra hipótesis de que sCD83 induce la secreción de IL-10 por los MAA. Curiosamente, la expresión del inhibidor de la proteasa leucocitaria secretora (IPLS) aumentó drásticamente en los ratones tratados con sCD83 el día 3 y moderadamente el día 6 (Fig. 2). De acuerdo con Ashcroft et al., IPLS participa en el control de la inflamación excesiva y, por tanto, es un mediador importante para la transición hacia la resolución de la inflamación y la regeneración tisular (Ashcroft, G.S. et al., *Nat Med* 6:1147-1153 (2000)).

B. La aplicación tópica de sCD83 también induce el cierre de la herida: La administración sistémica de fármacos puede conllevar varios inconvenientes en comparación con la administración tópica local. Por un lado, no se puede garantizar la administración de una concentración de fármaco prevista en el lugar específico de interés, por lo que se requiere una dosis mayor de medicamento. Por otra parte, la administración sistémica de fármacos puede dar lugar a efectos inesperados fuera del objetivo, interacciones celulares/ moleculares no deseadas que posteriormente podrían dar lugar a complicaciones adversas y efectos secundarios no deseados (Wen, H. et al., *AAPS J* 17:1327-1340 (2015)). Así pues, para evaluar los posibles efectos tópicos curativos del sCD83, este se estabilizó en un hidrogel de hidroxietilcelulosa. Para garantizar una dosificación uniforme de este hidrogel sCD83-, se eliminó el vello dorsal mediante depilación. En estos experimentos in vivo se incluyeron tres grupos de tratamiento, a saber: (I) aplicaciones

tópicas de sCD83-hidrogel o (II) de solución salina-hidrogel y (III) una aplicación sistémica de sCD83, como control positivo. Tal y como se esperaba y se muestra en la Fig. 3 A y B, el cierre de la herida se aceleró de nuevo de forma significativa en los ratones tratados sistémicamente con sCD83 el día 3 y el día 6. Curiosamente, en el día 3, la cicatrización de la herida también mejoró significativamente con la administración tópica de sCD83 y, en el día 6, los ratones tratados tópicamente alcanzaron un cierre de la herida comparable al del grupo tratado sistémicamente. Estos datos representan la primera prueba de que la administración tópica de sCD83 induce efectivamente un cierre acelerado de los vasos sanguíneos.

Las tinciones H&E representativas de biopsias cutáneas del día 8 demuestran una arquitectura cutánea restaurada en el grupo sistémico, pero también en el grupo tratado tópicamente con sCD83 (Fig. 3 C). Sólo la regeneración capilar, representada por el aumento de la capa de grasa que incluye numerosos folículos pilosos, seguía en curso en el grupo tópico. Por el contrario, en este punto temporal concreto, se detectó tejido de granulación en los ratones tratados con simulacro, lo que se asocia con un proceso de cicatrización de heridas en curso y retrasado. Por último, para analizar la estabilidad de sCD83 dentro del hidrogel de hidroxietilcelulosa, se realizaron análisis de Western blot y, como se muestra en la Fig. 3 D, la molécula de sCD83 fue estable durante al menos 10 d a 4 °C. Esto indica que sCD83 podría aplicarse tópicamente mediante el uso de tales geles de celulosa. Esto, por supuesto, es de gran interés para el desarrollo y la aplicación práctica de sCD83 en futuros ensayos clínicos.

C. La CD83 soluble acelera la recuperación de la colitis inducida por DSS y acelera los procesos de curación epitelial:

Aquí nos centramos en la investigación detallada de si y cómo sCD83 modula la inflamación intestinal aguda e induce procesos de cicatrización de heridas intestinales tal y como ocurren en patologías de EII. Para ello, utilizamos el modelo murino DSS-colitis, por el que se sabe que el DSS causa lesiones en la mucosa, así como inflamación del colon acompañada de la destrucción de la barrera colónica que conduce a heridas intestinales (Kiesler, P. et al., *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1:154-170 (2015); Neurath, M.F., *Mucosal Immunol* 7:6-19 (2014); Wirtz, S. et al., *Nat Protoc* 12:1295-1309 (2017)).

Se estableció una inflamación aguda del intestino del colon en ratones C57BIV6 de 10 a 12 semanas de edad, provocándoles una dosis de DSS al 3%, añadida al agua del grifo, durante un periodo de 5 días. Simultáneamente, los ratones recibieron una inyección i.p. de sCD83 o PBS durante un periodo de 6 días. Tras la fase de desafío, se inició la fase de recuperación sustituyendo el agua del grifo suplementada con DSS por agua del grifo normal. Además, un grupo de control no recibió ni DSS ni ningún otro régimen de tratamiento. Al evaluar la pérdida media diaria de peso, se hizo evidente que los animales tratados con sCD83 mostraban una mejor recuperación de peso durante la fase de recuperación, a partir del día 10, en comparación con los animales tratados con PBS. Es importante destacar que los ratones que recibieron sCD83 alcanzaron su peso inicial al final del experimento, mientras que el grupo PBS seguía mostrando una pérdida de peso, en comparación con su peso inicial (Fig. 4 A). Para investigar los posibles efectos mediados por sCD83 sobre los procesos de cicatrización en la mucosa intestinal, se evaluaron diferentes puntos temporales (d 9, d 16, d 22). Curiosamente, la mejor recuperación de los síntomas de colitis, en los ratones tratados con sCD83, fue evidente a nivel macroscópico, ya que se redujo el acortamiento del colon (Fig. 4 B). Durante la fase principal de recuperación (es decir, el día 16), se observó un ligero aumento de la longitud del colon en los ratones tratados con sCD83 (6,34 cm \pm 0,17 cm), en comparación con los ratones tratados con PBS (5,91 cm \pm 0,20 cm), que fue aún más claro en la fase final de recuperación (es decir, el día 22) (Fig. 1 B). Los datos relativos a una mejor cicatrización de la herida durante la fase de recuperación fueron corroborados por la endoscopia de alta resolución (Fig. 4 C). En el día 16, se observó una recuperación significativamente mejor de las manifestaciones de colitis en los ratones tratados con sCD83, caracterizada por una puntuación endoscópica media de la enfermedad reducida de 7,00 \pm 0,82, en comparación con los animales tratados con PBS que tenían una puntuación endoscópica media de la enfermedad de 10,14 \pm 0,54. En consonancia con los hallazgos macroscópicos descritos anteriormente, la evaluación histológica de muestras colónicas teñidas con H&E (d 9, d 16) proporcionó pruebas claras de que el tratamiento con sCD83 tuvo un efecto mejorador el día 16, durante la fase de recuperación de la colitis inducida por DSS (Fig. 4 D, E). En este punto temporal, los animales tratados con sCD83 mostraron una clara reducción del número de leucocitos infiltrantes, así como una mejor restitución de la barrera epitelial y de toda la arquitectura de la mucosa colónica (Fig. 4 D).

A continuación, se analizaron los perfiles de expresión de ARN de diferentes citocinas inflamatorias, tales como IFN- γ , IL-1 β , IL-6 y TNF- α , en el tejido colónico de ratones tratados con sCD83. Estas investigaciones revelaron un claro aumento de los procesos inflamatorios dentro de la fase de recuperación inicial en el día 9, cuando se aplicó sCD83 (Fig. 5 A). En consonancia con estos resultados, también factores que se sabe que median efectos beneficiosos en los procesos de cicatrización de heridas intestinales, tales como IL-17A, Cox2, CCL2, y YM-1 (gen Cha3), fueron significativamente regulados al alza en el tejido colónico de ratones tratados con sCD83 durante la fase de recuperación inicial (Fig. 5 A). Curiosamente, durante la fase principal de recuperación en el día 16, se observaron niveles de expresión de IL-1 β significativamente reducidos, en los animales tratados con sCD83 (Fig. 5 B). Se observó una tendencia a la reducción de los niveles de expresión de todos los demás transcritos.

D. Discusión - El sCD83 potencia la fase de inflamación de la cicatrización de heridas cutáneas: Numerosos grupos han señalado el potencial modulador de la sCD83 en términos de enfermedades autoinmunes y experimentos de trasplante. La administración de sCD83 mejora la progresión de la enfermedad en modelos autoinmunes murinos, por ejemplo EAE, LES, EII y AIA (Royzman, D. et al., *Front Immunol* 10:633 (2019); Zinser, E. et al., *J Exp Med* 200:345-351 (2004); Eckhardt, J. et al., *Mucosal Immunol* 7:1006-1018 (2014); Starke, C. et al., *Immunobiology* 218:1411-1415

(2013)). De forma análoga, el sCD83 ha mejorado significativamente la supervivencia del injerto en modelos de trasplante de córnea, corazón, riñón y piel (Ge, W. et al., *Transplantation* 90:1145-1156 (2010); Xu, J.F. et al., *Transpl Int* 20:266-276 (2007); Lan, Z. et al., *Transplantation* 90:1278-1285 (2010)). Mecánicamente por la inducción mediada porIDO de la diferenciación y proliferación de Treg [30]. En el presente estudio informamos por primera vez de los sorprendentes efectos del tratamiento con sCD83- en la cicatrización de heridas cutáneas e intestinales.

La cicatrización de las heridas cutáneas mejoró significativamente en los ratones tratados sistémicamente con sCD83, lo que se acompañó de un aumento de la deposición de vimentina dentro de los punches de 8 mm el día 3 y el día 6. Por un lado, la vimentina es un filamento intermedio que se expresa principalmente en las células madre mesenquimales y, por lo tanto, mejora la reconstitución de la zona de la herida (Walker, J.L. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 107:13730-13735 (2010)). Por otro lado, la vimentina proporciona estímulos cruciales para la proliferación de fibroblastos y la diferenciación de queratinocitos; potenciando así aún más las capacidades de curación del tejido cutáneo en el curso de la reepitelización y remodelación (Cheng, F. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E4320-4327 (2016)).

El día 6, pero no el día 3, se detectó una composición celular diferente entre los ratones tratados con sCD83 y los tratados con simulacro. Se observó una acumulación prominente de células B B220+ en ratones tratados con sCD83 y, aunque se sabe poco sobre el papel de las células B durante el curso de la cicatrización de heridas, se ha informado de que el cierre de heridas se acelera en presencia de células B maduras (Sirbulescu, R.F. et al., *Wound Repair Regen* 25:774-791 (2017)). Además, la presencia de células CD3+T en el día 6 se asocia con una mayor regeneración tisular, por ejemplo, a través de la secreción de IL-22, en particular por Th17 (Brockmann, L. et al., *Int J Mol Sci* 18 (2017)). Cabe destacar que la expresión de IL-17A aumentó en el tejido colónico de los ratones DSS tratados con sCD83 en el día 9, lo que indica efectos mejoradores de sCD83 a través de respuestas inmunitarias mediadas por Th17. A este respecto, es importante saber que, en marcado contraste con los trastornos inflamatorios autoinmunes, en los que la patogénesis se basa en una actividad excesiva de las células T y en la secreción de citocinas (McInnes, I.B. y Schett, G., *N Engl J Med* 365:2205-2219 (2011)), una regulación al alza temporal de los mediadores proinflamatorios es crucial para el cierre adecuado de las heridas (Hubner, G. et al., *Cytokine* 8:548-556 (1996)). En términos generales, la cicatrización de las heridas se inicia con una fuerte inflamación local que, representada por el aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias, se ve notablemente potenciada en los ratones tratados con sCD83. En este sentido, la IL-1p y el TNF a desempeñan un papel fundamental en el curso de la cicatrización de heridas y su bloqueo, ya sea por medio de knockout o depleción, da lugar a un deterioro de la fase de inflamación y a una eliminación deficiente de los agentes infecciosos (Ritsu, M. et al., *J Dermatol & Dermatologic Surgery* 21:14-19 (2017); Ishida, Y. et al., *J Immunol* 176:5598-5606 (2006)). Además, se ha descrito que el aumento observado de la secreción de IPLS en ratones tratados con sCD83 está asociado a propiedades antimicrobianas y a la mejora de la inflamación excesiva (Jin, F.Y. et al., *Cell* 88:417-426 (1997)). Los experimentos de knockout de IPLS revelaron un cierre de la herida drásticamente deteriorado debido a una resolución deficiente de la inflamación y a la cronificación de la herida (Ashcroft, G.S. et al., *Nat Med* 6:1147-1153 (2000)). Sin embargo, el papel principal del IPLS reside en la inhibición de la actividad de la elastasa en la transición a las fases de proliferación / remodelación, ya que la actividad excesiva de la proteasa se asocia con complicaciones relacionadas con la edad en la cicatrización de heridas (Herrick, S. et al., *Lab Invest* 77:281-288 (1997)).

Por lo tanto, nuestra hipótesis es que la administración de sCD83 anula este ajuste relacionado con la edad y restaura las capacidades de cicatrización, por ejemplo, en pacientes ancianos o diabéticos, al menos temporalmente.

Curiosamente, aunque el tratamiento con sCD83 se mantuvo hasta el final del experimento, la expresión de citocinas proinflamatorias disminuyó hacia el día 6, lo que indica una modulación múltiple regulada y a largo plazo por sCD83 a lo largo del proceso de cicatrización, y no se basa simplemente en potenciar la expresión de IL-1p y TNF a. Esta modulación crítica por sCD83 se ve apoyada además por la inducción retardada de IL-10 en el día 6, que representa la inducción de macrófagos activados alternativamente y la subsiguiente transición hacia la proliferación y la reepitelización. Lo más probable es que el cambio hacia los MAA estuviera mediado por el proceso de aclaramiento de neutrófilos apoptóticos, que inicia un denominado "programa de proresolución de avance" en los macrófagos y la posterior producción de IL-10 (Wang, J., *Cell Tissue Res* 371:531-539 (2018)). Por último, el ligero aumento de los niveles de VEGF puede contribuir positivamente a la angiogénesis y al suministro suficiente de oxígeno y nutrientes a la zona de la herida, ya que la desnutrición de la zona de la herida se asocia a un retraso en el cierre de la herida, por ejemplo en pacientes de edad avanzada (Sgonc, R. y Gruber, J., *Gerontology* 59:159-164 (2013)).

Todos estos datos indican que la función de sCD83 no depende únicamente de una activación/modulación única a nivel de una sola célula, sino que modifica la cicatrización de heridas mediante pasos multifactoriales. Inicialmente, estimula la fase inflamatoria y, por tanto, la eliminación bacteriana sin alterar la cinética natural de cicatrización de las heridas. Aquí vemos una profunda ventaja de nuestra sCD83-terapia en comparación con los medicamentos comúnmente utilizados (algunos de ellos inmunosupresores), ya que la cicatrización de heridas es un proceso estrechamente regulado, en el que las desviaciones mecanicistas pueden dar lugar a un retraso en el cierre de la herida o el desarrollo de heridas crónicas. Esta es una de las razones por las que numerosos agentes terapéuticos tienen un impacto negativo en la cicatrización de heridas (Guo, S. y Dipietro, L.A., *J Dent Res* 89:219-229 (2010); Krischak, G.D. et al., *J Wound Care* 16:76-78 (2007)). En este contexto, especialmente la medicación de enfermedades autoinmunes es muy controvertida, ya que la administración de, por ejemplo, metotrexato o corticosteroides se asocia a menudo con retraso en la cicatrización de heridas, formación de cicatrices, complicaciones postoperatorias y

ulceraciones (Tekur, V.K., *Indian Dermatol Online J* 7:418-420 (2016)). Lo más probable es que esto se deba a la interferencia con al menos uno de los múltiples mecanismos de cicatrización de heridas, por ejemplo, la respuesta inflamatoria o la proliferación celular (Anstead, G.M., *Adv Wound Care* 11:277-285 (1998)). Obviamente, este no es el caso cuando se utiliza sCD83, ya que nuestros estudios previos de trasplante no revelaron efectos negativos en la cicatrización de heridas. Por el contrario, se prolongó la supervivencia del trasplante y se aceleró la cicatrización de las heridas (Ge, W. et al., *Transplantation* 90:1145-1156 (2010); Bock, F. et al., *J Immunol* 191:1965-1975 (2013)). Así pues, a diferencia de los fármacos inmunosupresores aprobados actualmente, como la rapamicina, no se observaron efectos adversos durante la terapia con sCD83 en experimentos de trasplante, en relación con la cicatrización de heridas. Dado que el retraso en la cicatrización de las heridas es una de las principales causas de morbilidad en los trasplantes (Ueno, P. et al., *Transplantation* 101:844-850 (2017); Mehrabi, A. et al., *Clin Transplant* 20(Suppl 17):97-110 (2006)), la terapia con sCD83 abre nuevas estrategias para superar estos problemas intrínsecos de los fármacos actualmente disponibles y administrados.

De gran interés práctico es también el hallazgo de que la administración tópica de sCD83 mejoró potentemente el cierre de heridas cutáneas. Aunque hasta la fecha no se han notificado efectos secundarios graves del tratamiento con sCD83, una medicación restringida localmente proporciona ventajas cruciales sobre la administración sistémica, a saber, un suministro óptimo del fármaco y un riesgo restringido de efectos secundarios sistémicos. En nuestros experimentos de cicatrización de heridas cutáneas, la captación tópica de sCD83 está garantizada por la disrupción mecánica de las barreras epiteliales y, por tanto, puede proponerse como un medicamento de primeros auxilios para el cuidado de heridas, que esteriliza la zona de la herida por medio del aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias y, posteriormente, el aumento de las frecuencias de células inmunitarias que acelerarían la cicatrización y la remodelación tisular. También es digno de mención el hecho de que el sCD83 permaneció estable y activo durante al menos 10 días a 4 °C en la matriz de hidrogel utilizada, por lo que es muy probable que pueda almacenarse para un tratamiento a largo plazo. Esto se evaluará en estudios posteriores.

La liberación equilibrada de citoquinas y mediadores pro y antiinflamatorios es la principal fuente de regulación de las reacciones inmunitarias intestinales contra componentes microbianos potencialmente nocivos, así como contra bacterias comensales inocuas. La investigación intensiva ha demostrado que en las patologías de la EII las reacciones inmunitarias intestinales se descontrolan tras la activación por antígenos lumbinales, que son capaces de atravesar una barrera epitelial atenuada. A cambio, esto provoca una inflamación grave de la mucosa que va acompañada de una destrucción estructural continua del tejido epitelial (Zundler, S. et al., *Gut* 68:1688-1700 (2019); Strober, W. and Fuss, I.J., *Gastroenterology* 140:1756-1767 (2011)). Además del objetivo fundamental de prevenir la aparición de colitis, los objetivos terapéuticos recientes de la EII también se han centrado en mejorar el proceso de cicatrización de la mucosa inflamada tras la interrupción.

Además de la cicatrización de heridas cutáneas, los hallazgos en los experimentos de colitis inducida por DSS de este estudio han demostrado que sCD83 también tiene un efecto beneficioso sobre los mecanismos de reparación del epitelio intestinal, favoreciendo así una recuperación acelerada de los síntomas de la colitis. Al analizar los parámetros clínicamente relevantes para las patologías de la EII, los resultados revelaron que en los animales tratados con sCD83 la fase principal de recuperación (d 16) se caracterizó por una recuperación claramente acelerada del peso combinada con una mejora marginal de la longitud del colon, que se hizo explícitamente evidente hacia la fase tardía de recuperación. Los análisis endoscópicos e histológicos correspondientes confirmaron las propiedades positivas de sCD83 específicamente durante la fase principal de recuperación en el modelo de colitis inducida por DSS.

Otros análisis de la expresión génica del tejido del colon se centraron en mediadores proinflamatorios tales como el IFN- γ , la IL-1 β , la IL-6 y el TNF- α o en factores que se asocian clásicamente con la inflamación pero que también aportan efectos beneficiosos en los procesos de cicatrización tales como la IL-17A, la Cox2, la CCL2 y la YM-1. En las muestras de colon de los ratones tratados con sCD83, los niveles de expresión de los mediadores proinflamatorios fueron muy elevados durante la fase de recuperación inicial y casi volvieron a su nivel subyacente cuando los ratones alcanzaron la fase de recuperación principal. Por el contrario, los ratones tratados con PBS sólo mostraron niveles ligeramente elevados de esos factores en la fase inicial de recuperación, que se estancaron o siguieron aumentando durante la fase principal de recuperación. Estos resultados sugieren que sCD83 afecta a ciertos componentes del entorno de la mucosa para inducir niveles más elevados de citoquinas proinflamatorias en la fase de recuperación inicial. Este establecimiento de un estado proinflamatorio excepcionalmente intenso podría a su vez dar lugar a una inducción más rápida y a procesos de cicatrización de heridas más eficaces en la fase de recuperación posterior, lo que también se correlaciona con los resultados de la evaluación macroscópica y endoscópica del colon. En apoyo de nuestra conclusión, otros grupos ya han demostrado el papel esencial de citoquinas específicas como IFN- γ e IL-1 β justo después de una lesión de la mucosa, ya que estos factores regulan la etapa crucial de la restitución epitelial al promover positivamente la producción de TGF- β en las CEI (Neurath, M.F., *Mucosal Immunol* 7:6-19 (2014); Dignass, A.U. y Podolsky, D.K., *Gastroenterology* 105:1323-1332 (1993)). Los resultados de estudios anteriores también sugieren una correlación entre la liberación de IFN- γ y la expresión deIDO en las DC, seguida de la inducción de mecanismos tolerogénicos (Pallotta, M.T. et al., *Nat Immunol* 12:870-878 (2011); Chen, W., *Nat Immunol* 12:809-811 (2011)). De acuerdo con estos informes, observamos niveles muy elevados de expresión deIDO en animales tratados con sCD83 durante la fase de recuperación inicial del modelo de colitis inducida por DSS (datos no mostrados). En apoyo de nuestros resultados se propone que la cinurenina mediada porIDO contribuye a la inducción de tolerancia a largo plazo y a los mecanismos de reparación de heridas de la mucosa (Chen, W., *Nat Immunol* 12:809-811 (2011); Sugihara, K. et al., *Front Immunol* 9:3183 (2018)).

De forma comparable a los mediadores proinflamatorios analizados, curiosamente también los factores IL-17A, Cox2, CCL2 e YM-1 mostraron este llamativo aumento de los niveles de expresión durante la fase de recuperación inicial. Si nos centramos en la fase principal de recuperación, en la que se producen principalmente los procesos de cicatrización de las heridas intestinales, se obtuvo una imagen similar a la de las citocinas proinflamatorias. En los ratones tratados con sCD83 la expresión de la mayoría de los factores retrocede hacia su nivel de base, mientras que en los animales tratados con PBS no se detectó prácticamente ninguna modulación. Como ya se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los factores analizados no son conocidos por sus efectos beneficiosos con respecto a los procesos de cicatrización de heridas de forma clásica y, de hecho, son objeto de controversia a este respecto. Sin embargo, se sabe además que es necesaria una fase inflamatoria inicial sólida para eliminar los agentes patógenos y conseguir una cicatrización eficaz de la herida. Así pues, un posible efecto mecanicista del sCD83 puede ser la inducción de un aumento de la expresión de mediadores inflamatorios en la fase de recuperación inicial, que no sólo modula positivamente el propio epitelio de la mucosa, sino también la eficacia de eliminación bacteriana de las poblaciones celulares fagocíticas. A cambio, esto proporciona una base para una transición más rápida a los siguientes procesos de cicatrización de heridas. Apoyando nuestra conclusión, los análisis de muestras de colon e íleon de pacientes con EII mostraron que la enzima inducible Cox2 es, además de su expresión en tipos celulares como macrófagos y fibroblastos durante la inflamación intestinal, también expresada por CEIs, mientras que no es detectable en pacientes sanos (Neurath, M., *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14:688 (2017)). Además, se ha informado de que la inhibición selectiva de Cox2 en la colitis inducida por TNBS en ratas conduce a la exacerbación de los síntomas de colitis y a la destrucción epitelial, lo que se ha asociado a la ausencia de prostaglandinas que normalmente son producidas por Cox2 (Singer, II et al., *Gastroenterology* 115:297-306 (1998); Reuter, B.K. et al., *J Clin Invest* 98:2076-2085 (1996)). Además de Cox2, un estudio reciente demostró que la quimioquina CCL2 favorece la activación de los macrófagos inflamatorios y, por tanto, media en las respuestas inflamatorias (Carson, W.F.t. et al., *Cell Immunol* 314:63-72 (2017)). Simultáneamente a la inducción de una respuesta inmunitaria inflamatoria sólida, sCD83 puede favorecer un cierre más rápido de la herida intestinal al mediar en el aumento de la proliferación de células epiteliales. En este sentido, los estudios también han demostrado que se sugiere que las citocinas IL-6 e IL-17A, cuando están estrechamente controladas, median en la reparación de tejidos y los mecanismos de protección, ya que impulsan la proliferación de células epiteliales y la supervivencia en ciertas fases de recuperación (Neurath, M.F., *Mucosal Immunol* 7:6-19 (2014); Brockmann, L. et al., *Int J Mol Sci* 18 (2017)).

En resumen, nuestros resultados proporcionan pruebas sólidas de que sCD83 es un agente biológico interesante para el tratamiento de, por ejemplo, heridas de difícil cicatrización en el contexto de lesiones cutáneas y mucosas y/o de individuos que reciben terapia inmunosupresora, que se acompaña de un retraso en el cierre de la herida y de una mayor susceptibilidad a las infecciones.

Ejemplo 2

La molécula soluble CD83 induce el crecimiento del pelo. Además del impacto del sCD83 en la cicatrización de heridas descrito en el Ejemplo 1 anterior, se observó un crecimiento acelerado del pelo en ratones tratados con sCD83 en cuatro configuraciones experimentales independientes.

A. sCD83 aceleró el recrecimiento del pelo tras un exceso de barbería: en ratones C57BL/6 tratados con sCD83 el recrecimiento del pelo aumentó significativamente en la región dorsal en el día 21 (Fig. 6A). La superficie de las zonas calvas se cuantificó en relación con la superficie corporal total y reveló una recuperación significativa de la pérdida de pelo (Fig. 6B).

Para obtener más información sobre los mecanismos subyacentes de la regeneración capilar inducida por sCD83, hemos analizado la presencia de células T reguladoras (Tregs) en biopsias de piel dorsal, 31 días después de la depilación. Según el grupo de Rosenblum, la presencia de Tregs en los folículos pilosos de la piel se asocia a un mayor crecimiento del pelo. Por el contrario, la ablación de las Tregs provocó un deterioro de la inducción anágena y del recrecimiento del pelo (Ali, N. et al., *Cell* 169:1119-1129 e1111 (2017)). Dado que se sabe que sCD83 induce a las Tregs (Bock, F. et al., *J Immunol* 191:1965-1975 (2013)), planteamos la hipótesis de que sCD83 aumenta el número de Tregs en los animales tratados y que esto conduciría a un mejor crecimiento del pelo. De hecho, los análisis CMEL de las muestras de piel de los animales tratados con sCD83 revelaron una acumulación de CD4+/Foxp3+ Tregs en los ratones tratados con sCD83 en comparación con el grupo simulado (Fig. 7 A; 20 Tregs frente a 11 Tregs). Estos datos fueron respaldados además por análisis qPCR de la piel, que revelaron un aumento significativo de la expresión de Foxp3 en el grupo sCD83 (Fig. 7 B).

B. sCD83 promueve el recrecimiento del pelo tras la inducción de heridas: para investigar los efectos de sCD83 en el recrecimiento del pelo tras la inflicción de heridas, se depiló la región dorsal del cuello justo antes de la inducción de heridas de 6 mm. En el contexto del crecimiento del cabello, la depilación es un potente estímulo para la transición de telógeno a anágeno y la posterior inducción del crecimiento del vello (Muller-Rover, S. et al., *J Invest Dermatol* 117:3-15 (2001)). Curiosamente, los ratones que recibieron sCD83 i.p., revelaron una mayor coloración de la piel dorsal, que según Muller-Rover et al. se asocia con una fase progresada del crecimiento del pelo dentro de la anafase (Muller-Rover, S. et al., *J Invest Dermatol* 117:3-15 (2001)) (Fig. 8). De este modo, la forma oscura de la piel dorsal se asocia a una mayor producción de melanina en los folículos pilosos (Plikus, M.V. y Chuong, C.M., *J Invest Dermatol* 128:1071-1080 (2008)), lo que obviamente no ocurría en los ratones tratados con simulacro.

C. sCD83 promueve el recrecimiento del pelo después de la depilación: para corroborar el efecto de sCD83 sobre el crecimiento del pelo, se eliminó el pelo dorsal del cuello de ratones C57BL/6 sanos mediante depilación o afeitado, sin ningún procedimiento experimental adicional. Como ya se ha mencionado, la depilación induce una transición telógena a anágena. Así, los ratones depilados fueron tratados sistémicamente con sCD83 y el crecimiento del pelo se evaluó macroscópicamente hasta el día 14. Como se muestra en la Fig. 9, se indujo el recrecimiento del pelo en ratones depilados tratados con sCD83 y en ratones tratados con simulacro; sin embargo, el recrecimiento del pelo fue más denso en los ratones tratados con sCD83 que en los ratones tratados con simulacro (indicados con círculos rojos).

D. sCD83 aumenta el número y la longitud de las pestañas tras la aplicación tópica de sCD83: Por último, investigamos si la administración local de sCD83 modula el número de pestañas. Por lo tanto, se administró sCD83 por vía tópica en forma de colirio (7 pg de sCD83) tres veces al día durante un periodo de 14 días. Se retiraron los párpados el día 14 y dos investigadores independientes determinaron el número de pestañas con lupa. Sorprendentemente y digno de mención, el grupo tratado con sCD83 reveló un mayor número de pestañas con una forma más larga y gruesa, en comparación con los controles simulados (Fig. 10).

E. Debate: En conjunto, los experimentos independientes descritos anteriormente apoyan claramente el efecto de sCD83 sobre el crecimiento del pelo. Nuestros resultados demuestran además que la acumulación de Tregs en el tejido cutáneo aumenta significativamente con el tratamiento con sCD83. Como informaron Ali et al., las Tregs contribuyen positivamente a la inducción de la fase anágena y al posterior recrecimiento del cabello (Ali, N. et al., Cell 169:1119-1129 e111 (2017)). Cabe destacar que la administración tópica de sCD83 sobre el ojo potenció la formación de pestañas. En resumen, los datos experimentales descritos muestran por primera vez que el sCD83 mejora el recrecimiento del pelo y que la administración tópica aumenta el número de pestañas.

Así pues, el sCD83 representa un agente biológico muy interesante para promover el recrecimiento del cabello, por ejemplo, en individuos que sufren una caída del cabello relacionada con la edad o la enfermedad o en pacientes tratados con quimioterapia, que también provoca una calvicie pronunciada (efluvio).

Ejemplo 3

Expresión de sCD83 en cultivos de matraces de Pichia oastoris: En la Fig. 11 se muestra un diagrama de flujo de la producción de sCD83. Brevemente, N6HIS-sCD83-pPIC9K transformó P. pastoris (cepa: GS115) se cultivaron durante 72 h/30 °C y 150 rpm en una incubadora con agitación (la secuencia de N6HIS-sCD83 se muestra a continuación). Tras 72 h, se determinó la DO₆₀₀ por medio de fotómetro y se centrifugó durante 5 min a 3.000xg/4 °C. El sobrenadante se decantó completamente y el precipitado se dividió en cuatro matraces de agitación, cada uno con 400 ml de BMMY y una densidad óptica final de OD₆₀₀ = 10. El cultivo de levadura se incubó durante 72 h/30 °C y 150 rpm adicionales con un suplemento diario de metanol al 1%. Por último, la suspensión celular se recogió por centrifugación (5.000xg; 10 min; 4 °C). El sobrenadante se filtró a través de esterilcups de 0,22 µm para la posterior purificación de las proteínas marcadas con his mediante cromatografía líquida de alta presión (CLAP) mediante el uso de cartuchos cromatográficos HisPur™ Ni-NTA. Se cargó de una vez un volumen máximo de 150 ml de sobrenadante en una columna superbucle y se transfirió a la columna HisPur™ Ni-NTA de 5 ml a un caudal de 5 ml/min (la presión no debe superar un valor máximo de 0,3 MPa). La sCD83 marcada con His quedó retenida dentro de la columna HisPur™ Ni-NTA, mientras que otras moléculas pasaron la resina y siguieron con el flujo. Después, la columna HisPur™ Ni-NTA se enjuagó con 60 ml de amortiguador de equilibrio. Para la elución de sCD83, se utilizó amortiguador de elución y la solución de proteína se recogió en una jeringa limpia en cuanto la DO alcanzó un valor de 1,000 en el eje y. La solución de sCD83 se almacenó durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se eliminó el imidazol por medio del procedimiento de desalación HiPrep. Para ello, la solución proteica se cargó de nuevo en el superbucle y se transfirió a la columna HiPrep con un caudal de 3 ml/min. A continuación, la proteína se eluyó en PBS comercial. Por último, las posibles contaminaciones por LPS se eliminaron por medio de centrifugación en columnas Vivapure Q Maxi H durante 5 min a 1500 rpm/4 °C, antes de filtrar la solución de sCD83 (0,22 µm). Las alícuotas se almacenaron a -80 °C. La concentración de sCD83 se determinó por el procedimiento BCA siguiendo las instrucciones del fabricante.

Secuencia de N6HIS-sCD83 (SEO ID NO:!!):

Etiqueta 6xHIS

```
TACCATCATCACCACCATACGCCGGAGGTGAAGGTGTGGCTTGCTCCGAAGGTATGTGG
ACTTGCCCTGCACCGCCCTGGATCCGCAGGTTCCACGGTGTCTCCTGGGGTCAA
GTTATTGGAGGGTGGTGAAGAGAGGATGGAGACACCCCAGGAAGCACCCCTGGGA
ACAGCACTATCATCAGAAGGGGCAAATGGTTCTCGACGCCCAATGAAAGGCCCT
ATTCCCTGAAGATCCGAAACTACCAGCTGCAACTCGGGGGGACATACAGGTGCACTCTG
CAGGACCCGGATGGGCAGAGAAACCTAAGTGGCAAGGTGATCTTGAGTAGTGACAGGAT
GCCCTGACCAGCGTAAAGAAGAGACTTTTAAGAAATACAGCGGAGATTTGA
```

Codón de parada

El codón de inicio lo proporciona el vector de expresión pPIC9K. En la Fig. 12 se ofrecen más detalles sobre el vector de expresión y el procesamiento del sCD83.

Ejemplo4

5 A. El tratamiento con la proteína sCD83 mejoró la cicatrización de las heridas cutáneas significativamente más que
con la proteína de fusión Fc-CD83: Se infligieron heridas en ratones hembra C57BL/6 de siete semanas de edad
mediante el uso de un punzón de biopsia de 6 mm. Los ratones fueron tratados sistémicamente con una dosis diaria
de 100 pg de proteína de fusión sCD83 humana recombinante marcada con Fc disponible comercialmente, de Creative
Biomart - CD83-150H (descripción de la proteína de fusión CD83-150H: El dominio extracelular de CD83 humano (aa
10 20-131 de SEQ ID NO:2) se fusiona al N-terminal de la región Fc de IgG1 humana con la secuencia de SEQ ID NO:
50), sCD83 (descripción de la secuencia: secuencia sCD83: aa 20-145 de SEQ ID NO:2), o solución salina. El área
de la herida se midió en los días 0, 3 y 6 mediante el uso de un calibrador y se determinó el cierre de la herida en los
días 3 y 6. El porcentaje de cierre de la herida se determinó en relación con el valor inicial del día 0. Los ratones
tratados con sCD83 (i.p.) mostraron un cierre de la herida significativamente mayor en los días 3 y 6 en comparación
con la proteína de fusión CD83-Fc y los controles simulados. Los resultados se muestran en la Fig. 13, los datos se
muestran como media con valores individuales \pm SEM. La significación estadística se evaluó mediante ANOVA de dos
vías. Los asteriscos marcan diferencias estadísticamente significativas (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 y ****p <
15 0,0001), mientras que "ns" indica que no hay significación estadística. Esto demuestra que la molécula sCD83 induce
un proceso de cicatrización de heridas cutáneas mejor y estadísticamente significativo en comparación con la proteína
de fusión CD83-Fc.

20 B. Debate: En resumen, los experimentos descritos anteriormente demuestran claramente que sCD83 conduce a una
mejora estadísticamente significativa de los procesos de cicatrización de heridas, en comparación con una proteína
de fusión CD83-Fc.

REIVINDICACIONES

1. Una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas CD83 que consiste en el dominio extracelular de la proteína CD83 con los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2 (proteína sCD83), un derivado funcional de dicha proteína sCD83 que tiene hasta 10 aminoácidos unidos al C- o N-terminal de dicha proteína sCD83 y/o que tiene hasta 10 aminoácidos de dicha proteína sCD83 sustituidos, una forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o una forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83, para su uso en el cierre de heridas cutáneas.
2. La proteína sCD83, el derivado funcional de dicha proteína sCD83, la forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o la forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 para su uso en el cierre de heridas cutáneas de la reivindicación 1, en la que dicha proteína sCD83
 - (i) consiste en los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2; o
 - (ii) tiene hasta 10 residuos de aminoácidos derivados del dominio intracelular vecino unidos a su C-terminal, preferentemente la proteína CD83 soluble está formada por los residuos de aminoácidos 20 a 145 de SEQ ID NO:2; o bien
 - (iii) tiene secuencias funcionales de hasta 10 residuos de aminoácidos unidas a su N-terminal, y preferentemente dicha proteína sCD83 lleva en el N-terminal los aminoácidos adicionales Gly-Ser-Pro-Gly o Tyr-His-His-His-His.
3. La proteína sCD83, el derivado funcional de dicha proteína sCD83, la forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o la forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 para su uso en el cierre de heridas cutáneas de la reivindicación 1, en la que la proteína sCD83 es un dímero o un trímero, preferentemente un homodímero conectado a través de uno o más de los residuos de cisteína de la forma monomérica de la proteína sCD83, más preferentemente la proteína sCD83 es como se define en la reivindicación 2 y/o el homodímero está conectado a través del quinto residuo de cisteína de la forma monomérica de la proteína sCD83.
4. La proteína sCD83, el derivado funcional de dicha proteína sCD83, la forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o la forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 para su uso en el cierre de heridas cutáneas de la reivindicación 1, en la que la proteína sCD83 es una proteína CD83 monomérica, preferentemente una proteína CD83 monomérica en la que uno o más de los residuos de cisteína han sido sustituidos por el mismo o diferentes residuos de aminoácidos pequeños y/o polares seleccionados entre serina, alanina y glicina, más preferentemente
 - (i) la proteína sCD83 es como se define en las reivindicaciones 2 o 3; o
 - (ii) un residuo de cisteína, en particular el quinto residuo de cisteína ha sido sustituido; o
 - (iii) la proteína sCD83 consiste en los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2, en el que el residuo de cisteína en la posición 129 ha sido sustituido por un residuo de serina; o
 - (iv) la proteína sCD83 consiste en los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2, en el que el residuo de cisteína en la posición 129 ha sido sustituido por un residuo de serina, y además lleva en el N-terminal los aminoácidos adicionales Gly-Ser-Pro-Gly.
5. La proteína sCD83, el derivado funcional de dicha proteína sCD83, la forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o la forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 para su uso en el cierre de heridas cutáneas de la reivindicación 1, en la que la proteína sCD83 tiene un patrón de glicosilación nativo o no está glicosilada.
6. La proteína sCD83, el derivado funcional de dicha proteína sCD83, la forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o la forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 para su uso en el cierre de heridas cutáneas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el cierre de heridas comprende
 - (a) administración sistémica de la proteína sCD83, el derivado funcional de dicha proteína sCD83, la forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o la forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 para el cierre acelerado de heridas cutáneas; o
 - (b) administración tópica de la proteína sCD83, el derivado funcional de dicha proteína sCD83, la forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o la forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83, preferentemente en forma de una solución de sCD83 a base de gel, para el cierre de heridas de lesiones cutáneas, incluidas heridas localmente restringidas y heridas crónicas.
7. Una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas CD83 consistente en el dominio extracelular de la proteína CD83 con los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2 (proteína sCD83), un derivado funcional que tiene hasta 10 aminoácidos unidos al C- o N-terminal de dicha proteína sCD83 y/o que tiene hasta 10 aminoácidos de dicha sCD83 sustituidos, una forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o una forma

- dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83, para su uso en el crecimiento terapéutico del cabello después de estrés físico/medicación y/o enfermedad.
- 5 8. La proteína sCD83, el derivado funcional de dicha proteína sCD83, la forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o la forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 para su uso en el crecimiento terapéutico del cabello de la reivindicación 7, en la que dicha proteína sCD83
- (i) consiste en los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2; o
- (ii) tiene hasta diez residuos de aminoácidos derivados del dominio intracelular vecino unidos a su C-terminal, preferentemente la proteína CD83 soluble está formada por los residuos de aminoácidos 20 a 145 de SEQ ID NO:2; o bien
- 10 (iii) tiene secuencias funcionales de hasta 10 residuos de aminoácidos unidas a su N-terminal, y preferentemente dicha proteína sCD83 lleva en el N-terminal los aminoácidos adicionales Gly-Ser-Pro-Gly o Tyr-His-His-His-His.
- 15 9. La proteína sCD83, el derivado funcional de dicha proteína sCD83, la forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o la forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 para su uso en el crecimiento terapéutico del cabello de la reivindicación 7, en la que la proteína sCD83 es un dímero o un trímero, preferentemente un homodímero conectado a través de uno o más de los residuos de cisteína de la forma monomérica de la proteína sCD83, más preferentemente la proteína sCD83 es como se define en la reivindicación 8 y/o el homodímero está conectado a través del quinto residuo de cisteína de la forma monomérica de la proteína sCD83.
- 20 10. La proteína sCD83, el derivado funcional de dicha proteína sCD83, la forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o la forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 para su uso en el crecimiento terapéutico del cabello de la reivindicación 7, en la que la proteína sCD83 es una proteína CD83 monomérica, preferentemente una proteína CD83 monomérica en la que uno o más de los residuos de cisteína han sido sustituidos por el mismo o diferentes residuos de aminoácidos pequeños y/o polares seleccionados entre serina, alanina y glicina, más preferentemente
- 25 (i) la proteína sCD83 es como se define en las reivindicaciones 8 o 9; o
- (ii) un residuo de cisteína, en particular el quinto residuo de cisteína ha sido sustituido; o
- (iii) la proteína sCD83 consiste en los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2, en el que el residuo de cisteína en la posición 129 ha sido sustituido por un residuo de serina; o
- 30 (iv) la proteína sCD83 consiste en los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2, en el que el residuo de cisteína en la posición 129 ha sido sustituido por un residuo de serina, y además lleva en el N-terminal los aminoácidos adicionales Gly-Ser-Pro-Gly.
- 35 11. La proteína sCD83, el derivado funcional de dicha proteína sCD83, la forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o la forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 para su uso en el crecimiento terapéutico del cabello de la reivindicación 7, en la que la proteína sCD83 tiene un patrón de glicosilación nativo o no glicosilado.
- 40 12. La proteína sCD83, el derivado funcional de dicha proteína sCD83, la forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o la forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 para su uso en el crecimiento terapéutico del cabello de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que el crecimiento terapéutico del cabello comprende la aplicación sistémica o tópica de sCD83 después de estrés físico/medicación y/o enfermedad.
- 45 13. Composición que comprende una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas CD83 consistente en el dominio extracelular de la proteína CD83 con los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2 (proteína sCD83), un derivado funcional de dicha proteína sCD83 que tiene hasta 10 aminoácidos unidos al C- o N-terminal de dicha proteína sCD83 y/o que tiene hasta 10 aminoácidos de dicha proteína sCD83 sustituidos, una forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o una forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83, para su uso en el crecimiento terapéutico del cabello después de estrés físico/medicación y/o enfermedad.
- 50 14. La composición para uso en el crecimiento terapéutico del cabello de la reivindicación 13, en la que
- (i) la proteína sCD83 es como se define en las reivindicaciones 8 a 11; y/o
- (ii) el crecimiento terapéutico del cabello comprende la aplicación sistémica o tópica de sCD83 tras estrés físico/medicación y/o enfermedad.

- 5
15. Un procedimiento cosmético no terapéutico para la aceleración del crecimiento del cabello y para el cuidado del cabello, que comprende la aplicación sistémica o tópica de una composición que comprende una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas CD83 que consiste en el dominio extracelular de la proteína CD83 con los residuos de aminoácidos 20 a 144 de SEQ ID NO:2 (proteína sCD83), un derivado funcional de dicha proteína sCD83 que tiene hasta 10 aminoácidos unidos al C- o N-terminal de dicha proteína sCD83 y/o que tiene hasta 10 aminoácidos de dicha proteína sCD83 sustituidos, una forma dimérica o trimérica de dicha proteína sCD83, o una forma dimérica o trimérica del derivado funcional de dicha proteína sCD83 a la piel o pelo humano o animal.
 16. El procedimiento cosmético no terapéutico de la reivindicación 15, en el que la proteína sCD83 es como se define en las reivindicaciones 8 a 11.

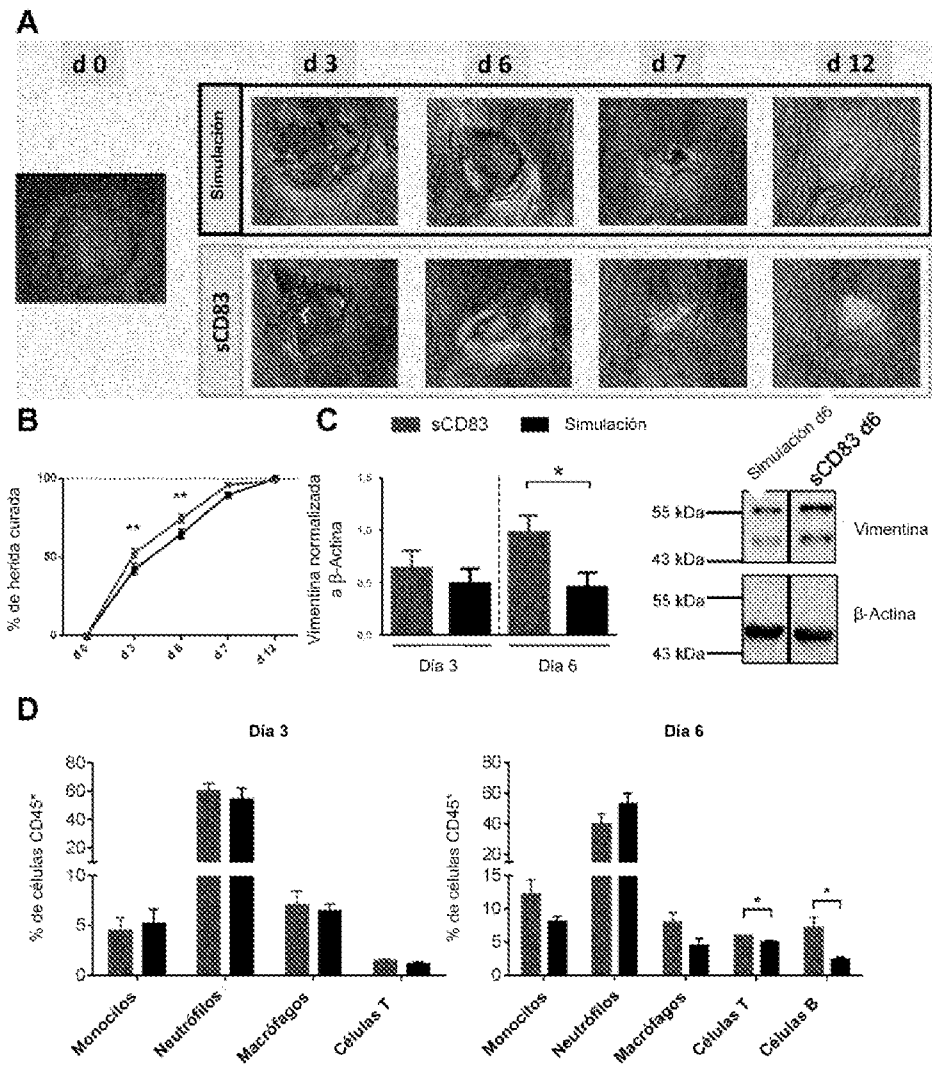


Fig. 1

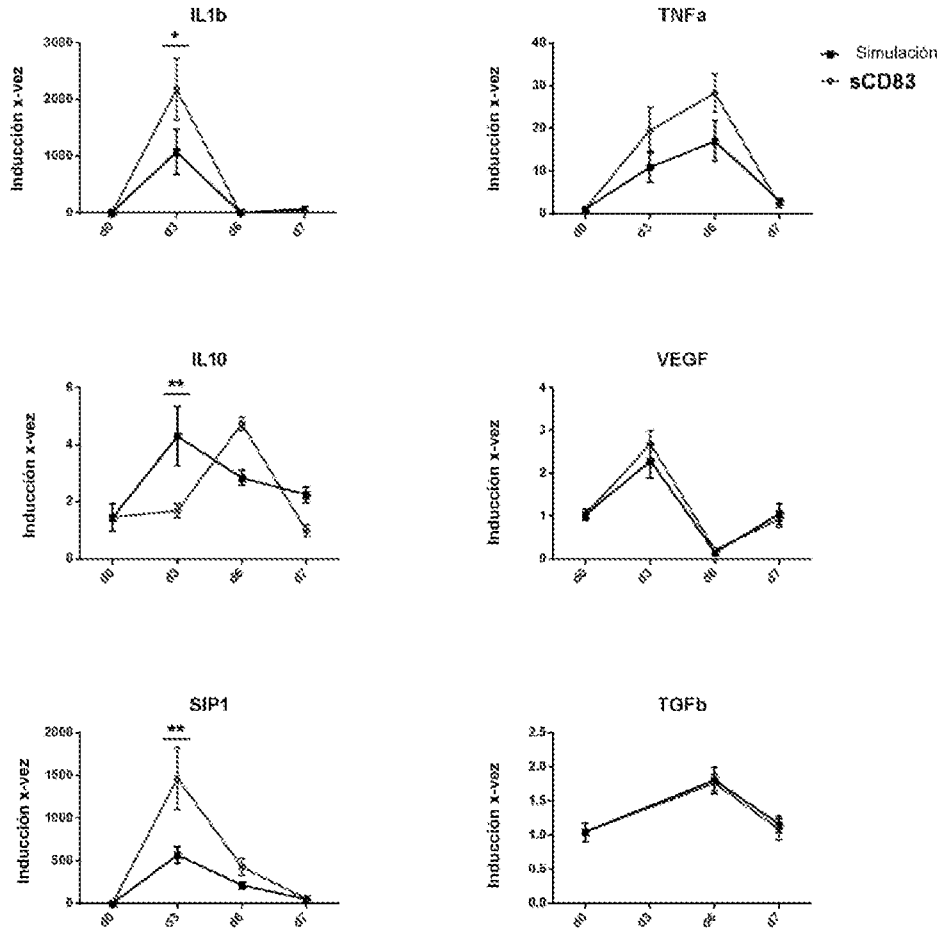


Fig. 2

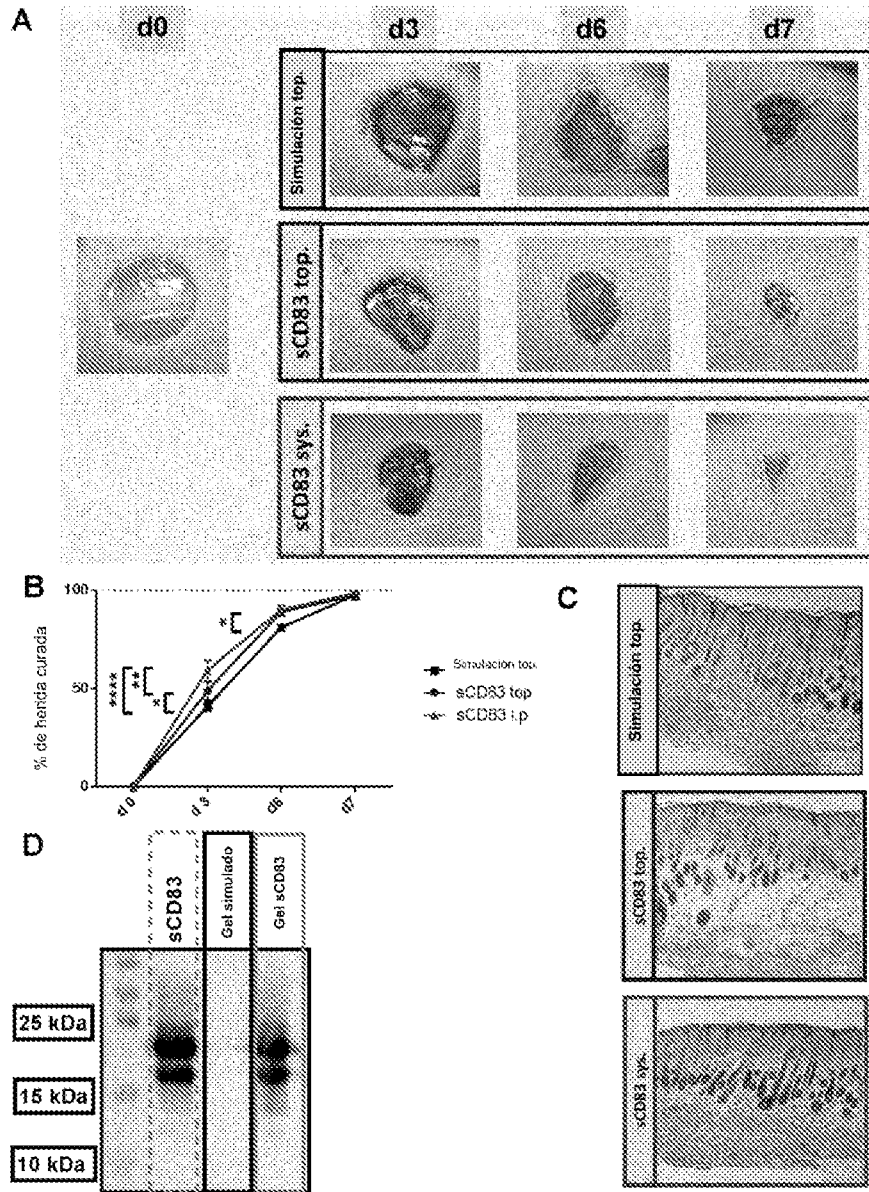


Fig. 3

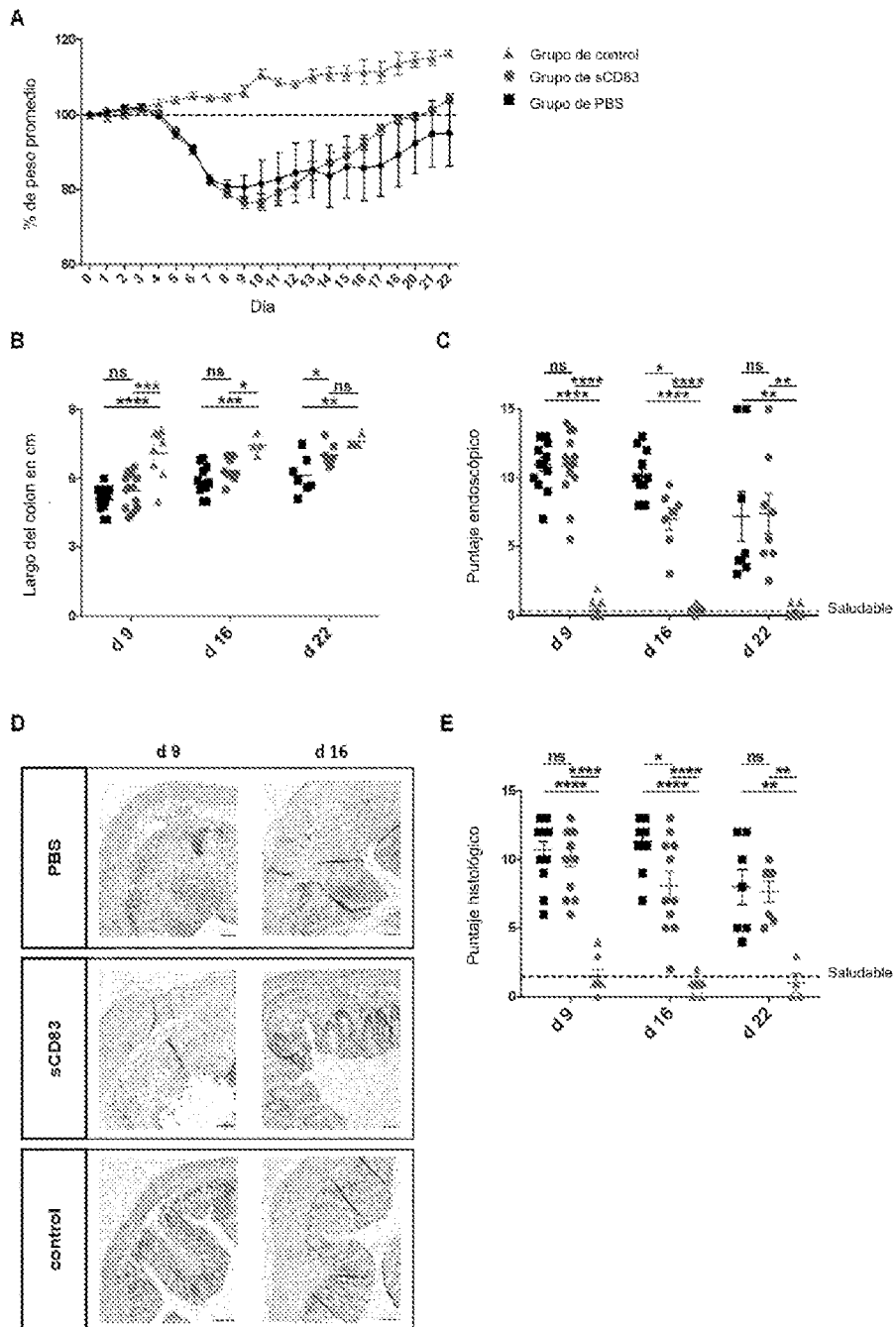
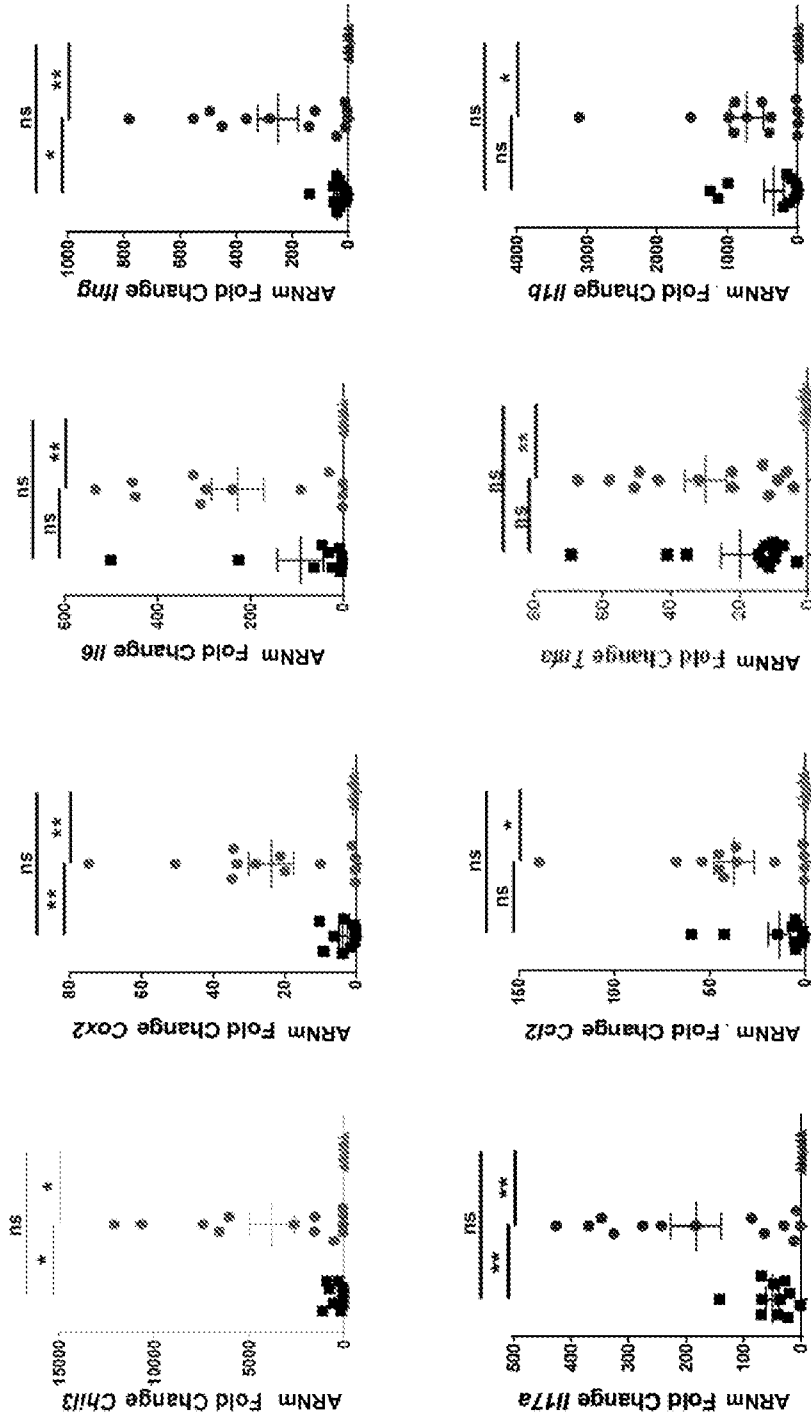


Fig. 4



▨ Grupo de control
 ▨ Grupo de sCD83
 ■ Grupo de PBS

Fig. 5 A

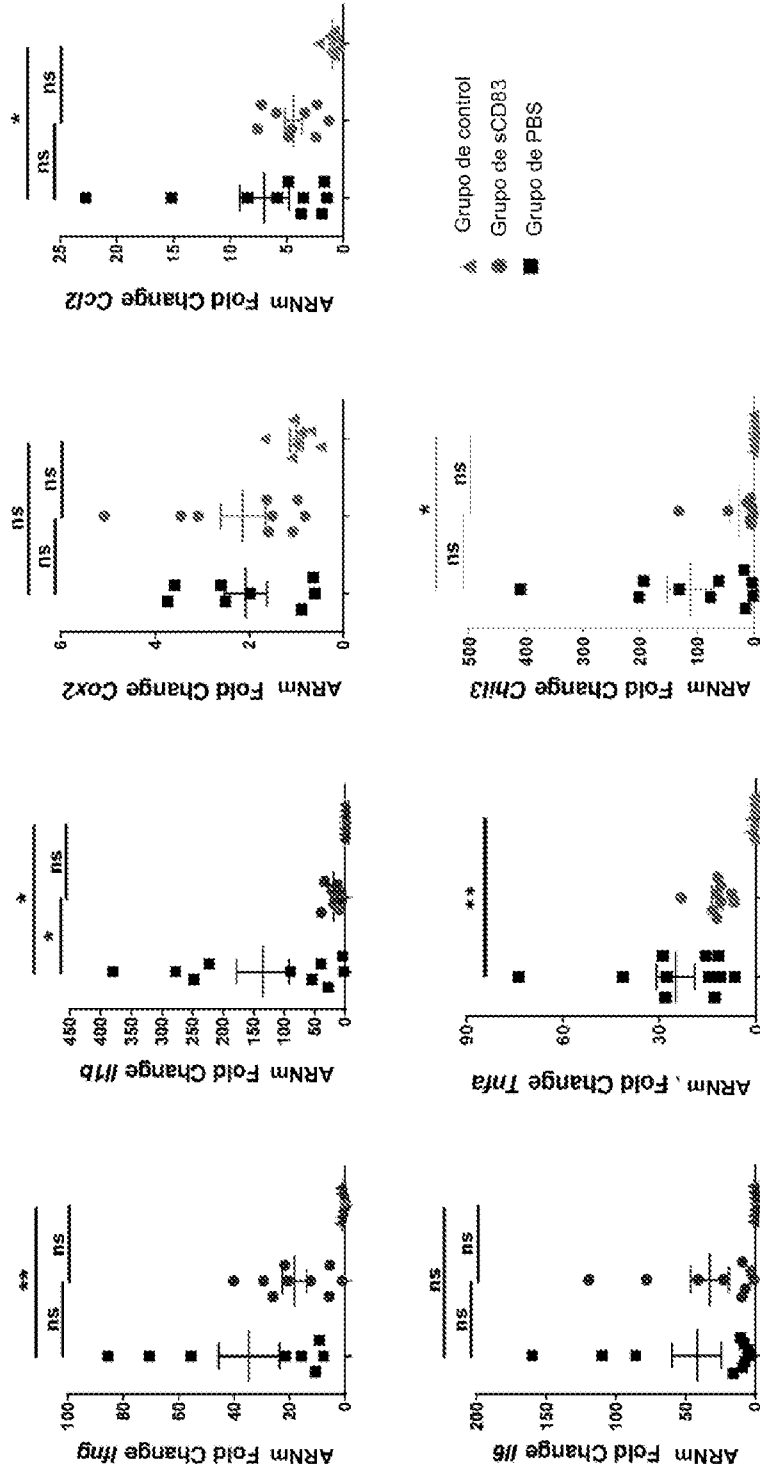
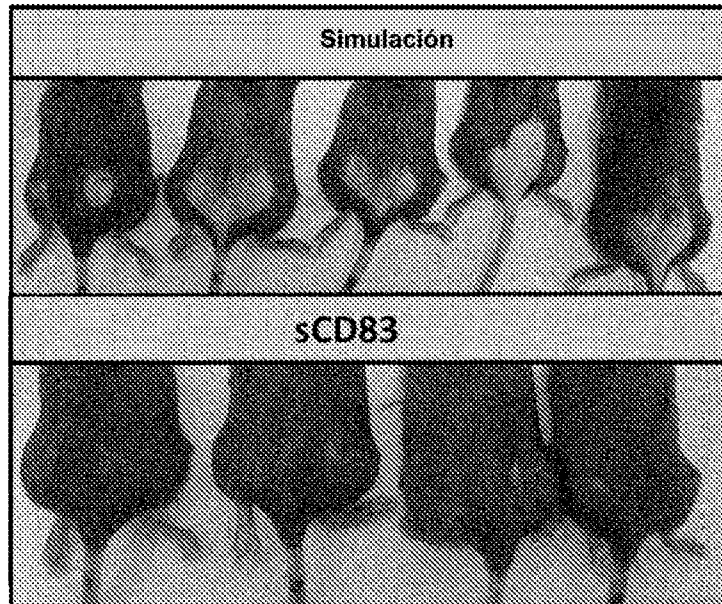


Fig. 5 B

A



B

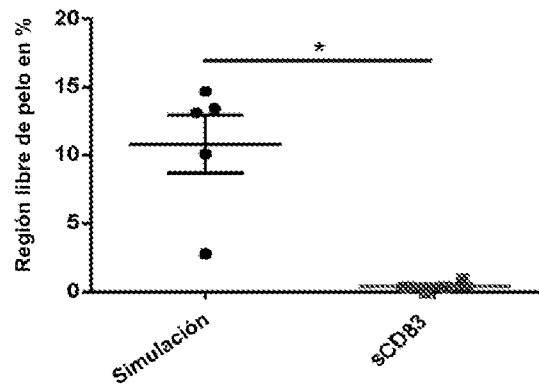


Fig. 6

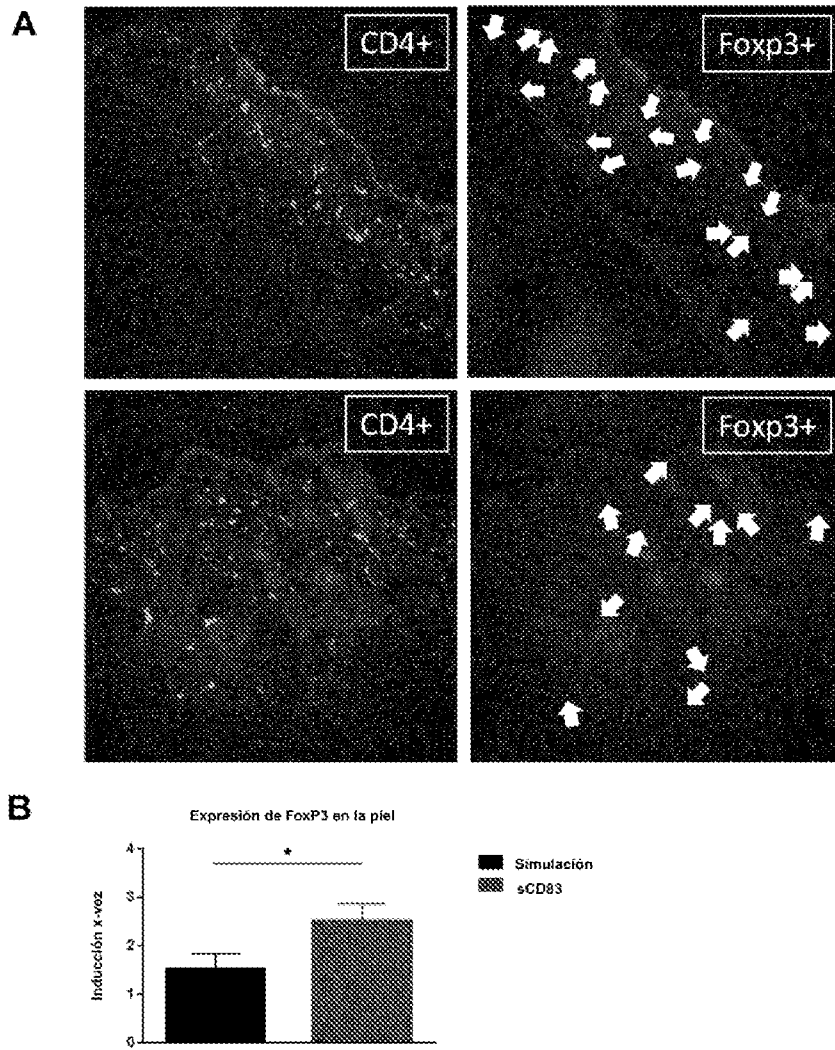


Fig. 7

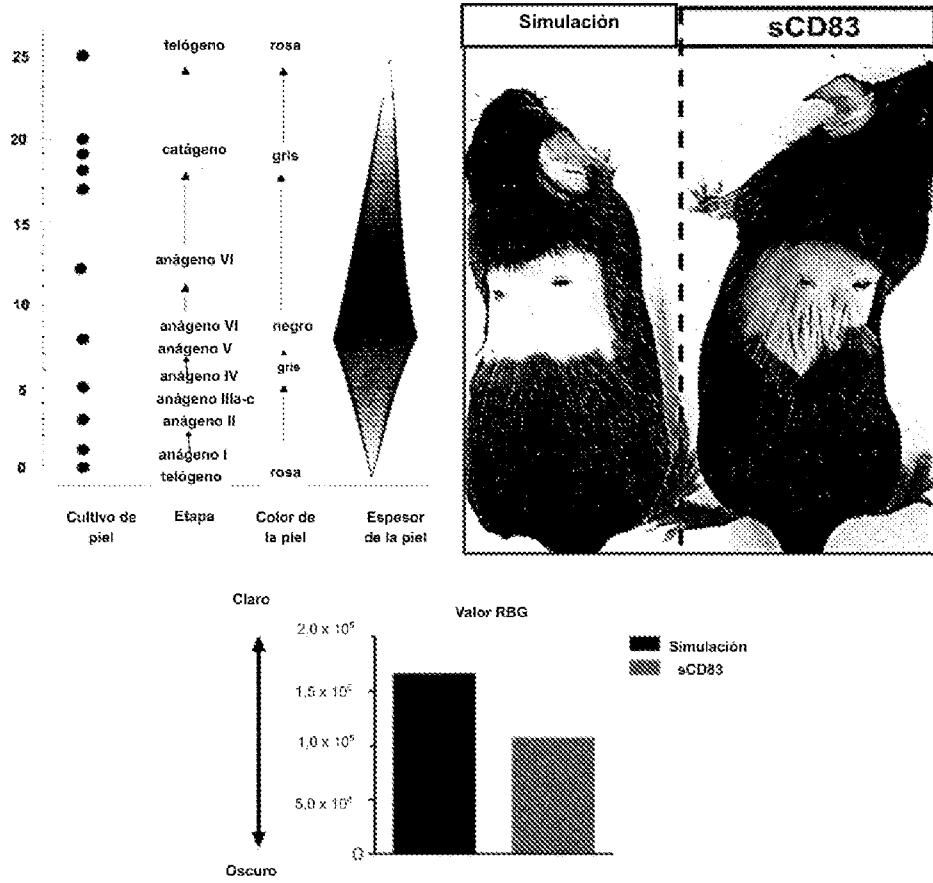


Fig. 8

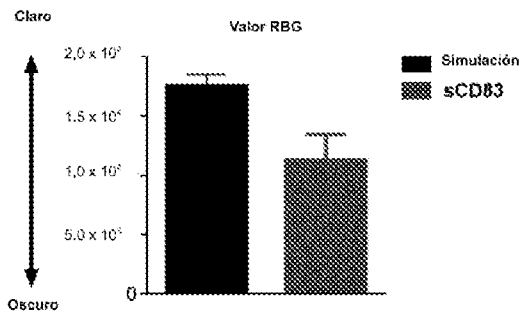
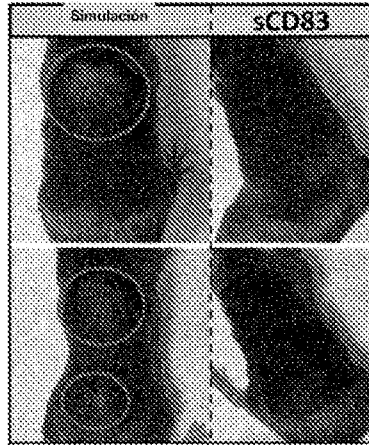


Fig. 9

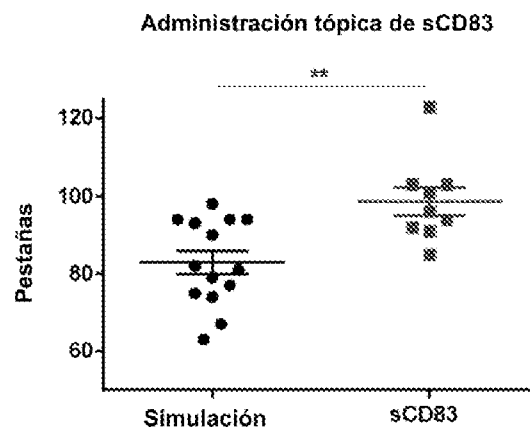
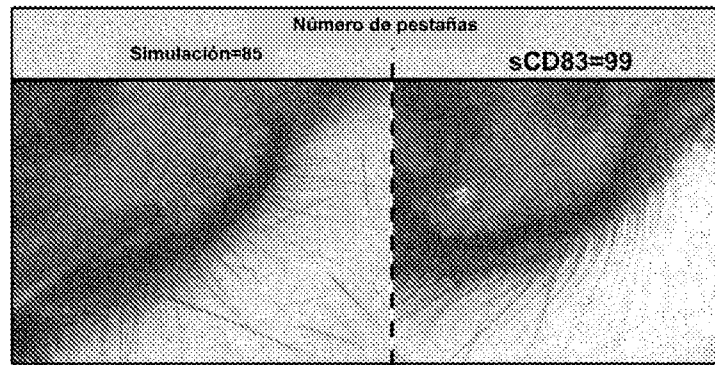


Fig. 10

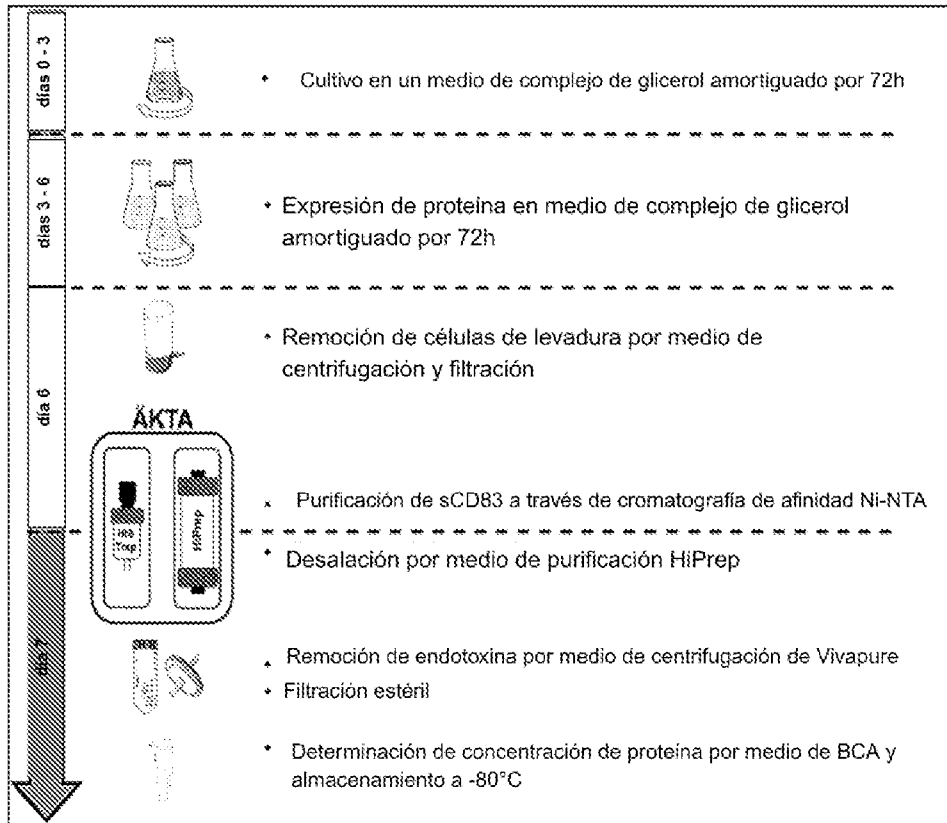


Fig. 11

Secuencia pPIC9K (SEQ ID NO:45):

pPIC9K.....TCCAAACGATGAGATTTCCCTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGC
 TCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAG
 AAGGGGATTTGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTATAAACTACTA
 TTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGA***GAGGCTGAAGCT###TAC///CAT
CATCACCACCACCATACGCCGGAGGTGAAGGTGGCTTCTCCGAAGATGTGGACTTGCCCTGCACCGCCCCCT
 GGGATCCGCAGGTTCCCTACACGGTCTCCTGGGTCAAGTTATTGGAGGGTGGTGAAGAGAGGATGGAGACAC
 CCCAGGAAGACCACCTCAGGGGACAGCACTATCATCAGAAGGGGCAAAATGGTCTTTTCGACGCCCAATGA
 AAGGCCCTATTCCCTGAAGATCCGAAACACTACCAGCTGCAACTCGGGGACATACAGGTGCACTCTGCAGGAC
 CCGGATGGGCAGAGAAACCTAAGTGGCAAGGTGATCTTGAGAGTGACAGGATGCCCTGCACAGCGTAAAGA
 AGAGACTTTTAAGAAATACAGAGCGGAGATTTGA///GTAGAAATCCCTAGGGCGGCCGAATTAATTGCGCT
 TAGACATGACTTTCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAG.....pPIC9K

ATG= Codón inicial

Itálica= Secuencia de señal factor-alfa

*** = Sitio de escisión Kex2

GAGGCTGAAGCT = Glu-Ala-Glu-Ala- repite (SEQ ID NO:46)

→ Sitio de escisión STE13

/// = Escisión con SnaI

CATCATCACCACCACCAT = 6NHIS (SEQ ID NO:47)

Secuencia de codificación de sCD83 en pGEX-2T sCD83 ext → Plásmido de Lechmann (SEQ ID NO:48):

ACGCCGGAGGTGAAGGTGGCTTCTCCGAAGATGTGGACTTGCCCTGCACCGCCCCCTGGGATCCGCAGGTTCC
 CCTACACGGTCTCCTGGGTCAAGTTATTGGAGGGTGGTGAAGAGAGGATGGAGACACCCAGGAAGACCACC
 TCAGGGGACAGCACTATCATCAGAAGGGGCAAAATGGTCTTTTCGACGCCCAATGAAAGGCCCTATTCCCT
 GAAGATCCGAAACACTACCAGCTGCAACTCGGGGACATACAGGTGCACTCTGCAGGACCCGGATGGGCAGAG
 AAACCTAAGTGGCAAGGTGATCTTGAGAGTGACAGGATGCCCTGCACAGCGTAAAGAAGAGACTTTAAGAA
 ATACAGAGCGGAGATT

TGA= Codón de parada

Secuencia de codificación final de proteína sCD83 (SEQ ID NO:11):

TACCATCATCACCACCACCATACGCCGGAGGTGAAGGTGGCTTCTCCGAAGATGTGGACTTGCCCTGCACCG
 CCCCCTGGGATCCGCAGGTTCCCTACACGGTCTCCTGGGTCAAGTTATTGGAGGGTGGTGAAGAGAGGATGG
 AGACACCCAGGAAGACCACCTCAGGGGACAGCACTATCATCAGAAGGGGCAAAATGGTCTTTTCGACGCCCA
 CAATGAAAGGCCCTATTCCCTGAAGATCCGAAACACTACCAGCTGCAACTCGGGGACATACAGGTGCACTCTG
 CAGGACCCGGATGGGCAGAGAAACCTAAGTGGCAAGGTGATCTTGAGAGTGACAGGATGCCCTGCACAGCGT
 AAAGAAGAGACTTTAAGAAATACAGAGCGGAGATTTGA

Fig. 12

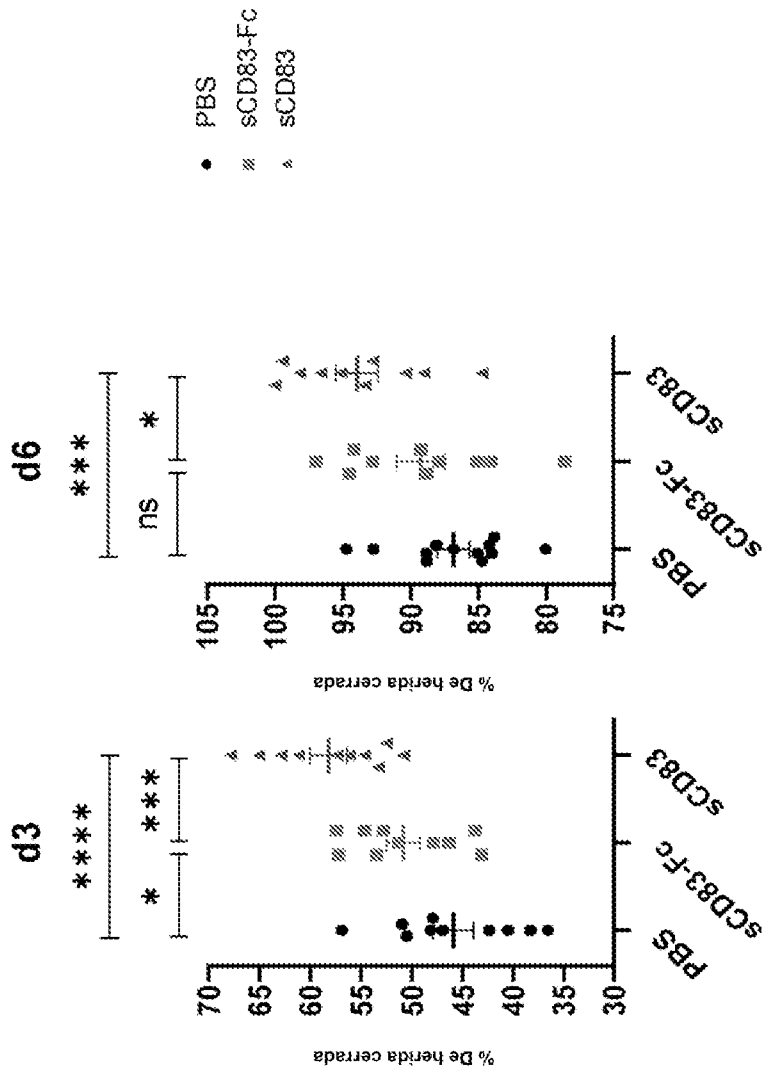


Fig. 13