

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 903 210**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.05.2017 PCT/US2017/030454**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017 WO17190148**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2017 E 17790649 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.11.2021 EP 3448421**

54 Título: **Métodos y composiciones para la prevención y el tratamiento de adherencias quirúrgicas**

30 Prioridad:

29.04.2016 US 201662329666 P

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

31.03.2022

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Office of the General Counsel, Building 170, Third
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**TSAI, JONATHAN;
FERNHOFF, NATHANIEL;
SINHA, RAHUL;
RINKEVICH, YUVAL y
WEISSMAN, IRVING, L.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 903 210 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

Métodos y composiciones para la prevención y el tratamiento de adherencias quirúrgicas

Las adherencias son tejidos fibrosos que se desarrollan como resultado de un traumatismo en el peritoneo, ya sea debido a un traumatismo físico (a menudo debido a una cirugía) o a agresiones inflamatorias importantes (peritonitis, infección, etc.). Aunque muchas adherencias son asintomáticas, sus secuelas principales incluyen obstrucción intestinal, infertilidad femenina (cuando se produce en el útero o cerca de él), dolor crónico y pobre calidad de vida. Los Institutos Nacionales de Salud estiman que más del 93% de los pacientes que se han sometido a una cirugía abdominal progresan a la formación de adherencias. Las estimaciones actuales sugieren que hasta el 20% de los pacientes después de una cirugía abdominal son readmitidos en hospitales debido a la formación de adherencias posoperatorias y proyectan que el costo de la atención médica superará los mil millones de dólares solo en los Estados Unidos, rivalizando con el de muchos cánceres. Además, no existen estrategias definitivas para evitar la formación de adherencias, subrayando la noción de que las adherencias presentan una carga sanitaria significativa y que el tratamiento y la prevención deben ser una prioridad médica permanente.

Estudios exhaustivos sobre la patogenia de la formación de adherencias se centraron en la infiltración inflamatoria y el equilibrio entre el depósito de fibrina y la fibrinólisis. Actualmente se cree que el daño a la superficie peritoneal inicia una cascada compleja que recluta células inflamatorias a través de un panel de señales de citoquinas. Se han realizado estudios meticulosos para mapear la cinética del infiltrado celular: los leucocitos polimorfonucleares (PMN) están presentes al principio (en el plazo de 6 horas) de la lesión, seguido de la entrada de macrófagos (que persiste durante 72 horas) y el reclutamiento en la etapa posterior de células T y B. Se han explorado las funciones de cada uno de estos tipos de células en la formación de adherencias, y la mayoría de los estudios coinciden en que los perfiles proinflamatorios de PMN, macrófagos y células T CD4+ sirven para exacerbar la gravedad de las adherencias.

Se ha trabajado más sobre la contribución de la cascada de coagulación como un impulsor clave del proceso de adherencia. La cascada de la coagulación se activa al mismo tiempo que la infiltración de células inmunitarias. La trombina convierte el fibrinógeno en fibrina, que forma depósitos en la superficie de los órganos poco después de la lesión mesotelial y se organiza en redes de fibrina para la cicatrización de heridas o el desarrollo de adherencias.

El estado actual del conocimiento estipula que la lesión peritoneal u orgánica suficiente para producir adherencias requiere la remoción del mesotelio superficial (diZ-erega & Campeau; Richardson, 1911; Schade & Williamson, 1968; A. Suzuki, 2015) exponiendo sus membranas basales subyacentes que llevan a las uniones de fibrina entre dos superficies desnudas y es seguido por acumulaciones de fibroblastos, de origen desconocido. Como estas observaciones han dependido en gran medida de los exámenes histológicos instantáneos clásicos, y debido a las dificultades para identificar el tipo de célula, la fuente de nuevas células de fibroblastos invasores ha sido un tema de debate. Entre las posibles fuentes se encuentran la metaplasia de los miofibroblastos dentro del tejido conectivo debajo de las superficies, las expansiones de las células madre mesenquimales (MSC), la invasión de MSC primitivas no diferenciadas, o el depósito de la matriz extracelular por fibroblastos subperitoneales que lleva a la formación de adherencias (Cheong et al.; Ellis, Harrison, & Hugh, 1965; Hellebrekers & Kooistra, 2011; Lucas, Warejcka, Young, & Lee, 1996; Raftery, 1973).

Siguiendo los paradigmas anteriores, los investigadores han trasplantado los tipos de células de fibroblastos mencionados en las cavidades abdominales de modelos de roedores en diferentes momentos después de la cirugía y, en consecuencia, muestran una mayor formación de adherencias posoperatorias, y afirman apoyar la noción de que las adherencias surgen de estos tipos de células (Lucas et al., 1996). Otros han indicado que las características epiteliales del mesotelio superficial, incluyendo su interfaz sin fricción, apuntan a un papel protector contra la formación de adherencias, e incluso han propuesto el uso de láminas de células de mesotelio como un enfoque clínico para prevenir adherencias posoperatorias (Inagaki, Inagaki, Kokudo Y Miyajima, 2015).

En ausencia de una célula de origen que pueda usarse para estudiar el inicio y la progresión de la enfermedad fibrótica (Rinkevich et al., 2012, 2015), no se sabe mucho sobre los eventos moleculares y celulares tempranos que conducen a las adherencias abdominales, y por lo tanto, no se han desarrollado tratamientos preventivos o posquirúrgicos sólidos. Por tanto, los tratamientos clínicos actuales usan barreras físicas para evitar el contacto entre órganos adyacentes como tratamiento preventivo ((Liu, Li, Shu, Gray y Prestwich, 2005), o lisis de adherencia que requiere que un médico separe quirúrgicamente los órganos adheridos, una táctica obstaculizada por una alta tasa de reforma de la adhesión (Ray, 1998).

El mesotelio es la monocapa epitelial externa que recubre todas las cavidades serosas (las cavidades pleural, pericárdica y peritoneal) del cuerpo de los mamíferos y las superficies externas de varios órganos internos. Aunque la arquitectura primaria del mesotelio es la de un epitelio escamoso, el tejido también expresa características citológicas y bioquímicas que son características de un tipo de célula de fibroblastos (Michailova & Usunoff, 2006), lo que hace que el mesotelio tenga una plasticidad celular remarcable (Rinkevich et al., 2012). Por ejemplo, se ha

sugerido que las células mesoteliales responden a citoquinas y otras señales y pueden adquirir un fenotipo miofibroblástico, secretando citoquinas y proteínas de la matriz extracelular, lo que exacerba el proceso de adherencia. Estudios recientes de rastreo de linajes demuestran aún más la plasticidad del mesotelio de la superficie para generar tipos de fibroblastos y células de músculo liso para los órganos internos y su vasculatura.

La US 5.639.468 describe un método para reducir o prevenir la formación de adherencias posquirúrgicas usando manoalida y análogos de la misma. La WO 99/20297 describe la prevención y el tratamiento de la formación de adherencias. Lope et al. (2009) European Journal of Cardio-Thoracic Surgery 35(2):313-318 describe el factor de crecimiento de queratinocitos. Nair et al. (2013) Gynecologic and Obstetric Investigation 76(2):119-124 informa que las modificaciones de la fibra y transcripcionales mejoran el direccionamiento de los adenovirus hacia las células de adhesión humanas.

Aunque varios informes diferentes han sugerido que la isquemia, el trauma físico, la hemorragia, la temperatura, el daño químico y la desecación tisular son factores que inician la formación de adherencias, no se han definido los mecanismos moleculares y genéticos subyacentes que regulan la patogénesis de las adherencias. La presente divulgación proporciona conocimientos sobre los mecanismos moleculares y genéticos de la formación de adherencias y, por tanto, proporciona, entre otras cosas, tratamientos terapéuticos basados en estos descubrimientos.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona un agente que interrumpe la formación de adherencias: (a) agotando los granulocitos o granulocitos inflamatorios o (b) inhibiendo el reclutamiento de granulocitos o granulocitos inflamatorios para su uso en un método de tratamiento de un sujeto para reducir la formación de adherencias o para reducir las adherencias ya formadas, en donde el agente inhibe la expresión o actividad de un producto génico cuya expresión es inducida en las células mesoteliales lesionadas, o se une selectivamente a un producto génico cuya expresión es inducida en las células mesoteliales lesionadas.

La invención proporciona además un agente que interrumpe la formación de adherencias: (a) agotando los granulocitos o granulocitos inflamatorios o (b) inhibiendo el reclutamiento de granulocitos o granulocitos inflamatorios para su uso en un método de tratamiento de un sujeto para reducir la formación de adherencias o para reducir la formación de adherencias ya formadas. adherencias, en donde el agente da como resultado uno o ambos de agotamiento de neutrófilos y prevención del reclutamiento de neutrófilos, opcionalmente en donde el agente es un polipéptido que se une a un marcador de granulocitos seleccionado de Gr-1, CD66b, CD177, CXCR1, VAP1, CXCR2 y CD10, opcionalmente, además, en donde el agente es un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo.

La presente divulgación demuestra que el mesotelio superficial representa el tejido de origen para la formación de adherencias, identificando las adherencias como una manifestación patológica macroscópica de las propias células del mesotelio. También proporciona la cadena molecular de eventos que llevan al mesotelio normal hacia un programa de adherencias y demuestra que la interrupción funcional de estas vías reduce la formación de adherencias *in vivo*. Estos resultados proporcionan una nueva comprensión patomecánica de la formación de adherencias y establecen nuevas tácticas/vías terapéuticas que tratan y/o previenen la patogénesis de las adherencias.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los agentes de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

En ciertos casos, la presente divulgación proporciona métodos para tratar a un sujeto para reducir la formación de adherencias, el método comprendiendo administrar a un sujeto con necesidad de ello un agente que se dirige a la formación de adherencias por células mesoteliales lesionadas. En ciertos casos, el agente se dirige a las células mesoteliales lesionadas para su destrucción. En ciertos casos, el agente recluta macrófagos inflamatorios en el sitio de adhesión. En ciertas realizaciones, el agente evita el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de adhesión. En ciertas realizaciones, el agente inhibe la expresión o actividad de un producto génico cuya expresión es inducida en las células mesoteliales lesionadas. Los ejemplos no limitativos de agentes incluyen: un anticuerpo anti-mesotelina o un fragmento de unión a mesotelina del mismo; un anticuerpo anti-CD47, un polipéptido de la proteína alfa reguladora de señales (SIRPα), o un fragmento de unión a CD47 de cualquiera de ellos; proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) o una porción de reclutamiento de macrófagos inflamatorios de la misma; un anticuerpo anti-Gr-1 o fragmento de unión a Gr-1 del mismo u otro marcador implicado en el agotamiento de granulocitos; tioglicolato; PLGA; manosa o manosa conjugada con una fracción de unión específica para el mesotelio lesionado que incluye la fracción de unión a UPKB1 o la fracción de unión a MSLN; y cualquier combinación de los mismos. Se incluyen péptidos, peptoides, ARN, ADN, PNA u otra molécula manipulada para unirse al mesotelio lesionado, por ejemplo, para UPKB1, MSLN, etc.

Los solicitantes han identificado marcadores biológicos que se expresan selectivamente en el mesotelio lesionado en el momento de la formación de la adherencia, tal marcador incluye, sin limitación, MSLN, UPK1B, etc.

Los marcadores proporcionan objetivos para la eliminación o destrucción de células mesoteliales lesionadas, por ejemplo, por apoptosis, fagocitosis, necrosis, etc. En algunas realizaciones, se administra una fracción de unión específica, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo, a un individuo para eliminar las células mesoteliales lesionadas, por ejemplo, para prevenir la formación de adherencias, para reducir la formación de adherencias en curso o para reducir las adherencias existentes. Los marcadores son biomarcadores útiles para la presencia de células mesoteliales lesionadas, por ejemplo, mediante PET, MRI, etc. En algunas realizaciones, un anticuerpo u otra fracción de unión específica que se une a un marcador de células mesoteliales lesionadas, incluyendo, sin limitación, MSLN o UPK1B, se marca con un marcador detectable. El marcador puede incluir, por ejemplo, fracciones útiles en imagenología por PET o MRI. El anticuerpo marcado u otra fracción de unión específica se pone en contacto con el paciente, por ejemplo, por vía intravenosa u otro sistema de administración, y la presencia de la fracción marcada se usa para obtener imágenes de las células implicadas en la formación de adherencias.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: El mesotelio superficial prolifera en respuesta a la inducción de la adherencia. Panel A: Las tinciones con hematoxilina y eosina (H&E) de botones isquémicos (B) después de 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 4 horas después de la colocación y la abrasión muestran la presencia inmediata continua del mesotelio peritoneal (flecha). Panel B: La tinción de inmunofluorescencia para mesotelina (MSLN) de botones isquémicos 1 hora, 24 horas, 72 horas e inmediatamente después de la colocación y la abrasión confirma y muestra la presencia prolongada del mesotelio y el posible engrosamiento de una sola capa de células después de 24 y 72 horas. Panel C: La tinción de inmunofluorescencia para MSLN y podoplanina (PDPN), marcadores específicos mesoteliales, 7 días después de la inducción de la adherencia muestran una adherencia de cordón completamente formada entre el hígado (L) y el peritoneo (P). Panel D: Tinción de inmunofluorescencia para PDPN y F4/80 de adherencias de parabiontes de tipo slavage y RFP⁺. Panel E: Se contaron los números de células mesoteliales (MSLN⁺) (arriba) y células mesoteliales con doble positivo EdU+MSLN⁺ (abajo) por campo de alta potencia (0,75 mm x 1 mm) (n=20) en tejido peritoneal normal frente a tejido peritoneal adherido. Se observaron significativamente más células mesoteliales y dobles positivas en los sitios de adherencia frente al tejido peritoneal normal. Panel F: Tinción de inmunofluorescencia para MSLN y EdU de peritoneo normal (P) (arriba) y adherencias (ADH) entre el peritoneo y el intestino grueso (I).

Figura 2: Panel A: el mesotelio de superficie se aisló de botones isquémicos y se purificó mediante un fenotipo de superficie PDPN⁺LYVE1-CD31-CD45⁻. Panel B: Mapa de calor de la secuenciación de ARN del mesotelio superficial purificado inmediatamente después y 6 horas, 12 horas y 24 horas después de la colocación de botones agrupados por expresión génica. Los genes representativos se muestran encima de los grupos. Panel C: Se calcularon cambios logarítmicos en los niveles de transcripción para cada 6, 12 y 24 horas después de la cirugía de inducción de adherencia en comparación con el control y se representaron gráficamente frente a todos los genes encontrados en el genoma. Panel D: Mapa de calor de conjuntos de genes regulados por incremento o regulados por disminución en el mesotelio de superficie activado 6, 12 y 24 horas después de la inducción de la adherencia. Panel E: Niveles de expresión (FPKM) de genes objetivo categorizados por mesotelio embrionario, fibroblasto o moléculas de adherencia durante un curso temporal de 24 horas a partir de la secuenciación de ARN. Panel F: Validación de genes objetivo mediante tinciones de inmunofluorescencia de tejido adherido 7 días después de la inducción.

Figura 3: Panel A: una puntuación de adherencia de 0 no muestra adherencia visible al botón isquémico (B). Se observa poca proliferación en la tinción de H&E y Hoechst y la tinción de botón es positiva para MSLN y fibronectina. Panel B: una puntuación de adherencia de 1 es una ligera adherencia del cordón al botón isquémico con tejido fibroso nucleado en tinción de H&E y Hoechst. La adherencia del cordón se tiñe positivamente para MSLN y fibronectina. Panel C: las adherencias con puntuaciones de 2 muestran la unión directa de un área de un órgano al botón isquémico con delineación identificable del botón isquémico en la tinción de H&E y Hoescht y la tinción positiva para MSLN, fibronectina y F4/80. Panel D: puntuaciones de adherencia de 3 muestran la unión directa de dos áreas no continuas de un órgano o dos áreas de dos órganos al botón isquémico con dos áreas identificables en tinción con H&E y Hoescht y tiñen positivamente para MSLN, fibronectina, F4/80, pancolágeno y CD31. Panel E: puntuaciones de adherencia de 4 muestran la unión directa de tres o más áreas no continuas al botón isquémico. El mesotelio específico del órgano es a menudo difícil de identificar en las tinciones con H&E y Hoescht, y las áreas de adherencia se tiñen para MSLN, fibronectina, F4/80, pancolágeno, CD31. Panel F: las puntuaciones de adherencia de 5 muestran el abdomen compactado completo con uniones entre el peritoneo y los órganos, así como uniones sistémicas entre los órganos en las tinciones con H&E y Hoescht. Todas las barras de escala son 100µm.

Figura 4: Los anticuerpos antimesotelina resuelven las adherencias. Panel A: las tinciones de inmunofluorescencia muestran que los anticuerpos anti-MSLN inyectados intraperitonealmente se unen a la superficie mesotelial lesionada inmediatamente después de la inducción de la adherencia in vivo. Panel B: CD47 se expresa 6, 12 y 24 horas después de la inducción de la adherencia, así como en estados normales. Panel C: las adherencias están presentes dos semanas después de la inducción y el tratamiento usando controles de vehículo. Panel D: el tratamiento con anticuerpos anti-MSLN solos muestra disminuciones significativas en las adherencias. Panel E: el tratamiento anti-CD47 con anticuerpos anti-MSLN mejora la eliminación de las adherencias. Panel F: tinciones inmunofluorescentes de colágeno, fibronectina, CD31, F4/80 y MSLN revelan la eliminación de células MSLN⁺.

Figura 5: El silenciamiento de HIF1 α es suficiente para prevenir la adherencia. Panel A: cocultivos de macrófagos mesoteliales in vitro en condiciones normales de oxígeno teñidos para PDPN o HIF1A. Panel B: cocultivos de macrófagos mesoteliales in vitro en hipoxia (incubadora de O₂ al 5%) teñidos para PDPN o HIF1A. Las barras de escala son de 250 μ m. Panel C: Las tinciones de inmunofluorescencia muestran que las adherencias son HIF1A + 7 días después de la inducción. Panel D: Las tinciones de inmunofluorescencia muestran adherencias de HIF1A-7 días después de la inducción y el tratamiento con inhibidores moleculares pequeños. Todas las barras de escala son de 100 μ m. Panel E: El tratamiento con inhibidores de molécula pequeña de Hif1 α , equinomicina y PX12, muestra disminuciones significativas en la formación de adherencias mediante la regulación por disminución de Hif1 α . Panel F: Niveles de expresión de la secuenciación de ARN de genes objetivo seleccionados durante un transcurso de 24 horas después de la inducción de la adherencia y después del tratamiento con equinomicina. Mapa de calor de la secuenciación de ARN de mesotelio superficial purificado inmediatamente después, 6 horas, 12 horas, 24 horas y con tratamiento con equinomicina después de la colocación del botón agrupado por expresión génica.

Figura 6: Las adherencias peritoneales humanas comparten una expresión similar de genes objetivo. Panel A: tinciones H&E de tejido de adherencia humano. Panel B: tinciones tricrómicas de tejido de adherencia humano. Panel C: tinciones de inmunofluorescencia e hibridación in situ de tejido de adherencia humano. Las barras de escala son todas de 100 μ m a menos que se indique lo contrario.

Figura 7: Ensayo de cultivo mesotelial in vitro. Cultivos explantados mesoteliales con y sin macrófagos en diferentes condiciones de oxígeno. Los cocultivos se colocaron en condiciones normales de oxígeno, incubadora de oxígeno al 5% y en 100 μ M de CoCl₂.

Figura 8: Objetivos génicos de HIF1A y mesoteliales después del silenciamiento de HIF1A. Los valores de expresión de una selección de secuenciación de ARN de genes objetivos de HIF1A y mesoteliales se tomaron durante un transcurso de tiempo de 24 horas y se compararon con muestras tratadas con 20 μ g/kg de equinomicina.

Figura 9: Panel A: Los resultados de la secuenciación de ARN de las células mesoteliales lesionadas durante un transcurso de 24 horas muestran la expresión diferencial de múltiples conjuntos de genes y procesos, incluyendo las quimiocinas y citoquinas inflamatorias. Panel B: Microscopía de fluorescencia de una adherencia inducida en experimentos de parabiosis entre un ratón que expresa constitutivamente la proteína roja fluorescente mCherry ("TM7") y un tipo salvaje (ratón sin color). F4/80 se muestra en verde. Panel C: Microscopía de fluorescencia de una adherencia inducida en ratones constitutivos de proteína fluorescente cian (CFP) ("Huésped") que reciben trasplantes de médula ósea de ratones mCherry constitutivos (TM7 "Donante"). F4/80 se muestra en verde. Panel D: Puntuación de adherencia de ratones pretratados con tioglicolato o catalasa (24 horas antes de la inducción de la adherencia), así como el tratamiento con MCP-1, anticuerpo anti-GR-1 o ambos, durante tres días después de la cirugía de inducción de adherencia.

Figura 10: Puntuaciones de adherencia de ratones pretratados con PLGA, tioglicolato o control de PBS 3 días antes de la cirugía de inducción de adherencia. Los ratones se evaluaron 7 días después de la lesión y se evaluaron en una escala de gravedad de la adherencia de 0 a 5 para determinar las adherencias que se formaban en el sitio de sutura (S) o el botón (B).

DEFINICIONES

En la descripción que sigue, se usan varios términos usados convencionalmente en el campo del cultivo celular. Para proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, y el alcance que se dará a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

Los términos y símbolos de química de ácidos nucleicos, bioquímica, genética y biología molecular usados en la presente siguen los de tratados y textos estándar en el campo, por ejemplo, Kornberg y Baker, DNA Replication, Segunda Edición (W.H. Freeman, Nueva York, 1992); Lehninger, Biochemistry, Segunda Edición (Worth Publishers, Nueva York, 1975); Strachan y Read, Human Molecular Genetics, Segunda Edición (Wiley-Liss, Nueva York, 1999); Eckstein, editor, Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach (Oxford University Press, Nueva York, 1991); Gait, editor, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1984); y similares.

El término "agente terapéutico" como se usa en la presente incluye uno o más "agentes terapéuticos" o "fármacos". Los términos "agentes terapéuticos" o "fármacos" pueden usarse indistintamente en la presente e incluyen compuestos farmacéuticamente activos. Los ejemplos incluyen, sin limitación: antibióticos, moléculas pequeñas, proteínas o polipéptidos, polinucleótidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, ribozimas, oligonucleótidos antisentido, sistemas génicos/de vectores, ácido nucleico antisentido (ARN o ADN), vectores de virus o vectores derivados de fuentes víricas, anticuerpos, antagonistas de receptores, represores de la transcripción, etc. Los polinucleótidos pueden codificar proteínas o polipéptidos terapéuticos.

"Polinucleótido" u "oligonucleótido" se usa indistintamente y cada uno significa un polímero lineal de monómeros de nucleótidos, por ejemplo, desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos también se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o

más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímero de aminoácidos de origen no natural.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos sintéticos y de origen natural, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Un análogo de aminoácido se refiere a un compuesto que tiene la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural.

Se pretende que el término "anticuerpo" o "fracción de anticuerpo" incluya cualquier estructura molecular que contenga cadenas polipeptídicas con una forma específica que se ajuste y reconozca un epítipo, donde una o más interacciones de unión no covalente estabilizan el complejo entre la estructura molecular y el epítipo. Los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales. En ciertos aspectos, los anticuerpos monoclonales pueden ser preferibles porque pueden reproducirse mediante cultivo celular o recombinantemente, y pueden modificarse para reducir su antigenicidad. La producción de anticuerpos policlonales y monoclonales es bien conocida en la técnica.

Además de las inmunoglobulinas completas (o sus contrapartidas recombinantes), los fragmentos de inmunoglobulina que comprenden el sitio de unión del epítipo (por ejemplo, Fab', F(ab')₂ u otros fragmentos) son útiles como fracciones de anticuerpos en la presente invención y a veces se denominan como "fragmentos de unión" o "fragmentos de unión a epítipo" de un anticuerpo. Tales fragmentos de anticuerpos pueden generarse a partir de inmunoglobulinas completas mediante escisión con ricina, pepsina, papaína u otra proteasa. Puede diseñarse un "fragmento" o inmunoglobulinas mínimas utilizando técnicas de inmunoglobulinas recombinantes. Por ejemplo, las inmunoglobulinas "Fv" para su uso en la presente invención pueden producirse enlazando una región de cadena ligera variable a una región de cadena pesada variable mediante un conector peptídico (por ejemplo, poli-glicina u otra secuencia que no forma un motivo de hélice alfa o lámina beta).

Los anticuerpos incluyen anticuerpos libres y fragmentos de unión a antígeno derivados de los mismos, y conjugados, por ejemplo, conjugados de anticuerpos pegilados, fármacos, radioisótopos o toxinas, y similares. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra un epítipo específico, o una combinación de epítopos, permitirán el direccionamiento y/o el agotamiento de las poblaciones celulares que expresan el marcador. Pueden utilizarse varias técnicas usando anticuerpos monoclonales para seleccionar poblaciones celulares que expresan el marcador o marcadores, e incluyen separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo, "adsorción" con anticuerpo unido a una matriz sólida (es decir, placa) y citometría de flujo. (Ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.985.660; y Morrison et al. Cell, 96:737-49 (1999)). Estas técnicas permiten la selección de poblaciones particulares de células; en inmunohistoquímica de muestras de biopsia; en la detección de la presencia de marcadores vertidos por las células cancerosas en la sangre y otros fluidos biológicos, y similares.

Las versiones humanizadas de tales anticuerpos también están dentro del alcance de esta invención. Los anticuerpos humanizados son especialmente útiles para aplicaciones *in vivo* en humanos debido a su baja antigenicidad.

Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente en la presente para referirse a un mamífero que se está evaluando para tratamiento y/o que se está tratando. En una realización, el mamífero es un ser humano. Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" abarcan, sin limitación, individuos que tienen o están en riesgo de tener una adherencia. Los sujetos pueden ser humanos, pero también incluyen otros mamíferos, particularmente aquellos mamíferos útiles como modelos de laboratorio para enfermedades humanas, por ejemplo, ratón, rata, etc.

Como se usan en la presente, los términos "tratamiento", "tratar" y similares, se refieren a la administración de un agente, o a llevar a cabo un procedimiento, con el propósito de obtener un efecto en un sujeto (por ejemplo, un paciente). El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una afección, enfermedad o síntoma indeseable de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de efectuar un remedio, remisión o cura parcial o completa para una afección, enfermedad y/o síntomas no deseables de la enfermedad. Por tanto, el tratamiento abarca la administración de un agente antes de que se produzca una afección, enfermedad o síntoma indeseable de la misma, durante el desarrollo de una afección, enfermedad o síntoma indeseable de la misma y/o después de que se haya producido una afección, enfermedad o síntoma indeseable de la misma. El tratamiento puede referirse a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora o prevención de una condición o enfermedad indeseable, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo como reducción; remisión; disminución de los

síntomas o hacer que la condición no deseable sea más tolerable para el paciente; ralentización de la tasa de degeneración o declive; o hacer que el punto final de la degeneración sea menos debilitante. El tratamiento o la mejora de los síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen realizado por un médico. Por consiguiente, el término "tratar" incluye la administración de los compuestos o agentes de la presente divulgación para prevenir o retrasar, aliviar o detener o inhibir el desarrollo de los síntomas o afecciones indeseables. El término "efecto terapéutico" se refiere a la reducción, eliminación, o prevención de la afección, enfermedad o síntomas indeseables o efectos secundarios de los mismos.

"En combinación con", "terapia de combinación" y "productos de combinación" se refieren, en ciertas realizaciones, a la administración concurrente a un paciente de un primer tratamiento y un segundo tratamiento. Cuando se administra en combinación, cada componente puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos. Por tanto, cada componente puede administrarse por separado pero lo suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

Como se usa en la presente, el término "correlaciona" o "correlaciona con" y términos similares, se refiere a una asociación estadística entre casos de dos eventos, donde los eventos incluyen números, conjuntos de datos y similares. Por ejemplo, cuando los eventos implican números, una correlación positiva (también referida en la presente "correlación directa") significa que a medida que uno aumenta, el otro también aumenta. Una correlación negativa (también referida en la presente "correlación inversa") significa que a medida que uno aumenta, el otro disminuye.

"Unidad de dosificación" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el individuo particular a tratar. Cada unidad puede contener una cantidad predeterminada del compuesto o compuestos activos calculada para producir los efectos terapéuticos deseados en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación puede ser dictada por (a) las características únicas del compuesto o compuestos activos y los efectos terapéuticos particulares que se van a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de combinar dicho compuesto o compuestos activos.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil para preparar una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano. Tales excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

Los términos "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y variaciones gramaticales de los mismos, en la medida que se refieren a composiciones, portadores, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales pueden administrarse a un ser humano o sobre él sin la producción de efectos fisiológicos no deseables en un grado que prohibiría la administración de la composición.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para efectuar el tratamiento de una afección, síntoma o enfermedad indeseable del sujeto. La dosis eficaz es suficiente para reducir las adherencias en por lo menos aproximadamente un 10%, por lo menos aproximadamente un 20%, por lo menos aproximadamente un 30%, por lo menos aproximadamente un 40%, por lo menos aproximadamente un 50%, por lo menos aproximadamente un 60%, por lo menos aproximadamente un 70%, por lo menos aproximadamente un 80%, por lo menos aproximadamente un 90% o más. La dosis de un anticuerpo terapéutico, por ejemplo, puede ser de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, y puede administrarse inmediatamente después de la cirugía u otro evento que se espera que dé como resultado la formación de adherencias; o para reducir las adherencias existentes. La dosificación puede repetirse diariamente, cada 2 días, cada 3 días, quincenalmente, semanalmente, etc.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

Como se ha resumido con anterioridad, la presente divulgación proporciona métodos para tratar adherencias quirúrgicas en un sujeto, que incluyen, por ejemplo, prevenir la formación de adherencias, detener o reducir la formación de adherencias y/o revertir o eliminar adherencias establecidas en un sujeto. También se proporcionan compuestos y kits para realizar tales métodos.

Antes de que se describan con mayor detalle los aspectos de la presente invención, debe entenderse que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que tales pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo indicado, está abarcado

dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también están incluidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también están incluidos en la invención.

En la presente se presentan ciertos intervalos con valores numéricos precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se usa en la presente para proporcionar soporte literal para el número exacto que precede, así como un número que está cerca o aproximadamente al número que precede el término. Para determinar si un número está cerca o aproximadamente a un número enumerado específicamente, el número cercano o aproximado no enumerado puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número enumerado específicamente.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque también puede usarse en la puesta en práctica o ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente, ahora se describen métodos y materiales ilustrativos representativos.

La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a ser anterior a dicha publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas de manera independiente.

Cabe señalar que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Cabe señalar además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, se pretende que esta afirmación sirva como base antecedente para el uso de terminología exclusiva como "únicamente", "solo" y similares en relación con la enumeración de elementos de la reivindicación o el uso de una limitación "negativa".

Cualquier método enumerado puede llevarse a cabo en el orden de los eventos enumerados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

La presente divulgación se refiere a métodos para tratar a un sujeto para reducir la formación de adherencias, por ejemplo, adherencias quirúrgicas, e incluye administrar a un sujeto un agente que se dirige a la formación de adherencias por células mesoteliales lesionadas. También se proporcionan composiciones y kits configurados para realizar tales métodos de tratamiento. La divulgación se basa, por lo menos en parte, en nuestra identificación del mesotelio superficial como un tipo de célula primaria responsable de iniciar y contribuir a las adherencias (ver los ejemplos a continuación). Demostramos que la formación de adherencias puede tratarse en sujetos dirigiéndose a uno o más de múltiples puntos de control diferentes en el proceso de formación de adherencias por células mesoteliales lesionadas.

En ciertas realizaciones, el agente se dirige a las células mesoteliales lesionadas para su destrucción. Por ejemplo, el agente puede unirse a un producto génico cuya expresión se induce en las células mesoteliales lesionadas, diferenciándolo de este modo de las células mesoteliales no lesionadas y permitiendo su eliminación. En algunas de estas realizaciones, el agente es específico (por ejemplo, se une específicamente a) una proteína objetivo que se expresa en células mesoteliales lesionadas pero no en células mesoteliales no lesionadas. En ciertas realizaciones, el producto génico es mesotelina (MSLN) o uroplaquina 1B (UPK1B), ambas de las cuales se analizan con mayor detalle a continuación.

Como se describe en la sección de Ejemplos, el uso de agentes que se dirigen a la MSLN puede aumentar la depuración de las adherencias posoperatorias. Además, la MSLN es un objetivo deseable ya que es un gen mesotelial embrionario y no se expresa ampliamente en etapas adultas, con la notable exclusión de adherencias (como se describe en la presente) y tumores.

En ciertas realizaciones, el agente es un polipéptido que se une específicamente a MSLN. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un anticuerpo anti-MSLN o un fragmento de unión a MSLN del mismo.

El agente puede administrarse solo o en combinación con otros agentes, por ejemplo, agentes inmunomoduladores. Como tal, en ciertas realizaciones, los métodos incluyen además la administración de anticuerpos anti-MSLN solos o junto con otros inmunomoduladores, por ejemplo, agentes que inducen la eliminación de células. En ciertas de estas realizaciones, el segundo agente inhibe la actividad de CD47 en las células mesoteliales lesionadas, por ejemplo, un polipéptido que se une a CD47 y altera la unión de CD47 con SIRP α , a una dosis que logra un agotamiento de las células mesoteliales lesionadas. En ciertas realizaciones, el polipéptido se selecciona del grupo que consiste de: un anticuerpo anti-CD47, un polipéptido de la proteína reguladora de señales alfa (SIRP α), un fragmento de unión a CD47 de cualquiera de ellos y cualquier combinación de los mismos. Ver, por

ejemplo, Patente de Estados Unidos N° US8.758.750 titulada " Synergistic anti-CD47 therapy for hematologic cancers"; Patente de Estados Unidos N° 8.562.997; Patente de Estados Unidos N° 9,623,079; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° Estados Unidos 2015/0071905 titulada " High Affinity Sirp-Alpha Reagents".

Los Ejemplos proporcionados en la presente demuestran que el uso de agentes polipeptídicos (por ejemplo, anticuerpos) específicos para productos génicos inducidos en células mesoteliales lesionadas da como resultado la reducción de adherencias en un entorno clínico mediante la eliminación de las células mesoteliales lesionadas. Específicamente, dirigirse a MSLN del receptor de superficie celular con un anticuerpo anti-MSLN muestra una reducción sustancial en los grados de adherencia en modelos animales después de la inducción y ha demostrado su viabilidad debido a que los animales manifiestan pocos o ningún efecto secundario. La eficacia del tratamiento aumenta aún más mediante el uso de adyuvantes inmunes, que incluyen, entre otros, anti-CD47.

En ciertos casos, el agente recluta macrófagos inflamatorios (mediante el reclutamiento de monocitos circulantes) en el sitio de adherencia. Este reclutamiento da como resultado la reducción de la formación de adherencias en un entorno clínico.

Como se describe en la sección de Ejemplos, el uso de agentes de reclutamiento de macrófagos/monocitos inflamatorios es eficaz en el tratamiento de adherencias posoperatorias en un sujeto (por ejemplo, prevenir o eliminar). Por ejemplo, la administración de MCP-1 (por ejemplo, intraperitonealmente) mostró una reducción sustancial en los grados de adherencia en modelos animales después de la inducción. Se demostró que tal administración es factible debido a que los animales manifiestan pocos o ningún efecto secundario.

Además de MCP-1, los agentes que inducen una inflamación estéril en un sujeto encuentran uso en el tratamiento de la formación de adherencias. Ejemplos de tales agentes incluyen tioglicolato y poli(ácido láctico-co-glicólico) PLGA.

Por lo tanto, el reclutamiento de macrófagos inflamatorios puede lograrse con cualquier agente o agentes convenientes, incluyendo pero no limitados a: proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) o una porción de reclutamiento de macrófagos inflamatorios de la misma, tioglicolato, PLGA o cualquier combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, el agente evita el reclutamiento de neutrófilos. Como se describe en la sección de Ejemplos, la eliminación/reducción de neutrófilos circulantes o la prevención de su migración a sitios de adherencia potenciales da como resultado la reducción de la formación de adherencias en un entorno clínico. Por tanto, cualquier agente que elimine/reduzca los neutrófilos circulantes y/o evite su migración a los sitios de adherencia potenciales puede administrarse a un sujeto para tratar las adherencias.

Por ejemplo, el agente puede ser un polipéptido que se une a un marcador de granulocitos seleccionado de Gr-1, CD66b, CD177, CXCR1, VAP1, CXCR2 y CD10, que se expresan en neutrófilos y otros granulocitos inflamatorios, y lleva a su eliminación/reducción o inhibe su migración a sitios potenciales de adherencia. En ciertas realizaciones, el agente es un polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo.

Se observa que pueden combinarse uno o más agentes que promueven el reclutamiento de macrófagos inflamatorios y uno o más agentes que eliminan/reducen o inhiben la migración de neutrófilos. Por ejemplo, pueden administrarse a un sujeto el anticuerpo anti-MSLN y el anticuerpo anti-granulocito para tratar adherencias.

En ciertas realizaciones, el agente inhibe la expresión o actividad de un producto génico cuya expresión se induce en las células mesoteliales lesionadas, por ejemplo, MSLN, UPK1B, etc.

Como se describe en la sección de Ejemplos, se induce la expresión de una serie de genes en células mesoteliales lesionadas que pueden explotarse para tratar adherencias en un sujeto. Pueden usarse una serie de agentes diferentes, cada uno de los cuales puede dirigirse a diferentes genes inducidos y/o las rutas celulares o actividades celulares que regulan. El agente puede inhibir la expresión génica, por ejemplo, un agente de ARN inhibidor, por ejemplo, ARNi, ARNh, ARN antisentido y similares. El agente puede inhibir la actividad del producto génico, por ejemplo, previniendo su interacción con un receptor/ligando o una molécula de señalización en una ruta de transducción de señales en la que el producto génico desempeña un papel. No se pretende ninguna limitación a este respecto.

Por ejemplo, el gen del factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF-1 α) es inducido tras la lesión de las células mesoteliales. La administración de un agente que inhibe la expresión y/o la actividad de HIF-1 α a un sujeto puede tratar (por ejemplo, prevenir, eliminar o reducir) las adherencias en el sujeto. Puede usarse cualquier agente que inhiba la expresión o actividad de HIF-1 α , incluyendo pero no limitado a: equinomicina, PX12, FM19G11, criptotansinona, quetomina, bortezumib, acriflavina, 3-[[2-[4-(2-adamantil)fenoxi]acetil]amino]-4-hidroxibenzoato de metilo, dimetiloxaloliglicina (DMOG), quimiostatina, YC-1, crisina, dimetil-bisfenol A, CL67 y combinaciones de los mismos.

Por ejemplo, como se muestra en la presente, la equinomicina reduce significativamente la formación de adherencias en un modelo de ratón inhibiendo la proliferación de células mesoteliales, la activación y el contacto célula-célula. Los agentes adicionales que interfieren con la actividad de HIF-1 α también reducen la formación de adherencias en estos modelos, incluyendo PX12, FM19G11 y criptotansinona.

Como otro ejemplo, el gen de la uroplaquina 1B (UPK1B) se induce tras la lesión de las células mesoteliales. La administración de un agente que inhibe la expresión y/o la actividad de UPK1B a un sujeto puede tratar (por ejemplo, prevenir, eliminar o reducir) las adherencias en el sujeto. Puede usarse cualquier agente que inhiba la expresión o la actividad de UPK1B. Además, agentes que se dirigen a las células que expresan UPK1B para su destrucción o eliminación. En ciertas realizaciones, el agente es un polipéptido que se une específicamente a UPK1B. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un anticuerpo anti-UPK1B o un fragmento de unión a UPK1B del mismo. El agente puede administrarse solo o en combinación con otros agentes, por ejemplo, agentes inmunomoduladores. Como tal, en ciertas realizaciones, los métodos incluyen además la administración de anticuerpos anti-UPK1B solos o junto con otros inmunomoduladores, por ejemplo, agentes que inducen la eliminación de células. En algunas de estas realizaciones, el segundo agente inhibe la actividad de CD47 en las células mesoteliales lesionadas, por ejemplo, un polipéptido que se une a CD47 (como se ha descrito anteriormente). UPK1B es un objetivo deseable ya que es un gen mesotelial embrionario y no se expresa ampliamente en el adulto excepto en las adherencias (mesotelio lesionado) y el epitelio de la vejiga.

La manosa es un monosacárido simple que se une competitivamente a UPK1B y previene su interacción con receptores/ligandos cognados. Como se muestra en los Ejemplos de la presente, la manosa se une competitivamente a UPK1B y lleva a una reducción sustancial en las puntuaciones de adherencia en modelos animales después de la inducción. Por tanto, en ciertas realizaciones, el agente administrado al sujeto para tratar las adherencias se une competitivamente a UPK1B. Estos agentes incluyen, por ejemplo, manosa, un derivado de unión a UPK1B del mismo (por ejemplo, conjugados de proteínas, dímeros, trímeros, dendrímeros, etc.) y/o análogos, así como otros agentes que se unen competitivamente a UPK1B, por ejemplo, polipéptidos solubles que se unen a UPK1B, por ejemplo, derivados de dominios de receptor/ligando natural a los que se une UPK1B.

Como otro ejemplo, la expresión de una serie de productos génicos de reclutamiento de neutrófilos se induce en células mesoteliales lesionadas, incluyendo las quimiocinas CXC. Por ejemplo, los genes CXCL1 y CXCL2 se inducen en las células mesoteliales tras la lesión. Como se ha indicado anteriormente, el reclutamiento de neutrófilos lleva a una formación de adherencia mejorada y, como tal, la prevención de la expresión y/o la actividad de los productos génicos de reclutamiento de neutrófilos reducirá la formación de adherencias en un sujeto. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, un agente que inhibe la expresión y/o la actividad de un producto génico de reclutamiento de neutrófilos puede administrarse a un sujeto para tratar adherencias. En ciertas realizaciones, el producto génico es una quimiocina CXC, por ejemplo, CXCL1, CXCL2 o combinaciones de las mismas. El agente puede ser un anticuerpo o fragmento de unión al mismo que se une e inactiva la quimiocina de CXC o un agente que bloquea la expresión de la quimiocina de CXC (por ejemplo, una fracción de ARN inhibidora, por ejemplo, ARNip o ARNhc, etc.).

Los métodos de tratamiento de adherencias divulgados en la presente pueden usarse para tratar a un sujeto para cualquiera de una variedad de condiciones que pueden promover la formación de adherencias, por ejemplo, lesiones postoperatorias/quirúrgicas (por ejemplo, cirugías abiertas o laparoscópicas) y/o para el tratamiento después de lesiones inflamatorias. Los agentes pueden administrarse para la profilaxis de la adherencia, por ejemplo, antes de la formación de una adherencia, o después de que se hayan formado o iniciado las adherencias. Por tanto, en ciertas realizaciones, la adherencia es una adherencia abdominal, por ejemplo, una adherencia quirúrgica abdominal. El agente puede administrarse antes, durante o después del procedimiento quirúrgico.

De acuerdo con la presente divulgación, los agentes de tratamientos de adherencias como se describen en la presente pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para uso terapéutico, por ejemplo, para tratamiento en humanos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen una o más entidades terapéuticas de la presente divulgación o sales, ésteres o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos. En algunas otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen una o más entidades terapéuticas de la presente divulgación en combinación con otro agente terapéutico, por ejemplo, un agente antiinflamatorio o un agente adicional para tratar una adherencia.

Las entidades terapéuticas de la presente divulgación a menudo se administran como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo y otro excipiente farmacéuticamente aceptable. La forma preferida depende del modo de administración y aplicación terapéutica pretendidos. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, portadores o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos usados comúnmente para formular composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. El diluyente se selecciona para que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada

con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros portadores, adyuvantes, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

En algunas otras realizaciones más, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden incluir macromoléculas grandes, de metabolización lenta como proteínas, polisacáridos como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (como Sepharose™ funcionalizado con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados de lípidos (como gotitas de aceite o liposomas).

Como se ha indicado anteriormente, en la presente se divulgan métodos para tratar adherencias en un sujeto mediante la administración de un agente que se dirige a la formación de adherencias por células mesoteliales lesionadas. Tales métodos incluyen administrar a un sujeto con necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis eficaz de uno o más agentes como se detalla en la presente.

Las dosis eficaces de la entidad terapéutica de la presente divulgación, por ejemplo, para el tratamiento de adherencias, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos, por ejemplo, animales de compañía como perros, gatos, caballos, etc., mamíferos de laboratorio como conejos, ratones, ratas, etc., y similares. Las dosificaciones de tratamiento pueden titularse para optimizar la seguridad y la eficacia.

En algunas realizaciones, la dosificación terapéutica puede variar de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las entidades terapéuticas de la presente divulgación pueden administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indique midiendo los niveles en sangre de la entidad terapéutica en el paciente. Alternativamente, las entidades terapéuticas de la presente divulgación pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del polipéptido en el paciente.

Las composiciones para el tratamiento de adherencias pueden administrarse mediante medios parenterales, tópicos, intravenosos, intratumorales, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares. Una vía de administración típica es intravenosa o intraperitoneal, aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces.

Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas como poliláctida, poliglicólido o copolímero para un efecto adyuvante mejorado, como se ha analizado anteriormente. Langer, Science 249: 1527, 1990 y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. Los agentes de esta divulgación pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que pueden formularse de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente como estériles, sustancialmente isotónicas y en total conformidad con todas las regulaciones de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) de la U.S. Food and Drug Administration.

La toxicidad de los agentes para el tratamiento de adherencias puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, determinando la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) o la LD₁₀₀ (la dosis letal para el 100% de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación que no sea tóxico para su uso en humanos. La dosificaciones de las proteínas descritas en la presente se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la dosis eficaz con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. El médico individual puede elegir la formulación, la vía de administración y la dosificación exactas en vista del estado del paciente. Cabe señalar que varios de los agentes de tratamiento de adherencias divulgados en la presente están aprobados para su uso en humanos.

También dentro del alcance de la divulgación están los artículos de fabricación (por ejemplo, sistemas o kits) que contienen un agente de tratamiento de adherencias o formulaciones del mismo e instrucciones de uso. El kit puede contener además por lo menos un reactivo adicional. Los kits típicamente incluyen una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier escritura o material grabado suministrado

en o con el kit, o que acompaña de otro modo al kit.

Como tal, los aspectos de la divulgación incluyen un kit que contiene: (a) una composición farmacéutica que tiene (i) un agente que se dirige a la formación de adherencias por las células mesoteliales lesionadas en una cantidad eficaz para reducir las adherencias (como se describe en la presente), y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable, y (b) instrucciones para administrar la composición farmacéutica a un sujeto que se ha sometido o se someterá a una cirugía. En algunos casos, el agente se selecciona del grupo que consiste de: un anticuerpo anti-MSLN o un fragmento de unión a MSLN del mismo; un anticuerpo anti-UPKB1 o un fragmento de unión a UPKB1 del mismo; un anticuerpo anti-CD47, un polipéptido SIRP α o un fragmento de unión a CD47 de cualquiera de ellos; MCP-1 o una porción de reclutamiento de macrófagos inflamatorios de la misma; un anticuerpo anti-Gr-1 o un fragmento de unión a Gr-1 del mismo; tioglicolato; PLGA; manosa o un derivado de la misma que se une a UPKB1; y cualquier combinación de los mismos.

También se divulgan métodos para elaborar artículos de fabricación (por ejemplo, sistemas o kits) como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, un kit, y eso incluye combinar (a) una composición farmacéutica que tiene (i) un agente que se dirige a la formación de adherencias por células mesoteliales lesionadas en una cantidad eficaz para reducir las adherencias (como se describe en la presente), y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable, y (b) instrucciones para administrar la composición farmacéutica a un sujeto que se ha sometido o se someterá a una cirugía. En algunos casos, el agente se selecciona del grupo que consiste de: un anticuerpo anti-MSLN o un fragmento de unión a MSLN del mismo; un anticuerpo anti-CD47, un polipéptido SIRP α o un fragmento de unión a CD47 de cualquiera de ellos; MCP-1 o una porción de reclutamiento de macrófagos inflamatorios de la misma; un anticuerpo anti-Gr-1 o un fragmento de unión a Gr-1 del mismo; tioglicolato; PLGA; manosa o un derivado de la misma que se une a UPKB1; y cualquier combinación de los mismos.

Las instrucciones para poner en práctica los presentes métodos se registran generalmente en un soporte de grabación adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar impresas en un sustrato, como papel o plástico, etc. Como tal, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un prospecto, en el etiquetado del recipiente del kit o componentes del mismo (es decir, asociado con el embalaje o subembalaje), etc. En otros casos, las instrucciones están presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento adecuado legible por ordenador, por ejemplo, CD-ROM, disquete, etc. En otros casos más, las instrucciones reales no están presentes en el kit, pero se proporcionan los medios para obtener las instrucciones de una fuente remota, por ejemplo, a través de Internet. Un ejemplo de este caso es un kit que incluye una dirección web donde pueden verse las instrucciones y/o desde donde pueden descargarse las instrucciones. Al igual que con las instrucciones, este medio para obtener las instrucciones está grabado en un sustrato adecuado.

EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar la presente invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni se pretende que representen que los experimentos a continuación sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio ponderado, la temperatura está en grados centígrados y la presión es igual o cercana a la atmosférica.

La presente invención se ha descrito en términos de realizaciones particulares encontradas o propuestas por el presente inventor para comprender modos preferidos para la puesta en práctica de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que, a la luz de la presente divulgación, pueden realizarse numerosas modificaciones y cambios en las realizaciones particulares ejemplificadas. Por ejemplo, debido a la redundancia de codones, pueden realizarse cambios en la secuencia de ADN subyacente sin afectar a la secuencia de la proteína. Además, debido a consideraciones de equivalencia funcional biológica, pueden realizarse cambios en la estructura de la proteína sin afectar a la acción biológica en especie o cantidad. Se pretende que todas estas modificaciones estén incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Las adherencias peritoneales son tejidos fibrosos que unen los órganos entre sí o a la pared peritoneal y son una causa importante de morbilidad posquirúrgica e infecciosa. Se han realizado estudios extensos que sugieren que las células hematopoyéticas, las citoquinas y el depósito de fibrina desempeñan un papel importante en la promoción de la formación de adherencias. Sin embargo, la patogénesis molecular que promueve inicialmente la formación de adherencias no ha sido bien caracterizada.

Aquí identificamos el mesotelio de la superficie como un tipo de célula primaria responsable de iniciar y contribuir a las adherencias. Las evoluciones temporales de las tinciones mesoteliales específicas y los marcadores de proliferación demuestran que las adherencias se forman a partir de la expansión de las células mesoteliales. El aislamiento y la secuenciación de ARN de células mesoteliales activadas en un breve transcurso de tiempo

inmediatamente después de la inducción de la adherencia sugieren un fenotipo de marcador de superficie específico de una adherencia y reguladores candidatos de la formación de adherencias. Se identificaron la mesotelina (MSLN) y la uroplaquina 1B (UPK1B) como receptores de superficie únicos en el mesotelio lesionado. El factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α) se identificó como un regulador temprano, y la inhibición funcional mostró una disminución significativa de la formación de adherencias, lo que sugiere nuevos agentes terapéuticos para prevenir las adherencias posoperatorias. El análisis de secuenciación de ARN adicional de las células mesoteliales deficientes en HIF1 α después de la inducción de la adherencia demostró que los tumores, como el tumor de Wilms 1 (WT1) y la UPK1 B, están en sentido descendente y controladas por HIF1 α y desempeñan un papel en el proceso de adherencia. Los análisis del tejido de adherencia humano confirman que existen firmas genéticas similares en las enfermedades humanas. Nuestros resultados destacan el papel profundamente crítico que desempeña el mesotelio lesionado en la formación de adherencias e investiga su fisiopatología celular y molecular.

Ejemplo 1

15 Materiales y métodos

Inducción de adherencias

Se realizaron cirugías de inducción de adherencia en ratones B6 de tipo salvaje (C57BL/6J (The Jackson Laboratory) de 6 a 10 semanas de edad. Se anestesió a los ratones con isoflurano inhalado hasta que se determinó que estaban inconscientes y se confirmó mediante la prueba de pellizco del dedo del pie. El abdomen se desinfectó con betadine y solución salina tamponada con fosfato. (PBS). Se hizo una incisión clavicular media izquierda en la piel a lo largo de la longitud del ratón. Se hizo una incisión clavicular media izquierda similar en el peritoneo que recorre la longitud del peritoneo. El peritoneo se dobló suavemente para la derecha y se mantuvo mediante una pinza hemostática. Se colocó un único botón isquémico en la mitad derecha de la pared peritoneal sujetando una pequeña pieza de peritoneo (~5 mm de diámetro) y ligando la base con una sutura de seda 4-0 (Ethicon, 683G). Opcionalmente se realizó una ligera abrasión en el botón (24 veces) y en el hígado, el ciego y el intestino delgado y grueso adyacentes (7 veces) (dependiendo de la gravedad de la adhesión deseada) con un cepillo quirúrgico. Se realizó un cepillado ligero con menos repeticiones para evitar un sangrado puntual. El peritoneo se cerró usando suturas de seda 4-0 y la piel se cerró con grapas (EZ Clips, 9 mm, Braintree Scientific Inc). Se dejó que los ratones se recuperaran sobre una almohadilla térmica y se les inyectaron 0,05-0,1 mg/kg de buprenorfina. Los ratones fueron seguidos de cerca y monitorizados diariamente para detectar signos de morbilidad durante 7 días hasta la eutanasia. Los tejidos adheridos se disecaron, puntuaron y fijaron en paraformaldehído al 2% durante la noche a 4 grados.

35 Puntuación de adherencia

En los estudios funcionales, asignamos una puntuación única para una adherencia, en base a los criterios detallados en el texto anterior, teniendo en cuenta tanto la superficie de contacto como la composición molecular. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la cantidad de contacto de área superficial no siempre dicta el fenotipo molecular y viceversa, ya que la gravedad de la adherencia probablemente existe en un continuo representado por nuestros criterios discretos descritos anteriormente. Hemos observado áreas de adherencia con un alto contacto de área superficial (una puntuación de 3 o 4) con poca o ninguna afectación de colágeno o macrófagos (F4/80-). Por el contrario, también hemos observado áreas de adherencia con bajo contacto de área superficial (una puntuación de 2) con alta infiltración de colágeno y macrófagos. En estos casos, puntuaremos las adherencias en base al contacto de área superficial o el número de órganos implicados, ya que predecimos que este es un indicador más significativo del resultado clínico.

50 Histología

Los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 2% durante la noche a cuatro grados y se incrustaron y congelaron en el compuesto O.C.T. (Sakura) de temperatura de corte óptima o se incrustaron en parafina. Las secciones congeladas se cortaron a 10-12 μ m en todos los órganos adheridos y se guardaron para inmunofluorescencia. Se cortaron secciones de parafina a 5 μ m y se realizaron tinciones con hematoxilina/eosina y tricoma de Masson mediante protocolos estándar.

Inmunofluorescencia

Se realizaron estudios de inmunofluorescencia en secciones congeladas. Las secciones congeladas se descongelaron a temperatura ambiente durante diez minutos y se lavaron en PBS dos veces. Los portaobjetos se bloquearon en suero al 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se tiñeron con anticuerpos primarios contra PDPN (1:100, monoclonal de ratón, Abcam), MSLN (1:200, monoclonal de conejo, ABBIOTEC), fibronectina (1:100, monoclonal de conejo, Abcam), F4/80 (1:100, monoclonal de rata, Abcam), CD31 (1:100, monoclonal de conejo, Abcam), pancolágeno (1:100, policlinal de conejo, Abcam), WT1 (1:100, policlinal de conejo, Abcam), CD44 (1:100, policlinal de conejo, Abcam), HIF1A (1:100, monoclonal de ratón) y S100A4 (1:100,

policlonal de conejo, Abcam), durante la noche a 4 grados y se lavaron tres veces en PBS. Los portaobjetos se tiñeron y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alex Fluor 488, 594, o 647 durante una o dos horas a temperatura ambiente. Las manchas se lavaron una vez con PBST y tres veces con PBS antes de la tinción nuclear con Hoechst 33342 (Life Technologies), durante dos minutos y se montaron con Fluoromount G (Southern Biotech).

Pulse-Chase de EdU

Después de la inducción de la adherencia, a los ratones se les inyectaron inmediatamente por vía subcutánea 0,025 mg de 5-etinil-2'-desoxiuridina (Life Technologies) en PBS al 90% y etanol al 10%. Se hizo un seguimiento de los ratones durante 7 días y se sacrificaron. Los tejidos adheridos se diseccionaron y fijaron con paraformaldehído al 2% durante la noche, se congelaron en O.C.T. (Sakura) y se seccionaron a 12 μ m. Las células positivas para EdU se visualizaron con el kit de imagenología Click-iT EdU (Life Technologies).

Citometría de flujo

Se realizó una cirugía de inducción de adherencia modificada de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente en C57BL/6J de tipo salvaje (The Jackson Laboratory). Se colocaron dos botones isquémicos a cada lado del peritoneo y no se realizó abrasión del botón ni de los órganos abdominales. Se dejó que los ratones se recuperasen durante 6, 12 o 24 horas y se sacrificaron. Los botones isquémicos se diseccionaron cortando la base y se colocaron en medio de disociación (DMEM (Life Technologies, 10565-042), 50 mg/ml de colagenasa IV (Worthington Biochemical), CaCl_2 20 μ M). Los botones se homogeneizaron usando una hoja de un solo filo (Razor Blade Company) y se incubaron en medio de disociación durante 30 minutos a 37° C. La suspensión celular posterior se filtró a través de un filtro de 100 μ m y se centrifugó y se lavó con suero bovino fetal (FBS) al 2% en PBS. Las células se trataron con 1 ml de tampón de lisis ACK (Life Technologies) durante 5 minutos a 4°C y se centrifugaron y lavaron. Las células se bloquearon con suero de cabra al 1% (Life Technologies) durante 10 minutos y se tiñeron con anti-PDPN (BioLegend, 8.1.1, 1:100), anti-LYVE-1 (eBioscience, ALY-7, 1:100), anti-CD31 (eBioscience, 390, 1:100) y anti-CD45 (BioLegend, 30-F11, 1:100) durante 30 minutos a 4°C. Las células se centrifugaron, se filtraron y se volvieron a suspender en 200 μ l de FBS al 2% en PBS. Las células se pasaron a través de un FACSaria (BD Biosciences) y las células PDPN+LYVE1-CD31-CD45- se clasificaron directamente en 750 μ l de Trizol LS (Life Technologies).

Secuenciación y análisis de ARN

El ARN total de la población mesotelial clasificada se aisló usando Trizol (ThermoFisher) según las recomendaciones del fabricante y se facilitó mediante la adición de poliacrilamida lineal (Sigma) como portador durante la precipitación del ARN. El ARN total purificado se trató con 4 unidades de ADNasa libre de ARNasa RQ1 (Promega) a 37° C durante 1 hora para eliminar cantidades traza de ADN genómico. El ARN total tratado con DNasa se limpió usando el micro kit RNeasy (QIAGEN). Se usaron 10-50 ng de ARN total como entrada para la preparación y amplificación de ADNc usando Ovation RNA-Seq System V2 (NuGEN). El ADNc amplificado se cortó usando Covaris S2 (Covaris) usando los siguientes ajustes: volumen total 120 μ l, ciclo de trabajo 10%, intensidad 5, ciclo/ráfaga 100, tiempo total 2 min. El ADNc cortado se limpió usando Agencourt Ampure XP (Beckman Coulter) para obtener fragmentos de ADNc $\geq$ 400 pares de bases (pb). Se usaron 500 ng de ADNc cortado y seleccionado por tamaño como entrada para la preparación de la biblioteca usando el kit de preparación de la biblioteca de ADN NEBNext Ultra de Illumina (New England BioLabs) según las recomendaciones del fabricante. Las bibliotecas resultantes (distribución de fragmentos: 300-700 pb; pico 500-550 pb) se secuenciaron usando HiSeq 4000 (Illumina) para obtener lecturas de extremos emparejados de 2x150 pares de bases. Las lecturas obtenidas se recortaron para la calidad de la llamada base y la presencia de secuencias de adaptadores usando Skewer (ref). Las lecturas de alta calidad obtenidas de este modo se alinearon con el genoma del ratón usando OLEGO (ref) y los niveles de ARNm expresados se estimaron usando cuffdiff2 (ref) y se representaron como fragmentos por kilo-base por millón de lecturas mapeadas (FPKM).

Tratamientos con anticuerpos

Se indujeron adherencias en B6 de tipo salvaje (C57BL/6J (The Jackson Laboratory) y se dejaron recuperar durante 7 días. Se administraron 200 μ g de anticuerpo monoclonal anti-MSLN (B35) mediante inyecciones intraperitoneales a los 7, 10 y 13 días después de la inyección. Se coadministraron 200 μ g de anti-CD47 monoclonal (MIAP301) (BioXCell) mediante inyecciones intraperitoneales con la misma frecuencia. Los ratones se sacrificaron 17 días después de la cirugía inicial y se puntuaron para determinar la gravedad de la adherencia. El anticuerpo anti-MSLN B35 fue un regalo de A. Miyajima.

Cultivo mesotelial in vitro

Se sacrificaron B6 de tipo salvaje (C57BL/6J (The Jackson Laboratory) y se extirpó el mesotelio de la cápsula renal y el intestino. El mesotelio extirpado se cortó en fracciones más pequeñas y se colocó en placas de

cultivo pretratadas con solución de gelatina EmbryoMax al 0,1% (EmdMillipore) durante 30 minutos y se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (Life Technologies) con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de aminoácidos no esenciales a 37 grados durante 7 días. Las células mesoteliales se cocultivaron con macrófagos (añadidos a confluencia) en condiciones normales o en condiciones hipóxicas (incubadora de O₂ al 1% o CoCl₂ 100uM).

Preparación de macrófagos primarios derivados de la médula ósea (BMDM)

Para preparar BMDM primarias, se sacrificaron ratones BALB/c de forma humanitaria y se desinfectaron con etanol al 70%. Se hizo una incisión a lo largo de las piernas y se extrajo el músculo de los huesos. El fémur y la tibia se extrajeron del cuerpo y se enjuagaron con PBS. Los huesos se enjuagaron con una jeringuilla de 6 ml y una aguja de calibre 23, y la médula se volvió a suspender en 10 ml de RPMI. La suspensión se centrifugó durante 5 minutos, 1200 rpm y el sedimento se volvió a suspender en 5 ml de tampón de lisis ACK (Invitrogen) durante 5 minutos para eliminar las células sanguíneas. La suspensión se filtró sobre un colador de células Falcon de 70 µm y se centrifugó de nuevo. El sedimento se volvió a suspender en 40 ml de medio de macrófagos (RPMI + 10% de FBS + 10% de penicilina/estreptomicina + 10 ng/ml de MCSF) y se sembró en cuatro placas Petri de 10 cm. El día 4, se reemplazó el medio de macrófagos. El día 7, se sacaron los macrófagos de la placa y se usaron.

Tratamientos con inhibidores de moléculas pequeñas

Se realizaron cirugías de inducción de adherencias en B6 de tipo salvaje de 4-8 semanas de edad (C57BL/6J (The Jackson Laboratory) como se ha descrito anteriormente. 200 mg/kg de criptotansinona (Sigma Aldrich), 2 mg/kg de FM19G11 (Sigma Aldrich), 10 µg/kg o 20µg/kg de equinomicina (Sigma Aldrich), o 25 mg/kg de PX12 (Sigma Aldrich) inmediatamente después de la lesión, 4 horas después de la lesión y cada 24 horas posteriormente durante 7 días.

Parabiosis

Las cirugías de parabiosis se realizaron en ratones B6 de tipo salvaje hembra (C57BL/6J (The Jackson Laboratory) y C57BL/Ka Rosa26 mRFP1 de la misma edad (4-6 semanas de edad). Los ratones sometidos a parabiosis se alojaron juntos en una sola jaula durante 10 días antes. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano inhalado hasta que se determinó la inconsciencia confirmada por la prueba de pellizco del dedo del pie. Se afeitaron los laterales de los ratones y se limpiaron con etanol al 70% y betadine. Los ratones se colocaron uno al lado del otro y se hicieron incisiones desde el codo hasta la rodilla en los laterales adyacentes. Se ligaron las articulaciones del codo y la rodilla con suturas 4-0 (Ethicon) y se grapó la piel suelta de los ratones adyacentes. Se permitió que los ratones se recuperaran sobre una almohadilla térmica y se les inyectaron 0,05-0,1 mg/kg de buprenorfina. Los ratones fueron seguidos de cerca y se monitorizaron diariamente para detectar signos de morbilidad durante 14 días. Las grapas se retiraron después de 14 días y los ratones se sangraron retroorbitalmente para analizar el quimerismo.

Resultados

Para identificar un modelo de adherencia con una gravedad y una localización de adherencia consistentes, analizamos los modelos de roedores publicados actualmente que incluían inyecciones intraperitoneales (I.P.) de sustancias químicas inflamatorias, abrasión áspera del ciego y el peritoneo usando un cepillo quirúrgico, papel de lija o un instrumento similar (Chung, 2002); Wei et al., 2015), cauterización del peritoneo y órganos abdominales (Kosaka, Yoshimoto, Yoshimoto, Fujimoto, y Nakanishi, 2008; T. Suzuki et al., 2015), y/o colocación de botones isquémicos en la pared peritoneal (Cassidy, Sherburne, Heydrick y Stucchi, 2015). Nuestro modelo final debe poder predecir de manera robusta las localizaciones donde se formarán las adherencias para que las células de origen que inician y contribuyen a la adherencia puedan identificarse y aislarse fácilmente durante el desarrollo de la adherencia. Descubrimos que el uso de métodos químicos o la abrasión general dificultaba el control de la localización y la gravedad de las adherencias abdominales, incluso con una abrasión localizada en las superficies de los órganos (en el peritoneo, ciego, hígado). Las localizaciones de las formaciones de las adherencias eran a menudo impredecibles, probablemente debido a la inflamación peritoneal. La cauterización llevó a una alta morbilidad y también a formaciones de adherencia inconsistentes.

De los modelos establecidos, descubrimos que colocar un solo botón isquémico en la mitad derecha de la pared peritoneal (ver 'Materiales y métodos') dio como resultado adherencias entre el botón y el hígado o intestino, con poca o ninguna morbilidad. Opcionalmente, descubrimos que aplicando una suave abrasión del botón y de los órganos abdominales adyacentes seguidos, podríamos controlar la gravedad de la adherencia. Usando este protocolo de adherencia pudimos controlar constantemente el sitio de las adherencias y, por lo tanto, predecir la localización de las células que forman la adherencia y su gravedad para explorar con más detalle la transición del mesotelio superficial durante la progresión de la enfermedad.

Después de la cirugía, se permitió que los ratones se recuperaran y se sacrificaron 30 minutos, 1 h, 2 h, 4

h, 24 h, 72 h y 7 días después de la inducción. Todos los botones isquémicos con adherencias ectópicas que se desarrollaron se diseccionaron, fijaron y tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) o con podoplanina (PDPN) y mesotelina (MSLN), marcadores del receptor de superficie del mesotelio (Rinkevich et al., 2012). Una capa celular intacta era claramente visible en el botón isquémico con y sin abrasión en todos los momentos posteriores a la cirugía (**Fig. 1A, 1B**), lo que indica que el mesotelio no está denudado ni se retrae después de una tensión o una lesión mecánica. Cuatro horas después de la cirugía, el mesotelio experimentó una proliferación celular y mostró un engrosamiento 24 horas después de la inducción (**Fig. 1B**), convirtiéndose en una capa multicelular. La proliferación celular se localizó en el sitio de la lesión, ya que el mesotelio no dañado, ambos adyacentes al botón, mostraban una morfología normal de una capa de células individuales. Se desarrolló localmente una formación de adherencia significativa a los 7 días después de la inducción, y el tejido de adherencia se tiñó fuertemente tanto para PDPN como para MSLN (**Fig. 1C**), lo que sugiere que los focos de adherencia se derivan del mesotelio subyacente y están compuestos por células mesoteliales.

Para confirmar que los focos de adherencia se derivan del mesotelio superficial y no de las células circulantes, realizamos estudios de parabiosis en ratones C57BL/6J y ratones C57BL/Ka Rosa26 mRFP1, que expresan constitutivamente proteína roja fluorescente (RFP) (Ueno & Weissman, 2006). Se conectó la vasculatura de ratones hembra de edad coincidente (4-6 semanas de edad) (ver "Materiales y métodos") y después de 14 días, se confirmó que los ratones parabióticos habían alcanzado el quimerismo sanguíneo. Luego, se indujeron las adherencias en ratones C57BL/6J de tipo salvaje sin color de los parabiontes y después de 7 días se ensayó la formación de adherencias. Las adherencias parabióticas se seccionaron y se tiñeron con PDPN para confirmar la contribución de las células mesoteliales. Se observó que las células PDPN⁺ eran visibles en todos los sitios de adherencia y no estaban coloreadas, lo que indica que las células mesoteliales que contribuyen a la adherencia se derivan de una fuente local en lugar de células circulantes (**Fig. 1D**). Las células RFP⁺ eran visibles y estaban dispersas por todo el sitio de adherencia y muchas células RFP⁺ también se tiñeron positivas para F4/80, lo que indica que los macrófagos derivados de los monocitos circulantes se infiltran en el sitio de adherencia.

También realizamos estudios pulse-chase de 5-etil-2'-desoxiuridina (EdU) después de la inducción de la adherencia para analizar la proliferación celular. Se inyectaron a los ratones 0,025 mg de EdU por vía intraperitoneal después de la inducción de la adherencia y se les permitió recuperarse durante 7 días hasta que fueron sacrificados y sus adherencias diseccionadas, seccionadas y teñidas para EdU, PDPN y MSLN. Las células mesoteliales (definidas como PDPN⁺ o MSLN⁺) se contaron en alta potencia (campos de 0,75 mm x 1 mm) múltiple (n=20) en ratones de control (sin inducción de adherencia) y ratones (n=16) después de la inducción de adherencia. Hubo un número significativamente mayor de células mesoteliales en las áreas de adherencia en comparación con los ratones de control, lo que indica un mayor número de células mesoteliales en las adherencias (**Fig. 1E, 1F**). Para evaluar la proliferación mesotelial, el número de células EdU+MSLN⁺ o EdU+PDPN⁺ dobles positivas se contaron en un campo de 0,75 mm x 1 mm (n=20). Encontramos un gran aumento de células dobles positivas en las áreas de adherencia sobre las áreas de control, lo que indica que la adherencia se debe en gran medida a las expansiones de las células mesoteliales preexistentes en los sitios de la lesión (**Fig. 1E, 1F**).

Para comprender mejor los cambios en el panorama transcripcional en las células mesoteliales que llevan a la formación de adherencias, aislamos células mesoteliales del sitio de inducción a las 6, 12 y 24 horas después de la inducción de la adherencia empleando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) con el siguiente mesotelio fenotipo de la superficie celular: PDPN⁺LYVE1⁻CD31⁻CD45⁻ (**Fig. 2A**). Para obtener cantidades adecuadas de células mesoteliales, se colocaron cuatro botones en ratones C57BL/6J individuales (dos a cada lado de la pared peritoneal). Se tomaron cinco ratones (20 botones) para un solo triplicado y se sacrificaron tres cohortes de ratones 6, 12 o 24 horas después de la lesión. Se aislaron células mesoteliales peritoneales por FACS de ratones que no se sometieron a cirugía y se usaron como un punto de referencia de control (t=0) para los cambios transcripcionales asociados con la inducción de un programa de adherencia. El ARN se aisló de las células agrupadas y se secuenció de acuerdo con los procedimientos estándar (ver "Materiales y métodos"). Los genes expresados diferencialmente se agruparon en base a los patrones de expresión a lo largo del transcurso de 24 horas y se ejecutaron mediante análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (consulte "Materiales y métodos" para elucidar el panorama transcripcional global que se produce en las primeras 24 horas de la progresión de la adherencia (**Fig. 2B,CD**).

Descubrimos que los genes expresados diferencialmente se agruparon ampliamente en seis patrones de expresión principales, alcanzando su punto máximo o disminuyendo a las 6, 12 y 24 horas (**Fig. 2B**), correspondiente a lo que creemos que son dos eventos principales en la patogénesis de la adherencia: inicio y progresión. Los genes tempranos, que muestran una expresión máxima o mínima después de 6 horas, son probablemente reguladores del proceso de adherencia y la formación de iniciación. Los genes intermedios, que alcanzan su punto máximo o bajan a las 12 horas, probablemente respondan a los genes tempranos que pueden llevar potencialmente a la progresión de la adherencia. Los genes tardíos, que aumentan o disminuyen a las 24 horas, son probablemente los genes que controlan la progresión de la adherencia.

También se calcularon las veces de cambio de las transcripciones después de 6, 12 y 24 horas y se representaron gráficamente frente a la totalidad del genoma (**Fig. 2C**). Se calcularon genes significativamente regulados por incremento o regulados por disminución en base a un umbral de $q < 0,05$, representados frente a la

identidad génica y ordenados por significancia en el cambio de veces. Sorprendentemente, descubrimos que en el plazo de 24 horas, aproximadamente 8000 genes se expresaron significativamente de manera diferente en el mesotelio después de la lesión. La cantidad de genes que están significativamente regulados por incremento y regulados por disminución durante nuestro transcurso del tiempo rivalizan con los cambios encontrados entre los macrófagos diferenciados terminalmente y las células B, aproximadamente XXXX, (datos no publicados). Esto indica que las células mesoteliales lesionadas experimentan una transformación completa en las primeras 24 horas después de la lesión, e insinúa la diversidad inexplorada que existe en el mesotelio.

El análisis del enriquecimiento de conjuntos de genes mediante análisis de términos GO (Fig. 2D) muestra que en el plazo de las primeras seis horas de la inducción los genes tempranos asociados con la angiogénesis y la respuesta de hipoxia están regulados positivamente en las células mesoteliales. Los mediadores distintivos de la respuesta inflamatoria se regularon por incremento significativamente durante todo el transcurso temporal de 24 horas, incluyendo la actividad de quimiocinas y quimiotaxis, secreción de citoquinas y la vía NF kappa B (Fig. 2D). Los procesos celulares fundamentales, como la proliferación, se regulan por incremento en el transcurso de 24 horas, lo que corrobora nuestros experimentos pulse-chase.

Curiosamente, los conjuntos de genes relacionados con la región extracelular y la organización del colágeno se regularon por disminución durante las 24 horas siguientes a la inducción de la adherencia. Estos conjuntos de genes incluyen los genes específicos fibronectina 1 (FN1) y varios colágenos, incluyendo COL1A1, COL1A2, COL3A1, (Fig. 2D), lo que indica que los reordenamientos transcripcionales importantes tienen lugar durante las primeras etapas de la lesión mesotelial.

Las vías de desarrollo clásicas también disminuyeron durante esta ventana temporal; se descubrió que las vías de señalización Wnt, Hedgehog, BMP e Hippo estaban reguladas por disminución en el primer día después de la inducción de la adherencia, aunque la importancia de esto aún no se ha explorado. Finalmente, se descubrió que la familia TGF, una vía que se cree que contribuye significativamente a la formación de adherencias y a la inflamación en general, está regulada por disminución en el mesotelio durante 24 horas (**Fig. 2D**), lo que indica que no se está produciendo una regulación por incremento en la señalización de TGF en las células mesoteliales *in vivo*.

Finalmente, realizamos un análisis directo del comportamiento de genes específicos. Curiosamente, muchos marcadores específicos expresados por el mesotelio durante el desarrollo embrionario se regularon por incremento después de la lesión, específicamente mesotelina (MSLN), uroplaquina1B (UPK1B) y tumor de Wilm 1 (WT1), todos los cuales alcanzan su punto máximo a las 24 horas (**Fig. 2E**), lo que sugiere que pueden regular las últimas etapas de formación de adherencias. La reexpresión de genes embrionarios después de una lesión no es infrecuente, pero sugiere un fenotipo proliferativo. También descubrimos que los genes característicos de los fibroblastos, específicamente S100A4, también conocida como proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1), y la actina del músculo liso (ACTA2) también se regulan por incremento después de una lesión, lo que sugiere que el mesotelio se diferencia en un fenotipo más parecido a un fibroblasto después de la lesión. Finalmente, notamos que las moléculas de adherencia están reguladas por incremento, lo que indica que la adherencia y la migración pueden desempeñar un papel importante en la formación de adherencias.

Para identificar los reguladores iniciadores del programa de adherencia, buscamos factores de transcripción que alcanzaron su punto máximo en el plazo de las primeras 6 horas de la inducción de la adherencia y que permanecieron constantes o disminuyeron poco después. El perfil de expresión génica del factor alfa inducible por hipoxia 1 (HIF1A) coincidió con esta tendencia (**Fig. 2B, 2E**).

Para validar nuestra selección de secuenciación de ARN, indujimos adherencias en ratones C57BL/6J de tipo salvaje como se ha descrito anteriormente, e inmunoteñimos las adherencias posteriores 7 días después de la cirugía para nuestros objetivos genéticos (**Fig. 2F**). Observamos una fuerte expresión de muchos de nuestros objetivos y la inmunofluorescencia y el análisis de hibridación *in situ* demuestran la especificidad de nuestro enfoque del mesotelio de superficie y su tejido de adherencia derivado. Algunos objetivos, como PDPN, MSLN y HIF1A, se expresan en todo el tejido de adherencia, mientras que WT1 se activa dentro de una subpoblación de los focos de adherencia, lo que indica heterogeneidad dentro del mesotelio y la adherencia.

Para interrogar funcionalmente a estos objetivos, primero necesitábamos un método para evaluar la gravedad de una adherencia. Estudios anteriores han caracterizado las adherencias enfocándose en la fuerza (dificultad mecánica para separar los órganos adheridos) y/o el número de órganos adheridos para puntuar la gravedad de la adherencia (Dinarvand, Hassanian, Weiler y Rezaie, 2015; Kosaka et al., 2008; Wang et al., 2014).

Nuestro esquema estándar para puntuar las adherencias tomó en consideración tanto la extensión del área de la superficie adherida como la composición molecular de la adherencia, proporcionando una guía celular y molecular detallada para puntuar la gravedad de la adherencia, con la gravedad de la adherencia mostrando un continuo de nuestros criterios discretos descritos a continuación. Se indujeron adherencias en ratones C57BL/6J de tipo salvaje usando el método descrito anteriormente, con diferente intensidad y alcance de abrasiones para inducir un intervalo de gravedad de adherencia. Se permitió que estos ratones se recuperaran durante siete días antes de

puntuar sus adherencias.

En nuestro esquema, una adherencia con una puntuación de 0 no tiene adherencia entre dos áreas, con un engrosamiento mesotelial limitado en el botón (**Fig. 3A**). El área se tiñe positivamente para MSLN y fibronectina (**Fig. 3A**). Los ratones con una puntuación de adherencia de 0 no presentaron signos de morbilidad y sobrevivieron al período de recuperación de 7 días (n=25). Una puntuación de adherencia de 1 indica una adherencia de "cordón", que conecta las dos áreas adheridas con un puente fibroso ligero (**Fig. 3B**). El cordón y las áreas circundantes fueron inmunopositivas para MSLN y fibronectina (**Fig. 3B**). La mayoría de los ratones con una puntuación de adherencia de 1 no presentaron signos de morbilidad y sobrevivieron al período de recuperación de 7 días (n=11).

Todas las adherencias con puntuaciones de 2 o más implican un único contacto directo entre dos tejidos. El propio contacto de adherencia fue ligero y, por lo general, implicó el contacto entre el peritoneo y un órgano abdominal (**Fig. 3C**). La adherencia entre las dos áreas adheridas se tiñó positivamente para MSLN, fibronectina y F4/80, lo que sugiere que se ha producido alguna infiltración de macrófagos (**Fig. 3C**). La mayoría de los ratones con una puntuación de adherencia de 2 no presentaron signos de morbilidad y sobrevivieron al período de recuperación de 7 días (n=12). Una puntuación de adherencia de 3 se caracterizó por el contacto directo y continuo de tres áreas, habitualmente entre el peritoneo y dos órganos abdominales o dos áreas distintas y no continuas de un solo órgano (**Fig. 3D**). El área adherida se tiñó positivamente para MSLN, fibronectina, F4/80, pancolágeno y CD31 (**Fig. 3D**). La mayoría de los ratones con una puntuación de adherencia de 3 tenían pequeños signos de morbilidad y sobrevivieron al período de recuperación de 7 días (n=9). Una puntuación de adherencia de 4 incluía el contacto directo y continuo de cuatro o más áreas, generalmente entre el peritoneo y tres órganos abdominales, o múltiples áreas separadas de uno o dos órganos (**Fig. 3E**). El área adherida se tiñó positivamente para MSLN, fibronectina, F4/80, pancolágeno y CD31 (**Fig. 3E**). La mayoría de los ratones con una puntuación de adherencia de 4 mostraron pequeños signos de morbilidad y sobrevivieron al período de recuperación de 7 días (n=14). Una puntuación de adherencia de 5 se caracterizó como compactación/encapsulación completa de los órganos abdominales. La mayoría de los órganos se adhirieron al peritoneo y entre sí como una sola masa rígida (**Fig. 3F**). Las áreas adheridas se tiñeron positivamente para MSLN, fibronectina, F4/80, colágeno y CD31 (**Fig. 3F**). La mayoría de los ratones con una puntuación de adherencia de 5 eran visiblemente mórbidos con tasas de supervivencia bajas a los 7 días después de la lesión (n=5).

Para explorar rutas preventivas, centramos nuestra atención inicial en el factor de transcripción HIF1A, ya que aumenta significativamente la abundancia de transcripciones a las 6 horas después de la lesión. En primer lugar, analizamos los efectos potenciales que ejerce HIF1A sobre la superficie del mesotelio *in vitro*. Las células mesoteliales primarias se extrajeron de la cápsula renal y el intestino y se trasplantaron en pocillos cultivados como se ha descrito anteriormente (Rinkevich et al., 2012). Después de 7 días, las células mesoteliales emergieron de su explante de tejido y se expandieron sobre la placa de cultivo. Las células mesoteliales cultivadas se incubaron en condiciones de bajo oxígeno (5% de O₂ o en presencia de 100 uM de CoCl₂) durante tres días. Sorprendentemente, se observó poca diferencia morfológica entre el mesotelio hipóxico y normal (**Fig. 7**). Por el contrario, explantes mesoteliales de 7 días de edad que fueron cocultivados con macrófagos derivados del mismo ratón mostraron una respuesta morfológica sorprendente (**Fig. 5A, B**) volviéndose altamente denso y fibrocítico, y se tiñeron positivamente para PDPN y HIF1A. Aunque el fenotipo fibrocítico se concentraba cerca del explante, las células mesoteliales derivadas de explantes adyacentes a menudo crecían unas hacia otras.

Para explorar si la inhibición de la vía de HIF1A *in vivo* puede prevenir la formación de adherencias, tratamos ratones que habían sido sometidos a inducción de adherencias con inhibidores de moléculas pequeñas contra HIF1A o su cascada inmediata en sentido descendente. Elegimos criptotansinona (*Sigma Aldrich*) que inhibe la activación de HIF1A (Dat et al., 2007), FM19G11 (*Sigma Aldrich*) que reprime los objetivos de las subunidades alfa (Moreno-Manzano et al., 2010), equinomicina (*Sigma Aldrich*) que bloquea la unión al ADN de HIF1A (Kong et al., 2005) y PX-12 (*Sigma Aldrich*) que bloquea la actividad transcripcional de HIF1A (Kim, Coon, Baker y Powis, 2011). Los ratones C57BL/6J de tipo salvaje se sometieron a inducción de adherencia y se les inyectó criptotansinona (200 mg/kg) o FM19G11 (2 mg/kg) o equinomicina (10 ug/kg o 20 ug/kg) o PX12 (25 mg/kg) inmediatamente después lesión, 4 horas después de la lesión, y posteriormente cada 24 horas durante 7 días. Los ratones se sacrificaron después de 7 días y se tomaron imágenes y se puntuaron sus adherencias. Las adherencias de control fueron positivas para PDPN, MSLN y HIF1A (**Fig. 5C**) mientras que el mesotelio que rodea los botones en ratones tratados con equinomicina o PX12 tiñó solo con MSLN y PDPN (**Fig. 5D**). Más importante aún, las adherencias en estas áreas se redujeron significativamente (**Fig. 5E**), y la mayoría de los ratones tratados con PX12 (n=5) o con equinomicina (n=15) no mostraron adherencias (puntuación 0).

Para determinar ampliamente los cambios transcripcionales causales en las células mesoteliales lesionadas en sentido descendente de la inhibición de HIF1A, tratamos 10 ratones C57BL/6J de tipo salvaje con (20 ug/kg) de equinomicina antes e inmediatamente después de la inducción de la adherencia mediante la colocación de cuatro botones isquémicos. Usando un método similar al indicado anteriormente, aislamos el mesotelio dañado de los botones, clasificamos y aislamos su ARN para secuenciarlo.

Primero confirmamos que se encontró que los objetivos conocidos de HIF1A VEGFb y transferrina (TRF)

estaban regulados por disminución después del tratamiento con equinomicina (**Fig. 8**). Después de aplicar análisis similares, encontramos que más de 200 genes que normalmente estaban regulados por incremento a lo largo de nuestro curso temporal inicial de 24 horas disminuyeron con la inhibición de HIF1A. Por el contrario, más de 600 genes que mostraron poca expresión o una disminuida durante el transcurso temporal de 24 horas fueron regulados por incremento por la inhibición de HIF1A (**Fig. 5F**).

Muchos de nuestros genes objetivo iniciales (**Fig. 2E**) no se vieron afectados por el tratamiento con equinomicina. Específicamente ITGAM, ITGB1 e ITGB2 mostraron poca diferencia en la expresión génica después de la inhibición de HIF1A (**Fig. 8**). Curiosamente, PDPN, MSLN y S100A4, aumentaron todos en expresión después del tratamiento con equinomicina (**Fig. 5F**).

Sin embargo, a partir de nuestra selección inicial de objetivos, se descubrió que UPK1B y WT1 eran dependientes de HIF1A, ya que sus niveles de expresión disminuyeron significativamente después del tratamiento con equinomicina (**Fig. 5F**). Por tanto, estos resultados sugieren que los genes mesoteliales embrionarios WT1 y UPK1B son objetivos de HIF1A durante el inicio de la adherencia y comienzan a trazar una vía dependiente de hipoxia para iniciar la formación de adherencias.

Se han realizado muchos estudios para prevenir la formación de adherencias o para disminuir las adherencias una vez que se han establecido. Nuestra selección de secuenciación de ARN nos proporcionó objetivos potenciales para tratamientos tanto preventivos como posteriores a la formación. Habíamos observado anteriormente que las adherencias son altamente celulares y, por lo tanto, planteamos la hipótesis de que la depuración del tejido de adherencia puede inducirse mediante la eliminación de estas células usando un enfoque de inmunoterapia que implica anticuerpos dirigidos específicos. El MSLN es una molécula embrionaria de la superficie mesotelial que tiene una expresión muy limitada en el adulto, pero que se reexpresa tras la lesión mesotelial y la inducción de la adherencia, lo que la convierte en un candidato ideal para el direccionamiento. Se descubrió que los anticuerpos monoclonales anti-MSLN de ratón se unían a los sitios lesionados inmediatamente después de la inducción de la adherencia y la inyección de anticuerpos (**Fig. 4A**).

Nosotros y otros hemos demostrado recientemente que dirigirse a adyuvantes inmunes además de los objetivos primarios aumenta en gran medida la eficacia de la eliminación del tumor. Específicamente, CD47 es un receptor de superficie que está altamente regulado por incremento en un espectro de tumores y actúa como una "señal de no me comas", inhibiendo la fagocitosis al unirse a SIRP1 α , su ligando en los macrófagos. Se ha demostrado que la inhibición de esta interacción mediante el bloqueo de CD47 o SIRP1 α , además de la administración de anticuerpos monoclonales específicos del tumor, disminuye en gran medida la carga tumoral y aumenta la supervivencia (Chao et al., 2010; Chao, Weissman y Majeti, 2012; Jaiswal et al., 2009; Tseng et al., 2013). Observamos una alta expresión de CD47 en el mesotelio antes y 24 horas después de la inducción de la adherencia (**Fig. 4B**), lo que indica que un régimen similar puede ayudar a inducir la depuración de la adherencia.

Para explorar si la unión del anticuerpo de MSLN podría iniciar la depuración de la adherencia, inducimos adherencias en ratones C57BL/6J de tipo salvaje y permitimos que los ratones se recuperaran durante 7 días. Luego administramos 200 μ g de anticuerpo anti-MSLN con y sin administración de 200 μ g de anticuerpo anti-CD47 7, 10 y 13 días después de la inducción de la adherencia. Vimos una disminución en la carga de adherencia a nuestro sitio de botones usando solo anti-MSLN (**Fig. 4D**) en comparación con los controles del vehículo (**Fig. 4C**), y una reducción incluso mayor usando anti-MSLN en asociación con anti-CD47 (**Fig. 4E**). El análisis inmunohistológico en botones diseccionados de ratones tratados con anticuerpos mostró tinción de colágeno, fibronectina y CD31, pero una falta de células MSLN⁺ (**Fig. 4F**), sugiriendo la eliminación de estas células y con ellas el tejido de adherencia. Estos resultados indican que la terapia con anticuerpos dirigida es una vía potencial para el tratamiento de la formación post-adherencia.

Nuestros datos ilustran una vía potencial inducida por hipoxia en la célula mesotelial que es necesaria para que se produzca la formación de adherencias. Sin embargo, como muchos sistemas se rigen de manera diferente en el ratón y en humanos, obtuvimos muestras de adherencia humana para determinar si nuestros genes objetivo se expresaban de manera similar en el tejido humano enfermo. Fijamos, seccionamos y teñimos adherencias humanas con tinciones H&E y tricrómicas y observamos una morfología similar; la adherencia era altamente celular y se tiñó fuertemente para el depósito de colágeno (**Fig. 6A**). Las tinciones posteriores con PDPN, MSLN, HIF1A, S100A4 y WT1 (**Fig. 6B**) y la hibridación in situ para el ARN de UPK1B demuestran que muchos de nuestros genes objetivo se expresan de hecho en el tejido mesotelial humano, lo que sugiere que pueden desempeñar un papel similar en la formación de adherencias humanas.

Análisis

A través de nuestro trabajo, creemos que hemos logrado una resolución celular sin precedentes de la formación de adherencias. Nuestro conocimiento actual sigue siendo ambiguo en cuanto a los orígenes celulares de las adherencias abdominales. Usando tinciones específicas y ensayos de proliferación, hemos descubierto que el mesotelio superficial es el tejido de origen de las adherencias abdominales y que la base mecanicista de la

formación de adherencias tiene sus raíces en los programas de las células del mesotelio y, potencialmente, incluso más en los subconjuntos de células del mesotelio.

Nuestros estudios de secuenciación también han ofrecido una resolución molecular sin precedentes del programa de adherencia. Al centrarnos en el tejido de origen de la adherencia, hemos empleado un panel de receptores de superficie combinado con métodos de citometría de flujo para aislar células mesoteliales *in vivo*. Hemos conservado sus programas transcripcionales y hemos usado enfoques de secuenciación de ARN para determinar qué programas en el mesotelio superficial contribuyen a la formación de adherencias, incluyendo el curso temporal de los eventos moleculares que llevan al mesotelio superficial no tratado a formar adherencias. El principal de estos programas es la vía inducida por hipoxia, cuya inhibición es suficiente para prevenir la formación de adherencias. Sin embargo, no deberíamos ignorar otros programas inexplorados, como la regulación por incremento temprana de la angiogénesis, el aumento constante de la expresión de varias quimiocinas y la regulación por disminución temprana de proteínas de la matriz extracelular y colágenos. Estos datos apuntan a un fenómeno global subyacente a la formación de adherencias que involucra a otros sistemas de órganos y tejidos además del mesotelio, cuya cooperación da como resultado patología de adherencia.

Los datos de secuenciación de ARN del mesotelio purificado demuestran una cascada de señalización diversa que se produce después de la inducción y comienza a delinear las vías dentro del mesotelio que contribuyen a la inducción de la adherencia. Notamos que la respuesta mesotelial se caracteriza por la reexpresión de los marcadores mesoteliales embrionarios MSLN, uroplaquina 1B (UPK1B) y tumor de Wilms 1 (WT1). Esto no es del todo sorprendente ya que los fenotipos embrionarios a menudo se reexpresan durante una lesión o enfermedad maligna.. El mesotelio lesionado también regula por incremento la expresión de los genes fibrocíticos S100A4 y ACTA2, que, junto con nuestros resultados de tinción *in vivo* e *in vitro*, sugieren que es el mesotelio el que se convierte en una célula parecida a un fibroblasto. Finalmente, la expresión de HIF1A refleja el ambiente hipóxico iniciado por el protocolo de inducción de la adherencia, que a su vez imita los procedimientos realizados durante las operaciones quirúrgicas. Sin embargo, lo que es sorprendente es el efecto significativo que demuestra la inhibición de HIF1A sobre la formación de adherencias. La interrupción de la vía de HIF1A por inhibidores de moléculas pequeñas equinomicina y PX12 es suficiente para llevar a una disminución dramática en la formación y frecuencia de la adherencia, lo que sugiere que HIF1A desempeña un papel importante en la patogénesis de la formación de adherencias.

Se han realizado investigaciones limitadas que establecen el papel de HIF1A en la formación de adherencias y menos aún en la implicación del mesotelio como un impulsor clave en esta cascada. Unos pocos grupos han demostrado el uso de la inhibición de HIF1A para abordar las adherencias, pero estos estudios hacen uso del ARN interferente (ARNi) o modelos animales transgénicos. Hasta donde sabemos, nuestro estudio es el primero en demostrar el uso de la inhibición de HIF1A usando inhibidores de moléculas pequeñas, una opción de tratamiento mucho más adecuada para uso terapéutico clínico. Nuestros datos proponen el uso de equinomicina, un antibiótico peptídico o PX12, ambos de fácil administración en un entorno clínico. Sin embargo, como HIF1A es un factor de transcripción general, es necesario trabajar más para dilucidar esta vía y diseñar un enfoque terapéutico más dirigido. El modelo *in vivo* puede proporcionar una plataforma funcional para interrogar a la biología molecular subyacente a la contribución mesotelial a la patogénesis de la adherencia.

También hemos demostrado un sistema *in vitro* como sustituto de nuestra cirugía de inducción de adherencia *in vivo*. Cocultivando explantes mesoteliales de la cápsula renal y los intestinos con macrófagos en condiciones hipóxicas, pudimos crear un fenotipo similar a la adherencia, caracterizado por una mayor densidad celular y cambio fibrocítico. Otros tipos de células hematopoyéticas, como neutrófilos y monocitos, pueden cocultivarse con células mesoteliales. Los factores de estrés distintos de la hipoxia, como las perturbaciones mecánicas o las provocaciones químicas o de microorganismos, pueden inducir respuestas similares. Un sistema *in vitro* es útil para seleccionar e identificar objetivos moleculares y puede proporcionar una plataforma para el descubrimiento de fármacos en lo que respecta a la patogénesis de la adherencia.

Hemos identificado múltiples moléculas específicas de las adherencias. Muchos de estos son genes mesoteliales embrionarios que se reexpresan durante la lesión y en algunos otros tejidos, lo que los convierte en objetivos principales para los tratamientos posteriores a la formación. Con la identificación de objetivos específicos de adherencia, hemos demostrado que el uso de una inmunoterapia basada en anticuerpos proporciona un enfoque terapéutico para el tratamiento de adherencias ya formadas.

Ejemplo 2

Un eje de neutrófilos y monocitos contribuye a la formación de adherencias

Se tomaron de experimentos anteriores resultados de la secuenciación de ARN de las células mesoteliales lesionadas durante un transcurso de tiempo de 24 horas (ver Ejemplo 1) y mostraron una expresión diferencial de múltiples conjuntos de genes y procesos, incluyendo las quimiocinas y citoquinas inflamatorias (Fig. 9A). Las señales específicas de reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, CXCL1, CCL2 y CXCL2, se regulan por incremento

inmediatamente después de 6 horas y permanecen aumentadas durante las primeras 24 horas. Los lavados peritoneales de puntos temporales similares confirmaron que un número de neutrófilos y macrófagos aumentado se introducen en el peritoneo. Aunque estudios anteriores han demostrado que los neutrófilos y los macrófagos responden y están implicados en la patogénesis de la adherencia, se ha realizado poco trabajo para demostrar qué subconjuntos de estas células hematopoyéticas desempeñan funciones clave. La inducción de la adherencia, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, en experimentos de parabiosis entre un ratón que expresa constitutivamente la proteína roja fluorescente mCherry ("TM7") y un tipo salvaje (ratón sin color) mostró células rojas F4/80+ infiltrando los sitios de adherencia en un ratón de tipo salvaje, lo que sugiere que los macrófagos que se introducen en las adherencias son monocitos circulantes, o se derivan de la médula ósea (Fig. 9B). Las inducciones de adherencias en ratones constitutivos de proteína fluorescente cian (CFP) ("Huésped") que reciben trasplantes de médula ósea de ratones constitutivos mCherry (TM7 "Donante") también muestran células rojas F4/80+ en los sitios de adherencias, lo que sugiere de nuevo que los macrófagos que se introducen en las adherencias son monocitos circulantes derivados de la médula ósea (Fig. 9C). Los ratones tratados con tioglicolato 24 horas antes de la inducción de la adherencia muestran adherencias disminuidas, lo que indica que la inflamación estéril puede tener efectos beneficiosos para la formación de adherencias. El tratamiento con catalasa, que proporciona a los neutrófilos una ventaja selectiva sobre los macrófagos, 24 horas antes de la inducción de la adherencia, empeora la formación de adherencias en comparación con el tratamiento con tioglicolato. El tratamiento con MCP-1, un quimioatrayente de monocitos conocido, y anticuerpos anti-GR-1, que resultan en el agotamiento de los neutrófilos circulantes, durante tres días después de la cirugía de inducción de adherencias, disminuyen la formación de adherencias. MCP1 junto con anti-GR-1 tiene un efecto aditivo en la disminución de la formación de adherencias (Fig. 9D).

Ejemplo 3

Los ratones fueron pretratados con control de PLGA, tioglicolato o PBS 3 días antes de la cirugía de inducción de la adherencia como se describe en el Ejemplo 1. Los ratones se evaluaron 7 días después de la lesión y se evaluaron en una escala de gravedad de la adherencia de 0-5 para las adherencias que se forman en el punto de sutura (S) o el botón (B). La Fig. 10 muestra que los ratones tratados previamente con PLGA o tioglicolato tienen una gravedad de adherencias significativamente reducida tanto en el sitio de sutura como en el botón. Llegamos a la conclusión de que el pretratamiento con PLGA solo, tioglicolato solo o una combinación de PLGA y tioglicolato antes de la cirugía reducirá la formación y/o la gravedad de las adherencias en un sujeto.

Referencias

1. Ward, B. C. & Panitch, A. Abdominal adhesions: current and novel therapies. *J. Surg. Res.* 165, 91-111 (2011).
2. Ghellai, A. Role of transforming growth factor beta-1 in peritonitis-induced adhesions. *J. Gastrointest. Surg.* 4, 316-323 (2000).
3. Parker, M. C. et al. Colorectal surgery: the risk and burden of adhesion-related complications. *Colorectal Dis.* 6, 506-11 (2004).
4. Hershlag, A., Diamond, M. P. & DeCherney, A. H. Adhesiolysis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 34, 395-402 (1991).
5. Ellis, H. et al. Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study. *Lancet (London, England)* 353, 1476-80 (1999).
6. Liakakos, T., Thomakos, N., Fine, P. M., Dervenis, C. & Young, R. L. Peritoneal adhesions: etiology, pathophysiology, and clinical significance. Recent advances in prevention and management. *Dig. Surg.* 18, 260-73 (2001).
7. Schnüriger, B. et al. Prevention of postoperative peritoneal adhesions: a review of the literature. *Am. J. Surg.* 201, 111-121 (2011).
8. Parker, M. C. et al. The SCAR-3 study: 5-year adhesion-related readmission risk following lower abdominal surgical procedures. *Colorectal Dis.* 7, 551-8 (2005).
9. Parker, M. C. et al. Postoperative adhesions: ten-year follow-up of 12,584 patients undergoing lower abdominal surgery. *Dis. Colon Rectum* 44, 822-29; discussion 829-30 (2001).
10. Ray, N. F., Denton, W. G., Thamer, M., Henderson, S. C. & Perry, S. Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in the United States in 1994. *J. Am. Coll. Surg.* 186, 1-9 (1998).
11. Chung, D. R. CD4+ T Cells Regulate Surgical and Postinfectious Adhesion Formation. *J. Exp. Med.* 195, 1471-1478 (2002).
12. Rinkevich, Y. et al. Identification and prospective isolation of a mesothelial precursor lineage giving rise to smooth muscle cells and fibroblasts for mammalian internal organs, and their vasculature. *Nat. Cell Biol.* 14, 1251-60 (2012).
13. Trochsler, M. & Maddern, G. J. Adhesion barriers for abdominal surgery: a sticky problem. *Lancet (London, England)* 383, 8-10 (2014).
14. Suzuki, T. et al. An injured tissue affects the opposite intact peritoneum during postoperative adhesion formation. *Sci. Rep.* 5, 7668 (2015).
- Cassidy, M. R., Sherburne, A. C., Heydrick, S. J., & Stucchi, A. F. (2015). Combined intraoperative administration of a histone deacetylase inhibitor and a neurokinin-1 receptor antagonist synergistically reduces intra-abdominal adhesion formation in a rat model. *Surgery*, 157(3), 581-589. doi:10.1016/j.surg.2014.09.031

- Chao, M. P., Alizadeh, A. A., Tang, C., Myklebust, J. H., Varghese, B., Gill, S., ... Majeti, R. (2010). Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell*, 142(5), 699-713. doi:10.1016/j.cell.2010.07.044
- Chao, M. P., Weissman, I. L., & Majeti, R. (2012). The CD47-SIRP α pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Current Opinion in Immunology*, 24(2), 225-32. doi:10.1016/j.coi.2012.01.010
- Cheong, Y. C., Laird, S. M., Li, T. C., Shelton, J. B., Ledger, W. L., & Cooke, I. D. Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. *Human Reproduction Update*, 7(6), 556-66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11727864>
- Chung, D. R. (2002). CD4+ T Cells Regulate Surgical and Postinfectious Adhesion Formation. *Journal of Experimental Medicine*, 195(11), 1471-1478. doi:10.1084/jem.20020028
- Dat, N. T., Jin, X., Lee, J.-H., Lee, D., Hong, Y.-S., Lee, K., ... Lee, J. J. (2007). Abietane diterpenes from *Salvia miltiorrhiza* inhibit the activation of hypoxia-inducible factor-1. *Journal of Natural Products*, 70(7), 1093-7. doi:10.1021/np060482d
- Dinarvand, P., Hassanian, S. M., Weiler, H., & Rezaie, A. R. (2015). Intraperitoneal administration of activated protein C prevents postsurgical adhesion band formation. *Blood*, 125(8), 1339-48. doi:10.1182/blood-2014-10-609339
- diZerega, G. S., & Campeau, J. D. Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation. *Human Reproduction Update*, 7(6), 547-55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11727863>
- Ellis, H., Harrison, W., & Hugh, T. B. (1965). The healing of peritoneum under normal and pathological conditions. *British Journal of Surgery*, 52(6), 471-476. doi:10.1002/bjs.1800520616
- Hellebrekers, B. W. J., & Kooistra, T. (2011). Pathogenesis of postoperative adhesion formation. *The British Journal of Surgery*, 98(11), 1503-16. doi:10.1002/bjs.7657
- Inagaki, N. F., Inagaki, F. F., Kokudo, N., & Miyajima, A. (2015). Use of mouse liver mesothelial cells to prevent postoperative adhesion and promote liver regeneration after hepatectomy. *Journal of Hepatology*, 62(5), 1141-7. doi:10.1016/j.jhep.2014.12.010
- Jaiswal, S., Jamieson, C. H. M., Pang, W. W., Park, C. Y., Chao, M. P., Majeti, R., ... Weissman, I. L. (2009). CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*, 138(2), 271-85. doi:10.1016/j.cell.2009.05.046
- Kim, Y. H., Coon, A., Baker, A. F., & Powis, G. (2011). Antitumor agent PX-12 inhibits HIF-1 α protein levels through an Nrf2/PMF-1-mediated increase in spermidine/spermine acetyl transferase. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68(2), 405-13. doi:10.1007/s00280-010-1500-0
- Kong, D., Park, E. J., Stephen, A. G., Calvani, M., Cardellina, J. H., Monks, A., ... Melillo, G. (2005). Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Research*, 65(19), 9047-55. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1235
- Kosaka, H., Yoshimoto, T., Yoshimoto, T., Fujimoto, J., & Nakanishi, K. (2008). Interferon-gamma is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. *Nature Medicine*, 14(4), 437-41. doi:10.1038/nm1733
- Liu, Y., Li, H., Shu, X. Z., Gray, S. D., & Prestwich, G. D. (2005). Crosslinked hyaluronan hydrogels containing mitomycin C reduce postoperative abdominal adhesions. *Fertility and Sterility*, 83 Suppl 1(4), 1275-83. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.09.038
- Lucas, P. A., Warejcka, D. J., Young, H. E., & Lee, B. Y. (1996). Formation of abdominal adhesions is inhibited by antibodies to transforming growth factor-beta1. *The Journal of Surgical Research*, 65(2), 135-8. doi:10.1006/jsre.1996.0355
- Michailova, K. N., & Usunoff, K. G. (2006). Serosal membranes (pleura, pericardium, peritoneum). *Normal structure, development and experimental pathology. Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 183, i-vii, 1-144, back cover. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16570866>
- Moreno-Manzano, V., Rodriguez-Jimenez, F. J., Aceña-Bonilla, J. L., Fustero-Lardies, S., Erceg, S., Dopazo, J., ... Sanchez-Puelles, J. M. (2010). FM19G11, a new hypoxia-inducible factor (HIF) modulator, affects stem cell differentiation status. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(2), 1333-42. doi:10.1074/jbc.M109.008326
- Raftery, A. T. (1973). Regeneration of parietal and visceral peritoneum: an electron microscopical study. *Journal of Anatomy*, 115(Pt 3), 375-92. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1271491&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ray, N. (1998). Abdominal Adhesiolysis: Inpatient Care and Expenditures in the United States in 1994. *Journal of the American College of Surgeons*, 186(1), 1-9. doi:10.1016/S1072-7515(97)00127-0
- Richardson, E. H. (1911). IV. Studies on Peritoneal Adhesions: With a Contribution to the Treatment of Denuded Bowel Surfaces. *Annals of Surgery*, 54(6), 758-97. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1406358&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rinkevich, Y., Mori, T., Sahoo, D., Xu, P.-X., Bermingham, J. R., & Weissman, I. L. (2012). Identification and prospective isolation of a mesothelial precursor lineage giving rise to smooth muscle cells and fibroblasts for mammalian internal organs, and their vasculature. *Nature Cell Biology*, 14(12), 1251-60. doi:10.1038/ncb2610
- Rinkevich, Y., Walmsley, G. G., Hu, M. S., Maan, Z. N., Newman, A. M., Drukker, M., ... Longaker, M. T. (2015). Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6232), aaa2151. doi:10.1126/science.aaa2151
- Schade, D. S., & Williamson, J. R. (1968). The pathogenesis of peritoneal adhesions: an ultrastructural study. *Annals of Surgery*, 167(4), 500-10. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1387240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Suzuki, A. (2015). Evidence of cell-fate conversion from hepatocytes to cholangiocytes in the injured liver: in-vivo genetic lineage-tracing approaches. *Current Opinion in Gastroenterology*. doi:10.1097/MOG.0000000000000172

Suzuki, T., Kono, T., Bochimoto, H., Hira, Y., Watanabe, T., & Furukawa, H. (2015). An injured tissue affects the opposite intact peritoneum during postoperative adhesion formation. *Scientific Reports*, 5, 7668. doi:10.1038/srep07668

Tseng, D., Volkmer, J.-P., Willingham, S. B., Contreras-Trujillo, H., Fathman, J. W., Fernhoff, N. B., ... Weissman, I. L. (2013). Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(27), 11103-8. doi:10.1073/pnas.1305569110

Ueno, H., & Weissman, I. L. (2006). Clonal analysis of mouse development reveals a polyclonal origin for yolk sac blood islands. *Developmental Cell*, 11(4), 519-33. doi:10.1016/j.devcel.2006.08.001

Wang, C., Li, X., Meng, X., Zhou, J., Qin, F., & Hou, L. (2014). Prevention of experimental postoperative peritoneal adhesions through the intraperitoneal administration of tanshinone IIA. *Planta Medica*, 80(12), 969-73. doi:10.1055/s-0034-1382877

Wei, G., Chen, X., Wang, G., Jia, P., Xu, Q., Ping, G., ... Li, X. (2015). Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents intra-abdominal adhesions by decreasing activity of peritoneal fibroblasts. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 3083-98. doi:10.2147/DDDT.S80221

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de la comprensión, es fácilmente evidente para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un agente que interrumpe la formación de adherencias: (a) agotando los granulocitos o granulocitos inflamatorios o (b) inhibiendo el reclutamiento de granulocitos o granulocitos inflamatorios para su uso en un método de tratamiento de un sujeto para reducir la formación de adherencias o para reducir las adherencias ya formadas, en donde el agente inhibe la expresión o actividad de un producto génico cuya expresión se induce en las células mesoteliales lesionadas, o se une selectivamente a un producto génico cuya expresión se induce en las células mesoteliales lesionadas.
2. El agente para el uso de la reivindicación 1, en donde el producto génico es uroplaquina 1B (UPK1B) o mesotelina (MSLN).
3. El agente para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde:
 - (a) el agente se une competitivamente o se dirige a UPK1B, opcionalmente en donde el agente se selecciona de un anticuerpo anti-UPK1B o un fragmento de unión a UPK1B del mismo, manosa, manosa conjugada con una fracción de unión a UPK1B, o un péptido, peptoide, ARN, ADN, PNA u otra molécula diseñada seleccionada para unirse a UPK1B, o
 - (b) el agente es un polipéptido que se une específicamente a MSLN, opcionalmente en donde el agente se selecciona de un anticuerpo anti-MSLN o un fragmento de unión a MSLN del mismo, manosa conjugada a una fracción de unión a MSLN, o un péptido, peptoide, ARN, ADN, PNA u otra molécula diseñada seleccionada para unirse a MSLN.
4. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el método comprende además administrar un segundo agente que interrumpe la unión de CD47 con SIRP α , a una dosis que logra una reducción de las células mesoteliales lesionadas, opcionalmente en donde el segundo agente es un polipéptido que se une a CD47, opcionalmente además en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste de: un anticuerpo anti-CD47, un polipéptido de proteína reguladora de señal alfa (SIRP α), un fragmento de unión a CD47 de cualquiera de ellos, y cualquier combinación de los mismos.
5. El agente para el uso de la reivindicación 1, en donde:
 - (a) el producto génico recluta o agota los neutrófilos, y/o
 - (b) el producto génico es una quimiocina CXC, opcionalmente en donde: (i) la quimiocina CXC se selecciona del grupo que consiste de: CXCL1 y CXCL2, o (ii) el agente se selecciona del grupo que consiste de: equinomicina, PX12, FM19G11, criptotansinona, quetomina, bortezumib, acriflavina, 3-[[2-[4-(2-adamantil)fenoxi]acetil]amino]-4-hidroxibenzoato, dimetiloxaloilglicina de metilo (DMOG), quimiotina, YC-1, crisina, dimetil-bisfenol A, CL67 y combinaciones de los mismos, o
 - (c) el producto génico es el factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF-1 α).
6. Un agente que interrumpe la formación de adherencias: (a) agotando los granulocitos o granulocitos inflamatorios o (b) inhibiendo el reclutamiento de granulocitos o granulocitos inflamatorios para su uso en un método de tratamiento de un sujeto para reducir la formación de adherencias o para reducir las adherencias ya formadas, en donde el agente da como resultado uno o ambos de agotamiento de neutrófilos y prevención del reclutamiento de neutrófilos, opcionalmente en donde el agente es un polipéptido que se une a un marcador de granulocitos seleccionado de Gr-1, CD66b, CD177, CXCR1, VAP1, CXCR2 y CD10, opcionalmente además en donde el agente es un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo.
7. El agente para el uso de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde el método comprende además administrar un segundo agente que interrumpe la unión de CD47 con SIRP α , a una dosis que logra una reducción de las células mesoteliales lesionadas, opcionalmente en donde el segundo agente es un polipéptido que se une a CD47, opcionalmente además en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste de: un anticuerpo anti-CD47, un polipéptido de proteína reguladora de señal alfa (SIRP α), un fragmento de unión a CD47 de cualquiera de ellos, y cualquier combinación de los mismos.
8. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde:
 - (a) la adherencia es una adherencia abdominal,
 - (b) la adherencia es una adherencia quirúrgica, opcionalmente en donde:
 - (i) el agente se administra antes de un procedimiento quirúrgico realizado en el sujeto, o
 - (ii) el agente se administra después de un procedimiento quirúrgico realizado en el sujeto.

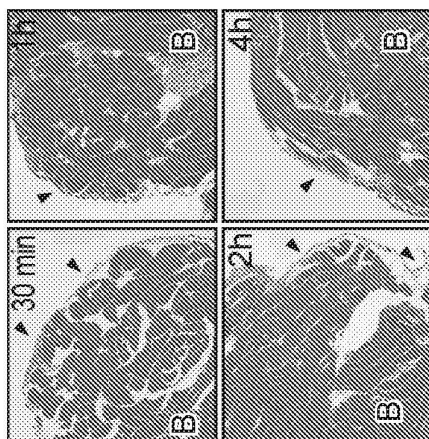


FIG. 1A

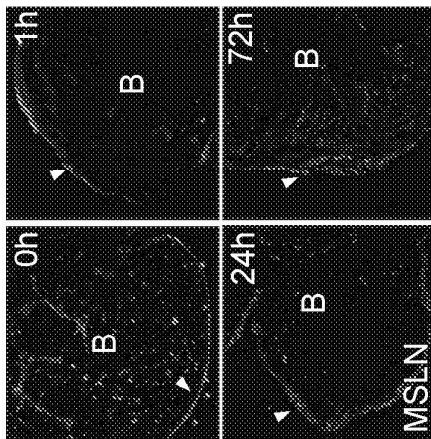


FIG. 1B

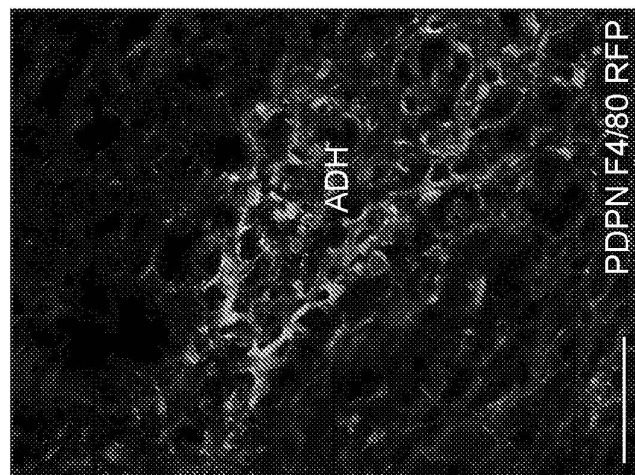


FIG. 1D

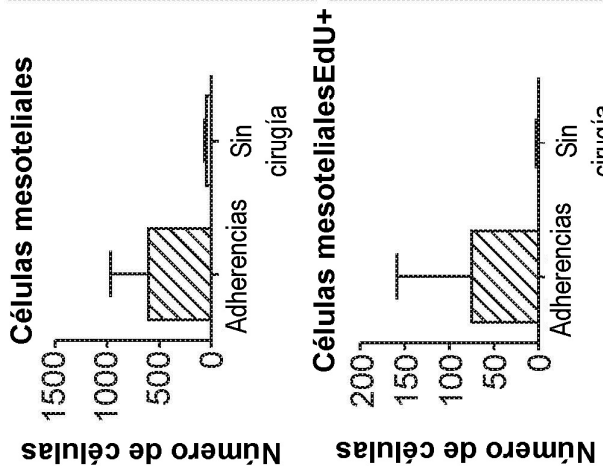


FIG. 1E

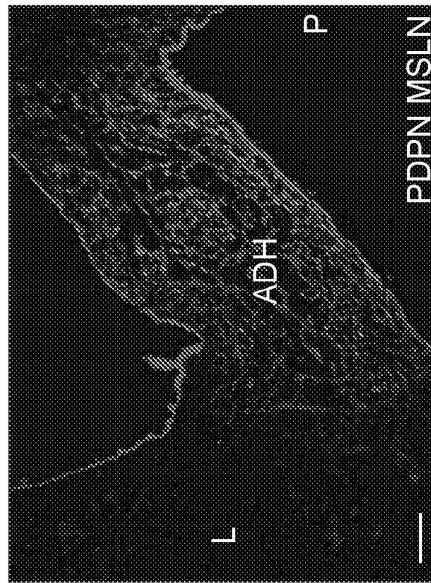


FIG. 1C

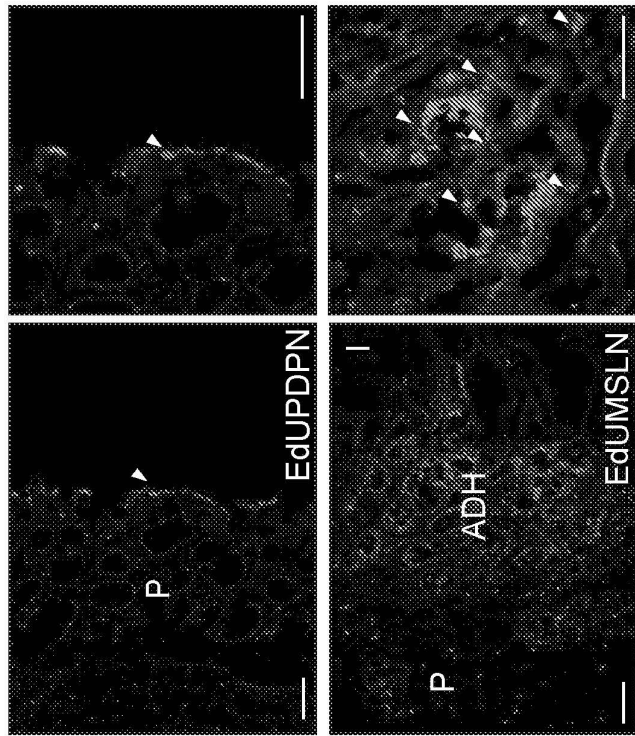


FIG. 1F

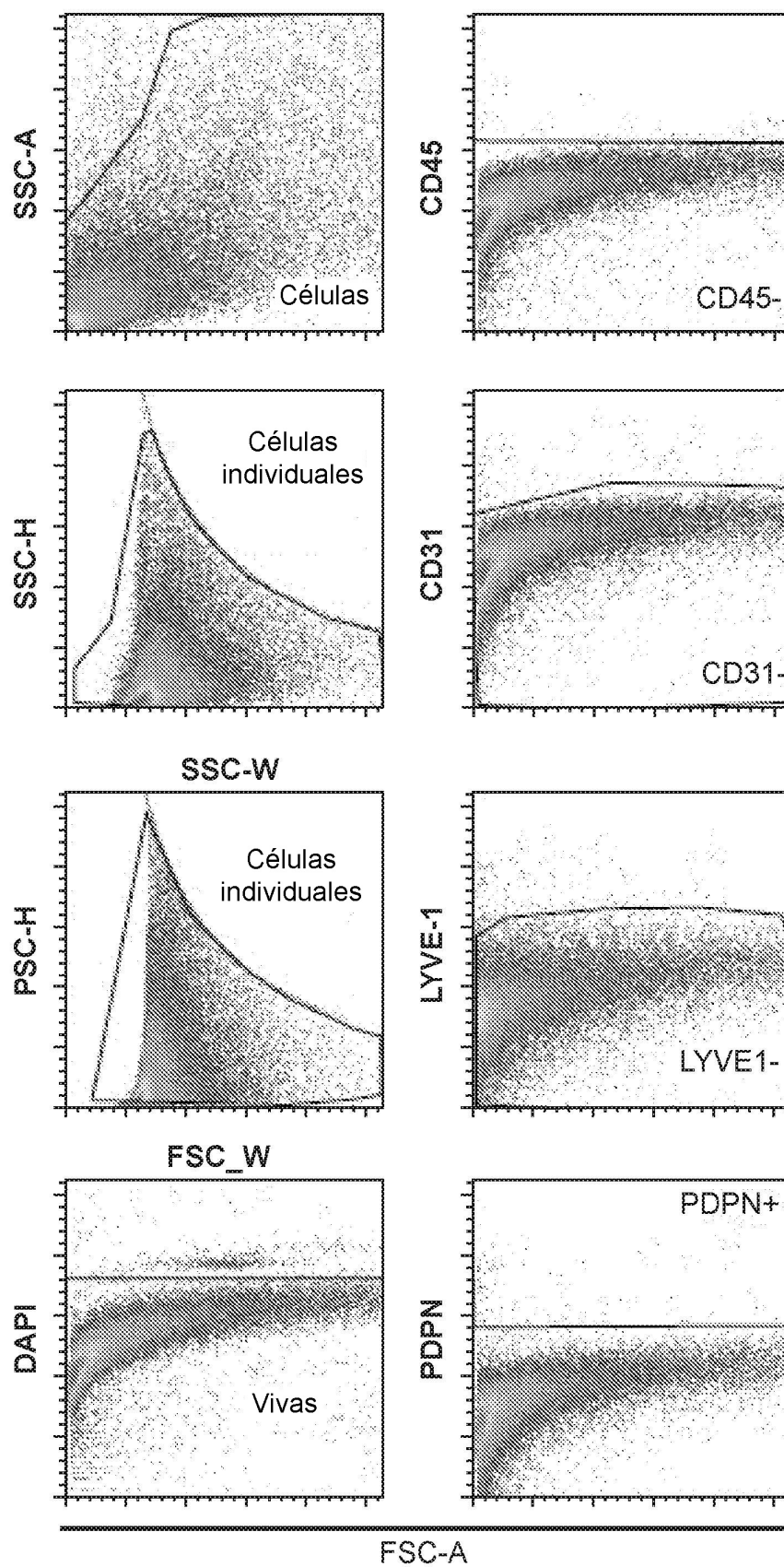


FIG. 2A

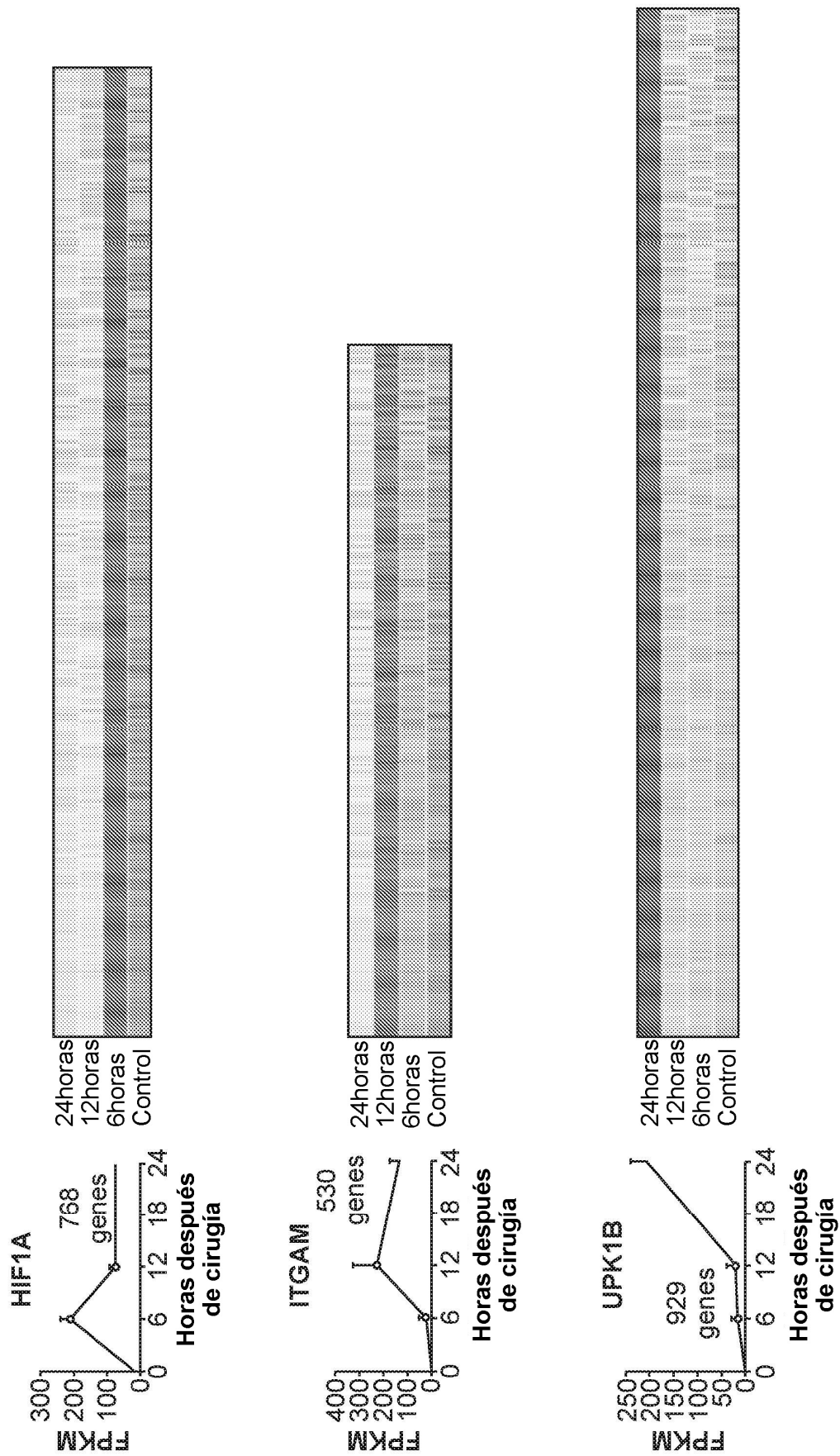


FIG. 2B

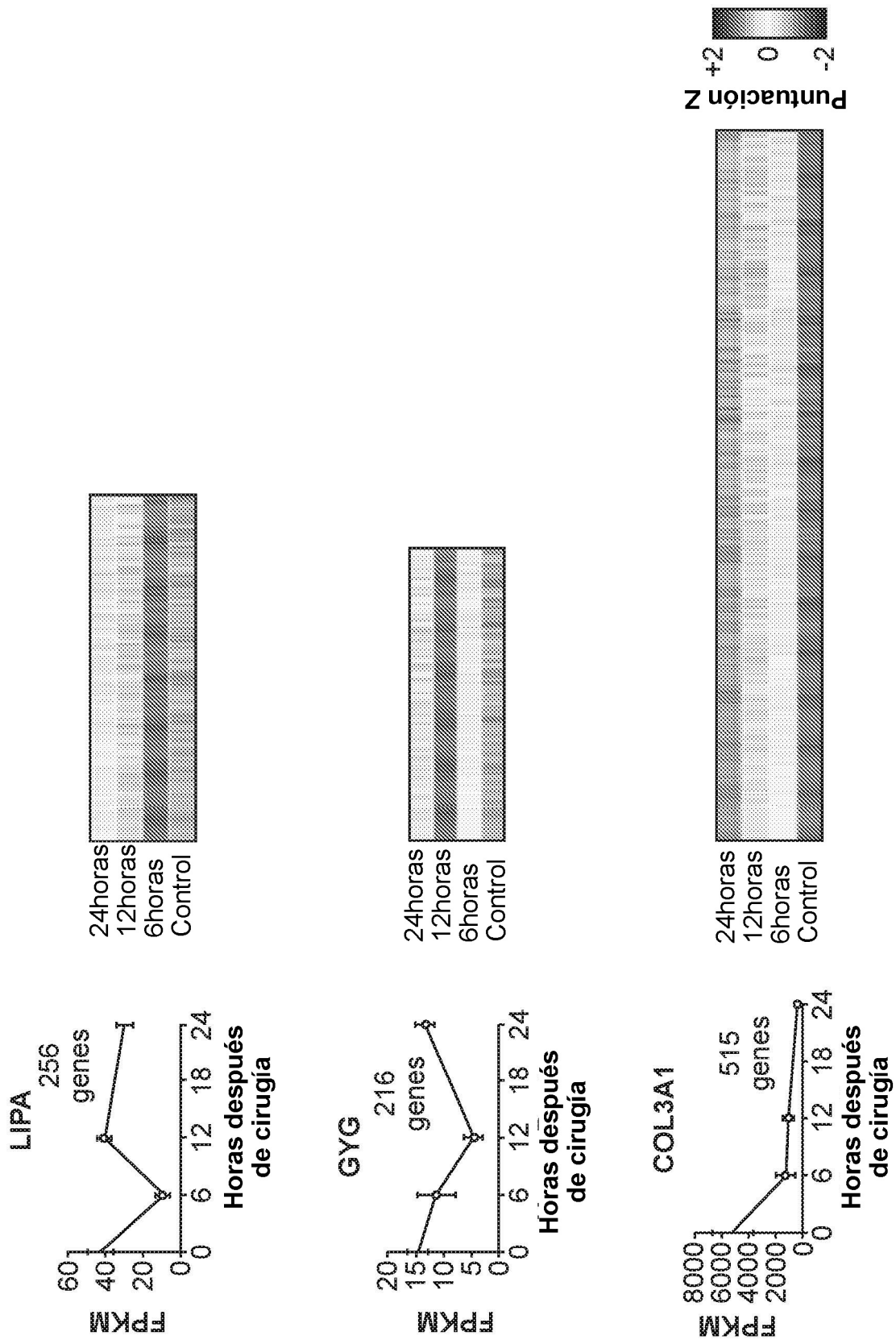


FIG. 2B (Cont.)

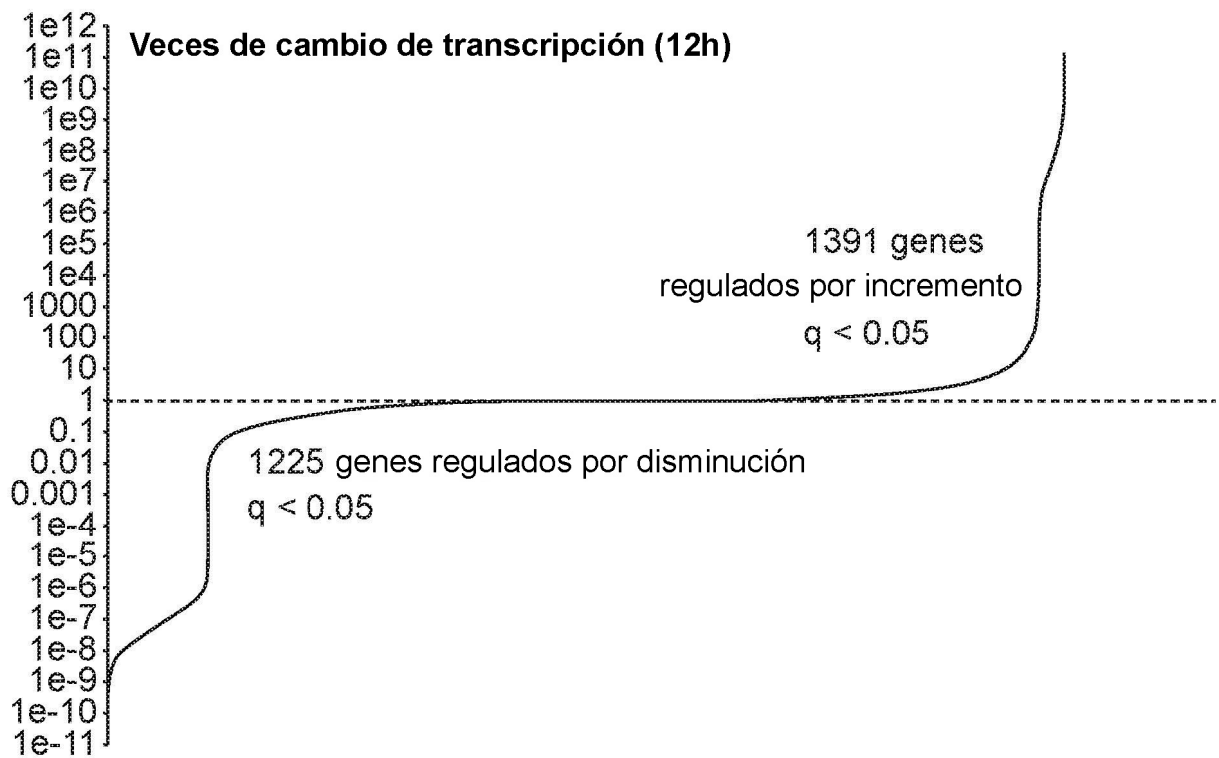
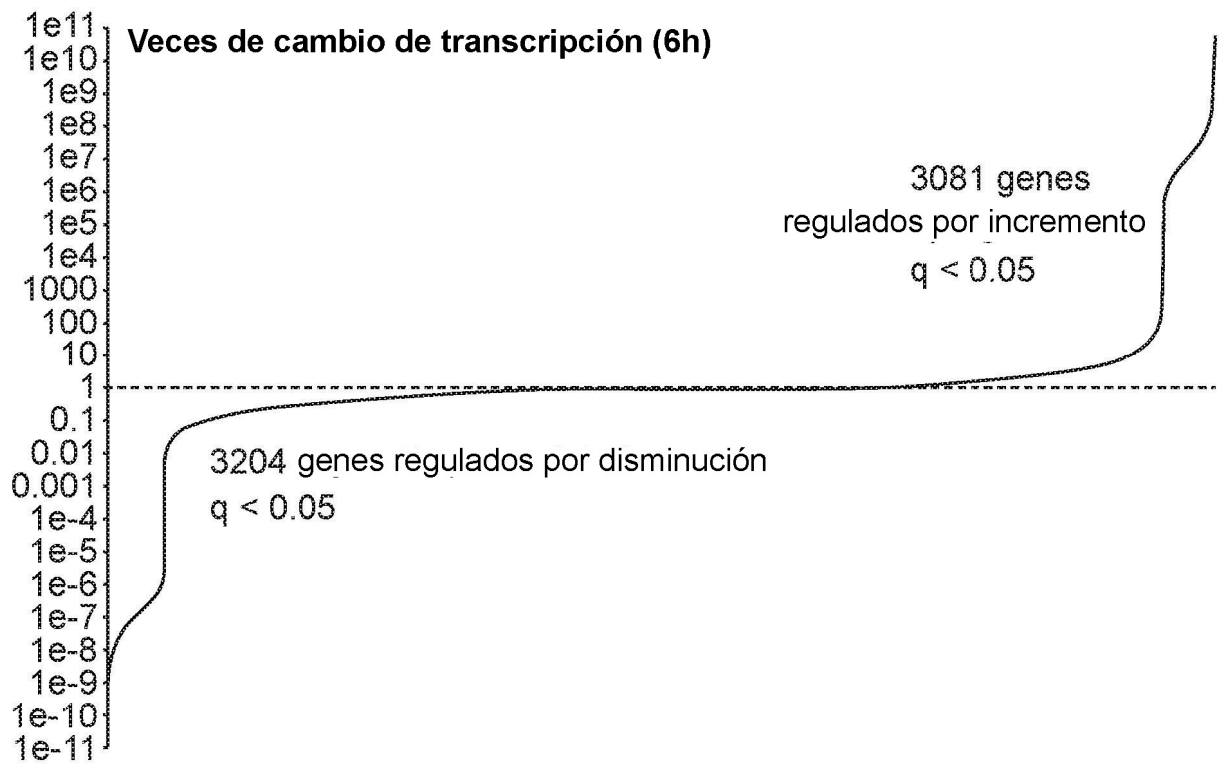


FIG. 2C

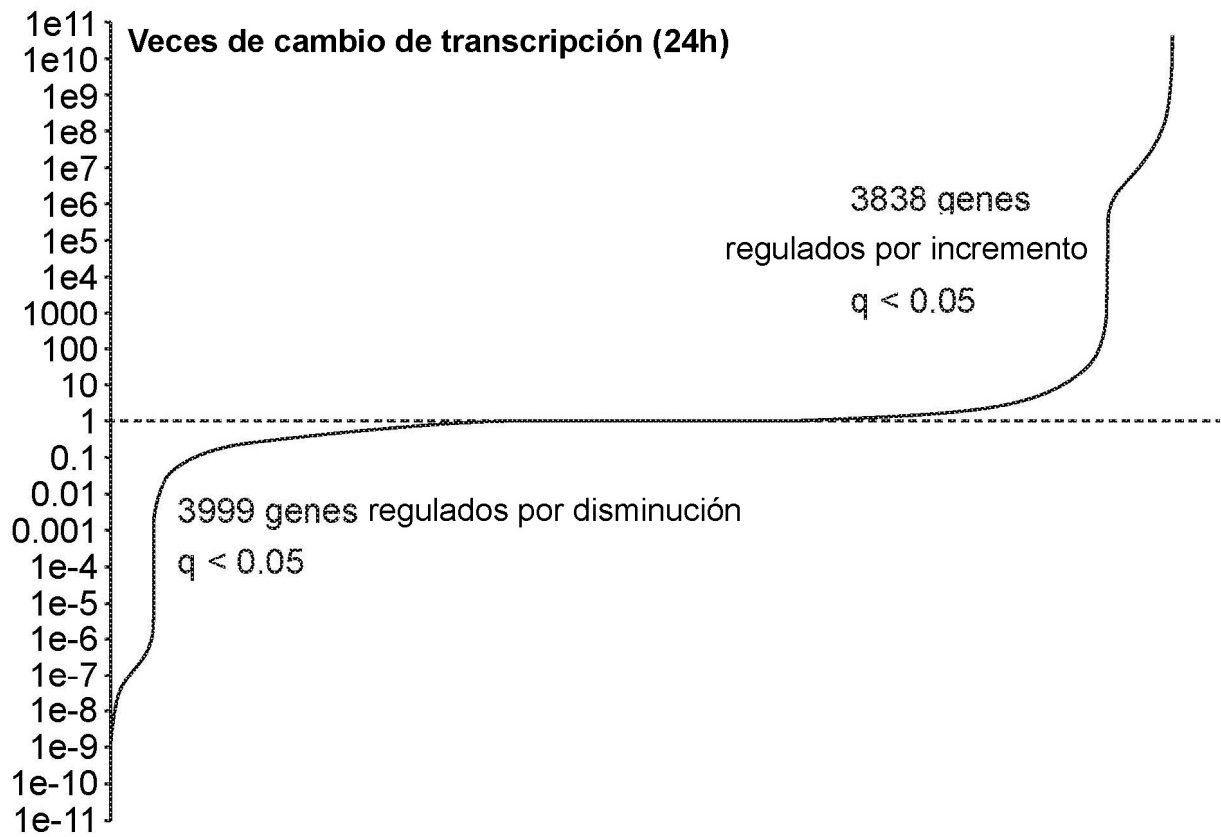
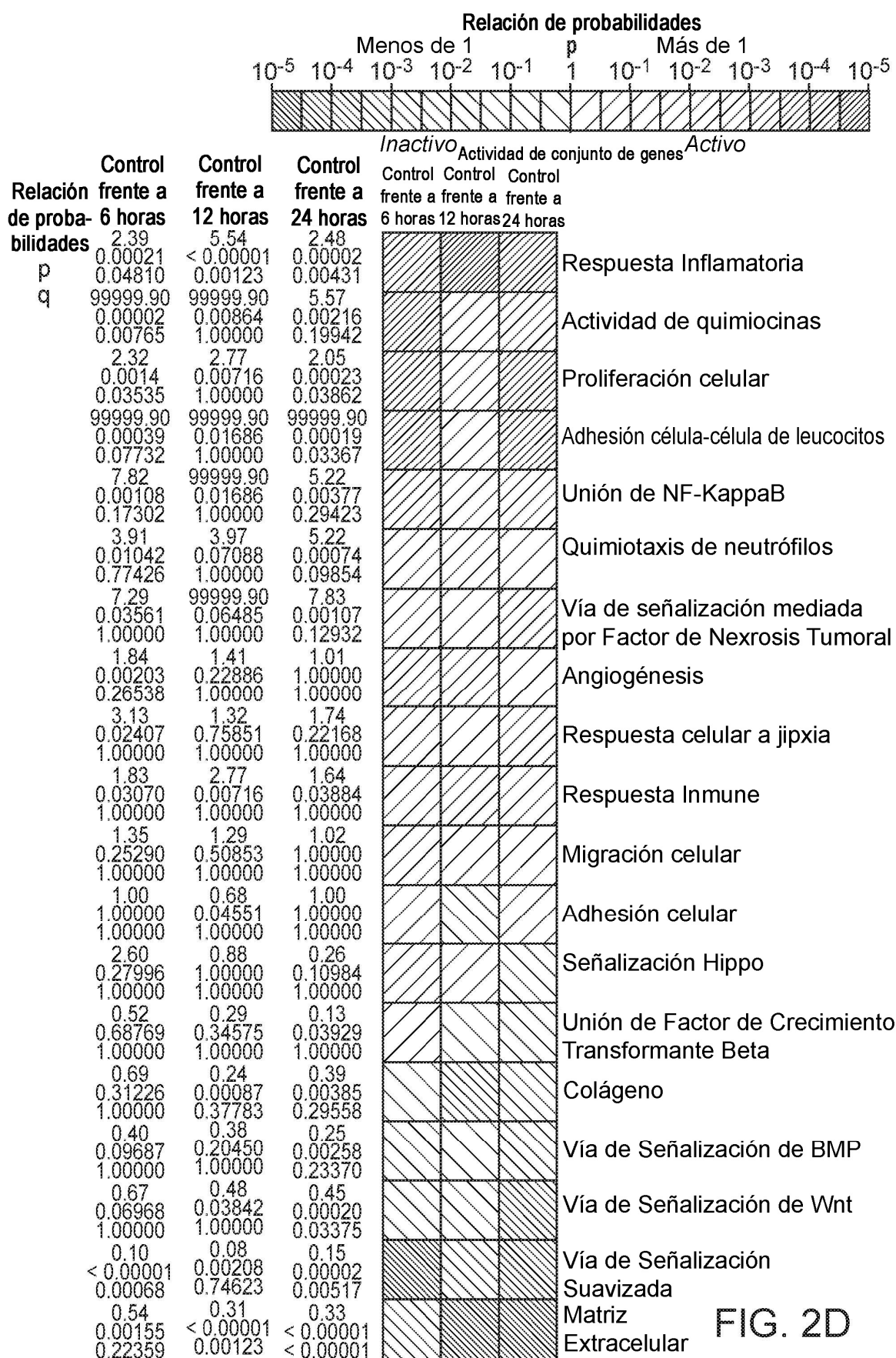


FIG. 2C (Cont.)



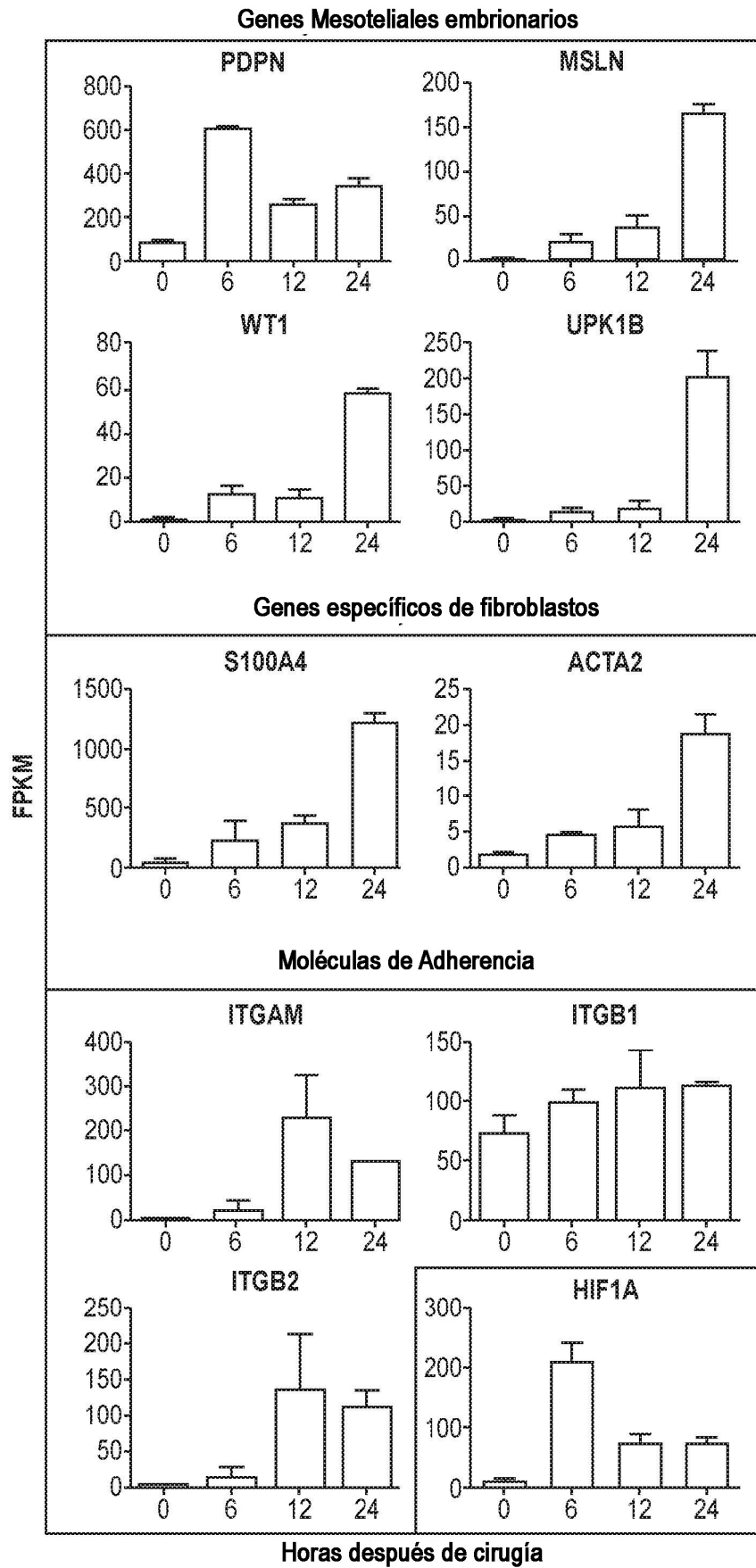


FIG. 2E

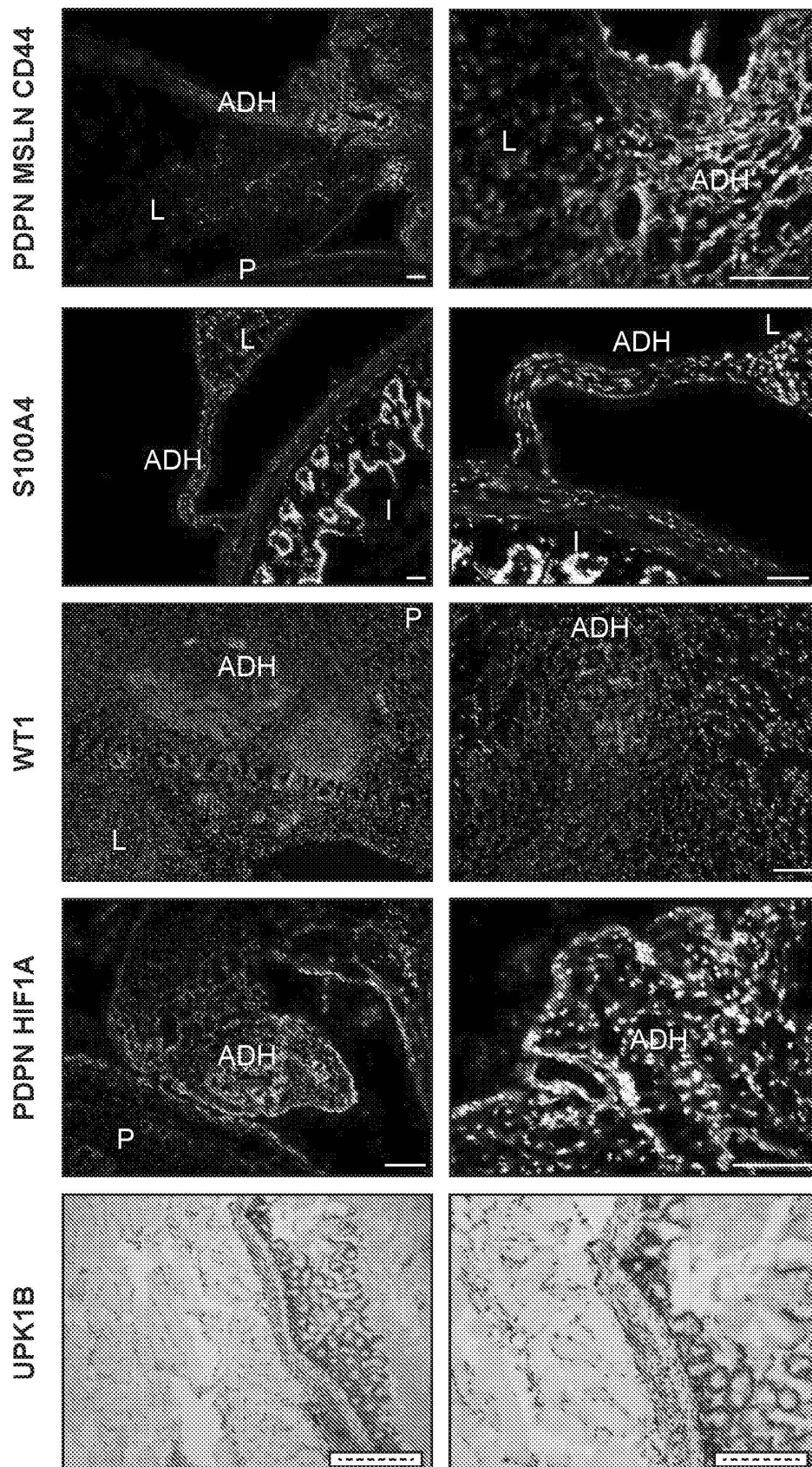


FIG. 2F

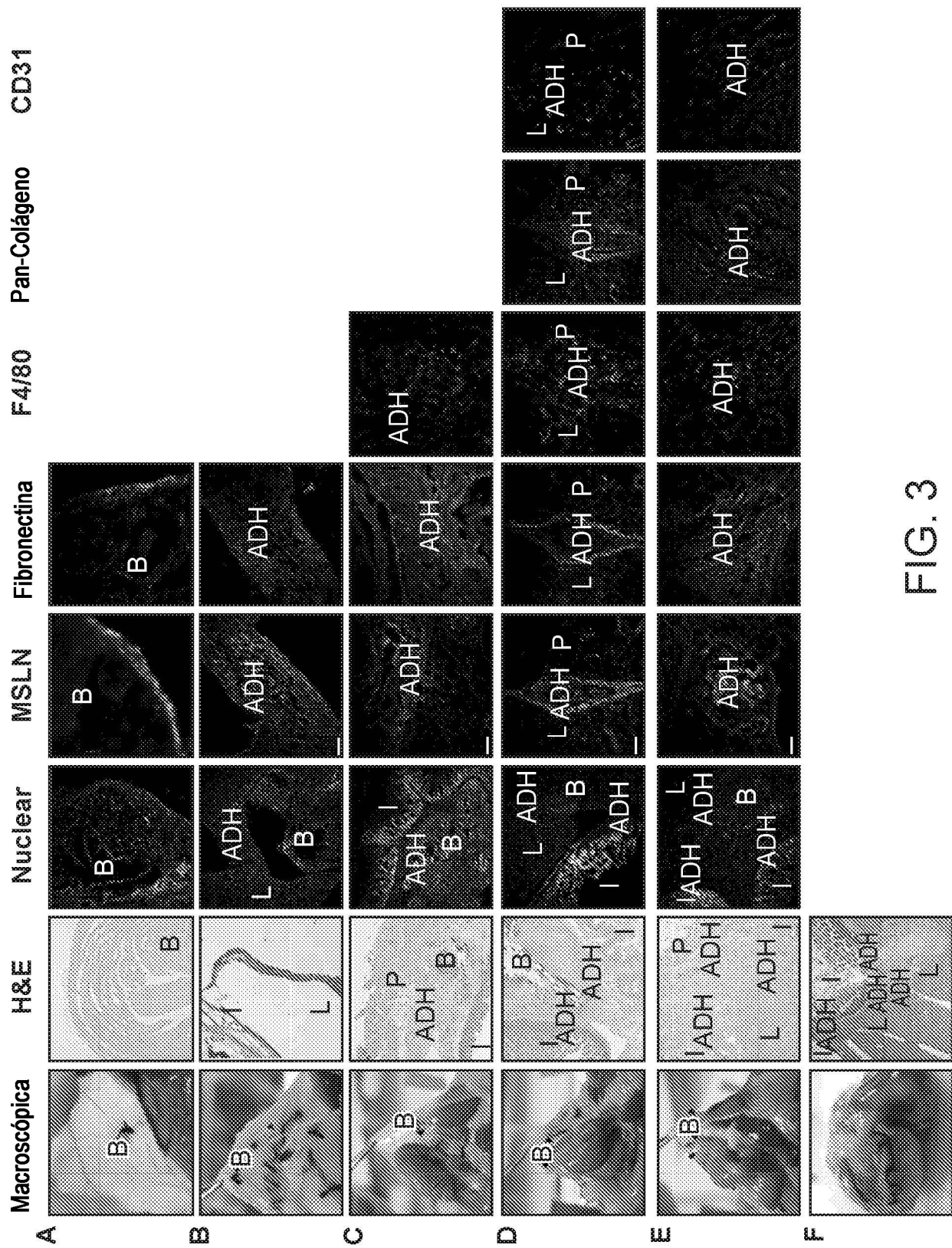


FIG. 3

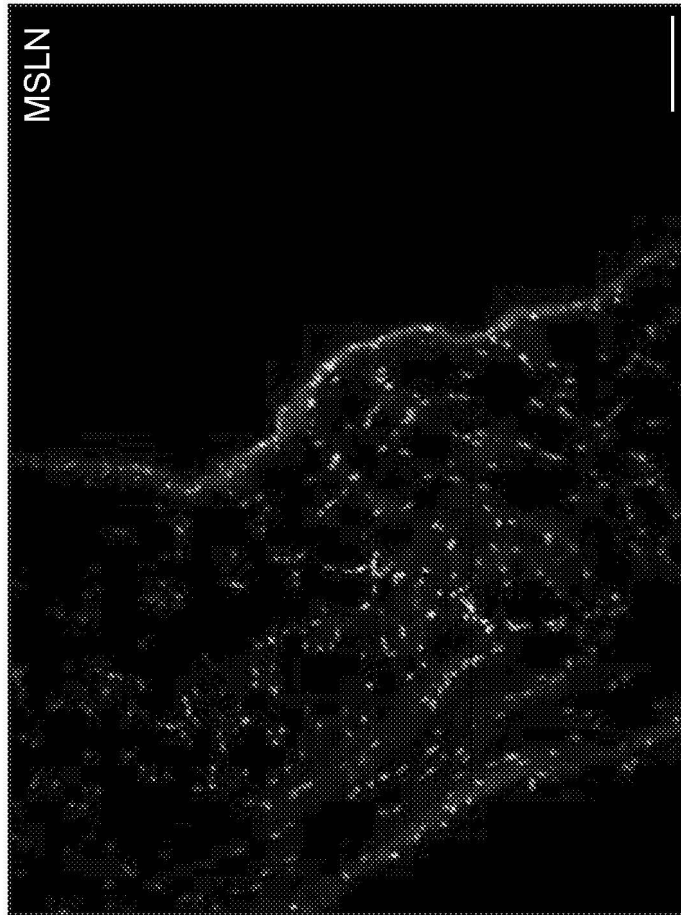


FIG. 4A

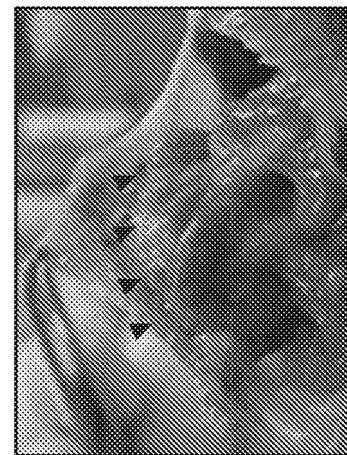


FIG. 4C



FIG. 4D

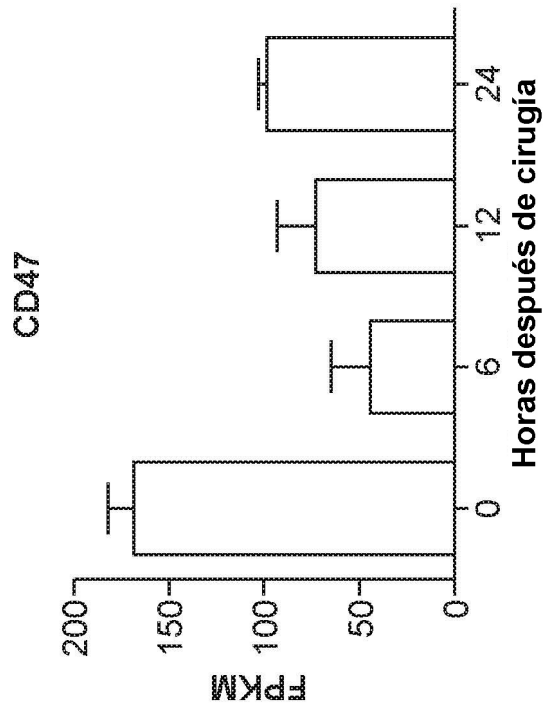


FIG. 4B

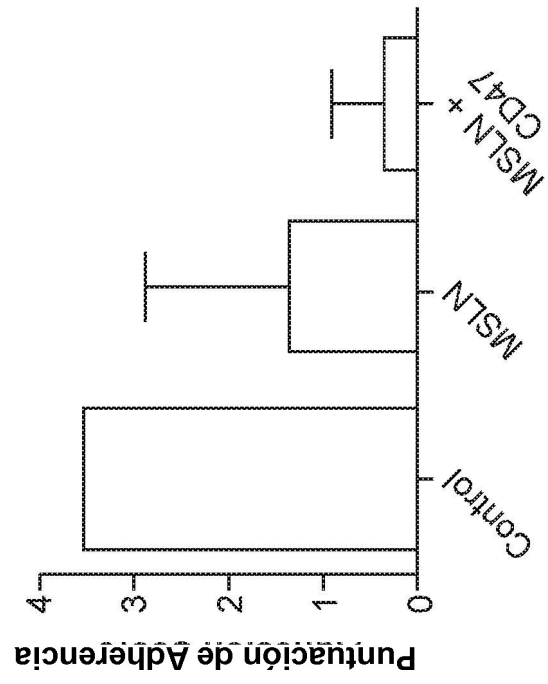


FIG. 4E

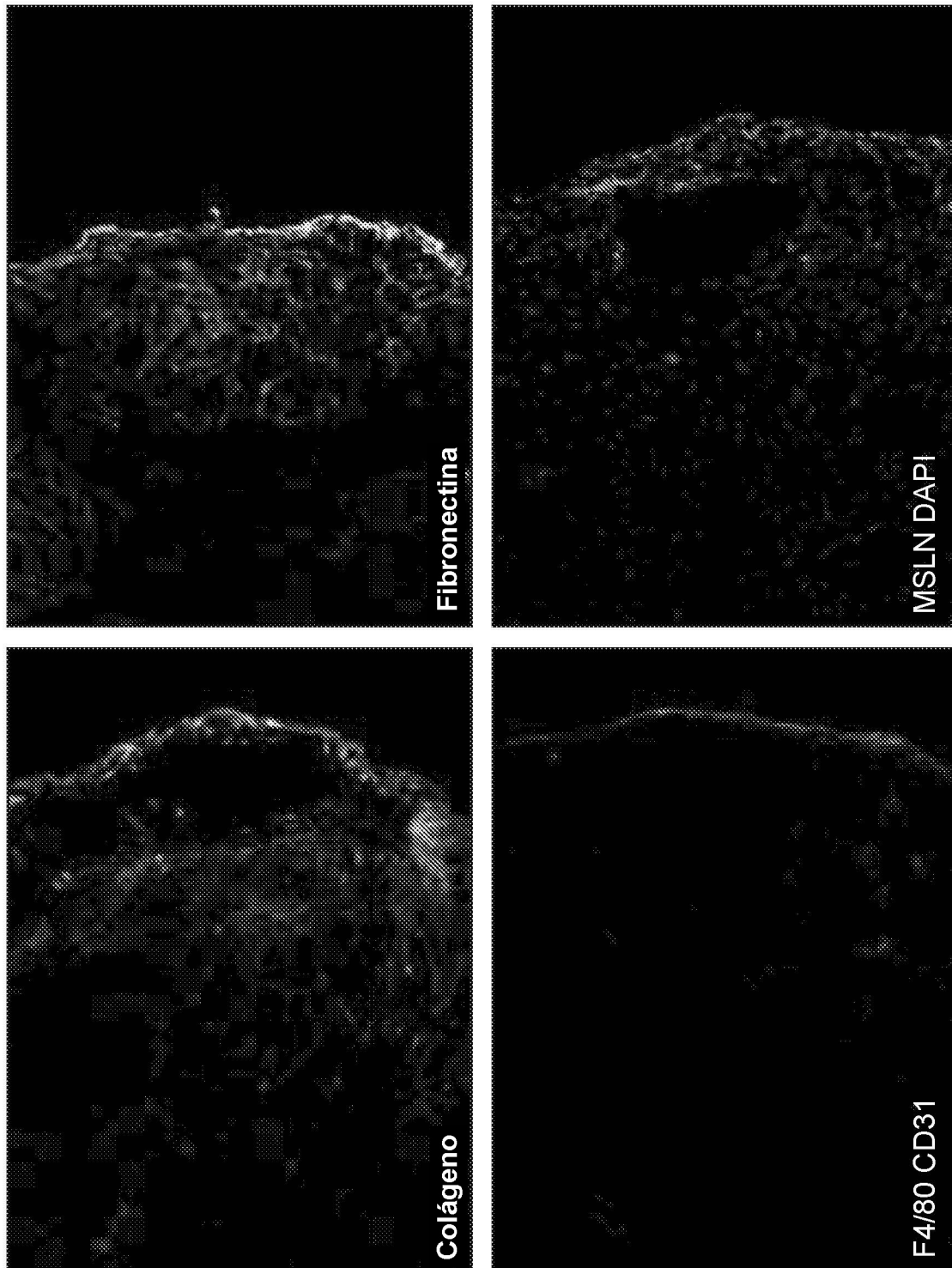


FIG. 4F

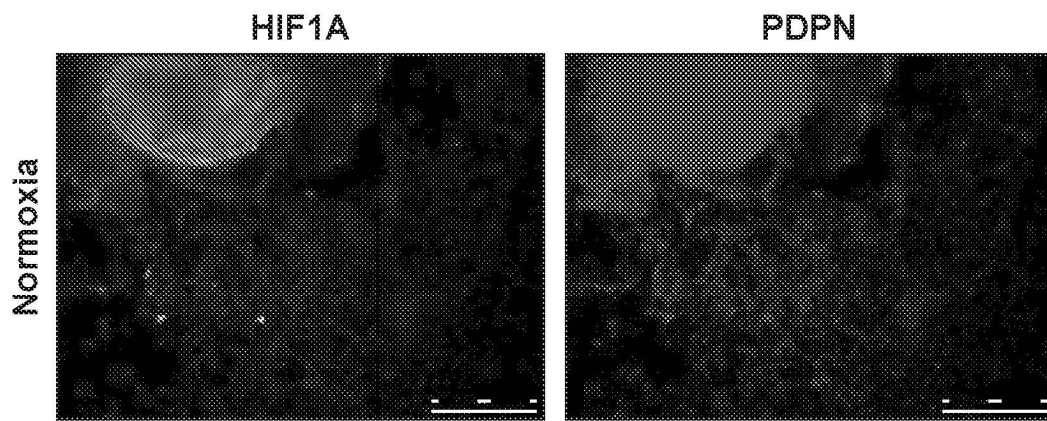


FIG. 5A

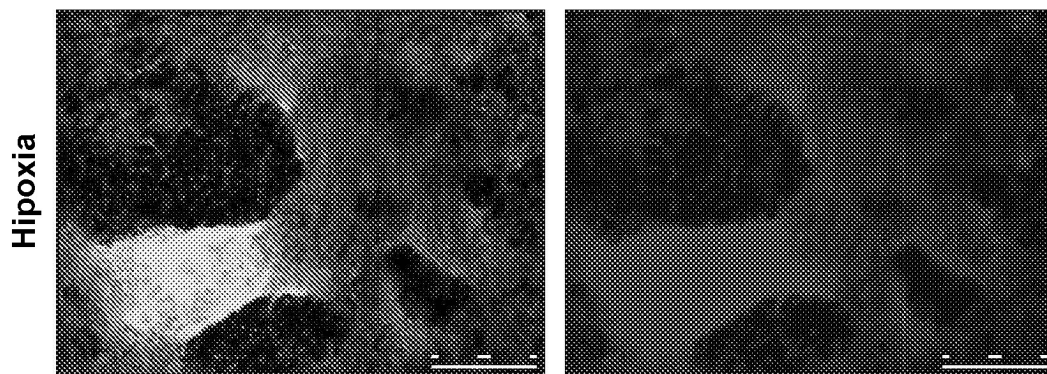


FIG. 5B

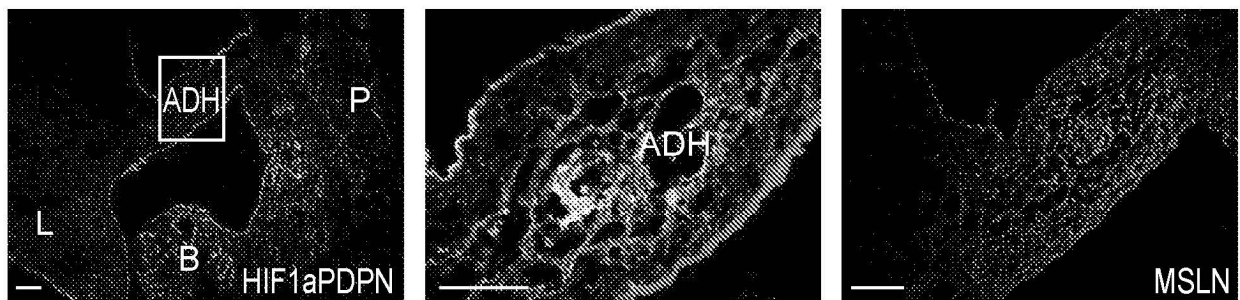


FIG. 5C

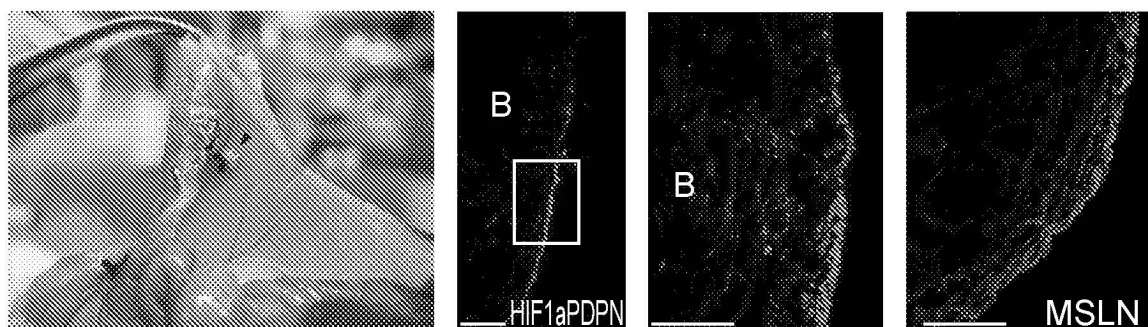


FIG. 5D

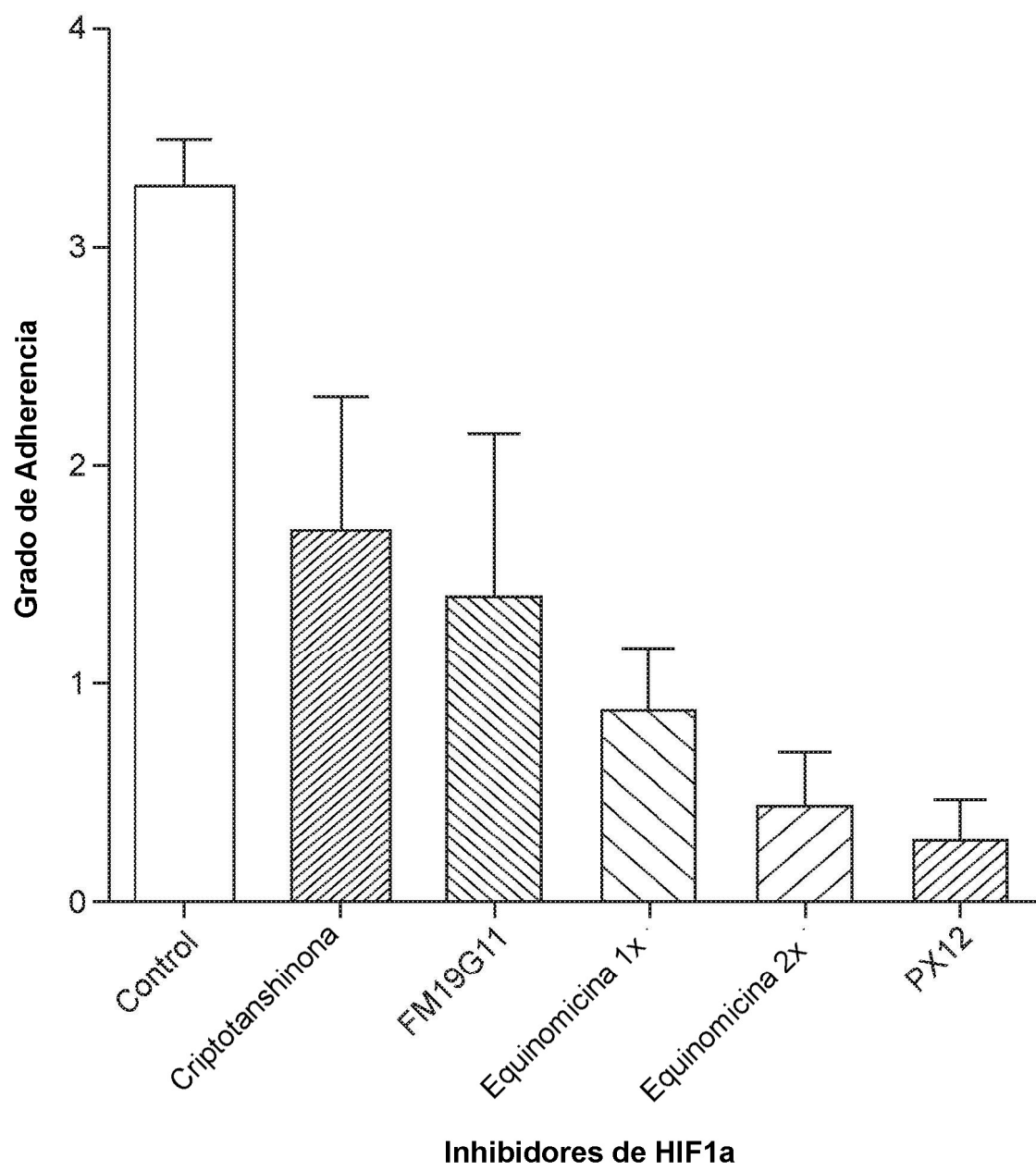


FIG. 5E

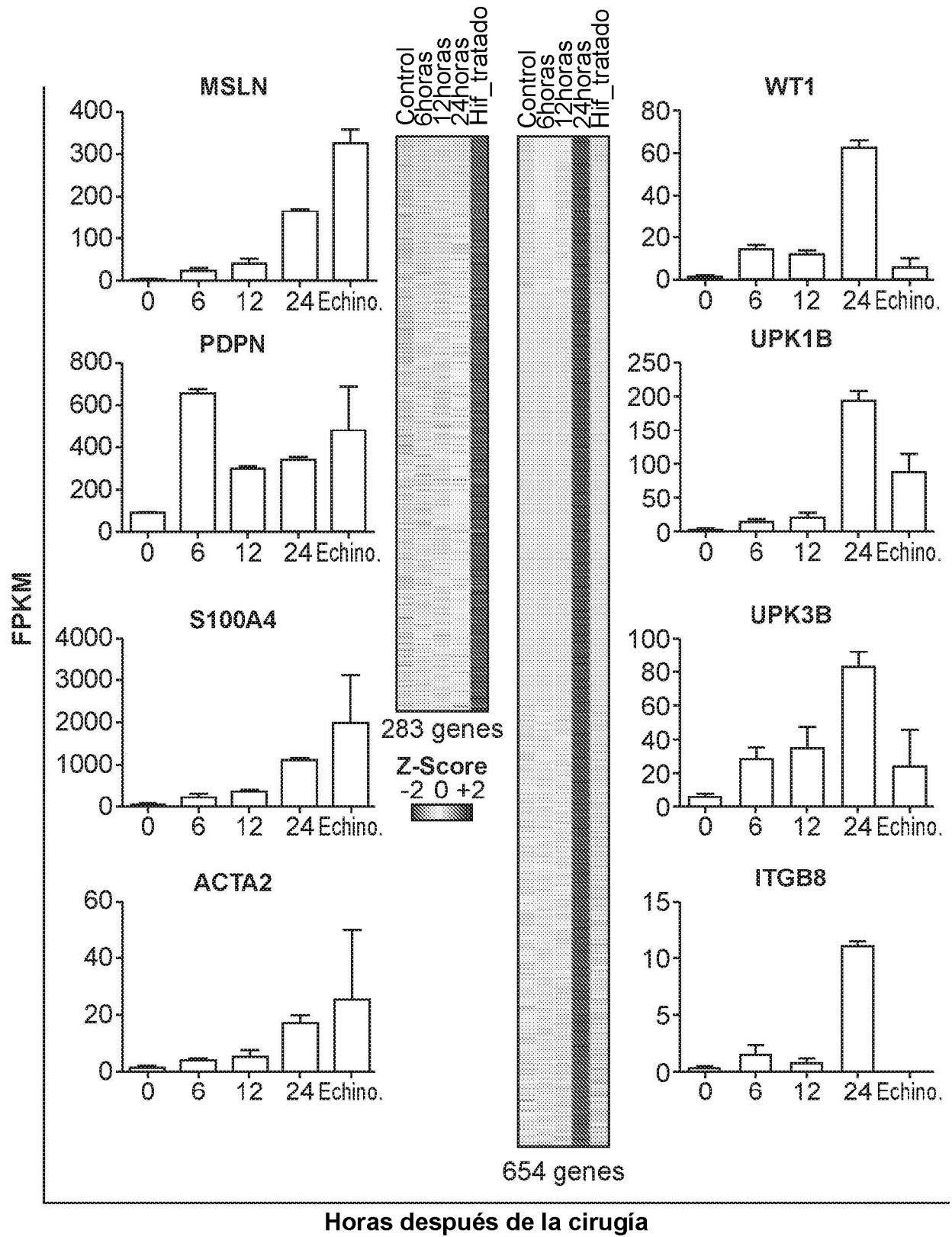


FIG. 5F

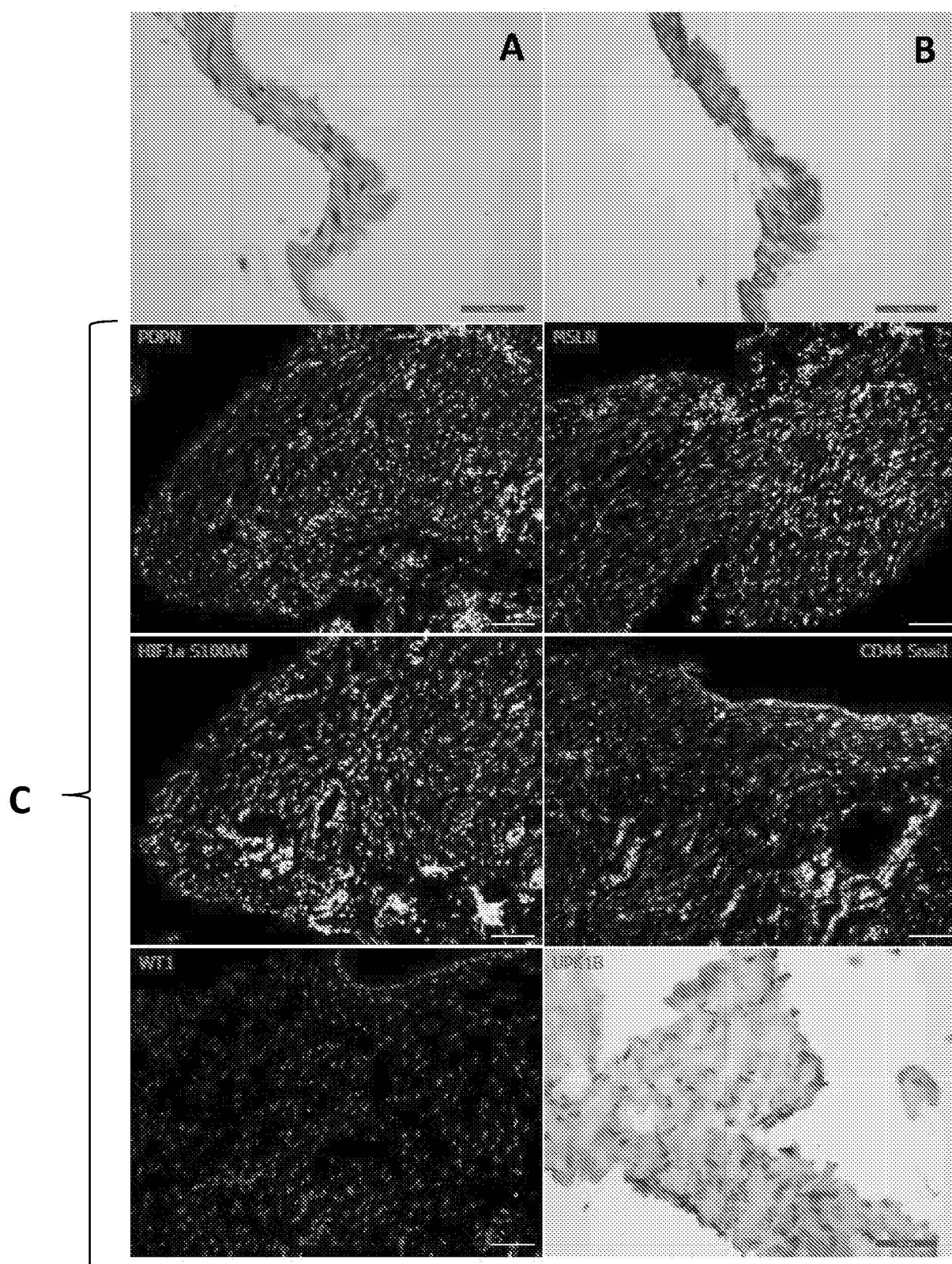


FIG. 6

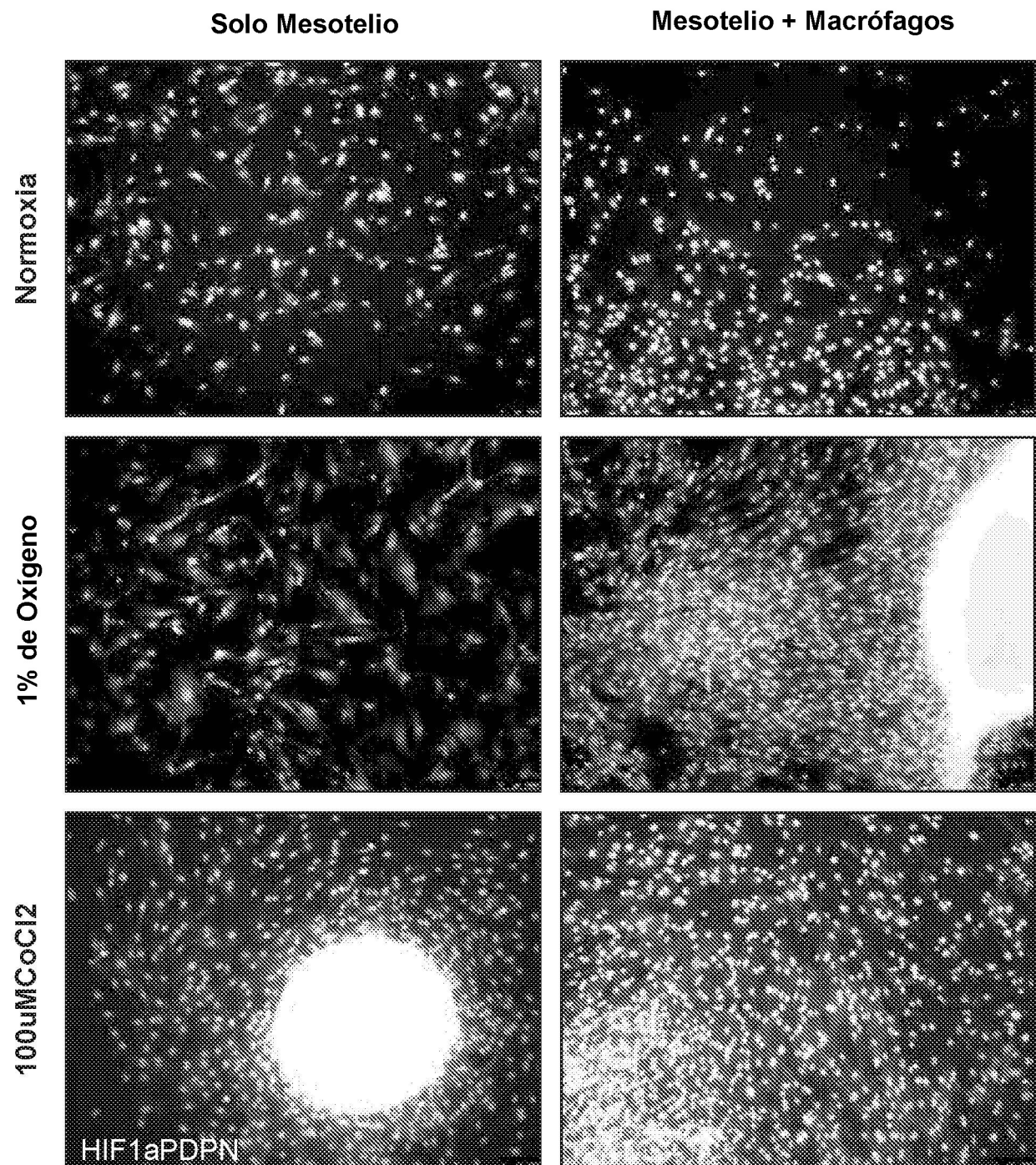


FIG. 7

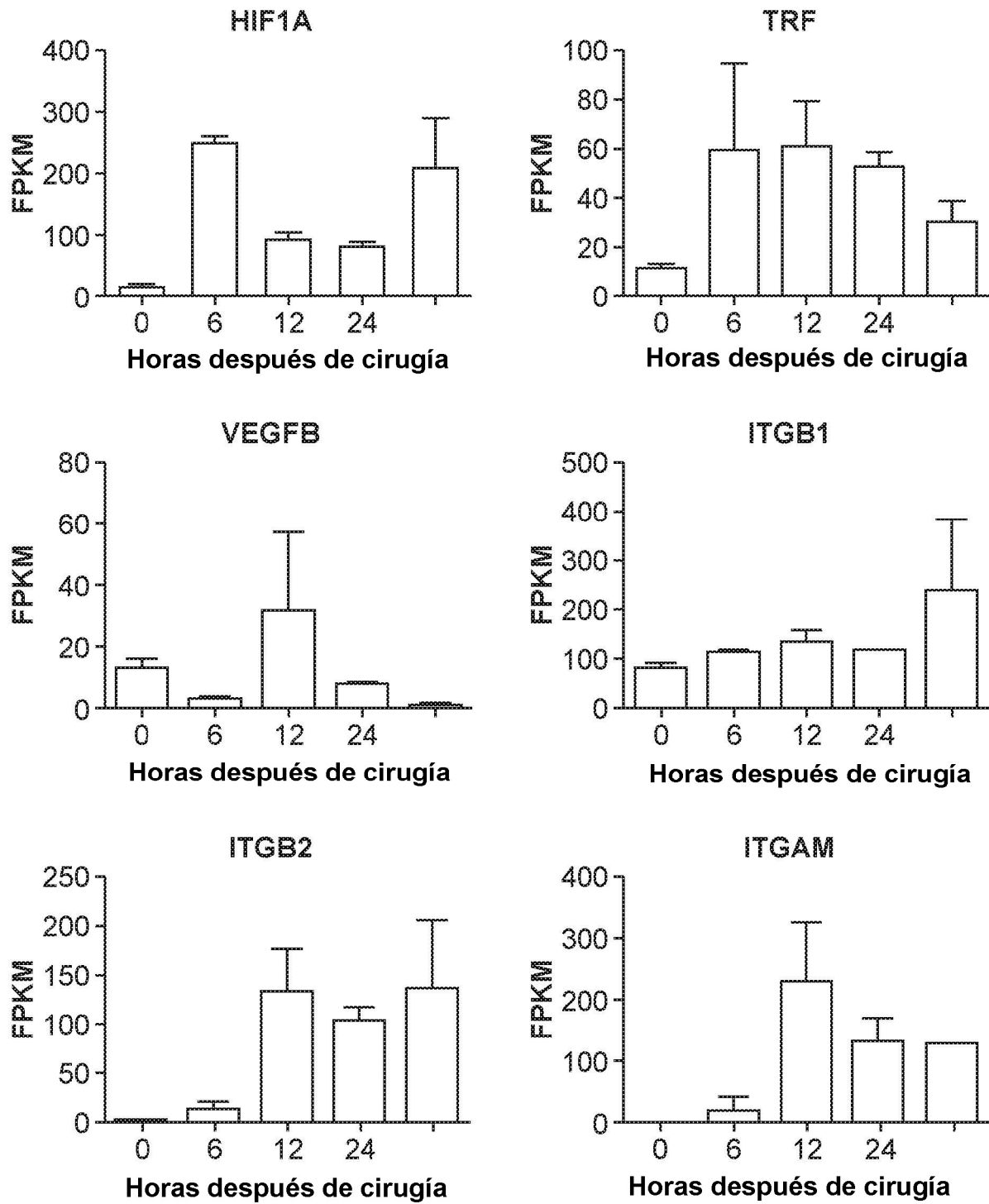


FIG. 8

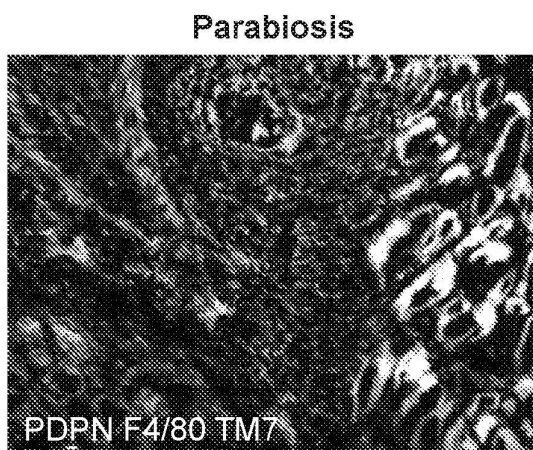
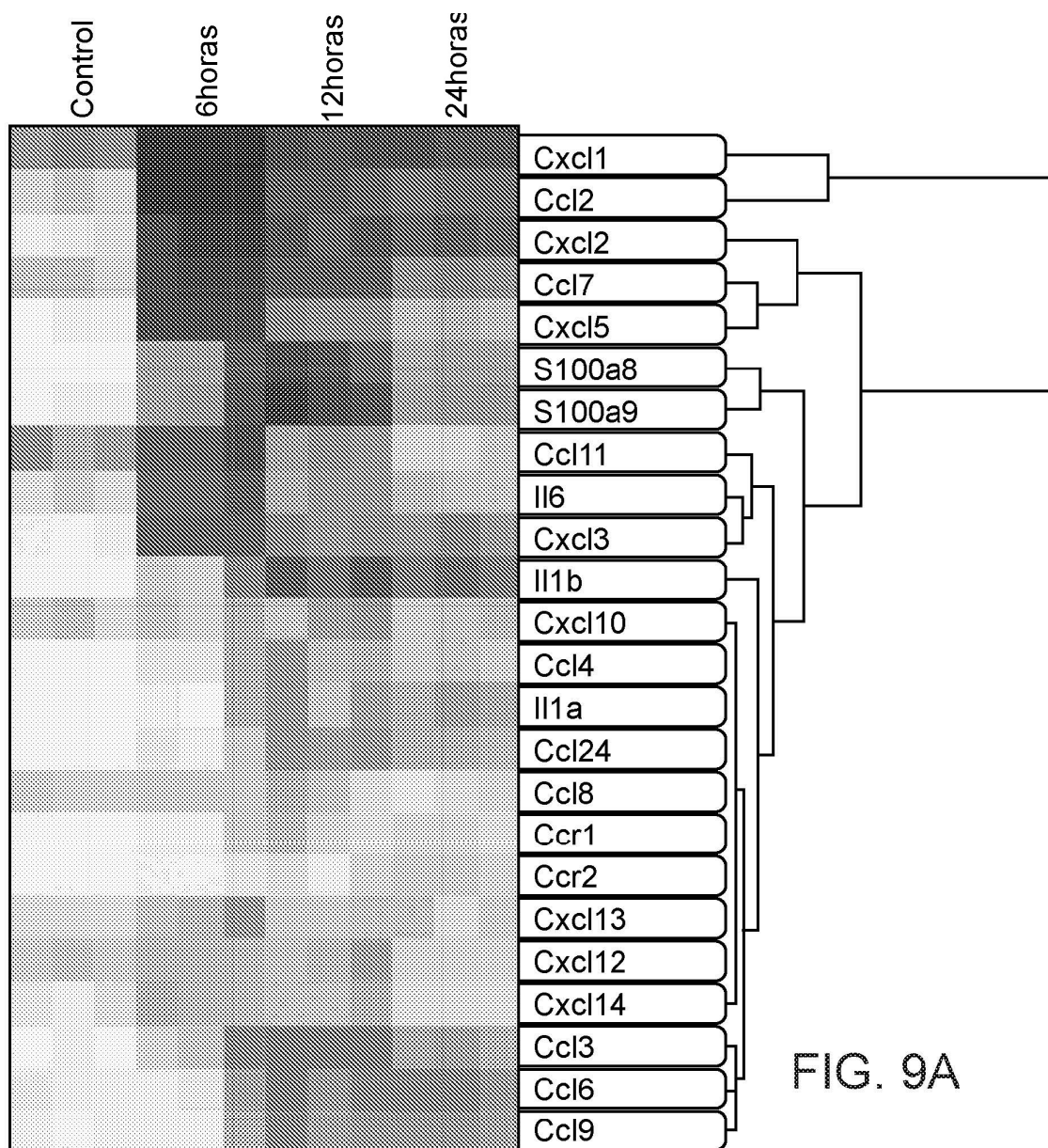


FIG. 9B



FIG. 9C

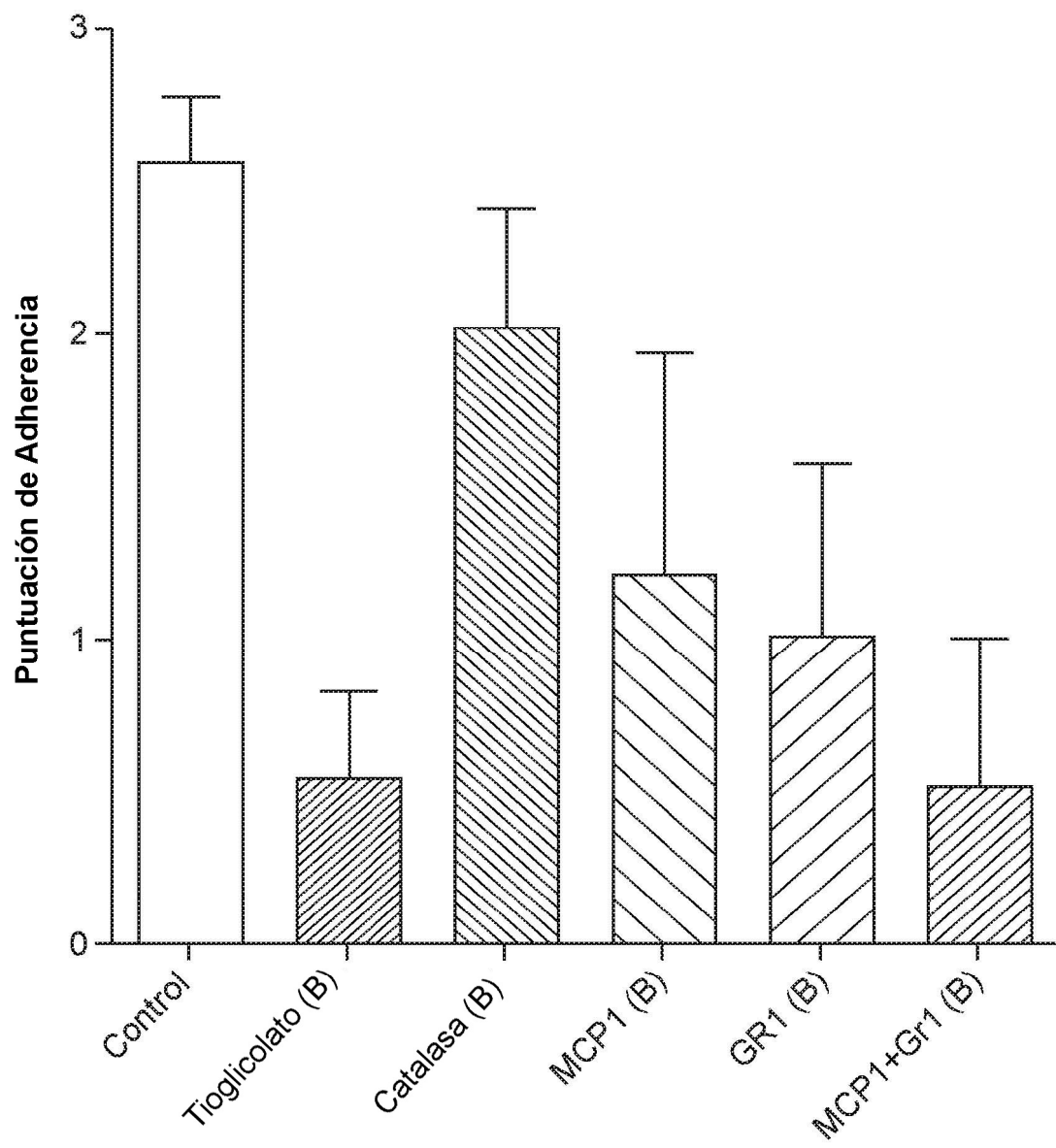


FIG. 9D

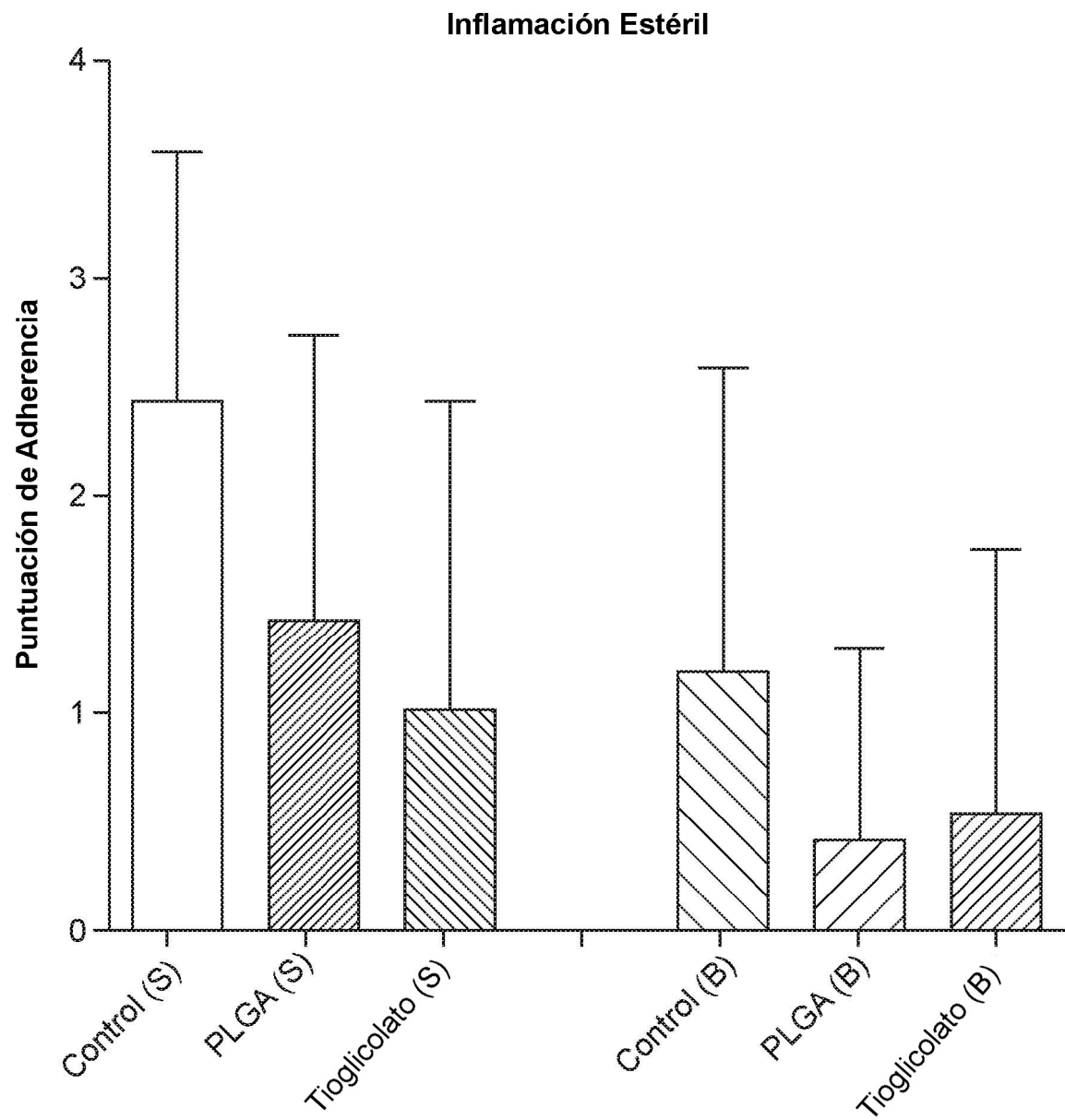


FIG. 10