



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 655**

51 Int. Cl.:
A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03814319 .4**

96 Fecha de presentación : **22.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1596880**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54 Título: **Métodos y composiciones para suprimir la diferenciación de fibrocitos.**

30 Prioridad: **23.12.2002 US 436046 P**
23.12.2002 US 436027 P
30.10.2003 US 515776 P
12.11.2003 US 519467 P
26.11.2003 US 525175 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.07.2011

73 Titular/es: **William Marsh Rice Univeristy**
P.O. Box 1892
Houston, Texas 77251-1892, US

72 Inventor/es: **Gomer, Richard y**
Pilling, Darrell

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 362 655 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

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a la capacidad de SAP para suprimir la diferenciación de monocitos en fibrocitos. Por consiguiente, incluye composiciones y métodos para suprimir dicha diferenciación. Estas composiciones pueden usarse en un método útil en una diversidad de aplicaciones en las que es beneficiosa una formación disminuida de fibrocitos, tal como el tratamiento de enfermedades fibrosantes y el asma.

ANTECEDENTES*Fibrocitos*

10 La inflamación es la respuesta coordinada a lesión o infección tisular. Los acontecimientos iniciadores están mediados por la liberación local de factores quimiotácticos, la activación de plaquetas, y el inicio de la coagulación y las vías del complemento. Estos acontecimientos estimulan el endotelio local, promoviendo la extravasación de neutrófilos y monocitos. La segunda fase de la inflamación está caracterizada por el flujo al interior del tejido de las células del sistema inmune adaptativo, incluyendo linfocitos. La fase de resolución posterior, cuando tiene lugar la apoptosis de los leucocitos en exceso y la absorción por los macrófagos tisulares, también se caracteriza por la reparación del daño tisular por células estromáticas, tales como fibroblastos.

15 En la inflamación crónica, la resolución de las lesiones inflamatorias está alterada, con el mantenimiento de las células inflamatorias, hiperplasia de los fibroblastos, y destrucción final del tejido. Los mecanismos que conducen a estos acontecimientos son complejos, pero incluyen un reclutamiento, supervivencia y retención potenciados de las células y emigración alterada.

20 La fuente de fibroblastos responsables de reparar lesiones por heridas o en otras respuestas fibróticas es controvertida. La hipótesis convencional sugiere que los fibroblastos quiescentes locales migran al área afectada, producen proteínas de matriz extracelular, y promueven la contracción de la herida o fibrosis. Una hipótesis alternativa es que los precursores en circulación de los fibroblastos (llamados fibrocitos) presentes en la sangre migran a los sitios de lesión o fibrosis, donde se diferencian y media la reparación tisular y otras respuestas fibróticas.

25 Se sabe que los fibrocitos se diferencian a partir de una población precursora de monocitos sanguíneos periféricos CD14+. Los fibrocitos expresan marcadores tanto de células hematopoyéticas (CD45, MHC clase II, CD34) y células estromáticas (colágeno tipo I y III y fibronectina). Los fibrocitos maduros entran rápidamente en los sitios de lesión tisular donde secretan citoquinas inflamatorias. Los fibrocitos también son capaces de secretar proteínas de matriz extracelular, otras citoquinas y moléculas pro-angiogénicas, que pueden provocar la fibrosis.

30 Los mecanismos que inhiben la diferenciación de fibrocitos a partir de monocitos CD14+ en gran medida eran desconocidos antes de la presente invención. Sin embargo, el control de la diferenciación de los fibrocitos probablemente es importante en el control de muchas enfermedades y procesos. Los fibrocitos están asociados a una diversidad de procesos y enfermedades incluyendo esclerodermia, cicatrización queloide, artritis reumatoide, lupus, dermatopatía fibrosante nefrogénica, y fibrosis pulmonar idiopática. Desempeñan una tarea en la formación de lesiones fibróticas después de infección por *Schistosoma japonicum* en ratones y también están implicados en fibrosis asociada con enfermedades autoinmunes. Los fibrocitos también se han implicado en fibrosis patogénica asociada con daño por radiación, enfermedad de Lyme y fibrosis pulmonar. Los fibrocitos CD34+ también se han asociado con el remodelado estromático en pancreatitis y fibrosis estromática, mientras que la ausencia de dichos fibrocitos está asociada con tumores pancreáticos y adenocarcinomas. Adicionalmente existe fibrosis en pacientes con asma y posiblemente otras enfermedades pulmonares tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica cuando los fibrocitos experimentan diferenciación adicional en miofibroblastos.

Amiloide P sérico

45 Dado el amplio intervalo de procesos y enfermedades en los que los fibrocitos desempeñan una tarea, los mecanismos que regulan su diferenciación a partir de monocitos sanguíneos periféricos son de gran interés. Los aspectos de la presente invención se basan en el descubrimiento de que la diferenciación de los fibrocitos sanguíneos periféricos a partir de monocitos está suprimida por un factor del suero y el plasma. El fraccionamiento del plasma humano identificó este factor como amiloide P sérico (SAP). SAP, un miembro de la familia de proteínas de la pentraxina que incluye la proteína reactiva C (CRP), se secreta por el hígado y circula en la sangre en forma de pentámeros estables. La tarea exacta de SAP aún no está clara, aunque parece desempeñar una tarea tanto en el inicio como en las fases de resolución de la respuesta inmune. El SAP se une a restos de azúcar en la superficie de bacterias lo que conduce a su opsonización y absorción. El SAP también se une a ADN libre y la cromatina generada por células apoptóticas en la resolución de una respuesta inmune, evitando de este modo una respuesta inflamatoria secundaria. Las moléculas unidas por SAP se retiran de las áreas extracelulares debido a la capacidad de SAP de unirse a los tres receptores Fc γ clásicos (Fc γ R), con una preferencia por Fc γ RI (CD64) y Fc γ RII (CD32). Después de la unión al receptor, la célula absorbe el SAP y cualquier molécula unida probablemente.

55 Los Fc γ R son necesarios para unión de IgG a una amplia diversidad de células hematopoyéticas. Los monocitos sanguíneos periféricos expresan tanto CD64 como CD32 (una subpoblación de monocitos expresa CD16), mientras que los macrófagos tisulares expresan los tres Fc γ R clásicos. El agrupamiento de Fc γ R en los monocitos por IgG, unidos a patógenos o como parte de un complejo inmune, inicia una amplia diversidad de acontecimientos bioquímicos. Los acontecimientos iniciales después de la agregación del receptor incluyen la activación de una serie de proteína quinasas src. En monocitos, éstas incluyen lyn, hck y fgr, que fosforidan los restos de tirosina en el motivo ITAM de la cadena FcR- γ asociada con Fc γ RI

5 y Fc γ RIII, o el motivo ITAM con el dominio citoplasmático de Fc γ RII. Los ITAM fosforilados conducen a la unión de una segunda serie de quinasas src, incluyendo syk. Se ha demostrado que syk es vital para la fagocitosis de partículas recubiertas por IgG. Sin embargo, la amplia distribución de syk en células no hematopoyéticas y la evidencia de que syk está implicada en la señalización por integrina y en receptores acoplados a proteína G, indica que esta molécula tiene muchas funciones.

10 Tanto SAP como CRP aumentan la fagocitosis y se unen a receptores Fcy en una diversidad de células. CRP se une con una elevada afinidad a Fc γ RII (CD32), una afinidad inferior a Fc γ RI (CD64), pero no se une a Fc γ RIII (CD16). SAP se une a los tres receptores clásicos Fcy, con preferencia por Fc γ RI y Fc γ RII, particularmente Fc γ RI. Aunque hay observaciones conflictivas sobre la unión de CRP a FcyR, se ha demostrado que tanto SAP como CRP se unen a receptores Fc e inician los acontecimientos de señalización intracelular coherentes con el ligamiento de FcyR.

15 En suero sanguíneo humano, los hombres normalmente tienen aproximadamente 32 μ g/ml \pm 7 μ g/ml de SAP, siendo normal un intervalo de 12-50 μ g/ml. Las mujeres generalmente tienen 24 μ g/ml \pm 8 μ g/ml de SAP en suero sanguíneo, siendo normal un intervalo de 8-55 μ g/ml. En fluido cefalorraquídeo humano normalmente hay aproximadamente 12,8 μ g/ml de SAP en hombres y aproximadamente 8,5 μ g/ml en mujeres. Combinando los datos de hombre y mujeres, el nivel normal de SAP en suero humano es de 26 μ g/ml \pm 8 μ g/ml siendo normal un intervalo de 12-55 μ g/ml. (Los niveles séricos anteriores se expresan como la media \pm la desviación típica.)

IL-12

20 Otros aspectos de la presente invención se refieren a la capacidad recién descubierta de que IL-12 suprime la formación de fibrocitos por los monocitos. IL-12 se ha implicado previamente en la fibrosis y enfermedades fibrosantes, pero la mayoría de los estudios se han centrado en la tarea de IL-12 para promover la respuesta inmune Th1 o desencadenando la producción de interferón- γ . Los efectos directos de IL-12 sobre la formación de fibrocitos no parece que se hayan reconocido previamente.

Laminina-1

25 Otros aspectos más de la presente invención se refieren a la capacidad recién descubierta de que la laminina-1 inhibe la diferenciación de monocitos en fibrocitos. Las lamininas son proteínas de matriz extracelular implicadas en el movimiento de los monocitos desde la circulación al interior de los tejidos.

30 Para que los leucocitos entren en los tejidos, deben cruzar a través de células endoteliales y la membrana basal adyacente de la pared del vaso sanguíneo. Este proceso implica el acoplamiento, rodamiento y detención de los leucocitos en las células endoteliales. Después de la adhesión a las células endoteliales, los leucocitos después cruzan entre las células endoteliales, a través de la pared del vaso sanguíneo y al interior de los tejidos. El proceso de extravasación de células a través de las paredes del vaso sanguíneo altera su fenotipo y función.

35 Estos acontecimientos están controlados por una serie de receptores de adhesión de superficie celular, incluyendo integrinas. Las integrinas se unen a una amplia diversidad de ligandos, incluyendo proteínas de matriz extracelular (ECM), tales como fibronectina, vitronectina, colágeno y laminina. Las proteínas de matriz están presentes en la base de la pared del vaso sanguíneo, incluyendo lamininas. Las lamininas son una gran familia de glucoproteínas, con una estructura heterotrimérica de cadenas α , β y γ . El uso de diferentes cadenas α , β y γ conduce a la expresión de al menos doce isoformas diferentes de laminina. Las diferentes lamininas se expresan en diferentes fases de desarrollo y en diferentes sitios dentro del cuerpo.

Esclerodermia

40 En investigaciones descritas en este documento, se descubrió que los sueros de pacientes con esclerodermia (esclerosis sistémica) eran menos capaces de inhibir la diferenciación de fibrocitos a partir de monocitos que los de pacientes normales. Adicionalmente se descubrió que pacientes con esclerodermia tenían niveles inferiores de SAP en circulación.

45 La esclerodermia es una enfermedad no infecciosa no hereditaria que tiene una gama de síntomas. Implica la formación de tejido cicatrizal que contiene fibroblastos en la piel y órganos internos. El origen de los fibroblastos es desconocido. En casos leves o tempranos de esclerodermia, existe un endurecimiento de la piel, fatiga, sarpullidos y sensibilidad al frío. En las fases más graves y tardías, hay una elevada presión sanguínea, úlceras cutáneas, dificultad en el movimiento de las articulaciones y muerte por cicatrización pulmonar o fallo renal. Aproximadamente 300.000 personas en los Estados Unidos tienen esclerodermia. La enfermedad tiene similitudes con el lupus y la artritis reumatoide. No existe cura o tratamiento significativo para la esclerodermia e incluso el diagnóstico es difícil porque no existe ensayo clínico.

Dermopatía fibrosante nefrogénica

55 La dermatopatía fibrosante nefrogénica (NFD) es una afección cutánea fibrosante tipo esclerodermia recién identificada. Se desarrolla en pacientes con insuficiencia renal. Se han propuesto las placas escleróticas amarillas y los anticuerpos anti-fosfolípidos en circulación como marcadores de NFD. La doble tinción inmunohistoquímica para CD34 y pro-colágeno en las células fisiformes de NFD sugieren que las células dérmicas de NFD pueden representar fibrocitos en circulación reclutados a la dermis. Por lo tanto, la inhibición de la formación de fibrocitos puede aliviar los síntomas de esta enfermedad.

Asma

El asma afecta a más de 100 millones de personas en todo el mundo, y su prevalencia está aumentando. Parece que el asma está causado por la inflamación crónica de las vías respiratorias. Uno de los aspectos más destructivos del asma es la remodelación de las vías respiratoria en respuesta a la inflamación crónica. Este remodelado implica el engrosamiento de la lámina reticularis (la membrana basal reticular sub-epitelial que rodea las vías respiratorias) debido a fibrosis. Los pasos de las vías respiratorias entonces llegan a estreñirse debido a las paredes engrosadas de las vías respiratorias.

La lámina reticularis engrosada en pacientes con asma contiene niveles anormalmente elevados de proteínas de la matriz extracelular tales como colágeno I, colágeno III, colágeno V, fibronectina y tenascina. Parece que la fuente de estas proteínas es un tipo especializado de fibroblastos llamados miofibroblastos.

En pacientes con asma, los fibrocitos CD34+/colágeno I+ se acumulan cerca de la membrana basal de la mucosa bronquial en 4 horas desde la exposición al alérgeno. Después de 24 horas de exposición al alérgeno, se han observado monocitos/fibroblastos marcados que expresan actina α de músculo liso, un marcador de los miofibroblastos. Estas observaciones sugieren que en pacientes con asma la exposición al alérgeno causa que los fibrocitos de la sangre entren en la mucosa bronquial, se diferencien en miofibroblastos, y después causen el engrosamiento de la pared de las vías respiratorias y la obstrucción de las vías respiratorias. Adicionalmente, hay una correlación entre tener una mutación en las regiones reguladoras de los genes que codifican la proteína quimioatrayente de monocitos 1 o TGF- β -1 y la gravedad del asma. Esto también sugiere que el reclutamiento de monocitos y la aparición de miofibroblastos conduce a complicaciones del asma.

El engrosamiento de la lámina reticularis distingue el asma de la bronquitis crónica o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y se encuentra incluso cuando el asma está controlado con medicamentos convencionales. Un grado aumentado de engrosamiento de la pared de las vías respiratorias está asociado con asma grave. No se han encontrado medicamentos o tratamientos para reducir el engrosamiento de la lámina reticularis. Sin embargo, parece probable que reduciendo la cantidad de miofibroblastos hallados en las paredes de las vías respiratorias se pueda reducir el engrosamiento o ayudar a evitar un engrosamiento adicional.

Fibrosis pulmonar idiopática

La fibrosis pulmonar idiopática (IPF) es un tipo único de enfermedad pulmonar fibrosante crónica de etiología desconocida. La secuencia de los mecanismos patogénicos es desconocida, pero la enfermedad está caracterizada por lesión y activación epitelial, la formación de focos distintivos de fibroblastos/miofibroblastos sub-epiteliales y acumulación excesiva de matriz extracelular. Estos procesos patológicos habitualmente conducen a cambios progresivos e irreversibles en la arquitectura pulmonar, provocando una insuficiencia respiratoria progresiva y un resultado casi universalmente terminal en un periodo relativamente corto de tiempo. Aunque las investigaciones se han centrado en gran medida sobre los mecanismos inflamatorios para iniciar la respuesta fibrotica, las evidencias recientes sugieren de forma importante que la alteración del epitelio alveolar es un acontecimiento patogénico subyacente. Dada la tarea desempeñada por los fibrocitos en la curación de heridas y su papel conocido en el engrosamiento de las paredes de las vías respiratorias en el asma, parece probable que la sobreproducción de fibrocitos pueda estar implicada en IPF.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención incluye composiciones y su uso en un método para suprimir la diferenciación de fibrocitos a partir de monocitos. La diferenciación de los fibrocitos en una localización diana puede suprimirse proporcionando SAP. (Las denominaciones para "SAP", "1" como se usa en este documento también se refieren a fragmentos funcionales de esta proteína salvo que esté claro que dichos fragmentos están excluidos del uso en un contexto dado.) La localización diana puede estar localizada *in vitro* o *in vivo*. *In vivo* la localización diana puede incluir un organismo completo o una parte del mismo y la composición puede administrarse por vía sistémica o puede confinarse a un área particular, tal como un órgano o tejido. Las composiciones pueden incluir aquellas suministradas directamente o producidas en la localización diana o el mismo organismo como localización diana, como por ejemplo, a través de la expresión de un transgén. Estas composiciones pueden darse en una cantidad suficiente para aumentar las concentraciones por encima de los niveles normales o para llevar sus concentraciones hasta niveles normales o restaurar sus niveles de actividad normales. Las concentraciones o actividad de algunas de estas composiciones pueden aumentarse estimulando la producción natural o suprimiendo la degradación normal.

Una disminución en la diferenciación de los fibrocitos a partir de monocitos puede aliviar los síntomas de numerosas enfermedades fibrosantes u otros trastornos causados por fibrosis.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS GRÁFICOS

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la siguiente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos gráficos en combinación con la descripción detallada presentada en este documento.

La FIGURA 1 ilustra los efectos del suero y el plasma sobre la rápida diferenciación de células tipo fibroblasto.

En la FIGURA 1A se cultivaron células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) a $2,5 \times 10^5$ por ml en medio sin suero durante 3 ó 6 días en presencia o ausencia de suero humano al 0,1% y después se examinaron por microscopía para el aspecto de las células tipo fibroblasto. La barra es 100 μ m.

En la FIGURA 1B se cultivaron PBMC a $2,5 \times 10^5$ por ml en medio sin suero durante 6 días en diluciones de plasma humano. Después las células se secaron al aire, se fijaron, se tiñeron y se enumeraron los fibrocitos por morfología. Los resultados se expresan como la media \pm SD de la cantidad de fibrocitos por $2,5 \times 10^5$ PBMC (n=5 experimentos). Las estrellas indican las diferencias estadísticamente significativas del plasma 0.

5 La FIGURA 2 ilustra la expresión de moléculas superficiales sobre células tipo fibroblasto. Se cultivaron PBMC sobre portaobjetos de vidrio en medio sin suero durante 6 días. Las células se secaron al aire y se analizaron por inmunohistoquímica. Se usaron anticuerpos monoclonales como se indica, y se identificaron por anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón conjugado con biotina por ExtrAvidina peroxidasa. Las células se tiñeron con contraste con hematoxilina de Mayer para identificar los núcleos. La tinción positiva se identificó por tinción marrón, los núcleos se tiñeron con contraste en azul. Se usó un inserto para CD83 para indicar la tinción positiva en una célula dendrítica.

10 La FIGURA 3 ilustra la caracterización de la molécula presente en plasma que inhibe la diferenciación de los fibrocitos. Se trató plasma citrado con BaCl₂ y el material precipitado se recogió por centrifugación y se dializó frente a fosfato sódico 10 mM que contenía EDTA 10 mM e inhibidores de proteasa. Este material después se fraccionó por heparina y cromatografía de intercambio iónico.

15 En la FIGURA 3A se analizaron las fracciones por PAGE en un gel reductor al 4-20% y se tiñeron con azul de coomassie. M indica marcadores de peso molecular. El carril 1 contenía plasma, el carril 2 contenía sobrenadante de BaCl₂, el carril 3 contenía el lavado 1, el carril 4 contenía el lavado 2, el carril 5 contenía el precipitado de BaCl₂, el carril 6 contenía el precipitado de BaCl₂, el carril 7 contenía el flujo de heparina, el carril 8 contenía la fracción de heparina, el carril 9 contenía el flujo High Q, el carril 10 contenía la fracción High Q, el carril 11 contenía la fracción purificada en gel. Los carriles 1-5 se diluyeron 1:500 en tampón fosfato sódico, los carriles 6-11 no se diluyeron.

20 Las fracciones activas eluidas de la columna de intercambio iónico High Q y los cortes de gel se analizaron por PAGE al 4-20% en un gel nativo en la FIGURA 3B y un gel reductor en la FIGURA 3C. NM indica marcadores de gel nativo, RM indica marcadores de gel reducido. En 3C, los carriles 1-3 son muestras de control de gel, el carril 4 contenía la fracción activa. En la FIGURA 3D las fracciones se evaluaron por transferencia de western, usando un anticuerpo de conejo anti-SAP. Los carriles 1-11 corresponden a los de la FIGURA 3A.

25 La FIGURA 4 muestra la inhibición de la formación de fibrocitos por SAP, pero no CRP u otras proteínas plasmáticas. Se cultivaron PBMC a $2,5 \times 10^5$ por ml en medio sin suero durante 6 días en presencia de SAP purificado disponible en el mercado (cuadrado relleno), CRP (cuadrado claro), Proteína S (diamante claro) o C4b (círculo claro) y después se examinaron para la aparición de células tipo fibroblasto. Las células después se secaron al aire, se fijaron, se tiñeron y se enumeraron los fibrocitos por morfología. Los resultados son la media \pm SD de fibrocitos por $2,5 \times 10^5$ PBMC (n=3 experimentos diferentes).

La FIGURA 5 muestra el efecto de la eliminación de SAP del plasma en un ensayo de diferenciación de fibrocitos.

35 La FIGURA 5A muestra el efecto sobre la diferenciación de fibrocitos de la eliminación de SAP del plasma con perlas de agarosa BioGel. Se muestra la cantidad de fibrocitos hallada en un ensayo suministrado con cada plasma (cuadrado claro) o plasma desprovisto con BioGel (cuadrado relleno) a una diversidad de diluciones. Las estrellas indican diferencias estadísticamente significativas entre las dos curvas.

La FIGURA 5B muestra la cantidad de fibrocitos formados en un ensayo realizado sin plasma o diluciones iguales de plasma, plasma desprovisto de SAP con BioGel, o plasma desprovisto de anticuerpo anti-SAP. Las estrellas indican diferencias estadísticamente significativas.

40 La FIGURA 6 muestra los efectos de diversas citoquinas sobre la diferenciación de monocitos en fibrocitos. La FIGURA 6A muestra los efectos de una diversidad de citoquinas. La FIGURA 6B muestra los efectos de IL-12 en mayor detalle.

45 La FIGURA 7 muestra los efectos de proteínas de matriz extracelular sobre la formación de fibrocitos. Las proteínas de matriz extracelular se unieron a placas de cultivo tisular de 96 pocillos durante 18 horas a 4°C en tampón carbonato 50 mM pH 9,5. Se diluyeron ProNectina-F y ProNectina-L en PBS. Las placas se lavaron en PBS, y se incubaron durante 60 minutos a 37°C en PBS que contenía albúmina sérica bovina al 2%, para evitar la unión no específica. Las placas se lavaron con PBS y después en medio de cultivo tisular. Después se añadieron células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) y se cultivaron durante 4 días. Se muestran los resultados para una diversidad de proteínas de matriz extracelular en la FIGURA 7A. Los efectos de Laminina-1, Laminina-10/11 y ProNectina-L se muestran en mayor detalle en la FIGURA 7B.

50 La FIGURA 8 muestra los efectos de IgG monomérica sobre la capacidad de SAP de unirse a monocitos e inhibir su diferenciación. Se cultivaron PBMC en medio sin suero en presencia de una gama de concentraciones de IgG monomérica durante 60 minutos. Después se añadió SAP, a las concentraciones indicadas, y se cultivaron las células durante 4 días.

55 La FIGURA 9 muestra los efectos del ligamiento y entrecruzamiento de receptores Fc sobre la diferenciación de monocitos en fibrocitos. Se usaron complejos inmunes solubles (ovalbúmina-anticuerpo), complejos inmunes particulados, incluyendo glóbulos rojos de oveja opsonizados (SRBC) e IgG agregada por calor. En la FIGURA 9A se cultivaron PBMC durante 4 días con ovalbúmina o mAb anti-ovalbúmina solo, o complejos inmunes de ovalbúmina:anti-ovalbúmina. La FIGURA 9B muestra los efectos de SRBC solas y SRBC opsonizadas con anticuerpo anti-SRBC de conejo a proporciones de SRBC:monocito de 20:1 y 40:1. Finalmente, la FIGURA 9C muestra los efectos sobre PBMC de IgG agregada por calor y F(ab)₂ agregado por calor. Las estrellas en 9A y 9B indican diferencias estadísticamente significativas.

60

La FIGURA 10 muestra los efectos de anticuerpos anti-Fc γ R sobre la diferenciación de monocitos. Las estrellas indican una diferencia estadísticamente significativa del control.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Supresión de la diferenciación de monocitos

5 La regulación de los acontecimientos que conducen a fibrosis implica la proliferación y diferenciación de los fibrocitos. Los fibrocitos son una población distinta de células tipo fibroblasto derivadas de monocitos sanguíneos periféricos que normalmente entran en sitios de lesión tisular para promover la angiogénesis y la curación de heridas. El cultivo de monocitos sanguíneos periféricos CD14+ en ausencia de suero o plasma conduce a la rápida diferenciación de los fibrocitos. Este proceso sucede en 72 horas y se suprime por la presencia de suero o plasma. El factor del suero que suprime la rápida aparición de fibrocitos es el amiloide P sérico (SAP). Adicionalmente, una cohorte de pacientes con la enfermedad fibrosante esclerodermia tienen sueros con una mala capacidad de suprimir la diferenciación de fibrocitos y muestran un nivel correspondientemente bajo de SAP. Estos resultados sugieren que bajos niveles de SAP en la circulación o en los tejidos periféricos conduce a o desempeña una parte en los procesos patológicos tales como fibrosis. Los ensayos de diferenciación de monocitos también han revelado que IL-12, Laminina-1 y moléculas IgG conjugadas también suprimen la diferenciación de monocitos en fibrocitos.

15 Pueden usarse composiciones que contienen uno o más de los supresores de formación de fibrocitos para suprimir la fibrosis en localizaciones inapropiadas y en trastornos fibrosantes y afecciones inflamatorias crónicas, *inter alia*. Las composiciones pueden aplicarse de forma local o sistémica. En realizaciones específicas, las composiciones que contienen SAP pueden ser funcionales para elevar la concentración de SAP en localizaciones diana hasta aproximadamente al menos 20 0,5 μ g/ml. En seres humanos, se ha administrado previamente SAP radiomarcado con I¹²⁵ a pacientes de estudio con amiloidosis. En los tratamientos, se administraron aproximadamente 600 μ g de SAP a un ser humano adulto. Por consiguiente, la administración de aproximadamente 600 μ g de SAP de forma sistémica a un ser humano adulto es segura. Dosificaciones mayores también pueden ser seguras en condiciones apropiadas.

25 El SAP suministrado en ciertas composiciones de la presente invención puede incluir la proteína SAP completa o una parte de la misma, preferiblemente la parte funcional en la supresión de la formación de fibrocitos. En una realización ejemplar, la parte funcional de SAP se selecciona de la región que no comparte homología de secuencia con CRP, que no tiene efectos sobre la formación de fibrocitos. Por ejemplo, los aminoácidos 65-89 (KÉRVGEYSLYIGRHKVTPKVIÉKFP-SEC.ID.Nº 1) de SAP no son homólogos a CRP. Los aminoácidos 170-181 (ILSAYQGTPLPA-SEC.ID.Nº 2) y 192-205 (IRGYVIKPLV-SEC.ID.Nº 3) tampoco son homólogos. Adicionalmente, se conocen varias diferencias de un único aminoácido entre las dos proteínas y pueden provocar diferencias funcionales.

30 Las composiciones que contienen IL-12 pueden ser funcionales para elevar la concentración de IL-12 en localizaciones diana hasta aproximadamente 0,1 a 10 ng/ml. Las composiciones que contienen Laminina-1 pueden ser funcionales para elevar la concentración de Laminina-1 en localizaciones diana hasta aproximadamente 1 a 10 μ g/ml. Las composiciones que contienen IgG agregada pueden ser funcionales para elevar las concentraciones de IgG agregada en localizaciones diana hasta aproximadamente 100 μ g/ml. Las composiciones también pueden administrarse en combinaciones o con cofactores. Las composiciones pueden administrarse en una cantidad suficiente para restaurar los niveles normales, si la composición está normalmente presente en la localización diana, o pueden administrarse en una cantidad para elevar los niveles por encima de los niveles normales en la localización diana.

35 Las composiciones anteriores pueden suministrarse a una localización diana desde una fuente exógena, o pueden producirse *in vivo* por células en la localización diana o las células en el mismo organismo que la localización diana. Estas composiciones pueden aislarse de tejidos humanos donados, incluyendo fluidos biológicos. También pueden prepararse en forma de una proteína recombinante en bacterias, células de cultivo tisular, o cualquier otro tipo de células o tejidos conocidos en la técnica, o en animales completos. También pueden producirse sistémicamente o por cualquier otra metodología conocida en la técnica. Si estas composiciones se producen *in vivo*, pueden ser el producto de expresión de un transgén o pueden ser el resultado de la potenciación de la producción en una fuente *in vivo* existente. Los niveles de estas composiciones, si están normalmente presentes en una localización diana, también pueden elevarse reduciendo sus tasas normales de degradación. Adicionalmente, puede ser posible aumentar la capacidad de supresión de diferenciación de fibrocitos de estas composiciones, por ejemplo suministrando cofactores.

40 Las composiciones de la presente invención pueden estar en cualquier formulación fisiológicamente apropiada. Puede administrarse a un organismo por vía tópica, por inyección, por inhalación, o por cualquier otro medio eficaz.

Enfermedades diana

45 Las mismas composiciones y metodologías descritas anteriormente para suprimir la diferenciación de monocitos en fibrocitos también pueden usarse para tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones incluyendo, aunque sin limitación: esclerodermia, cicatrización queloide, artritis reumatoide, lupus, dermatopatía fibrosante nefrogénica, lesiones fibróticas tales como las formadas después de infección con *Schistosoma japonicum*, enfermedades autoinmunes, fibrosis patogénica, enfermedad de Lyme, remodelado estromático en pancreatitis y fibrosis estromática, asma, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y fibrosis pulmonar. En algunas de dichas enfermedades fibrosantes los fibrocitos pueden no representar una fase final de fibrosis. Por ejemplo, en asma, los fibrocitos se diferencian adicionalmente en miofibroblastos, que persisten en las paredes de las vías respiratorias engrosadas.

60 La invención también incluye un procedimiento para inhibir la formación de fibrocitos o para tratar o prevenir una enfermedad fibrosante o el asma activando cualquier componente de la vía de señalización de Fc en monocitos

normalmente activados por SAP. Esta vía se describe en detalle en Daeron, Marc, "Fc Receptor Biology", Annu. Rev. Immunology 15:203-34 (1997). En una realización ejemplar, una parte de la vía que no está compartida con otras cascadas de señalización o solamente una cantidad limitada de cascadas de señalización no críticas se selecciona para la activación para minimizar los efectos secundarios.

5 Ensayos de diferenciación de monocitos

Otro aspecto de la invención se refiere a ensayos para detectar la capacidad de una muestra de modular la diferenciación de fibrocitos a partir de monocitos. En medio sin suero, los monocitos normales forman fibrocitos en dos a tres días. El suero normal, la sangre u otros fluidos biológicos suprimen la formación de fibrocitos a partir de monocitos normales sobre un intervalo de dilución específico. Por tanto, el ensayo puede usarse para ensayar si una muestra puede modular la diferenciación de monocitos en fibrocitos en medio sin suero. También puede usarse para determinar si los monocitos de la muestra se diferencian normalmente en fibrocitos en medio sin suero y si responden de forma normal al suero, SAP u otros factores que afectan a esta diferenciación.

En una realización específica, el ensayo puede usarse para determinar si el fluido biológico de un paciente tiene una capacidad disminuida o aumentada para suprimir la diferenciación de monocitos en fibrocitos. Si tiene que ensayarse la supresión por SAP, puede usarse cualquier fluido biológico en el que SAP esté presente de forma normal o transitoria en la presente invención, incluyendo sangre completa, suero, plasma, fluido sinovial, fluido cefalorraquídeo y fluido bronquial. Una capacidad disminuida para suprimir la diferenciación de monocitos puede ser indicativa de una enfermedad fibrosante o la propensión a desarrollar dicha enfermedad. Aunque en muchos pacientes una capacidad disminuida de un fluido biológico para suprimir la formación de fibrocitos puede deberse a elevados niveles de SAP, éste no es necesariamente el caso. SAP puede estar presente a niveles normales, pero mostrar actividad supresora aumentada debido a defectos en el propio SAP o la ausencia o presencia de un cofactor u otra molécula. Los métodos para determinar la naturaleza más precisa del problema de supresión, tal como el uso de ELISA, electroforesis, y fraccionamiento serán evidentes para los especialistas en la técnica.

La metodología descrita anteriormente también puede usarse para determinar si ciertos fármacos potenciales que afectan a la diferenciación de fibrocitos pueden ser apropiados o no para un paciente.

En otra realización específica, el ensayo puede usarse para determinar si los monocitos de un paciente son capaces de diferenciarse en fibrocitos en medio sin suero y si responden de forma normal a un fluido biológico, SAP u otra composición. Más particularmente, si un paciente con una enfermedad fibrosante parece tener niveles normales de SAP, puede ser aconsejable obtener una muestra de los monocitos del paciente para determinar si son capaces de diferenciarse fácilmente en fibrocitos incluso en presencia de suero o SAP.

Finalmente, en otro ejemplo específico, el ensayo puede usarse para ensayar los efectos de un fármaco u otra composición sobre la diferenciación de monocitos en fibrocitos. El ensayo puede usarse de este modo para identificar fármacos potenciales diseñados para modular la formación de fibrocitos, o puede usarse para explorar cualquier efecto adverso potencial de los fármacos pretendidos para otros usos.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones específicas de la invención. Los especialistas en la técnica deben apreciar que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención. Sin embargo, los especialistas en la técnica, a la luz de la presente descripción, deben apreciar que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y aún obtener un resultado parecido o similar sin alejarse del espíritu y alcance de la invención.

40 EJEMPLOS

EJEMPLO 1: INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE FIBROCITOS

Mientras se examinaba el posible papel de la densidad celular en la supervivencia de células T sanguíneas periféricas, se observó que en medio sin suero las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) daban lugar a una población de células tipo fibroblasto. Estas células eran adherentes y tenían una morfología con forma de huso (Figura 1A). Aproximadamente el 0,5-1% de las PBMC se diferenciaban en células tipo fibroblasto en medio sin suero, y esto sucedía en portaobjetos de plasticware y borosilicato tratadas de cultivo tisular y portaobjetos de vidrio convencionales.

La rápida aparición de estas células, en 3 días de cultivo, se inhibía por suero o plasma humano. Para examinar este proceso en mayor detalle, se cultivaron PBMC a 5×10^5 células por ml en medio sin suero que contenía concentraciones crecientes de plasma humano durante 6 días. Cuando el plasma estaba presente a concentraciones entre el 10% y el 0,5%, las células tipo fibroblasto no se diferenciaban (Figura 1B). Sin embargo, en suero al 0,1% o por debajo del 0,1%, las células tipo fibroblasto se desarrollaban rápidamente. La actividad en el suero que inhibía la formación de fibrocitos se retuvo por un filtro de centrifugación de 30 kDa de punto de corte (datos no mostrados). Si el suero se calentaba hasta 56°C durante 30 minutos, la eficacia se reducía en 10 veces, el calentamiento hasta 95°C suprimía la actividad inhibitoria (datos no mostrados).

Estos datos sugieren que el factor inhibitor es una proteína. Como el factor inhibitor estaba presente es suero humano, esto indicaba que la actividad probablemente no estaba implicada en el sistema de coagulación. El factor inhibitor también parecía ser una proteína conservada evolutivamente ya que sueros bovinos, equinos, caprinos y de rata también eran capaces de inhibir la aparición de estas células tipo fibroblasto (datos no mostrados).

EJEMPLO 2: CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TIPO FIBROBLASTO

La diferenciación de estas células tipo fibroblasto a partir de sangre periférica sugirió que pueden ser fibrocitos sanguíneos periféricos. Los fibrocitos son una población derivada de monocitos sanguíneos periféricos que se diferencian *in vitro* e *in vivo* en células tipo fibroblasto. Entrán rápidamente en sitios de herida y son capaces de presentar antígeno a células T. Su fenotipo está compuesto por marcadores tanto hematopoyéticos tales como CD45 y MHC de clase II, como marcadores estromáticos, tales como colágeno I y fibronectina. Sin embargo, para identificar estas células, las PBMC generalmente se cultivaron durante 1-2 semanas en medio que contenía suero.

Para caracterizar si las células observadas en el sistema eran fibrocitos, se eliminaron las células T de las PBMC con anti-CD3, las células B con anti-CD19, los monocitos con anti-CD14 o todas las células presentadoras de antígeno con anti-HLA clase II y después se cultivaron en condiciones sin suero durante 6 días. La eliminación de las PBMC con anti-CD3 o anti-CD19 no eliminaba las células tipo fibroblasto de las PBMC cuando se cultivaban en cultivos sin suero (datos no mostrados). La eliminación de las células presentadoras de antígeno con anti-HLA clase II o monocitos con el anticuerpo anti-CD14 no evitaba la aparición de células tipo fibroblasto, lo que indica que las células tipo fibroblasto se obtienen de monocitos y no de una población de células dendríticas.

Para caracterizar adicionalmente las células tipo fibroblasto, se cultivaron PBMC en medio sin suero durante 5 días en portaobjetos de vidrio. Las células después se secaron al aire, se fijaron en acetona y se marcaron con una diversidad de anticuerpos (Tabla 1 y Figura 2). Los fibrocitos expresan CD11a, CD11b, CD45, CD80, CD86, MHC clase II, colágeno I, fibronectina, los receptores de quimioquina CCR3, CCR5, CCR7, CXCR4 y actina α de músculo liso. En las condiciones de cultivo anteriores, las células tipo fibroblasto en el presente experimento también expresaban todos estos marcadores. Los fibrocitos son negativos para CD1a, CD3, CD19, CD38 y vWF, como las células tipo fibroblasto en el presente experimento. En base a estos datos parece que las células tipo fibroblasto observadas en los experimentos eran fibrocitos. Se realizaron experimentos adicionales para extender este fenotipo. En las condiciones anteriores, los fibrocitos expresaban varias integrinas β 1 incluyendo α 1 (CD49a), α 2 (CD49b), α 5 (CD49e), β 1 (CD29) y β 3 (CD61) junto con elevados niveles de β 2 (CD18), pero eran negativos para α 3, α 4, α 6, α 4 β 7, α E y CLA (Figura 2 y Tabla 1).

Tabla 1: Expresión de marcadores superficiales en fibrocitos

Marcador	Nombre alternativo	Expresión de fibrocitos
CD11a	LFA-1	positivo
CD11b	Mac-1	positivo
CD11c		positivo
CD13		positivo
CD18	Integrina β 2	positivo
CD29	Integrina β 1	positivo
CD34		positivo
CD40		positivo débil
CD45	LCA	positivo
CD49a	Integrina α 1	positivo débil
CD49b	Integrina α 2	negativo
CD49e	Integrina α 5	positivo
CD51		positivo
CD54	ICAM-1	positivo
CD58	LFA-3	positivo
CD61	Integrina β 3	positivo
CD80	B7-1	positivo débil
CD86	B7-2	positivo
CD105	Endoglina	positivo
CD148		positivo
MHC clase II		positivo
CD162	PSGL-1	positivo
CCR1		positivo débil
CCR3		positivo débil
CCR4		positivo débil
CCR5		positivo débil
CCR7		positivo débil
CCR9		positivo débil
CXCR1		positivo
CXCR3		positivo
CXCR4		positivo débil
Colágeno I		positivo
Colágeno III		positivo
Fibronectina		positivo
Actina α	de músculo liso	positivo
Vimentina		positivo
CD1a		negativo
CD3		negativo

CD10		negativo
CD14		negativo
CD19		negativo
CD25		negativo
CD27		negativo
CD28		negativo
CD38		negativo
CD49c	Integrina α 3	negativo
CD49d	Integrina α 4	negativo
CD49f	Integrina α 6	negativo
CD69		negativo
CD70	CD27-L	negativo
CD90		negativo
CD103	Integrina α E	negativo
CD109		negativo
CD154	CD40-L	negativo
α 4 β 7		negativo
CLA		negativo
CCR2		negativo
CCR6		negativo
CXCR2		negativo
CXCR5		negativo
CXCR6		negativo
Citoqueratina		negativo
vWF		negativo

Para obtener los datos de la Tabla 1, se cultivaron PBMC en pocillos de portaobjetos de vidrio de 8 pocillos a $2,5 \times 10^5$ células por ml (400 μ l por pocillo) en medio sin suero durante 6 días. Las células después se secaron al aire, se fijaron en acetona y se tiñeron por inmunoperoxidasa. Las células se valoraron positivas o negativas para los antígenos indicados, en comparación con anticuerpos de control de isotipo coincidente.

EJEMPLO 3: CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR INHIBIDOR DE FIBROCITOS

La caracterización inicial del factor sérico que evita la rápida diferenciación de fibrocitos indicó que el factor era una molécula de unión a heparina que eluía de una columna de intercambio iónico (High Q) como una de cuatro proteínas. Por secuenciación de fragmentos trípticos de la proteína en una banda cortada de un gel nativo, una de estas proteínas se identificó como la proteína de unión a C4b (C4BP). La proteína de unión a C4b es una proteína de 570 kDa, compuesta por siete cadenas alfa (70 kDa) y habitualmente una única cadena beta (40 kDa), que está implicada en la regulación de la descomposición de los componentes C4b y C2a del sistema del complemento. C4BP también interacciona con la proteína S anticoagulante dependiente de vitamina K. El complejo C4BP/proteína S puede purificarse de suero o plasma usando precipitación con $BaCl_2$.

Para evaluar si C4BP, o una proteína asociada, era el factor responsable de inhibir la diferenciación de fibrocitos, se trató plasma citrado con $BaCl_2$. El factor inhibidor estaba presente en el precipitado de $BaCl_2$ (FIGURA 3 y Tabla 2). Esta fracción se aplicó a una columna de heparina y las fracciones, eluidas por aumento de las concentraciones de NaCl, se evaluaron para su capacidad de inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos en medio sin suero. El factor activo se eluyó de la columna de heparina en un pico a NaCl 200 mM (FIGURA 3 y Tabla 2). Un ligero aumento en el rendimiento sugirió que esta etapa puede haber eliminado un factor que interfería ligeramente con la actividad del factor.

Las fracciones del pico de 200 mM se combinaron y se fraccionaron adicionalmente por cromatografía de intercambio iónico High Q. Un pequeño pico que eluía a NaCl 300 mM contenía actividad que inhibía la diferenciación de fibrocitos. El análisis de las proteínas presentes en esta fracción indicó que la banda principal era una proteína de 27 kDa. Aunque la cromatografía de intercambio iónico condujo a una reducción en la cantidad de SAP recuperado (FIGURA 3A, carriles 8-10 y FIGURA 3D, carriles 8-10) esta capa no eliminaba varias proteínas contaminantes. Después de la etapa de intercambio iónico, el único contaminante discernible era albúmina a 65 kDa (FIGURA 3A, carril 10).

La fracción High Q se concentró y se fraccionó por electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturizante, seguido por elución del material en trozos de gel. Una única banda que migraba a aproximadamente 140 kDa era capaz de inhibir la diferenciación (FIGURA 3B). Esta banda tenía un peso molecular de 27 kDa en un gel de poliacrilamida reductor, lo que sugiere que la conformación activa de la proteína era un pentámero (FIGURA 3C). Esta banda se escindió del gel, se digirió con tripsina y se analizó por espectrometría de masas MALDI. Se identificaron tres péptidos principales y dos péptidos minoritarios: VFVFPR, VGEYSLYIGR, AYSLFSYNTQGR, QGYFVEAQPK y IVLGQEQDSYGGK. Estas secuencias coincidían exactamente con las secuencias de los aminoácidos 8-13, 68-77, 46-57, 121-130 y 131-143 del amiloide P sérico. Para confirmar que las fracciones activas contenían SAP, las fracciones recogidas de la cromatografía en columna se analizaron por transferencia de western (FIGURA 3D). La presencia de SAP a 27 kDa se detectó en todas las fracciones que inhibían la diferenciación de fibrocitos (FIGURA 3D, carriles 6, 8, 10 y 11). Estaba presente una cantidad considerable de SAP en el sobrenadante de la etapa de precipitación con $BaCl_2$, lo que indica que este procedimiento era ineficaz, con una recuperación sólo de aproximadamente el 10-15% de la actividad inhibidora de fibrocitos en el sedimento de $BaCl_2$ (FIGURA 3A, carril 2). Para eliminar el problema conocido de anticuerpos anti-SAP que se unen a inmunoglobulinas cuando se usan con transferencia de western, el anticuerpo se preincubó con IgG humana unida a agarosa. Las fracciones también

se analizaron para la presencia de CRP, C4BP y proteína S. La transferencia de western indicó que C4BP y la proteína S estaban presentes en el plasma, y en la precipitación con bario, pero estaban ausentes de las fracciones activas recogidas de la cromatografía con heparina (datos no mostrados).

Tabla 2: Recuperación de proteína y actividad inhibitora de fibrocitos de plasma humano fraccionado

	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Rendimiento (%)
Plasma	250	70	17.500	100
Sobrenadante de BaCl ₂	240	60	14.400	82,3
Precipitado de BaCl ₂	31	1	31	0,18
Fracción de heparina	4,3	0,25	1,075	0,006
Fracción de High Q	1,96	0,05	0,098	0,00056
Corte de gel	0,075	0,025	0,0018	0,00001
	Actividad (U/ml)	Actividad total (U)	Rendimiento (%)	Actividad específica (U/mg)
Plasma	10.000	2,5 x 10 ⁰	100	143
Sobrenadante de BaCl ₂	6.666	1,6 x 10 ⁰	64	111
Precipitado de BaCl ₂	1.666	5,1 x 10 ⁻⁴	2	1.645
Fracción de heparina	500	2.150	0,086	2000
Fracción de High Q	400	720	0,029	7.300
Corte de gel	2000	150	0,006	80.000

5

El plasma se fraccionó por precipitación con BaCl₂, heparina y cromatografía de intercambio iónico. Las concentraciones de proteína se evaluaron por espectrofotometría a 280 nm. La inhibición de la diferenciación de fibrocitos se evaluó por morfología. La actividad inhibitora de fibrocitos de una muestra se definió como el recíproco de la dilución a la que inhibía la diferenciación de fibrocitos en un 50%, cuando se añadía a medio sin suero.

10

El SAP también puede detectarse por ELISA usando la siguiente metodología:

15

Se recubrieron placas de 96 pocillos Maxisorb (Nalge Nunc International, Rochester, NY) durante una noche a 4°C con anticuerpo monoclonal anti-SAP (SAP-5, Sigma) en tampón carbonato sódico 50 nM pH 9,5. Las placas después se incubaron en solución salina tamponada con Tris pH 7,4 (TBS) que contenía BSA al 4% (TBS-BSA al 4%) para inhibir la unión no específica. El suero y las proteínas purificadas se diluyeron a 1/1000 en TBS-BSA al 4%, para evitar que SAP se agregara y se incubó durante 60 minutos a 37°C. Las placas después se lavaron en TBS que contenía Tween-20 al 0,05%. Se usó anticuerpo policlonal de conejo anti-SAP (BioGenesis) diluido 1/5000 en TBS-BSA al 4% como anticuerpo de detección. Después del lavado, se añadieron 100 pg/ml de (Fab)2 de cabra biotinilado anti-conejo (Southern Biotechnology Inc.) diluido en TBS-BSA al 4% durante 60 minutos. Los anticuerpos biotinilados se detectaron por ExtrAvidina peroxidasa (Sigma). El sustrato de peroxidasa no diluido 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB, Sigma) se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de detener la reacción con HCl 1 N y se leyó a 450 nm (BioTek Instruments, Winooska, VT). El ensayo era sensible a 200 pg/ml.

20

EJEMPLO 4: ESPECIFICIDAD DEL AMILOIDE P SÉRICO

25

El amiloide P sérico es una proteína plasmática constitutiva y está muy relacionada con CRP, la proteína de fase aguda principal en seres humanos. Para evaluar si otras proteínas plasmáticas también podían inhibir la diferenciación de fibroblastos, se cultivaron PBMC en medio sin suero en presencia de SAP, CRP, C4b o proteína S purificada disponibles en el mercado. El SAP disponible en el mercado se purificó usando cromatografía de afinidad dependiente de calcio sobre agarosa no sustituida. De las proteínas ensayadas, solamente SAP era capaz de inhibir la diferenciación de fibrocitos, con una actividad inhibitora máxima a 10 µg/ml (FIGURA 4). Una curva de dilución indicaba que el SAP disponible en el mercado tenía aproximadamente 6,6 x 10³ unidades/mg de actividad (FIGURA 4). El suero y el plasma contenían entre 30-50 µg/ml de SAP. Los fibrocitos comenzaban a aparecer a una dilución de plasma del 0,5%, que sería aproximadamente 0,15-0,25 µg/ml de SAP, que es comparable con la concentración umbral de SAP purificado. Los datos que muestran que SAP purificado usando dos procedimientos diferentes inhibe la diferenciación de fibrocitos sugieren en gran medida que SAP inhibe la diferenciación de fibrocitos.

30

Aunque estos datos indican que SAP es capaz de inhibir el desarrollo de fibrocitos y que SAP se purifica de un modo que indica que es el factor activo en plasma, no se determinó si la eliminación de SAP del plasma y del suero negaría la inhibición. Se eliminó SAP del plasma usando perlas de agarosa (BioGel A, BioRad). El plasma se diluyó al 20% en Tris 100 mM pH 8, NaCl 150 mM, tampón CaCl₂ 5 mM y se mezcló con 1 ml de perlas de agarosa durante 2 horas a 4°C. Las perlas después se retiraron por centrifugación y se repitió el proceso. Este plasma desprovisto después se evaluó para su capacidad de inhibir la diferenciación de fibrocitos. El plasma de control se diluyó al 20% en Tris 100 mM pH 8, NaCl 150 mM, tampón CaCl₂ 5 mM que tenía una curva de dilución similar a la observada con plasma no tratado. En contraste, el plasma tratado con perlas era menos capaz de inhibir la diferenciación de fibrocitos a niveles intermedios de plasma. Estos datos, junto con la capacidad de SAP purificado de inhibir la diferenciación de fibrocitos, sugieren en gran medida que SAP es el factor activo en suero y plasma que inhibe la diferenciación de fibrocitos. (Véase la FIGURA 5).

También se eliminó SAP del plasma usando perlas de proteína G recubiertas con anticuerpos anti-SAP. La eliminación de SAP condujo a una reducción significativa en la capacidad del plasma de inhibir la diferenciación de fibrocitos en comparación con plasma, o plasma tratado con perlas recubiertas con anticuerpos de control ($p < 0,05$) (FIGURA 5B). Las perlas recubiertas con anticuerpos de control no eliminaban parte de la actividad inhibitoria de fibrocitos del plasma, pero esto no era significativamente diferente de las células cultivadas con plasma. Esto probablemente refleja la unión de SAP a la agarosa en las perlas de proteína G. Estos datos, junto con la capacidad de SAP purificado de inhibir la diferenciación de fibrocitos, sugieren en gran medida que SAP es el factor activo en suero y plasma que inhibe la diferenciación de fibrocitos.

EJEMPLO 5: ANTICUERPOS Y PROTEÍNAS

La CRP humana purificada, el amiloide P sérico, la proteína S y C4b se adquirieron de Calbiochem (San Diego, CA). Los anticuerpos monoclonales contra CD1a, CD3, CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD34, CD40, Pan CD45, CD64, CD83, CD90, HLA-DR/DP/DQ, IgM de ratón, IgG1 de ratón y IgG2a de ratón fueron de BD Pharmingen (BD Biosciences, San Diego, CA). Los anticuerpos para el receptor de quimioquinas se adquirieron de R and D Systems (Minneapolis, MN). El anticuerpo de conejo anti-colágeno I fue de Chemicon International (Temecula, CA), la proteína de unión a C4b monoclonal fue de Green Mountain Antibodies (Burlington, VE), el anticuerpo de oveja anti-proteína de unión a C4b humana fue de The Binding Site (Birmingham, UK), el anticuerpo monoclonal anti-CRP fue de Sigma (St. Louis, MO). El anticuerpo de conejo policlonal anti-proteína S fue de Biogenesis (Poole, Dorset, UK).

EJEMPLO 6: SEPARACIÓN CELULAR

Las células mononucleares sanguíneas periféricas se aislaron de capas leuco-plaquetarias (Gulf Coast Regional Blood Center, Houston, Texas) por centrifugación Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) durante 40 minutos a 400 x g. La eliminación de los subconjuntos de leucocitos específicos se realizó usando selección negativa usando Dynabeads magnéticas (DynaL Biotech Inc. Lake Success, NY), como se ha descrito previamente. En resumen, las PBMC se incubaron con anticuerpos primarios durante 30 minutos a 4°C. Las células después se lavaron y se incubaron con Dynabeads recubiertas con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón durante 30 minutos, antes de la eliminación de las células recubiertas con anticuerpo por selección magnética. Este proceso se repitió dos veces. Las células seleccionadas negativamente estaban de forma rutinaria en un exceso de pureza del 98% determinado por marcaje con anticuerpo monoclonal.

EJEMPLO 7: CULTIVO CELULAR Y ENSAYO DE DIFERENCIACIÓN DE FIBROCITOS

Las células se incubaron en medio sin suero: RPMI (GibcoBRL Life, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) suplementado con HEPES 10 mM (GibcoBRL/Life), glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, albúmina sérica bovina al 0,2% (BSA, Sigma), 5 µg/ml de insulina (Sigma), 5 µg/ml de transferrina saturada con hierro (Sigma) y 5 ng/ml de selenita sódica (Sigma). Se añadieron suero humano normal (Sigma), plasma humano normal (Gulf Coast Regional Blood Center) o suero de ternera fetal (Sigma), fracciones de columna, sueros y fluido sinovial de pacientes o proteínas purificadas a las concentraciones indicadas. Las muestras de los pacientes se obtuvieron de un banco disponible para los investigadores en la University of Texas Medical School en Houston. Este banco mantiene confidencial la información del paciente y cumple todas las directrices NIH.

Las PBMC se cultivaron en placas de cultivo tisular de 24 ó 96 pocillos en volúmenes de 2 ml o 200 µl, respectivamente (Becton Dickinson, Flankin Lakes, NJ) a $2,5 \times 10^5$ células por ml en un incubador humidificado que contenía CO₂ al 5% a 37°C durante los tiempos indicados. Se enumeraron los fibrocitos en 5 campos diferentes de 900 µm de diámetro de visión por morfología en cultivos viables como células adherentes con una morfología alargada en forma de huso distinta de los linfocitos pequeños o monocitos adherentes. Como alternativa, las células se secaron al aire, se fijaron en metanol y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Hema 3 Stain, VWR, Houston, TX). Los fibrocitos se contaron usando el criterio anterior y la presencia de un núcleo oval. La enumeración de los fibrocitos se realizó en células cultivadas durante 6 días en placas de 96 pocillos de fondo plano, con $2,5 \times 10^4$ células por pocillo. Además, la identidad de los fibrocitos se confirmó por tinción con inmunoperoxidasa (véase a continuación). La actividad inhibitoria de fibrocitos de una muestra se definió como el recíproco de la dilución a la que inhibía la diferenciación de fibrocitos en un 50%, cuando se añadía a medio sin suero.

EJEMPLO 8: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS SÉRICAS Y PLASMÁTICAS

Se descongelaron rápidamente 100 ml de suero o plasma humano congelado a 37°C y se añadieron inhibidor de proteasa "Completo" 1x (Roche, Indianápolis, IN, USA), benzamidina HCl 1 mM (Sigma) y Pefabloc 1 mM (AEBSF: clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo, Roche). Todas las etapas posteriores se realizaron en hielo o a 4°C. Se realizó adsorción en citrato de bario del plasma como se ha descrito previamente. El precipitado se recogió por centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos, se resuspendió en 20 ml de BaCl₂ 100 mM más inhibidores y se volvió a

centrifugar. Después de dos rondas de lavado, el sedimento se resuspendió a 20 ml en tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,4 que contenía EDTA 5 mM y benzamidina HCl 1 nM y se dializó durante 24 horas frente a tres cambios de 4 litros del mismo tampón.

5 La cromatografía se realizó usando un sistema Econo (Bio-Rad, Hercules, CA) recogiendo muestras de 1 ml con un caudal de 1 ml/min. El precipitado de citrato de bario dializado se cargó en una columna de heparina Hi-Trap de 5 ml (Amersham Biosciences) y la columna se lavó extensivamente en tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,4 hasta que la absorbancia a 280 nm volvió a la medida inicial. El material unido se eluyó con un gradiente por etapas de 15 ml cada uno de NaCl 100, 200, 300 y 500 mM en tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,4. Las fracciones que inhibían la diferenciación de monocitos en fibrocitos eluía a NaCl 200 mM. Estas se combinaron (2 ml) y se cargaron en una columna Econo-Pak High Q de 5 ml. Después de lavar la columna en tampón fosfato 10 mM, el material unido se eluyó con el gradiente por etapas como anteriormente, eluyendo la fracción activa a NaCl 300 mM.

15 Las fracciones activas de la cromatografía High Q se concentraron a 200 μ l usando Aquacide II (Calbiochem) y después se cargaron en geles de poliacrilamida nativos al 4-20% (BMA, BioWhittaker, Rockland, ME) como se ha descrito previamente. Después de la electroforesis, los carriles del gel se cortaron en trozos de 5 mm, se mezclaron con 200 μ l de fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5mM pH 7,4 que contenía benzamidina HCl 1 mM, se trituraron con una pequeña mano de mortero en un tubo eppendorf y se colocaron en un mezclador de extremo a extremo a 4°C durante 3 días. Las proteínas que eluyeron del gel se analizaron para su actividad. Para obtener las secuencias de aminoácidos, las proteínas eluidas de los trozos de gel se cargaron en un gel al 4-20% con ácido tioglicólico 100 μ M en la cámara superior (Sigma). Después de la electroforesis, el gel se tiñó rápidamente con azul brillante de Coomassie, se destiñó, y las bandas se escindieron del gel. La secuenciación de aminoácidos la realizó el Dr. Richard Cook, Protein Sequencing Facility, Department of Immunology, Baylor College of Medicine.

EJEMPLO 9: TRANSFERENCIA DE WESTERN

25 Para la transferencia de western, las muestras de plasma y suero se diluyeron 1:500 en fosfato sódico 10 mM pH 7,4. Las fracciones de las columnas de heparina y High Q no se diluyeron. Las muestras se mezclaron con tampón de muestra de Laemmli que contenía DTT 20 mM y se calentaron a 100°C durante 10 minutos. Las muestras se cargaron en geles de Tris/glicina poliacrilamida al 4-20% (Cambrex). Las muestras para los geles nativos se analizaron en ausencia de DTT o SDS. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon p, Millipore, Bedford, MA) en tampón Tris/glicina/SDS que contenía metanol al 20%. Los filtros se bloquearon con solución salina tamponada con Tris (TBS) pH 7,4 que contenía BSA al 5%, proteína de leche desnatada al 5% y Tween 20 al 0,1% a 4°C durante 18 horas. Los anticuerpos primarios y secundarios biotinilados se diluyeron en TBS pH 7,4 que contenía BSA al 5%, proteína de leche desnatada al 5% y Tween 20 al 0,1% usando diluciones optimas predeterminadas (datos no mostrados) durante 60 minutos. Se usó ExtrAvidina-peroxidasa (Sigma) diluida en TBS pH 7,4 que contenía BSA al 5% y Tween 20 al 0,1% para identificar el anticuerpo biotinilado y la quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences) para visualizar el resultado.

EJEMPLO 10: INMUNOHISTOQUÍMICA

35 Las células cultivadas en portaobjetos de vidrio de microscopio de 8 pocillos (Lab-Tek, Nalge Nunc International, Naperville, IL) se secaron al aire antes de su fijación en acetona durante 15 minutos. La peroxidasa endógena se inactivó durante 15 minutos con H₂O₂ al 0,03% y después se bloqueó la unión no específica por incubación en BSA al 2% en PBS durante 60 minutos. Los portaobjetos se incubaron con anticuerpos primarios en PBS que contenía BSA al 2% durante 60 minutos. Se usaron anticuerpos irrelevantes de isotipo coincidente como controles. Los portaobjetos después se lavaron en tres cargas de PBS durante 15 minutos y se incubaron durante 60 minutos con anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón biotinilado (BD Pharmingen). Después del lavado, los anticuerpos biotinilados se detectaron por ExtrAvidina peroxidasa (Sigma). La tinción se reveló con DAB (Diaminobenzadina, Sigma) durante 3 minutos y se tiñó con contraste durante 30 segundos con hemalumbre de Mayer (Sigma).

EJEMPLO 11: EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE SOBRE FIBROCITOS

45 Se cultivaron PBMC en los pocillos de portaobjetos de vidrio de 8 pocillos a $2,5 \times 10^5$ células por ml (400 μ l por pocillo) en medio sin suero durante 6 días. Las células después se secaron al aire, se fijaron en acetona y se tiñeron por inmunoperoxidasa. Las células se valoraron positivas o negativas para los antígenos indicados, en comparación con anticuerpos de control de isotipo coincidente.

50 EJEMPLO 12: RECUPERACIÓN DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD INHIBIDORA DE FIBROCITOS A PARTIR DE PLASMA HUMANO FRACCIONADO

El plasma se fraccionó por precipitación con BaCl₂, heparina y cromatografía de intercambio iónico. Las concentraciones de proteína se evaluaron por espectrofotometría a 280 nm. La inhibición de la diferenciación de fibrocitos se evaluó por morfología. La actividad inhibidora de fibrocitos de una muestra se definió como el recíproco de la dilución a la que inhibía la diferenciación de fibrocitos en un 50%, cuando se añadía a medio sin suero.

55 EJEMPLO 13: IL-12

Los experimentos han demostrado que la IL-12 es capaz de promover la diferenciación de fibrocitos *in vitro*.

Específicamente, se cultivaron células mononucleares sanguíneas periféricas en medio sin suero en presencia de diversas citoquinas (véase la FIGURA 6A). Concentraciones de IL-12 por encima de aproximadamente 5 ng/ml inhibían la

cantidad de fibrocitos en cultivo (véase la FIGURA 6B). Esto indica que la IL-12 es capaz de suprimir la diferenciación de los precursores de fibrocitos en fibrocitos maduros.

EJEMPLO 14: LAMININA-1

5 El proceso de cruzar el endotelio y la membrana basal induce señales de activación y diferenciación en los monocitos. Por lo tanto, se realizaron experimentos para determinar si las proteínas de matriz extracelular tenían efecto sobre la diferenciación de los fibrocitos. Se unieron proteínas de matriz extracelular a placas de cultivo tisular de 96 pocillos durante 18 horas a 4°C en tampón carbonato 50 nM pH 9,5. Se diluyeron pronectina-F y pronectina-L en PBS. Las placas se lavaron en PBS, y se incubaron durante 60 minutos a 37°C en PBS que contenía albúmina sérica bovina al 2%, para evitar la unión no específica. Las placas se lavaron con PBS y después medio de cultivo tisular. Después se añadieron células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) y se cultivaron durante 4 días. La diferenciación de los fibrocitos no estaba afectada por el cultivo en una amplia diversidad de proteínas ECM, incluyendo colágenos, fibronectina y vitronectina. Sin embargo, el cultivo de PBMC con laminina-1 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) o pronectina-F (Sanyo Chemical Industries Inc, Kyoto, Japón) condujo a una reducción significativa en la cantidad de fibrocitos (véase la FIGURA 7A) ($p < 0,0001$). La pronectina-F es una construcción de la proteína de la seda y repeticiones de la secuencia de adhesión canónica RGD de la fibronectina. La pronectina-L es una construcción similar a la pronectina-F, con la secuencia de aminoácidos IKVAV, de la cadena $\alpha 1$ de laminina.

Se realizaron experimentos adicionales para determinar si otras proteínas de laminina podían suprimir la diferenciación de fibrocitos. La laminina 10/11 (Chemicon, Temecula, CA), una segunda laminina disponible en el mercado, no era capaz de inhibir la diferenciación de fibrocitos, en comparación con la laminina-1 (véase la FIGURA 7B).

Estos datos sugieren que secuencias específicas para laminina-1, fuera de la región IKVAV, y ausentes en la laminina-10 y 11, pueden ser responsables del efecto supresor sobre la diferenciación de los fibrocitos.

EJEMPLO 15: ESTUDIOS DE ANTICUERPOS

25 SAP y CRP aumentan la fagocitosis y se unen a receptores $Fc\gamma$ en una diversidad de células. CRP se une con elevada afinidad a $Fc\gamma RII$ (CD32), una baja afinidad a $Fc\gamma RI$ (CD64), pero no se une a $Fc\gamma RIII$ (CD16). SAP se une a los tres receptores clásicos $Fc\gamma$, con preferencia por $Fc\gamma RI$ y $Fc\gamma RII$. Los monocitos expresan de forma constitutiva $Fc\gamma RI$. Como este receptor se une a IgG monomérica, está saturado *in vivo*. Para determinar si la presencia de IgG humana monomérica podía evitar que SAP inhibiera la diferenciación de fibrocitos, se cultivaron PBMC en medio sin suero en presencia de un intervalo de concentraciones de IgG monomérica durante 60 minutos. Después se añadió SAP, a las concentraciones indicadas en la FIGURA 8A, y las células se cultivaron durante 4 días. Como se ha descrito en los ejemplos anteriores, 2,5 $\mu g/ml$ de SAP en ausencia de IgG inhibían fuertemente la diferenciación de los fibrocitos (véase la FIGURA 8A). La IgG monomérica en un intervalo de 0,1 a 1000 $\mu g/ml$, que corresponde a aproximadamente el 0,001 al 10% de suero respectivamente, tenía poco efecto sobre la supresión de la formación de fibrocitos por SAP.

35 Para determinar si el ligamiento y el entrecruzamiento de los receptores Fc también podía influir en la diferenciación de los monocitos en fibrocitos, se usaron tres muestras de ensayo; complejos inmunes solubles (ovalbúmina-anticuerpo), complejos inmunes particulados, incluyendo glóbulos rojos de oveja opsonizados (SRBC) e IgG agregada por calor. Las PBMC se cultivaron durante 4 días con ovalbúmina o mAb anti-ovalbúmina, lo que mostró que las dos proteínas solas tenían un efecto moderado sobre la diferenciación de los monocitos en comparación con cultivos en los que no se añadía reactivo (véase la FIGURA 9A). Sin embargo, la adición de complejos inmunes ovalbúmina:anti-ovalbúmina conducía a una reducción significativa en la cantidad de fibrocitos diferenciados (véase la FIGURA 9A). Se observó un efecto similar cuando se cultivaban PBMC con SRBC opsonizadas. Las SRBC opsonizadas con anticuerpo de conejo anti-SRBC a proporciones de SRBC:monocito de 20:1 y 40:1 suprimían significativamente la diferenciación de los fibrocitos en comparación con células cultivadas con SRBC solas (véase la FIGURA 9B). Finalmente, las PBMC cultivadas con IgG agregada por calor, pero no $F(ab)_2$ agregado por calor, también mostraban potente inhibición de la diferenciación de los fibrocitos (véase la FIGURA 9C). Estos datos juntos sugieren que el ligamiento y el entrecruzamiento de receptores Fc es un supresor de la diferenciación de monocitos en fibrocitos.

La observación de que los complejos inmunes inhiben la diferenciación de los fibrocitos sugiere que uno o más $Fc\gamma R$ influyen en la diferenciación de los fibrocitos. Para examinar el papel de $Fc\gamma R$ en la diferenciación de los fibrocitos, se cultivaron PBMC en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes contra $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RII$ (CD32) o $Fc\gamma RIII$ (CD16) antes de la adición de SAP, o como CRP de control. Cuando se pre-incubaron las muestras con un mAb bloqueante para cada uno de los tres $Fc\gamma R$, SAP posteriormente era capaz de suprimir moderadamente la diferenciación de los fibrocitos. Sin embargo, en ausencia de SAP añadido de forma exógena, el mAb bloqueante de $Fc\gamma RI$ (CD64) tenía un efecto profundo sobre la diferenciación de los fibrocitos. La incubación de las PBMC con mAb bloqueante contra $Fc\gamma RI$, pero no $Fc\gamma RII$ o $Fc\gamma RIII$, promovía la diferenciación de los fibrocitos en comparación con células cultivadas con mAb de control de isotipo coincidente o células cultivadas sin mAb ($P < 0,01$) (véase la FIGURA 10). Estos datos sugieren que el SAP o la IgG, pueden haberse producido por algunas células del sistema de cultivo durante 4 días, o que el SAP o la IgG se retenían por las células de la sangre. La transferencia de western no logró demostrar la presencia de SAP o IgG después de que las células se hubieran cultivado durante 4 días *in vitro*. Esto sugiere que el mAb bloqueante de $Fc\gamma RI$ tiene un efecto directo sobre la diferenciación de fibrocitos o que el SAP o la IgG están solamente presentes durante los primeros momentos puntuales del cultivo celular.

Aunque anteriormente se han descrito solamente realizaciones ejemplares de la invención de forma específica, se apreciará que son posibles modificaciones y variaciones de estos ejemplos sin alejarse del espíritu y alcance pretendido de la invención.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> William Marsh Rice University Gomer, Richard Pilling, Darrell

<120> Métodos para detectar la diferenciación de fibrocitos, composiciones y métodos para suprimir la fibrosis

<130> 002376.0974

<140> No asignada

5 <141> 22-12-2003

<150> US 60/436.046

<151> 23-12-2002

<150> US 60/436.027

<151> 23-12-2002

10 <150> US 60/515.776

<151> 30-10-2003

<150> US 60/519.467

<151> 12-11-2003

<150> US 60/525.175

15 <151> 26-11-2003

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 25

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Glu Arg Val Gly Glu Tyr Ser Leu Tyr Ile Gly Arg His Lys Val
 1 5 10 15

Thr Pro Lys Val Ile Glu Lys Phe Pro
 20 25

<210> 2

25 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Leu Ser Ala Tyr Gln Gly Thr Pro Leu Pro Ala
 1 5 10

30 <210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ile Arg Gly Tyr Val Ile Ile Lys Pro Leu Val
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende amiloide P sérico (SAP) o una parte del mismo, que se une a receptores Fc γ e inhibe la diferenciación de fibrocitos a partir de monocitos, para su uso en un método para el tratamiento o prevención de la fibrosis.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un componente adicional seleccionado entre el grupo compuesto por: IL-12, laminina-I, agregados de IgG, IgG entrecruzada, y combinaciones de las mismas.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que el SAP se proporciona a una concentración suficiente para elevar la concentración de SAP en las localizaciones diana hasta al menos aproximadamente 0,5 μ g/ml.
4. La composición de la reivindicación 1, donde la composición es para administración tópica.
5. La composición de la reivindicación 1, donde la composición es para administración por inyección.
- 10 6. La composición de la reivindicación 1, donde la composición es para administración por inhalación.
7. La composición de la reivindicación 1, en la que el SAP o parte del mismo incluye una o más secuencias seleccionadas entre KERVGEYSLYIGRHKVTPKVIKFP (SEC.ID.Nº 1), ILSAYQGTPLPA (SEC.ID.Nº 2) y IRGYVIKPLV (SEC.ID.Nº 3).
- 15 8. La composición de la reivindicación 1, en la que la fibrosis es el resultado de una afección o trastorno seleccionado entre esclerodermia, asma, cicatrización queloide, artritis reumatoide, lupus, dermatopatía fibrosante nefrogénica, lesiones fibróticas tales como las formadas después de infección con Schistosoma japonicum, enfermedades autoinmunes, fibrosis patogénica, enfermedad de Lyme, remodelado estromático en pancreatitis y fibrosis estromática, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar, y combinaciones de las mismas.

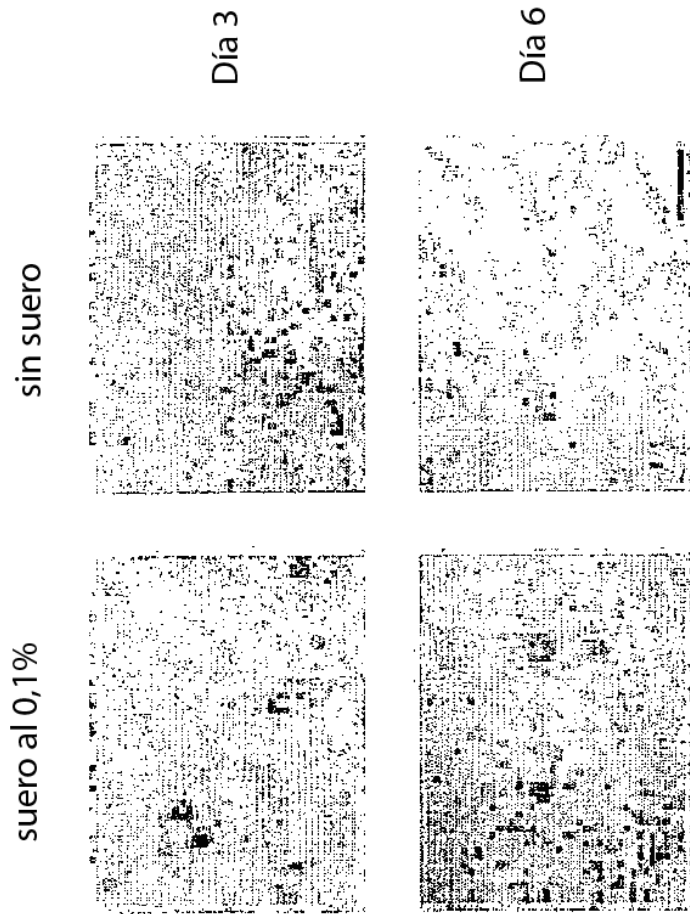


FIGURA 1A

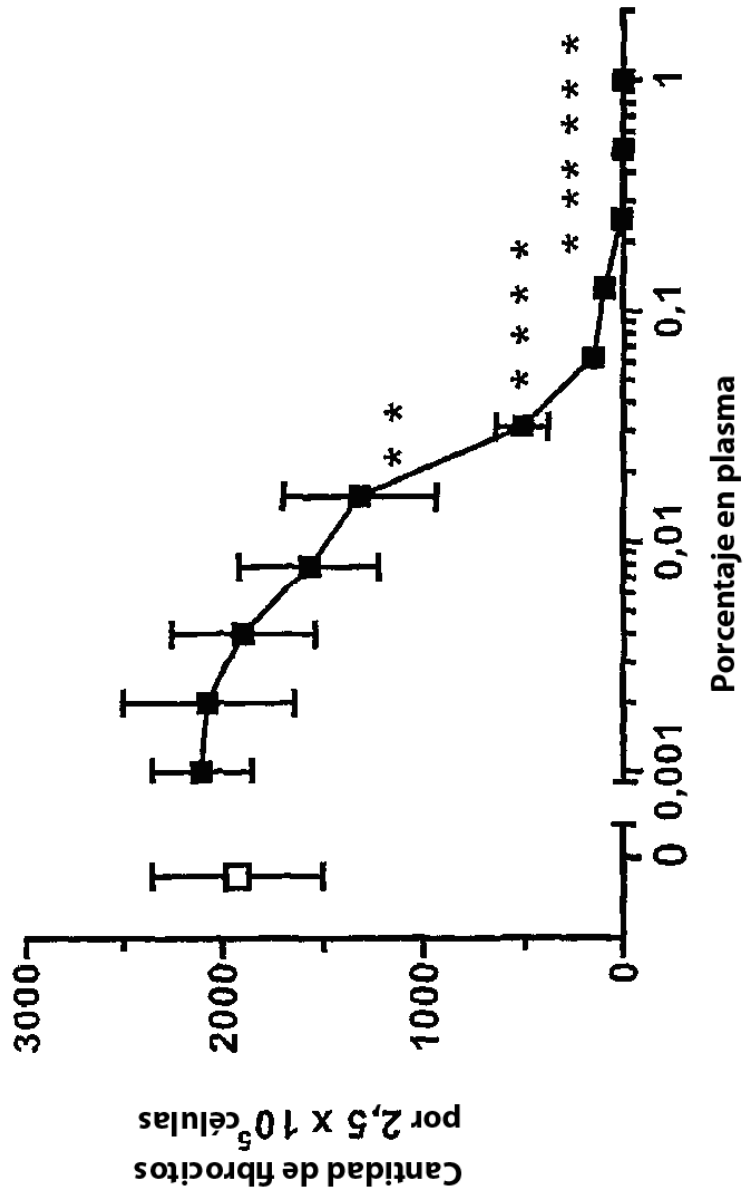


FIGURA 1B

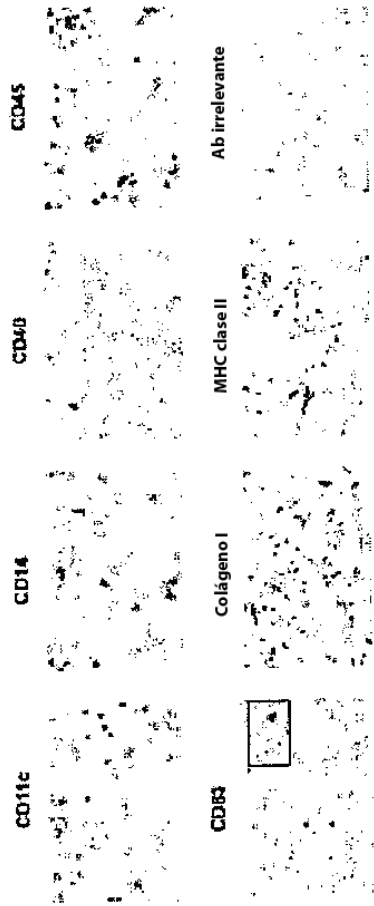


FIGURA 2

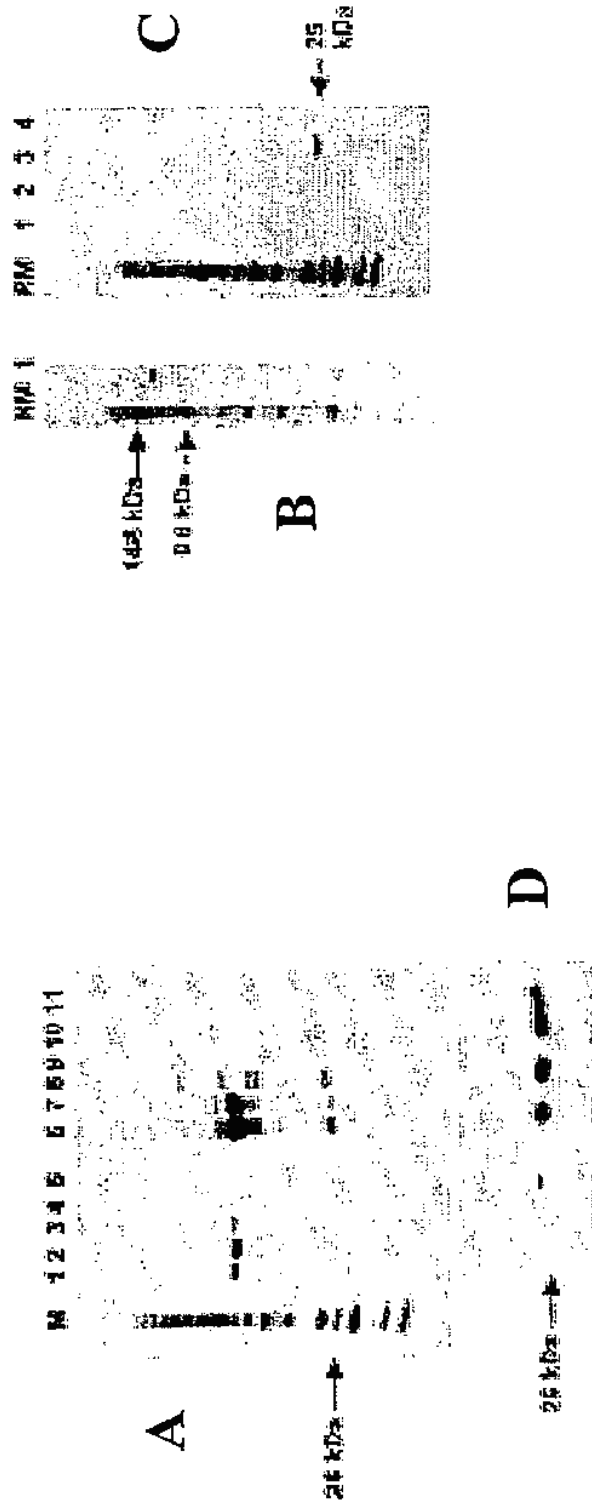


FIGURA 3

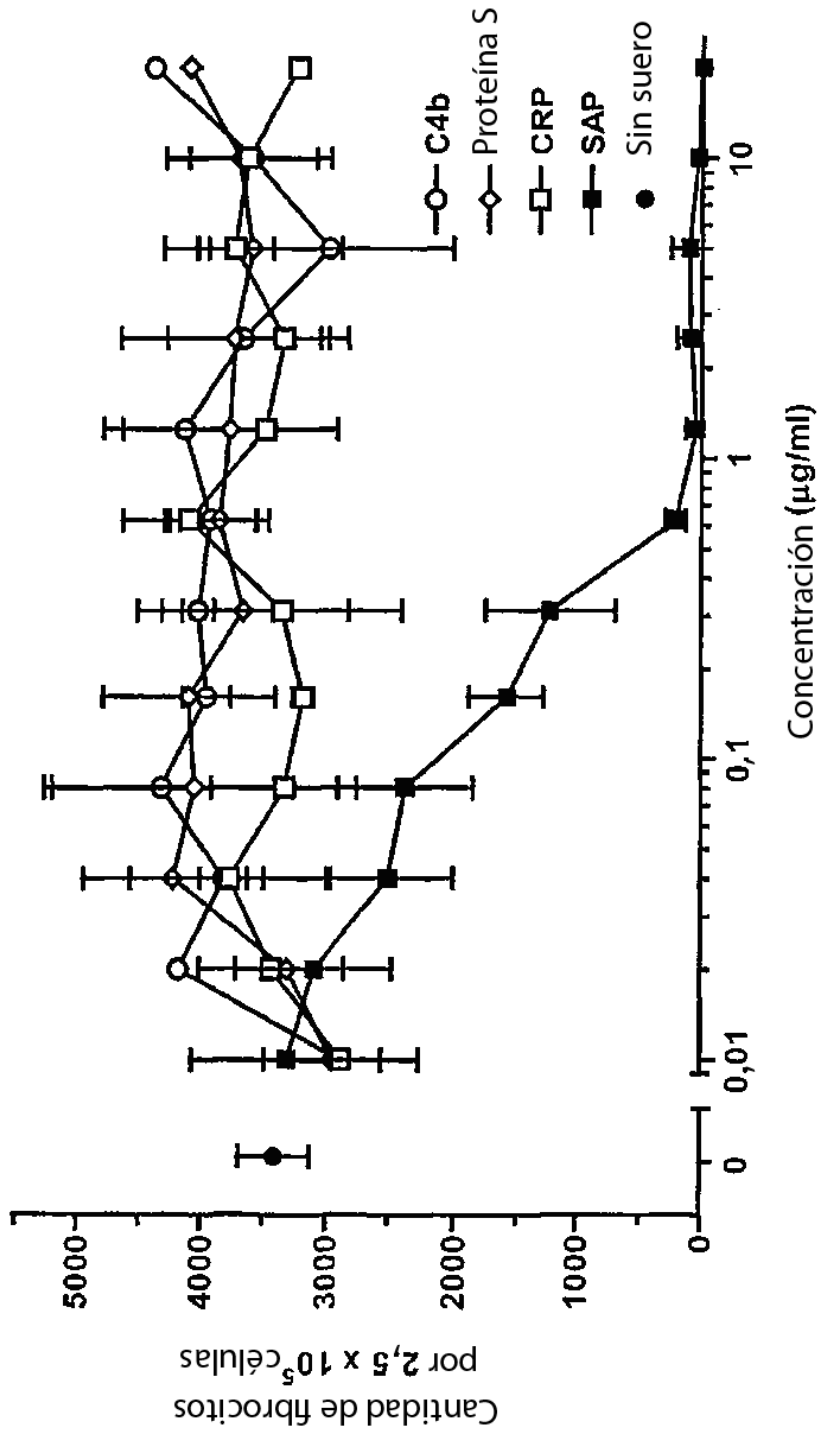


FIGURA 4

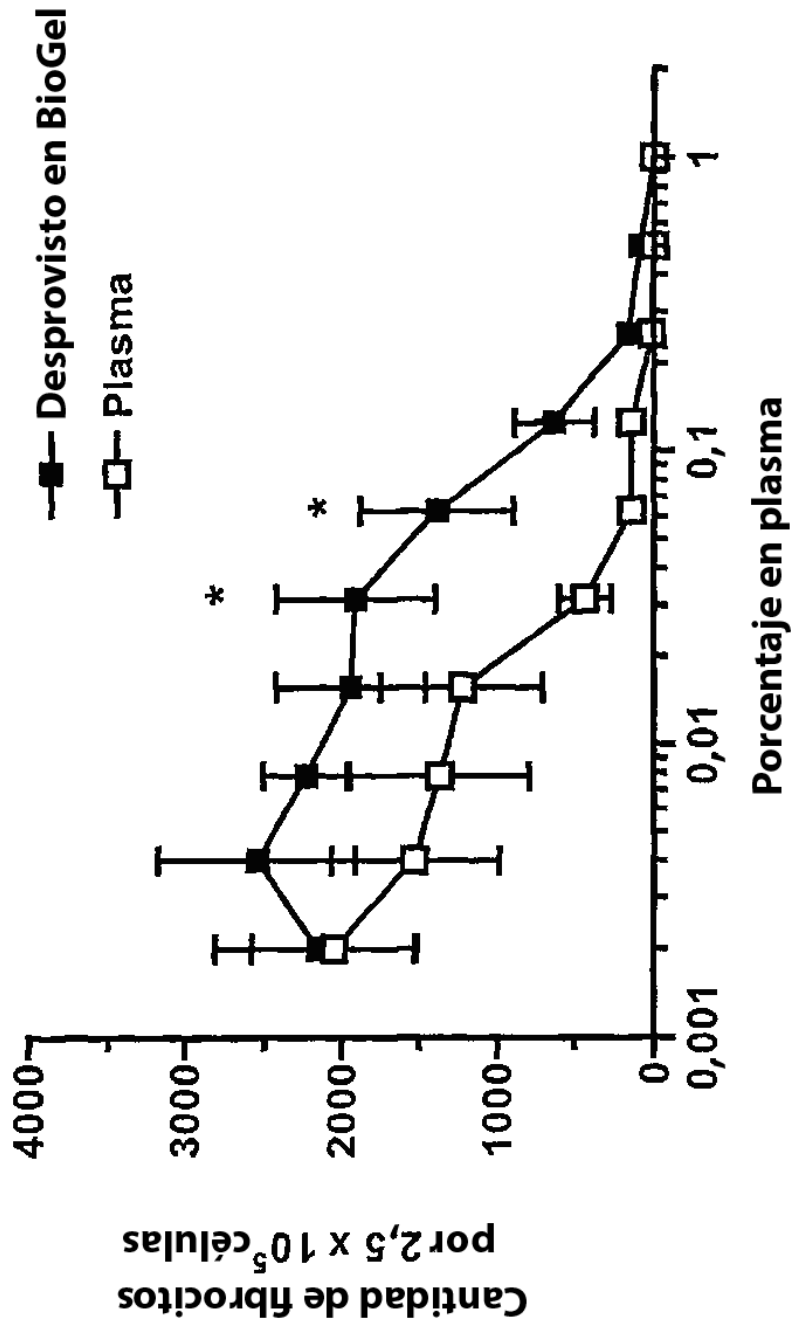


FIGURA 5A

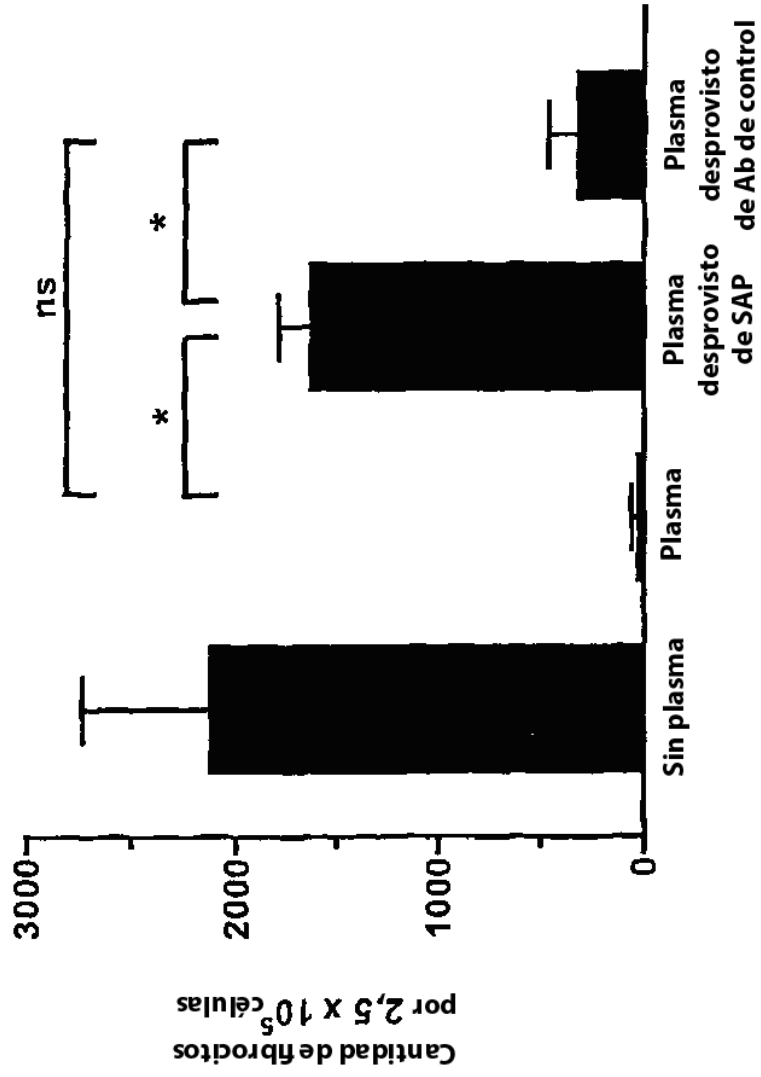


FIGURA 5B

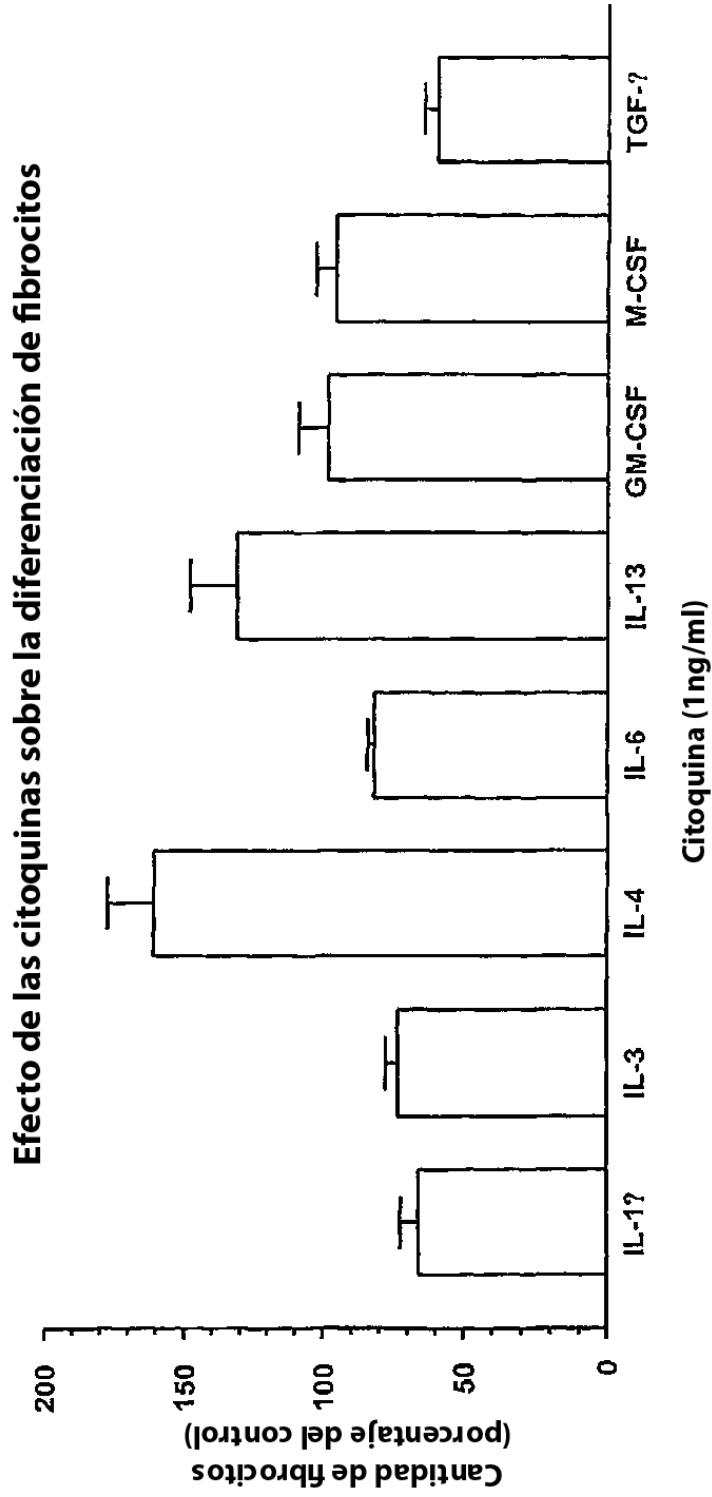


FIGURA 6A

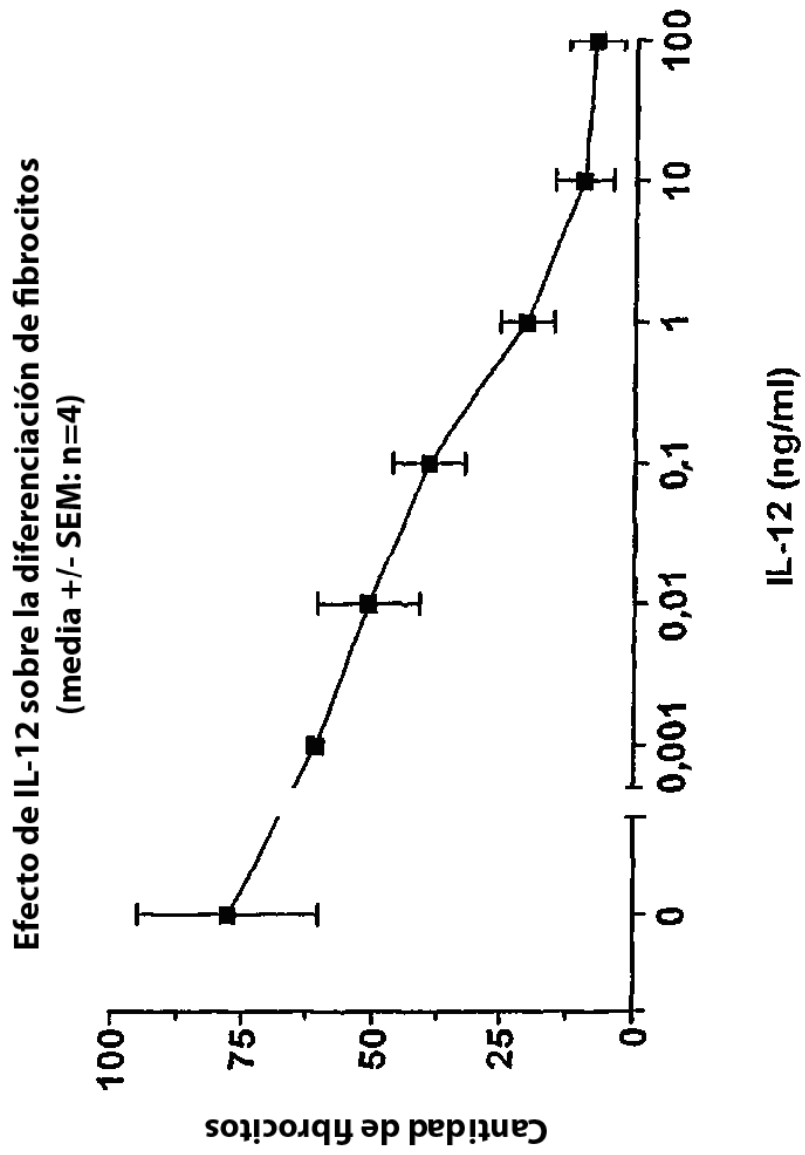
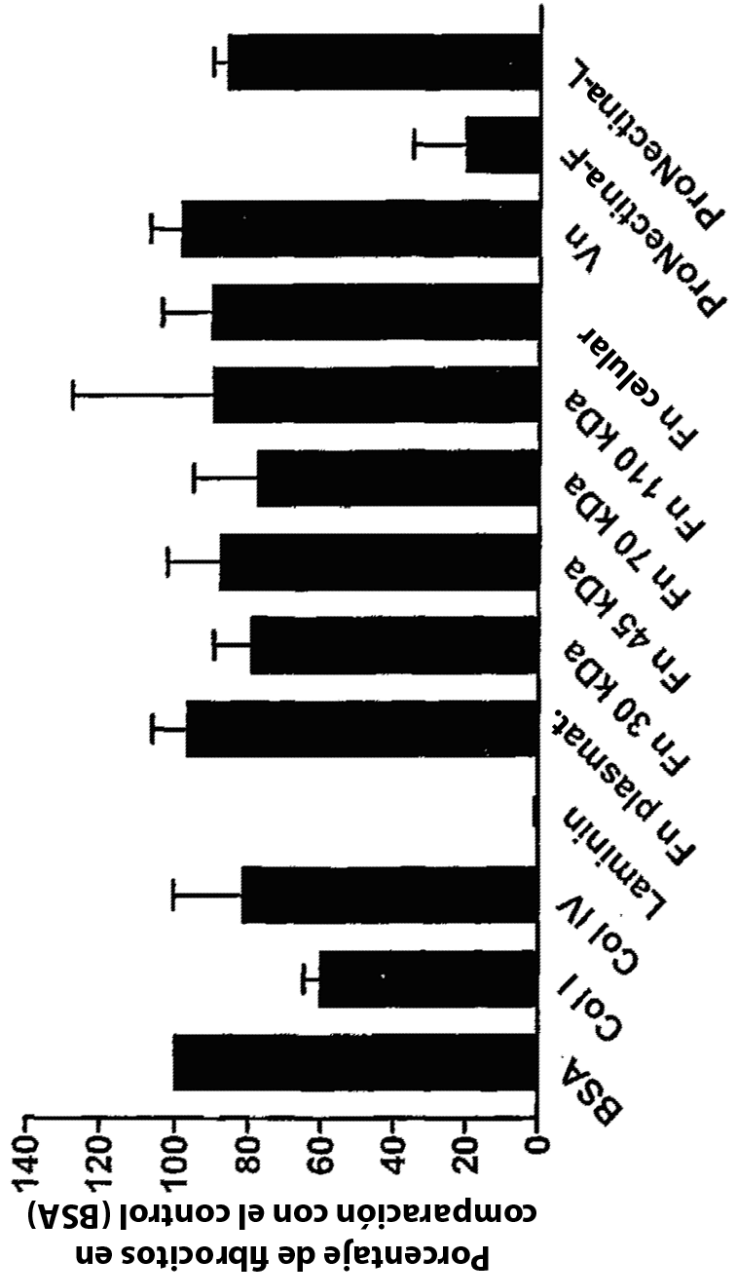
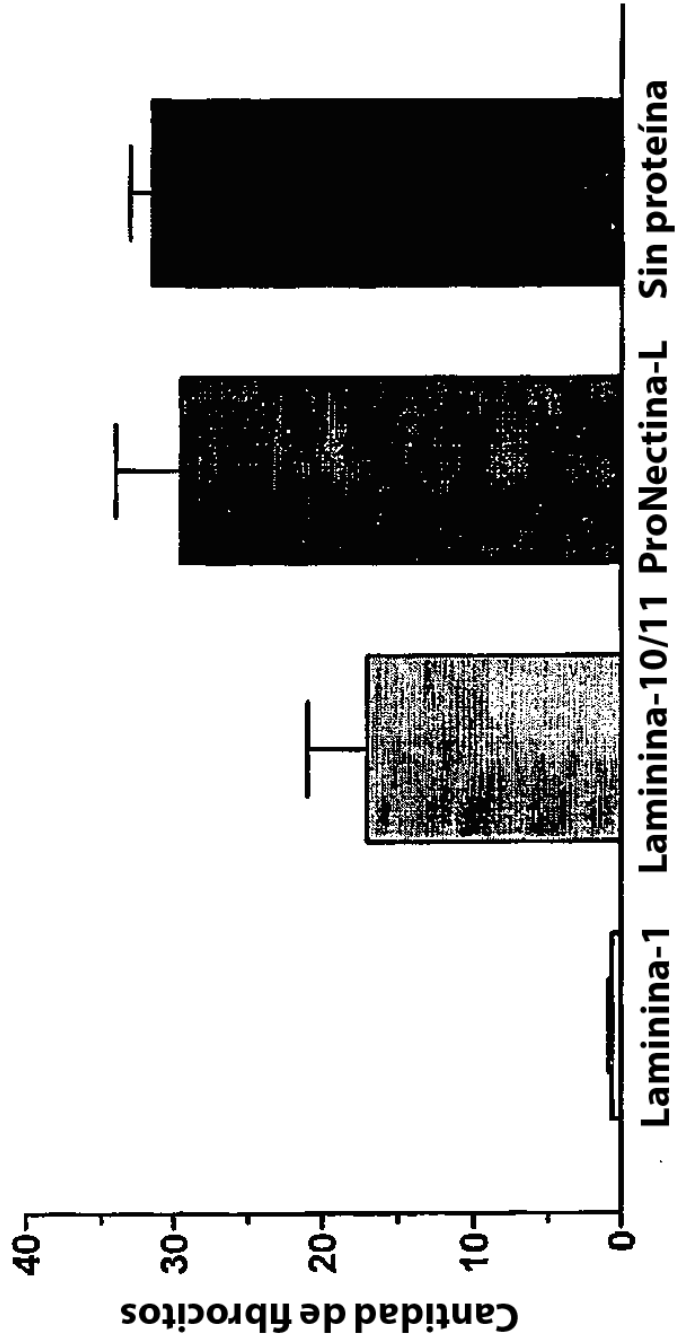


FIGURA 6B



Proteínas ECM (a 10 µg/ml): Vn a 1 µg/ml)

FIGURA 7A



Proteína ECM (10 µg/ml)

FIGURA 7B

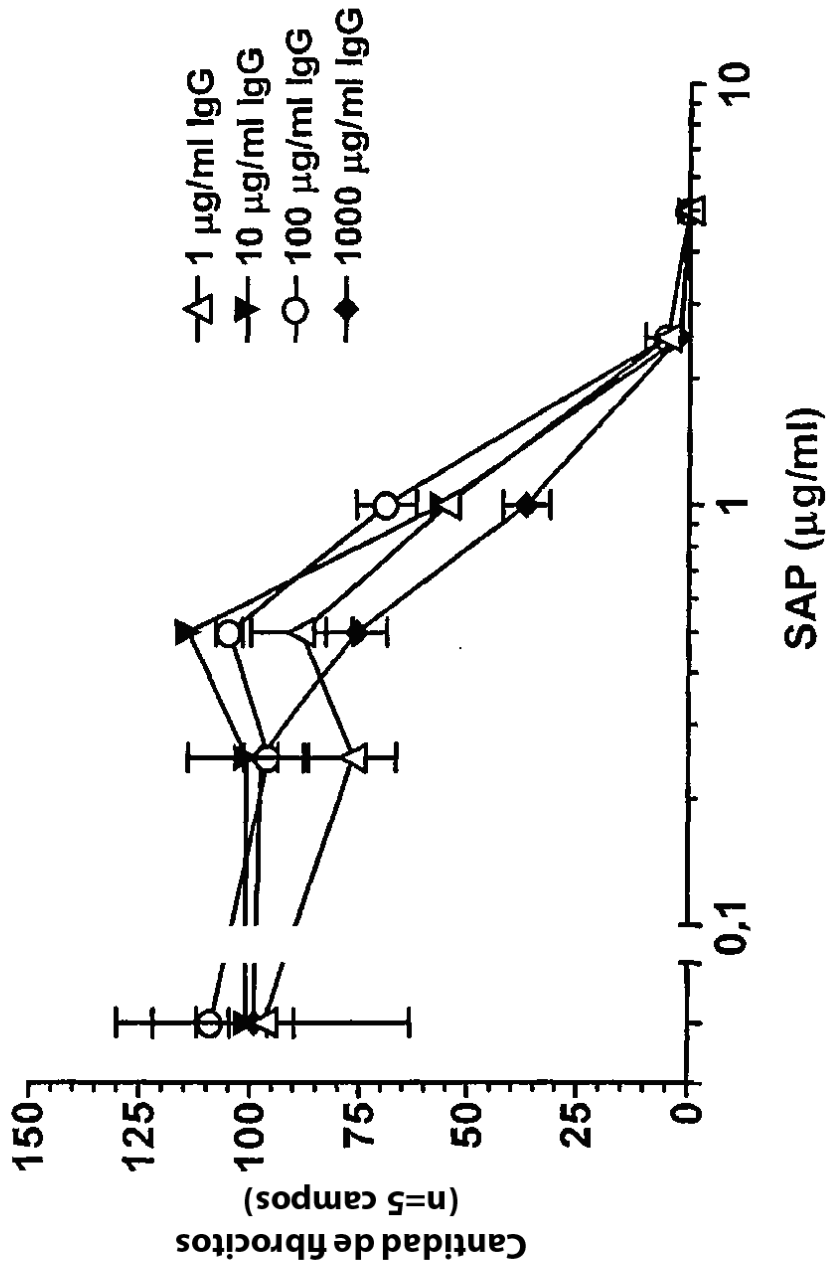


FIGURA 8

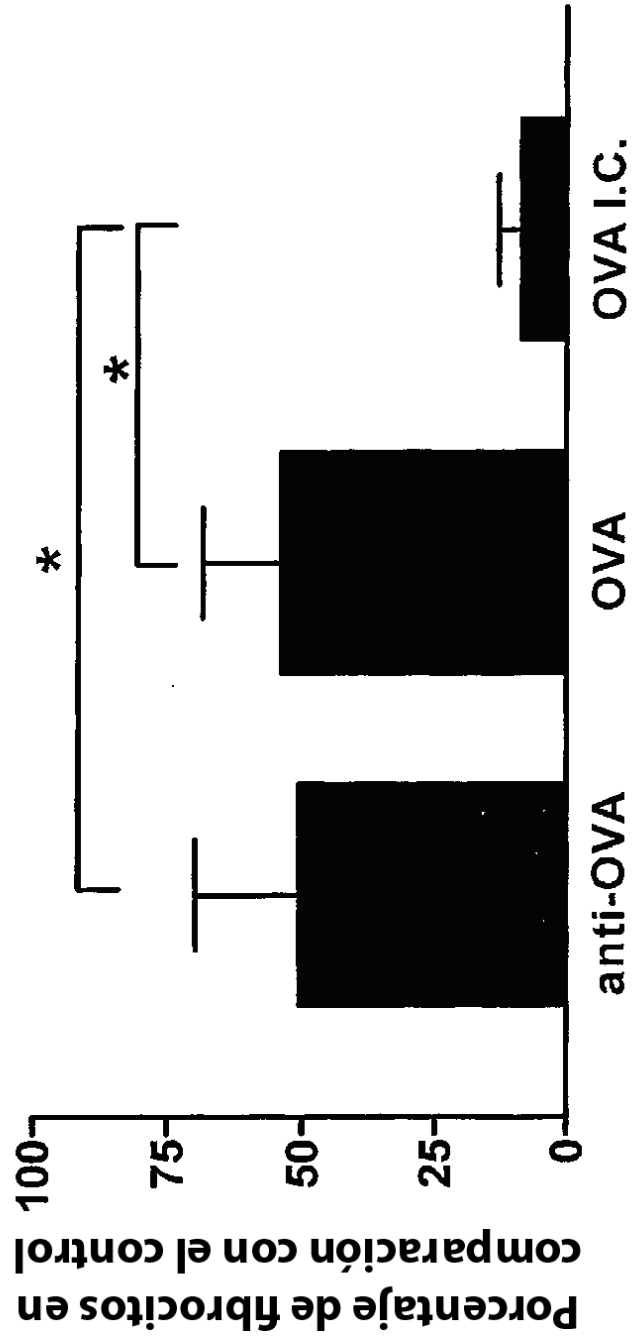


FIGURA 9A

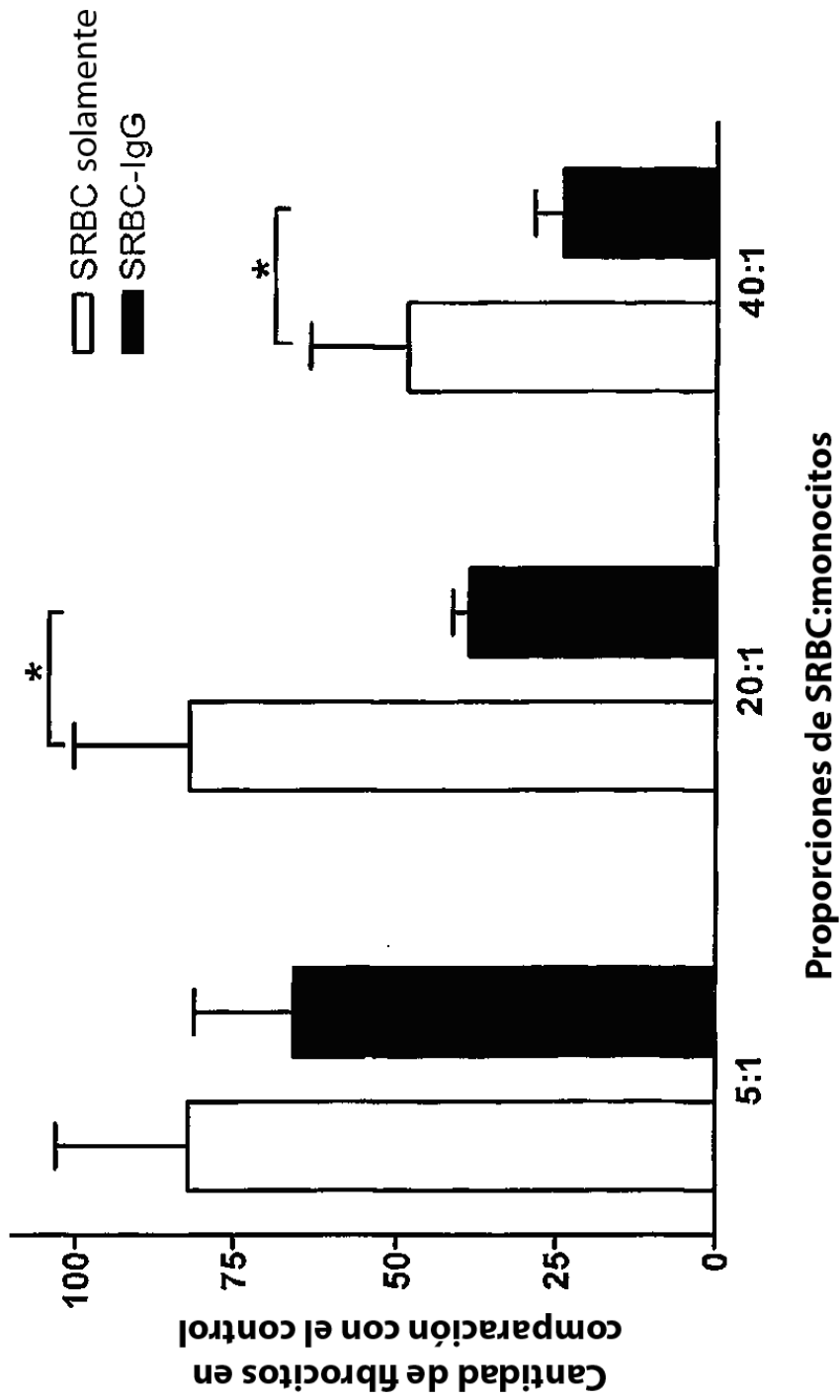


FIGURA 9B

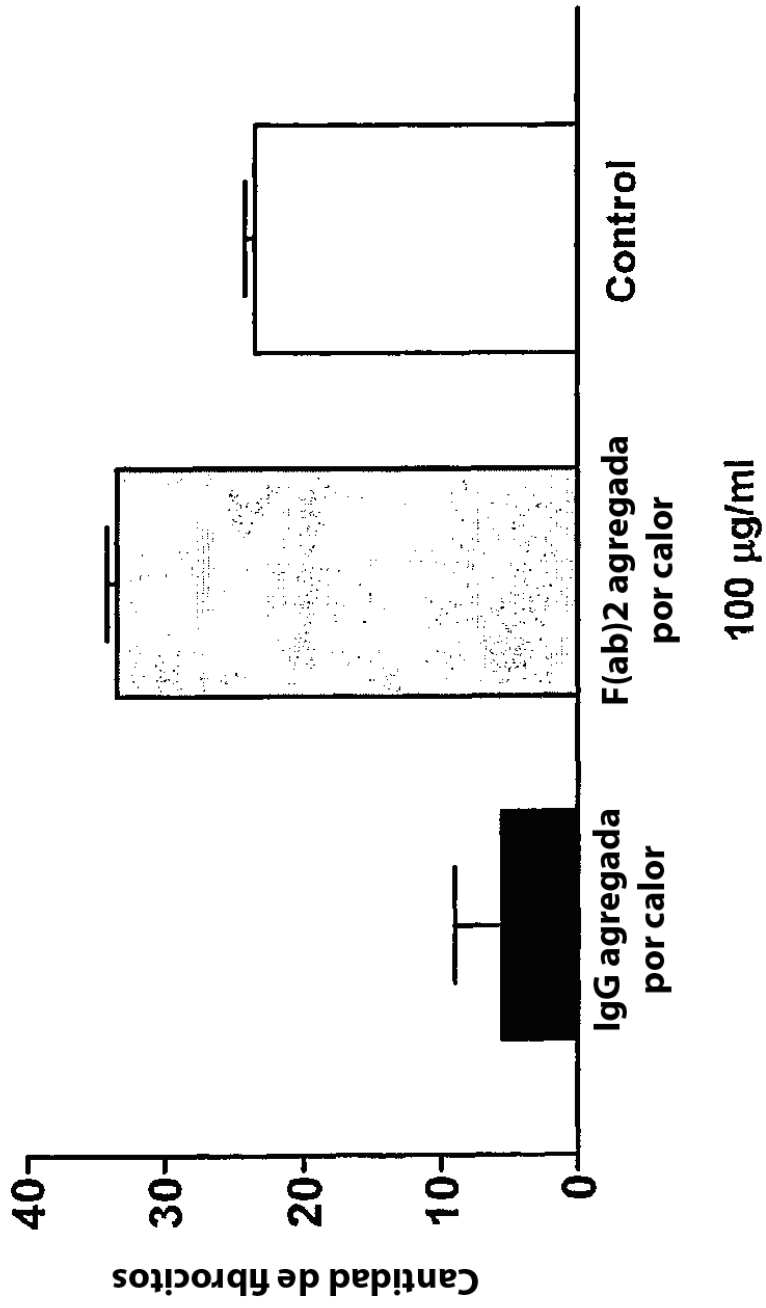


FIGURA 9C

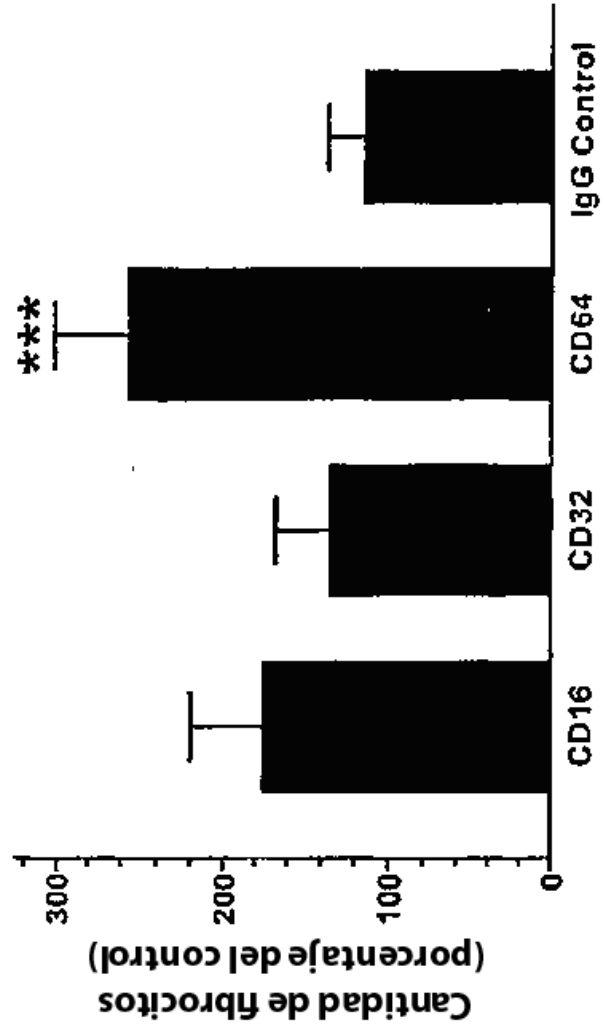


FIGURA 10