



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 162**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/17 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06720055 .0**

96 Fecha de presentación : **01.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1843789**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2007**

54

Título: **Composiciones y procedimientos para el tratamiento de trastornos fibróticos.**

30

Prioridad: **01.02.2005 US 649287 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.07.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.07.2011

73

Titular/es: **Amgen Inc.**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72

Inventor/es: **Comeau, Michael, R. y**
Fitzpatrick, David, R.

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 162 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

Composiciones y procedimientos para el tratamiento de trastornos fibróticos

Campo de la invención

La presente mención se refiere a composiciones y procedimientos para el tratamiento de trastornos fibróticos

5 Antecedentes de la invención

El proceso de reparación de tejidos tisular como una parte de cicatrización de heridas implica dos fases .La primera fase es la fase es la fase regenerativa ,en la que las células dañadas se sustituyen por células del mismo tipo .La segunda fase es la formación de tejido fibroso denominada también fibroplasia o fibrosis, en la que el tejido conjuntivo se sustituye por tejido parenquimático normal .El proceso de reparación tisular puede hacerse patógeno si la fase de fibrosis continua descontrolada, lo que conduce a una reestructuración excesiva del tejido y la formación de tejido cicatricial permanente(Wynn,Nature Rev. Inmunol. 4, 583 (2004)).

Se ha calculado que hasta el 45% de muertes en los Estados Unidos puede atribuirse puede atribuirse a enfermedades fibroproliferativas, que pueden afectar a diversos tejidos y sistemas orgánicos (Wynn, A anteriormente en 595(2004)).Las principales enfermedades fibróticas orgánicas incluyen enfermedad pulmonar intersticial (EPI), caracterizada por inflamación pulmonar y fibrosis. Se sabe que la EPI tiene diversas causas tales como sarcoidosis, silicosis, enfermedades vasculares por colágeno y esclerodermia sistémica. Sin embargo, se desconocen las causas de la fibrosis pulmonar idiopática, un tipo común de EPI. Otros trastornos fibróticos orgánicos incluyen cirrosis hepática, fibrosis hepática producida por infección por hepatitis B o C crónica, enfermedad renal, enfermedad cardíaca y enfermedades oculares incluyendo degeneración macular y retinopatía retinal y vítrea. Los trastornos fibroproliferativos también incluyen esclerodermia sistémica y local, queloides y cicatrices hipertróficas, aterosclerosis y restenosis. Las enfermedades fibroproliferativas adicionales incluyen cicatrización de heridas en exceso dando como resultado cirugía, fibrosis inducida por fármacos quimioterapéuticos, fibrosis inducida por radiación y lesiones y quemaduras (Wynn, A, anteriormente, página 585).

Actualmente, existen tratamientos disponibles para trastornos fibróticos que incluyen fármacos inmunosupresores generales tales como corticoesteroides y otros tratamientos antiinflamatorios. Sin embargo, los mecanismos implicados en la regulación de la fibrosis que parecen ser diferentes a los de la inflamación y terapias antiinflamatorias no son siempre eficaces reduciendo y previniendo la fibrosis (Wynn, anteriormente, página, 591). El documento WO98/36061 se refiere a la reducción de fibrosis y/o cicatrización inhibiendo la actividad mediada por el receptor de IL-6. Por lo tanto, sigue siendo necesario desarrollar tratamientos para reducir y prevenir la fibrosis y controlar los trastornos fibróticos.

La presente invención aborda esta necesidad y proporciona procedimientos y composiciones para prevenir o reducir la fibrosis asociada con trastornos fibróticos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona procedimientos para modular la acumulación de fibroblastos y deposición de colágeno en un tejido modulando la cantidad o actividad de la citocina linfopoyetina estromal tímica (LPET) en el tejido. En un aspecto, la presente invención proporciona un antagonista de LPET para su uso en la reducción o prevención de fibrosis en un sujeto que padece un trastorno fibrótico en el que el antagonista se une a la linfopoyetina estromal tímica o al receptor de la linfopoyetina estromal tímica y se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un péptido o polipéptido. En otro aspecto, la presente invención proporción el uso de al menos un antagonista de LPET en la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de un trastorno fibrótico en un sujeto que padece dicho trastorno. La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica para prevenir o reducir fibrosis en un sujeto que padece un trastorno fibrótico que comprende una dosificación terapéuticamente eficaz de al menos un antagonista de LPET mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los trastornos fibróticos incluyen, pero sin limitación, esclerodermia, enfermedad pulmonar intersticial (EPI),fibrosis pulmonar idiopática (FPI), fibrosis hepática producida por infección por hepatitis B o C crónica, fibrosis inducida por radiación y fibrosis producida por cicatrización.

En la realización el antagonista de LPET es un agente de unión a ligando de LPET que puede unirse a LPET y reducir o bloquear su actividad. Estos antagonistas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos antagonistas, agentes de unión a péptidos o polipéptidos, receptores de LPET solubles (RLPET), antagonistas de receptores del heterodímero (heterodiméricos) receptor alfa de interleucina 7 soluble (IL-7R α)/RLPET). Los anticuerpos antagonistas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos completamente humanos, humanizados, quiméricos, monocatenarios y fragmentos de anticuerpos. Los agentes de unión a péptidos o polipéptidos, receptores solubles y antagonistas de receptores heterodiméricos solubles pueden comprender adicionalmente dominios de Fc u otros componentes multimerizantes o moléculas vehículos tales como PEG .

En otra realización, el antagonista de LPET es un antagonista de RLPET. Los antagonistas de RLPET incluyen antagonistas que se unen al receptor de LPET y antagonistas que se unen al heterodímero IL-7R α /RLPET. Estos

antagonistas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos antagonistas que se unen a RLPET; anticuerpos antagonistas que se unen al heterodímero, ligandos solubles que se unen a RLPET; ligandos solubles que se unen al heterodímero. Los anticuerpos antagonistas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos y monocatenarios y fragmentos de anticuerpos. El ligando soluble puede contener adicionalmente dominios Fc u otros componentes multimerizantes o moléculas transportadoras tales como PEG.

En otra realización, los procedimientos y composiciones de la presente invención comprenden adicionalmente al menos un antagonista adicional para una o más citocinas, factores de crecimiento o quimiocinas que promueven la fibrosis. Estos factores profibróticos incluyen, pero sin limitación, factor de crecimiento transformante β (TGF- β), interleucina-4 (IL-4), interleucina -5 (IL-5), interleucina -9 (IL-9) , interleucina -13 (IL-13), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), interleucina -6 (IL-6), oncostatina M (OSM), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteína quimiotáctica de monocitos de tipo 1 (CCL2/MCP-1), y quimiocina pulmonar y regulada por activación (CCL18/PARC).

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A y 1B , y la figura 2A ,2B Y 2C muestran los resultados de la inyección de cinco grupos de ratones Balb/c por vía intradérmica con diversas dosificaciones de LPET y ASR (albúmina de suero de ratón) como control negativo, una vez a la semana durante una semana (Figura 1A, grupo 2); y una vez a la semana durante 2 semanas (Figura 1B, Grupo 2); y tres veces a la semana durante dos semanas en la Figura 2A (Grupo 3), 2B (Grupo 4), y 2C (Grupo 5). La figura 1A (Grupo 1) no muestra fibrosis subcuticular inducida por una sola inyección de 10 ug de LPET durante una semana; ASR en solitario y PBS en solitario. La figura 1B (Grupo 2) no muestra fibrosis subcuticular inducida por una sola inyección ninguna de las dos semanas (2 inyecciones totales) de 10 ug de LPET; ASR en solitario y PBS en solitario. La figura 2A (Grupo 3) muestra fibrosis subcuticular con valor al nivel 3 para 10 ug de LPET cuando se inyecta 3 veces a la semana durante tres semanas, pero no muestra fibrosis para ASR en solitario ni PBS en solitario. La figura 2B (Grupo 4) muestra fibrosis con valor a nivel 2 para 1 ug de LPET cuando se inyecta tres veces a la semana durante dos semanas, pero no muestra fibrosis para ASR en solitario ni tampoco para PBS en solitario con la excepción de un animal que muestra fibrosis a nivel de 1 para PBS en solitario. La figura 2C (Grupo 5) muestra fibrosis con valor 1 para LPET pulmonar cuando se inyecta tres veces a la semana durante 2 semanas, pero no muestra fibrosis para ASR en solitario ni PBS en solitario.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un antagonista de LPET para su uso en la modulación de la acumulación de fibroblastos y deposición de colágeno en un tejido, modulando la cantidad o actividad de la citocina linfopoyetina estromal tímica (LPET) en el tejido. Se ha descubierto que la LPET induce la acumulación de fibroblastos y deposición de colágeno característica de trastornos fibróticos en animales. En otro aspecto, la presente invención proporciona un antagonista contra LPET para su uso en la reducción o prevención de fibrosis en un sujeto que padece un trastorno fibrótico. En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de al menos un antagonista de LPET en la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de un trastorno fibrótico en un sujeto que padece dicho trastorno. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o reducir la fibrosis en el sujeto que comprende una dosificación terapéuticamente eficaz de al menos un antagonista contra LPET mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento la expresión "enfermedad fibroproliferativa" o "enfermedad o trastorno fibrótico" se refiere a afecciones que implican fibrosis en uno o más tejidos. Como se usa en el presente documento el término "fibrosis" se refiere a la formación de tejido fibroso como un proceso de reparación o reactivo, en lugar de cómo un constituyente normal de un tejido u órgano. La fibrosis se caracteriza por la acumulación de fibroblastos y deposición de colágeno por encima de la deposición normal en cualquier tejido particular. Como se usa en el presente documento el término "fibrosis" se usa como sinónimo de "acumulación de fibroblasto y deposición de colágeno". Los fibroblastos son células del tejido conjuntivo que se dispersan en el tejido conjuntivo por todo el cuerpo. Los fibroblastos secretan una matriz extracelular no rígida que contiene colágeno de tipo I y/o de tipo III. En respuesta a una lesión en un tejido, los fibroblastos cercanos migran hacia la herida, proliferan y producen grandes cantidades de matriz extracelular de colágeno. El colágeno es una proteína fibrosa rica en glicina y prolina que es un componente principal de la matriz extracelular y tejido conjuntivo, cartílago y hueso. Las moléculas de colágeno son estructuras helicoidales tricatenarias denominadas cadenas- α , que se enrollan mutuamente en una hélice de tipo cuerda. El colágeno existe en diversas formas o tipos; de estos, el tipo I, el más común, se encuentra en la piel, tendón y hueso; y el tipo III se encuentra en la piel, vasos sanguíneos y órganos internos.

Los trastornos fibróticos incluyen, pero sin limitación, esclerodermia sistémica y local, cicatrices queloides e hipertróficas, aterosclerosis, restenosis, inflamación y fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, fibrosis producida por infección por hepatitis B o C crónica, enfermedad hepática, enfermedad cardíaca producida por tejido cicatricial y enfermedades oculares tales como degeneración macular y retinopatía retinal y vítrea. Otras enfermedades fibróticas incluyen fibrosis producida por fármacos quimioterapéuticos, fibrosis inducida por radiación y lesiones y quemaduras.

La esclerodermia es un trastorno fibrótico caracterizado por un engrosamiento y endurecimiento de la piel causado por la sobreproducción de nuevo colágeno por los fibroblastos en la piel y otros órganos. La esclerodermia puede producirse como una enfermedad local o sistémica. La esclerodermia sistémica puede afectar a varios órganos. La esclerodermia sistémica se caracteriza por la formación de tejido fibroso de colágeno hialinizado y engrosado con engrosamiento de la piel y adhesión a tejidos subyacentes, especialmente en las manos y en la cara. La enfermedad también puede caracterizarse por disfagia debido a una pérdida de peristalsis y fibrosis submucosa del esófago, disnea debido a fibrosis pulmonar, fibrosis miocárdica y cambios vasculares renales (Stedman's Medical Dictionary, 26ª edición, Williams & Wilkins, 1995). La fibrosis pulmonar afecta del 30 al 70% de pacientes con esclerodermia, produciendo a menudo enfermedad pulmonar restrictiva (Atamas y col., Cytokine and Growth Factor Rev 14: 537-500 (2003)).

La fibrosis pulmonar idiopática es un trastorno pulmonar crónico, progresivo y normalmente letal, que se piensa que es una consecuencia de un proceso inflamatorio crónico (Kelly y col., Curr Pharma Design 9: 39-49 (2003)). La causa de esta enfermedad aun no se conoce.

Como se usa en el presente documento el término "sujeto" se refiere a animales incluyendo mamíferos incluyendo seres humanos. El término "mamífero" incluye primates, animales domésticos que incluye perros, gatos, ovejas, vacas, cabras, cerdos, ratones, ratas, conejos, cobayas, animales en cautividad, tal como animales de zoológico y animales salvajes. Como se usa en el presente documento el término "tejido" se refiere a un órgano o a un conjunto de células especializadas tales como tejido cutáneo, tejido pulmonar, tejido renal u otros tipos de células.

LPET

La linfopoyetina estromal tímica (LPET) se refiere a una citocina de tipo 1 de cuatro paquetes α -helicoidales que es un miembro de la familia de IL-2 pero más estrechamente relacionada con la IL-7. Las citocinas son proteínas reguladoras de bajo peso molecular secretadas en respuesta a determinados estímulos, que actúan sobre receptores en la membrana de células diana. Las citocinas regulan una diversidad de respuesta celulares. Las citocinas se describen generalmente en referencias tales como Cytokines, A. Mire-Sluis and R. Thorne, ed., Academia Press, Nueva York, (1998).

La LPET se clonó originalmente a partir de una línea celular estromal tímica murina (Sims y col. J. Exp. Med 192 (5), 671-680 2000)), y se observó que apoyaba el desarrollo temprano de linfocitos B y T. Posteriormente se clonó la LPET humana y se observó que tenía una identidad de secuencia de aminoácidos del 43% con respecto a la homóloga murina (Quentmeier y col., Leukemia 15, 1286-1292 (2001), y patente de Estados Unidos N°: 6.555.520). La secuencia de polinucleótidos y de aminoácidos de la LPET humana se presenta en la SEC ID N° 1 y 2 respectivamente. Se observó que la LPET se unía con baja afinidad a una cadena receptora de la familia de receptores de hematopoyetina denominada receptor de LPET (RLPET), que se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 09/895.945 (publicación N°: 2002/0068323) (SEC ID N° : 4 y 5). La secuencia de polinucleótidos que codifica al RLPET humano se presenta como SEC ID N°: 3 de la presente solicitud y la secuencia de aminoácidos se presenta como SEC ID N°: 4 de la presente solicitud respectivamente. El dominio soluble del RLPET es aproximadamente de 25 a 231 aminoácidos de la SEC ID N°:4. La LPET se une con elevada afinidad a un complejo heterodimérico del RLPET y el receptor alfa de interleucina 7 IL-7 R α (Park y col., J. Exp. Med 192:5 (2000), solicitud de patente de Estados Unidos N°: 09/895.945, número de publicación U.S. 2002/0068323). La secuencia del receptor α de IL-7 se muestra en la figura 2 de la patente de Estados Unidos N°: 5.264.416. La secuencia del dominio soluble del receptor α de IL-7 es de 1 a 219 aminoácidos de la Figura 2 en la patente de Estados Unidos N°: 5.264.416.

La LPET humana también puede expresarse en forma modificada, en la que se ha eliminado un sitio de escisión de furina mediante modificación de la secuencia de aminoácidos, como se describe en la publicación de solicitud de patente PCT WO 03/032898. La LPET modificada conserva la actividad pero la secuencia de longitud completa se expresa más fácilmente en células de microbios o de mamíferos.

La LPET se produce en células epiteliales humanas que incluyen células epiteliales de piel, bronquios, traquea y vías respiratorias, queratinocitos, células estromales y mastocitos, células del músculo liso y fibroblastos de pulmón y dérmicos, determinado por medio de análisis cuantitativo de ARNm (Soumelis y col., Nature Immunol. 3 (7) 673-680 (2002)). Tanto la LPET murina como la humana están implicadas en la promoción de la inflamación alérgica. Soumelis y col., anteriormente, indicaron que el complejo receptor heterodimérico de LPET se expresa en células dendríticas CD11c+ humanas (células DC). Experimentos con cultivos de células dendríticas han mostrado que la unión de LPET a células DC induce la producción quimiocinas atrayentes de células T_H2 TARC (quimiocinas reguladas por el timo y por activación; también conocidas como CCL17) y MDC (quimiocinas derivadas de macrófagos, conocidas como CCL22) y regula positivamente moléculas HLA-DR, CD40, CD80, CD86 y CD83 co-estimuladoras sobre la superficie de las células. Las DC activadas por LPET en cultivos de células inducen la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ no tratados (Soumelis, anteriormente) en células efectoras pro-alérgicas (Giliet y col., J. Exp Med. 197(8), 1059-1063 (2003)) que producen citocinas proalérgicas IL-4, IL-5, IL-3 y TNF- α regulando negativamente al mismo tiempo IL-10 e interferon- γ (Soumelis y col., anteriormente, Guillet y col., anteriormente). Se ha indicado que LPET se expresa en muestras de tejido de células epiteliales de amígdalas inflamadas y queratinocitos en lesiones de pacientes con dermatitis atópica (Soumelis y col., anteriormente).

Ensayos con LPET

Las actividades de LPET pueden medirse en un ensayo usando células BAF que expresan RLPET humano (BAF/HTR), que requieren LPET activa para la proliferación como se describe en la publicación de solicitud de patente PCT WO 03/032898. El bioensayo BAF/HTR usa una línea celular de pro-linfocitos B murinos que se ha transfectado con el receptor de LPET humano (línea celular obtenida de Steven F. Ziegler, Virginia Mason Research Center, Seattle, WA). Las células BAF/HTR dependen de huLPET para el crecimiento y proliferan en respuesta a huLPET activa añadida a las muestras de ensayo. Después de un periodo de incubación, la proliferación celular se mide por la adición de colorante Azul Alamar I (Biosource Internacional catálogo N° DAL 110,10 ul pocillo). Las células BAF/HTR metabólicamente activas captan y reducen el colorante Azul Alamar, lo que conduce a un cambio en las propiedades de fluorescencia del colorante. Otros ensayos para determinar la actividad de huLPET incluyen, por ejemplo, un ensayo que mide la inducción de crecimiento de linfocitos T de médula ósea humana por LPET, como se describe en la patente de Estados Unidos 6.555.520. Otra actividad de la LPET es la capacidad para activar STAT5 como se describe en la referencia de Levin y col., J. Immunol. 162:677-683 (1999) y en la solicitud de patente PCT WO03/032898. Ensayos adicionales incluyen la producción de CCL17/TACR inducida por LPET de monocitos humanos primarios y células dendríticas como se describe en la referencia de Soumelis y col., anteriormente.

Se ha observado que LPET induce la acumulación de fibroblastos y deposición de colágeno, como se describe en el siguiente Ejemplo. La inyección de LPET murina por vía intradérmica en ratones produce fibrosis en la hipodermis de los ratones, caracterizada por proliferación de fibroblastos y deposición de colágeno. Antagonizando la actividad de LPET se produciría la prevención o disminución de la proliferación de fibroblastos y deposición de colágeno en un tejido.

Como se usa en el presente documento la expresión "factores profibróticos" se refiere a citocinas, factores de crecimiento o quimiocinas además de LPET que se ha observado que promueven la acumulación de fibroblastos y deposición de colágeno en diversos tejidos. Se han descrito numerosas citocinas y factores de crecimiento que están implicados en la regulación de la reestructuración de tejidos y fibrosis. Esto incluye a las "citocinas profibróticas" tales como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-13 (IL-13), que se ha observado que estimulan la síntesis de colágeno y fibrosis en tejidos fibróticos (Letterio y col., Ann Rev. Immunol. 16, 137-161 (1998), Fertin y col., Cell Mol. Biol. 37, 823-829 (1991), Doucet y col., J. Clin. Invest. 101, 2129-2139 (1998). Se ha observado que la interleucina-9 (IL-9) induce fibrosis en las vías respiratorias en los pulmones de ratones (Zhu y col., J. Clin. Invest. 103, 779-778 (1999)). Además del TGF- β , se han descrito otras citocinas o factores de crecimiento que aumentan la fibrosis en el trastorno fibrótico fibrosis pulmonar idiopática (FPI) que incluye factor de estimulación de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β) y factor de crecimiento del tejido conjuntivo (FCTC) (Kelly y col. Curr Pharmaceutical Des 9: 39-49 (2003)). Las citocinas y factores de crecimiento descritos que están implicados en la promoción de fibrosis pulmonar que se produce en la esclerodermia incluyen TGF- β , interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), oncostatina M (OSM), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), citocinas IL-4 y IL-13 de tipo 2, IL-9, proteína quimiotáctica de monocitos 1 (CCL2/MCP-1), y quimiocina pulmonar y regulada por activación ((CCL18/PARC) (Atamas y col., Cyto Growth Fact Rev 14:537-550 (2003)). Por lo tanto, en una realización, los procedimientos y composiciones de la presente invención comprenden adicionalmente administrar al menos un antagonista adicional a uno o más factores profibróticos además de al menos un antagonista de LPET para reducir o prevenir la fibrosis en un sujeto que padece un trastorno fibrótico. En otro aspecto, la presente invención proporciona para su uso al menos una antagonista profibrótico además de al menos un antagonista de LPET en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno fibrótico en un sujeto. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende, además de al menos un antagonista de LPET, uno o más antagonistas contra factores profibróticos, es decir citocinas, factores de crecimiento o quimiocinas, mezclados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estos factores profibróticos incluyen, pero sin limitación, las siguientes citocinas, factores de crecimiento o quimiocinas: Interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-9 (IL-9), interleucina-13 (IL-13), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis pulmonar alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de crecimiento de tejido conjuntivo (FCTC), interleucina-6 (IL-6), oncostatina M (OSM), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (CCL2/MCP-1), y quimiocina pulmonar y regulada por activación (CCL18/PARC). En la siguiente Tabla 1 se observan los números de acceso de estas citocinas y sus receptores específicos (si están disponibles).

TABLA I

Nombre de la proteína	Especie	Sinónimo	Base (bases) de datos (o solicitud de patente)	Nº de acceso (o SEC ID Nº:)
LPET	Homo sapiens	Proteína linfopoyetina estromal tímica.	GenBank/ Patente de estados unidos Nº.6555520	AAK67940/ SEC ID NO: 2
LPET	Mus musculus	Linfopoyetina tímica derivada de estroma	GenBank	AAF81677
RLPET	Homo sapiens	Receptor de citocina de tipo 2 (CRL-2); IL-XR; receptor de proteína linfopoyetina estromal tímica.	Documento US 2002/0068323	SEC ID Nº: 5
RLPET	Mus	Receptor de citocina de tipo factor 2; Receptor de citocina de tipo 1 delta 1; Molécula 2 de tipo receptor de citocina (CRLM-2); Receptor de proteína linfopoyetina estromal tímica.	GenBank, SWISSPROT	Q8CII9
TNF-alpha	Homo sapiens	Factor de necrosis tumoral; Miembro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral 2; TNF-a; Caquetina.	GenBank, SWISSPROT	P01375
TNF-alpha	Mus	Factor de necrosis tumoral; Miembro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral 2; TNF-a; Caquetina.	GenBank, SWISSPROT	P06804
TNF-RI	Homo sapiens	Miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral 1A; p60; TNF-R1; p55; CD120a [contiene: Proteína de unión al factor de necrosis tumoral 1 (TBPI)]	GenBank, SWISSPROT	P19438
TNF-RI	Mus	Miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral 1A; p60; TNF-R1; p55.	GenBank, SWISSPROT	P25118

(continuación)

Nombre de la proteína	Especie	Sinónimo	Base (bases) de datos (o solicitud de patente)	Nº de acceso (o SEC ID Nº:)
TNF-RII	Homo sapiens	Miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral 1B; Receptor del factor de necrosis tumoral 2; p80; TNF-R2; p75; CD120b; Etanercept [contiene: proteína de unión al factor de necrosis tumoral 2 (TBPII)]	GenBank, SWISSPROT	P20333
TNF-RII	Mus	Miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral 1B; Receptor del factor de necrosis tumoral 2; TNF-R2; p75	GenBank, SWISSPROT	P25119
IL-1 alpha	Homo sapiens	Interleucina-1alfa; Hematopoyetina-1.	GenBank, SWISSPROT	P01583
IL-1 alpha	Mus	Interleucina-1 alfa	GenBank, SWISSPROT	P01582
IL-1 R-1	Homo sapiens	Receptor de interleucina-1, tipo I; IL-R-alfa; P80; Antígeno CD121a	GenBank, SWISSPROT	P14778
IL-1 R-1	Mus	Receptor de interleucina-1, tipo I; P80	GenBank, SWISSPROT	P13504
IL-1 R-2	Homo sapiens	Receptor de interleucina-1, tipo II; IL-1R-beta; Antígeno CDw121b	GenBank, SWISSPROT	P27930
IL-1 R-2	Mus	Receptor de interleucina, tipo II	GenBank, SWISSPROT	P27931
IL-4	Homo sapiens	Interleucina-4; Factor 1 estimulador de linfocitos B (BSF-1); Factor 1 estimulador de linfocitos	GenBank, SWISSPROT	P05112

(continuación)

Nombre de la proteína	Especie	Sinónimo	Base (bases) de datos (o solicitud de patente)	Nº de acceso (o SEC ID Nº:)
IL-4	Mus	Interleucina -4; Factor 1 estimulador de linfocitos B (BSF-1); Factor 1 estimulador de linfocitos; Factor de inducción de IGG 1; Factor de diferenciación de IGG de linfocitos B; Factor 1 de crecimiento de linfocitos B	GenBank, SWISSPROT	P07750
IL-4R	Homo sapiens	Cadena alpha del receptor de interleucina-4 (IL-4R-alfa; antígeno CD124) [contiene: cadena alfa del receptor de interleucina-4 soluble, (sIL4alfa/prot); proteína de unión a IL-4 (IL-4-BP)]	GenBank, SWISSPROT	P24394
IL-4R	Mus	Cadena alfa del receptor de interleucina 4(IL-4R-alfa) [contiene: cadena alfa del receptor de interleucina- 4 soluble; proteína de unión a IL-4(IIA-BP)]	GenBank, SWISSPROT	P16382
IL-5	Homo sapiens	Interleucina-5; Factor de sustitución de linfocitos T (TRF); Factor de diferenciación de eosinófilos ; Factor i de diferenciación de linfocitos B.	GenBank, SWISSPROT	P05113
IL-5	Mus	Interleucina-5; Factor de sustitución de linfocitos T (TRF); Factor II de crecimiento de linfocitos B (BGF-II); Factor de diferenciación de eosinófilos; inductor de linfocitos T citotóxicos.	GenBank, SWISSPROT	P04401
IL-5R	Homo sapiens	Cadena alfa del receptor de interleucina-5 (IL-5R-alfa); Antígeno CD125.	GenBank, SWISSPROT	Q01344

(continuación)

Nombre de la proteína	Especie	Sinónimo	Base (bases) de datos (o solicitud de patente)	Nº de acceso (o SEC ID Nº:)
IL-5R	Mus	Cadena alfa del receptor de interleucina 5 (IL-5R-alfa).	GenBank, SWISSPROT	P21183
IL-9	Homo sapiens	Interleucina-9; Factor de crecimiento de linfocitos P40; citocina P40.	GenBank, SWISSPROT	P15248
IL-9	Mus	Interleucina-9; Factor de crecimiento de linfocitos P40; citocina P40.	GenBank, SWISSPROT	P15247
IL-9R	Homo sapiens	Receptor de interleucina-9.	GenBank, SWISSPROT	Q01113
IL-9R	Mus	Receptor de interleucina-9.	GenBank, SWISSPROT	Q01114
IL-13	Homo sapiens	Interleucina-13	GenBank, SWISSPROT	P35225
IL-13	Mus	Interleucina-13; proteína de activación de linfocitos T P600	GenBank, SWISSPROT	P20109
IL-13RA-1	Homo sapiens	Cadena 1 alfa-1 del receptor de interleucina-13 (IL-13R-alfa-1); antígeno CD213a1	GenBank, SWISSPROT	P78552
IL-13RA-1	Mus	Cadena 1 alfa del receptor de interleucina-13 (IL-13R-alfa-1); proteína de unión a interleucina-13; NR4.	GenBank, SWISSPROT	009030
IL-13RA-2	Homo sapiens	Cadena alfa-2 del receptor de interleucina-13; Proteína de unión a interleucina-13.	GenBank, SWISSPROT	Q14627
IL-13RA-2	Mus musculus	Receptor de IL-13 alfa 2	GenBank	AAC33240
TGF-β1	Homo sapiens	Factor transformante del crecimiento beta 1.	SWISSPROT	P01137

(continuación)

Nombre de la proteína	Especie	Sinónimo	Base (bases) de datos (o solicitud de patente)	Nº de acceso (o SEC ID Nº:)
TGF-β1	Mus musculus	Factor transformante del crecimiento beta 1	SWISSPROT	P04202
TGF-β R1	Homo sapiens	Receptor beta del factor transformante del crecimiento; receptor 4 de la proteína serina/treonina-quinasa (SKR4); quinasa 5 de tipo receptor de activina (ALK-5)	SWISSPROT	P36897
TGF-β R2	Homo sapiens	Receptor beta del factor transformante del crecimiento de tipo II	SWISSPROT	P37173
GM-CSF	Homo sapiens	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; factor estimulante de colonias; sargramostim; molgramostin.	SWISSPROT	P04141
IL-6	Homo sapiens	Interleucina 6; interferón, beta 2	Genbank	AAH15511
IL-6	Homo sapiens	Precursor de interleucina-6, factor 2 estimulador de linfocitos B; interferon beta-2; factor de crecimiento de hibridomas; factor de diferenciación de CTL.	SWISSPROT	P05231
IL-6	Mus musculus	Precursor de interleucina-6; HP-1 interleucina; factor de crecimiento de hibridomas de linfocitos B.	SWISSPROT	P08505
IL-6 R β	Homo sapiens	Cadena beta del receptor de interleucina-6; Glucoproteína de membrana 130; gp130; receptor de oncostatina M; CDw130; antígeno CD130	SWISSPROT	P40189
IL-6R-alfa	Homo sapiens	Precursor de cadena alfa del receptor de interleucina-6; antígeno CD126.	SWISSPROT	P08887
IL-6R-beta	Homo sapiens	Cadena beta del receptor de interleucina-6	Genbank; SWISSPROT	AAB63010;

(continuación)

Nombre de la proteína	Especie	Sinónimo	Base (bases) de datos (o solicitud de patente)	Nº de acceso (o SEC ID Nº:)
IL-6 R-alfa	Mus musculus	Cadena alfa del receptor de interleucina-6	SWISSPROT	P22272
IL-6R-beta	Mus musculus	Cadena beta del receptor de interleucina-6	SWISSPROT	Q00560
OSM	Homo sapiens	Oncostatina M	Genbank	AAA36388
OSMR- subunidad beta	Homo sapiens	Subunidad beta del receptor específico de oncostatina M	Genbank; Patente de Estados Unidos Nº: 5891997	AAC50946; SEC ID NO: 2
OSM	Mus musculus	Precursor de oncostatina M	SWISSPROT	P53347
OSMR	Mus musculus	receptor específico de oncostatina M	Genbank	AAC40122
CTGR	Homo sapiens	Precursor del factor de crecimiento del tejido conjuntivo; Proteína 24 específica de condrocitos hipertróficos.	SWISSPROT	P29279
CTGR	Mus musculus	Precursor del factor de crecimiento del tejido conjuntivo; Proteína FISP-12; proteína 24 específica de condrocitos hipertróficos.	SWISSPROT	P29268
PDGF-1	Homo sapiens	Factor de crecimiento derivado de plaquetas; polipéptido alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas.	SWISSPROT	P04085
PDGF-2	Homo sapiens	Factor de crecimiento derivado de plaquetas; polipéptido beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas.	SWISSPROT	P01127
PDGF-1	Mus musculus	Factor de crecimiento derivado de plaquetas, precursor de cadena A.	SWISSPROT P20033	
PDGF-2	Mus musculus	Factor de crecimiento derivado de plaquetas, precursor de cadena B	SWISSPROT	P31240

(continuación)

Nombre de la proteína	Especie	Sinónimo	Base (bases) de datos (o solicitud de patente)	Nº de acceso (o SEC ID Nº:)
PDGR-R- α	Homo sapiens	Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas, antígeno CD140a.	SWISSPROT	P16234
PDGR-R- β	Homo sapiens	Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas, antígeno CD140B.	SWISSPROT	P09619
CCL2	Homo sapiens	Precursor A2 de citocina pequeño inducible; proteína quimiotáctica de monocitos 1(MCP-1); factor de activación y quimiotáctico de monocitos (MCAF); proteína secretora de monocitos JE (HC11).	SWISSPROT	P13500
MCP-1-R	Homo sapiens	Receptor de tipo 2 de quimiocina C-C (CCR2); receptor de proteína 1 quimioatrayente de monocitos.	SWISSPROT	P41597
CCL18	Homo sapiens	Precursor A18 de citocina pequeño inducible (CCL18); proteína 4 inflamatoria de macrófagos (MIP-4); Quimiocina pulmonar y regulada por activación (quimiocina CC PARC); quimiocina 1 CC asociada por activación alternativa de macrófagos (MAC-1); quimiocina 1 de células dendríticas (DC-CK1)	SWISSPROT	P55774

Antagonistas de LPE

5 Un antagonista de LPET inhibe o bloquea al menos una actividad de LPET, o como alternativa, bloquea la expresión de la citocina o su receptor. La inhibición o bloqueo de la actividad de citocina puede conseguirse, por ejemplo, usando uno o más agentes inhibidores que interfieren con la unión de la citocina a su receptor y/o bloquea la transducción de señal resultante de la unión de la citocina con su receptor.

10 En la presente invención, el antagonista de LPET comprende un agente de unión a LPET, que se une a LPET y previene la unión de la citocina con su receptor y/ o bloquea la transducción de señal resultante de la unión de la citocina con su receptor. Estas antagonistas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos antagonistas, agentes de unión a péptidos o polipéptidos, RLPET soluble y heterodímeros de IL-7R α /RLPET solubles.

En otra realización, el antagonista es un antagonista de RLPET, que se une a su receptor y bloquea la unión al ligando y/o la transducción de señal. Estos antagonistas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos antagonistas y ligandos solubles, que se unen a RLPET e interfieren con la transducción de señal y actividad de LPET.

En otra realización, el antagonista es un antagonista contra el heterodímero IL-7R α /RLPET, que se une al heterodímero y bloquea la unión al ligando y/o la transducción de señal. Estos antagonistas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos antagonistas, ligandos solubles que se unen al heterodímero e interfieren con la transducción de señal y actividad de LPET.

- 5 En otra realización, los usos y composiciones de la presente invención proporcionan un antagonista adicional contra uno o más "factores profibróticos" que incluyen, pero sin limitación, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, TGF- β , GM-CSF, TNF- α , IL-1 β , CTGF, IL-6, OSM, PDGF, CCL2/MCP-1 y CCL18/PARC para prevenir o reducir la fibrosis en un sujeto que padece un trastorno fibrótico. Los antagonistas de estos factores profibróticos pueden seleccionarse de agentes que se unen al propio factor, al receptor o al receptor heterodimérico al cual puede unirse el factor y la señal, en el que el antagonista interfiere con la unión ligando/receptor y/o con al menos una actividad. En una realización, el factor antagonista bloquea la expresión del factor o su receptor.

- 15 En una realización, los antagonistas de LPET se unen específicamente al ligando, receptor o receptor heterodimérico de LPET. Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente" se refiere a antagonistas, tales como anticuerpos, que tienen una afinidad de unión (K_a) por LPET, RLPET, o el heterodímero (o correspondiente a una citocina profibrótica, receptor de citocina o receptor heterodimérico de citocina) mayor o igual a $10^6 M^{-1}$, en una realización $10^7 M^{-1}$, en otra realización, $10^8 M^{-1}$, en otra realización $10^9 M^{-1}$, como se determina por técnicas bien conocidas en el campo técnico (tales como, por ejemplo, Scatchard, Ann NY Acad Sci 51:660-672 (1949) y como se describe a continuación).

A continuación se describen, en líneas generales, con mayor detalle, antagonistas de LPET y factores profibróticos.

20 **Antagonistas particulares**

Anticuerpos

- Los antagonistas incluyen anticuerpos que se unen a citocinas o a su receptor y reducen o bloquean al menos una actividad de la citocina. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos intactos que incluyen anticuerpos policlonales (véase, por ejemplo Anticuerpos: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (eds), Cold Spring Harbor Press, (1988)), y anticuerpos monoclonales (véanse, por ejemplo las Patentes de Estados Unidos N $^{\circ}$ RE 32,011, 4,902,614, 4,543,439, y 4,411,993, y Anticuerpos monoclonales: A New Dimension in Biological Analysis. Plenum Press, Kennett, McKeam and Bechtol (eds.) (1980)). Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" también se refiere a un fragmento de un anticuerpo tal como F(ab), F(ab'), F(ab') $_2$, Fv, fragmentos de regiones determinantes de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv) o combinaciones de estos, que pueden producirse por técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los anticuerpos también incluyen polipéptidos tales como proteínas de fusión que contienen al menos una parte de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión específica al antígeno con el polipéptido. Los anticuerpos también incluyen dAb (dominio V $_H$), diacuerpos (anticuerpos bivalentes que comprenden dos cadenas polipeptídicas, cada una con cadenas V $_H$ y V $_L$), y triacuerpos y tetracuerpos (anticuerpos con tres y cuatro cadenas polipeptídicas respectivamente, cada una con cadenas V $_H$ y V $_L$). Los anticuerpos también incluyen minicuerpos (como se describe en el documento WO 94/09817), y maxicuerpos o fusiones scFv-Fc (Powers y col, Immunol Meth 251, 123-135 (2001)), producidos por técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos.

- El término "anticuerpo" también se refiere a anticuerpos biespecíficos o bifuncionales que son un anticuerpo híbrido artificial que tienen dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una diversidad de procedimientos que incluyen fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. (Véase Songvilai y col, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990), Kostelny y col., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)). Como se usa en el presente documento el término "anticuerpo" también se refiere a anticuerpos quiméricos, es decir, anticuerpos que tienen un dominio de inmunoglobulina de anticuerpo constante humano que se acopla a uno o más de dominios de inmunoglobulina de anticuerpo variable no humano, o fragmentos de los mismos (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N $^{\circ}$ 5.595.898 y N $^{\circ}$ 5.693.493). Los anticuerpos también se refieren a anticuerpos "humanizados" y anticuerpos humanos producidos por animales transgénicos, ambos de los cuales se describen más completamente a continuación. El término "anticuerpos" también incluye anticuerpos multiméricos, o un complejo de proteínas de orden superior tal como anticuerpos heterodiméricos. Los "anticuerpos" también incluyen anticuerpos anti-idiotrópicos. La producción de anticuerpos se describe con mayor detalle a continuación.

- Los anticuerpos policlonales dirigidos contra una citocina o su polipéptido receptor pueden producirse en animales (por ejemplo, conejos o ratones) por medio de inyecciones subcutáneas o intraperitoneales múltiples del polipéptido y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el polipéptido antigénico con una proteína transportadora que es inmunogénica en las especies a inmunizar, tal como hemocianina de lapa californiana, suero, albúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de semilla de soja. Además, pueden usarse agentes de agregación, tal como alumbre, para potenciar la respuesta inmunológica. Después de la inmunización, se extrae la sangre de los animales y se analiza el suero para determinar la titulación de los anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales que son inmunoreactivos con una citocina o su receptor se producen usando cualquier procedimiento que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por medio de líneas celulares continuas en cultivos. Son ejemplos de procedimientos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales los que incluyen los procedimientos de hibridoma de Kohler y col. *Nature* 256:495-97 (1975) y el procedimiento de hibridoma de linfocitos C humanos (Kozbor, J. *Immunol.* 133:3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). La invención también proporciona líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales reactivos con citocinas o sus receptores.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden modificarse para su uso como agentes terapéuticos. Una realización es un anticuerpo "quimérico" en la que una parte de la cadena pesada (H) y/o ligera (L) es idéntica u homóloga a una secuencia correspondiente en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena (o cadenas) es idéntica u homóloga a una secuencia correspondiente en los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos. También se incluyen fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. Véase la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-55 (1985).

Un anticuerpo monoclonal también puede ser un anticuerpo "humanizado". En la técnica se conocen bien procedimientos para humanizar anticuerpos no-humanos. Véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.585.089 y 5.693.762. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoacídicos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. La humanización puede realizarse, por ejemplo, usando procedimientos descritos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567 y el documento WO 94/10332, Jones y col., *Nature* 321:522-25 (1986); Riechmann y col., *Nature* 332:323-27 (1998); Verhoeyen y col., *Science* 239:1534-36 (1988)), sustituyendo al menos una parte de una región determinante de la complementariedad de roedores para las regiones correspondientes de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos. Usando animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena dichos anticuerpos se producen por humanización con el antígeno apropiado (es decir, que tiene al menos 6 aminoácidos contiguos), opcionalmente conjugados con un vehículo. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2551-55 (1993); Jakobovits y col., *Nature* 362:255-58 (1993) Bruggermann y col. *Year in Immuno.* 7:33 (1993), Mendez y col., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), y la Patente de Estados Unidos N° 6.300.129.). En un procedimiento, dichos animales transgénicos se producen mediante incapacitación del locus endógeno que codifica las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera en su interior e insertando el locus que codifica las proteínas de cadena pesada y ligera humana en el genoma del mismo. Después, los animales parcialmente modificados, que son los que tienen menos modificaciones en complemento completo, se cruzan para obtener un animal que tiene todas las modificaciones del sistema inmunológico deseadas. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos producen anticuerpos con secuencias de aminoácidos de seres humanos (en lugar de, por ejemplo, murinas), que incluyen regiones variables que son inmunoespecíficas para estos antígenos. Véanse las publicaciones PCT N°s WO9633735 y WO9402602. Se describen procedimientos adicionales en la Patente de Estados Unidos N° 5.545.807, en las publicaciones PCT N°s WO9110741 y WO 9004036 y en las Patentes Europeas N°s 546073B1 y 546073A1. Los anticuerpos humanos también pueden producirse mediante expresión de ADN recombinante en células huéspedes o por expresión en células de hibridoma como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos que incluyen anticuerpos humanos también pueden producirse a partir de bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom y col., *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222:581(1991)). Estos procesos imitan la selección inmune a través de la presentación de repertorios de anticuerpos en la superficie de bacteriófagos filamentosos y posterior selección de fagos mediante su unión a un antígeno de elección. Una de dichas técnicas se describe en el documento WO 9910494 que describe el aislamiento de anticuerpos agonistas de elevada afinidad y funcionales para receptores MPL y msk usando dicha estrategia. Existen disponibles bibliotecas de anticuerpos de presentación de fagos en las que los fragmentos de anticuerpos Fab, por ejemplo, se presentan en fagos y bibliotecas de fagémidos, que permiten la selección y purificación de los Fab e IgG solubles y que permiten la purificación por afinidad (Dyax Corp).

Los anticuerpos quiméricos, injertados en CDR y humanizados se producen típicamente por procedimientos recombinantes. Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos se introducen en células huéspedes y se expresan usando materiales y procedimientos descritos en el presente documento. En una realización, los anticuerpos se producen en células huéspedes de mamíferos, tales como células CHO. Los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, humanos) pueden producirse por la expresión de ADN recombinante en células huéspedes o por la expresión en células de hibridoma como se describe en el presente documento.

Antagonistas Peptídicos/Polipeptídicos

Los antagonistas contra LPET incluyen péptidos y polipéptidos que pueden unirse a LPET. RLPET o al receptor heterodimérico IL-7R α /RLPET, que inhiben o bloquean la unión del receptor al ligando y/o reducen o bloquean la actividad de la citocina. Los antagonistas peptídicos y polipeptídicos contra otros factores profibróticos incluyen

péptidos o polipéptidos que pueden unirse al ligando, al receptor del ligando o al receptor heterodimérico, cuando es aplicable. Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de aminoácidos unida por enlaces peptídicos, independientemente de la longitud o modificación postraduccional. El término "péptido" generalmente se refiere a una cadena más corta de aminoácidos, entre aproximadamente dos aminoácidos a aproximadamente cincuenta aminoácidos. Los polipéptidos y péptidos incluyen proteínas naturales, polipéptidos y péptidos sintéticos o recombinantes. Como se usa en el presente documento el término "aminoácido" se refiere a los 20 α -aminoácidos convencionales así como derivados de origen natural y sintético. Un polipéptido puede contener aminoácidos L o D o una combinación de los mismos. Como se usa en el presente documento el término "péptido mimético" se refiere a estructuras de tipo peptídicas que tienen estructuras no aminoacídicas sustituidas por uno o más aminoácidos.

Los péptidos y polipéptidos de unión de la presente invención pueden incluir una secuencia o una secuencia parcial de proteínas de origen natural, secuencias aleatorizadas derivadas de proteínas de origen natural o secuencias completamente aleatorizadas.

Los antagonistas de péptidos y polipéptidos incluyen proteínas de fusión en las que el extremo amino y/o carboxilo del péptido o polipéptido está fusionado a otro polipéptido, un fragmento del mismo o a aminoácidos que no se reconocen generalmente como parte de ninguna secuencia de proteína específica. Son ejemplos de dichas proteínas de fusión polipéptidos inmunogénicos tales como regiones constantes de inmunoglobulina (Fc), proteínas marcadoras, proteínas o polipéptidos que facilitan la purificación del péptido o polipéptido deseado, secuencias que promueven la formación de proteínas multiméricas, tales como motivos cremallera de leucina, que son útiles en la formación de dímeros o trímeros y que promueven estabilidad y mayores semividas circulantes. Otras proteínas de fusión útiles incluyen la unión de dominios funcionales, tales como sitios activos de enzimas, dominios de glucosilación, señales de direccionamiento celular o regiones transmembrana. Además, estos péptidos o polipéptidos pueden unirse a engarces peptídicos además de agentes de multimerización tal como una región Fc para multimerizar la molécula y por lo tanto potenciar la afinidad de unión. Se conocen bien fusiones de fragmentos de anticuerpos tales como el dominio Fc de IgF, IgA, IgM, o IgG con un polipéptido tal como un dominio soluble de un receptor de citocina. Los péptidos o polipéptidos de unión también pueden unirse a moléculas transportadoras tal como polietilén glicol (PEG).

Los polipéptidos y péptidos de unión incluyen adicionalmente pepticuerpos, que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.660.853.

Ligandos solubles

Los antagonistas peptídicos y polipeptídicos incluyen antagonistas de ligandos solubles. Como se usa en el presente documento la expresión "antagonista de ligando soluble" se refiere a péptidos, polipéptidos o peptidomiméticos solubles que pueden unirse al receptor de LPET o a otro receptor de factor profibrótico, o receptor heterodimérico y bloquear la unión del receptor a citocina y/o la transducción de señal y la actividad. Los antagonistas de ligandos solubles que incluyen variantes de la citocina que conservan homología sustancial con, pero no la actividad de ligando, incluyen truncamientos tales como truncamientos N- o C- terminales, sustituciones, deleciones y otras modificaciones en la secuencia de aminoácidos, tales como sustitución de un péptido mimético no aminoacídico por un resto aminoacídico. Los antagonistas de ligandos solubles, por ejemplo, pueden unirse a receptores de citocina pero no permiten la transducción de señal. Para los fines de la presente invención, una proteína es "sustancialmente similar" a otra proteína si existe al menos una identidad del 80%, preferentemente al menos aproximadamente el 90%, más preferentemente al menos aproximadamente el 95% entre sí en la secuencia de aminoácidos.

Receptores solubles

Los antagonistas peptídicos y polipeptídicos incluyen adicionalmente versiones truncadas o fragmentos de receptores de citocina, modificados o, de otra manera, que pueden unirse a LPET (u otros factores profibróticos) y/o bloquear o inhibir la unión al receptor de LPET y por lo tanto reducir o bloquear la actividad de la citocina. Estas versiones truncadas del receptor de citocina, por ejemplo, incluyen dominios solubles de origen natural, así como variaciones debido a proteólisis en el extremo N- o C-. Los dominios solubles incluyen todo o parte del dominio extracelular del receptor, en solitario o unido a péptidos adicionales o modificaciones. El dominio soluble de la LPET humana es de aproximadamente 25 a 231 aminoácidos de la SEC ID N°: 4. El dominio soluble de IL-7R α es de aproximadamente 1 a 219 aminoácidos de la Figura 2 de la Patente de Estados Unidos N° 5.264.416. Los dominios solubles de los receptores también pueden proporcionarse como proteínas de fusión, tal como fusiones de Fc.

Los antagonistas de citocinas también incluyen receptores o fragmentos de receptores homo o heterodiméricos entrecruzados diseñados para unirse a citocinas, conocidos también como "trampas de citocinas". Las trampas de citocinas son polipéptidos de fusión que pueden unirse a una citocina para formar un complejo no funcional. Una trampa de citocina incluye al menos una parte de unión a citocina de un domino extracelular de la región determinante de especificidad de un receptor de citocina junto con una parte de unión a citocina del dominio extracelular del componente de transducción de señal del receptor de citocina y un componente tal como un Fc que multimeriza los fragmentos de receptores de citocina. Las trampas de citocinas se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 6.472.179.

Péptidos y polipéptidos

Los antagonistas peptídicos y polipeptídicos de la presente invención pueden generarse por cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica que incluyen síntesis química, digestión de proteínas o tecnología recombinante, presentación de fagos, exploración de péptido-ARN y otras técnicas de exploración por afinidad. Por ejemplo, los polipéptidos y péptidos pueden sintetizarse en solución o en un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. En el mercado existen disponibles diversos sintetizadores automáticos y pueden usarse de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart y Young (anteriormente); Tam y col., J Am Chem Soc, 105:6442, (1983); Merrifield, Science 232:341-347 (1986); Barany y Merrifield, The Peptides, Gross y Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284; Barany y col., Int JPep Protein Res, 30:705-739 (1987); y la Patente de Estados Unidos N° 5.424.398. En Coligan y col., Curr Prot Immunol, Wiley Interscience, 1991, unidad 9, por ejemplo, se describen procedimientos para la síntesis de péptidos en fase sólida.

Los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida usan un copoli(estireno-divinilbenceno) que contiene 0,1-1,0 mM de aminos/g de polímero. Estos procedimientos para la síntesis de péptidos usan protección butoxicarbonilo (t-BOC) o 9-fluorenilmetiloxi-carbonilo (FMOC) de grupos alfa-amino. Ambos métodos implican la síntesis gradual mediante la cual se añade un solo aminoácido en cada etapa comenzando a partir del extremo C del péptido (Véase, Coligan y col., Curr Prot Immunol, Wiley Interscience, 1991, unidad 9). Al finalizar la síntesis química, el péptido sintético puede desprotegerse para eliminar los grupos bloqueantes aminoácidos t-BOC o FMOC y escindir el polímero por tratamiento con ácido a temperatura reducida (por ejemplo, HF líquido-anisol al 10% durante aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1 hora a 0°C). Después de la evaporación de los reactivos, los péptidos se extraen del polímero con solución de ácido acético al 1% que después se liofiliza para producir el material bruto. Este puede purificarse normalmente por técnicas tales como filtración en gel sobre Sephadex G-15 usando ácido acético al 5% como disolvente. La liofilización de fracciones apropiadas de la columna producirá los péptidos o derivados peptídicos homogéneos, que después pueden caracterizarse mediante técnicas convencionales como análisis de aminoácidos, cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alto rendimiento, espectroscopía por absorción ultravioleta, rotación molar, solubilidad, y cuantificarse mediante degradación de Edman en fase sólida.

Las técnicas de presentación de fagos representan otro procedimiento para identificar péptidos que puedan unirse a las citocinas o a sus receptores. Brevemente, se prepara una fagoteca (usando, por ejemplo, 13 ml de fago fd o lambda), que presente insertos de restos aminoácidos. Los insertos pueden representar, por ejemplo, una matriz completamente degenerada o parcial. Los insertos portadores de fagos que se unen al antígeno deseado se seleccionan y este proceso se repite durante varios ciclos de reelección de fagos que se unen al antígeno deseado. La secuenciación de ADN se realiza para identificar las secuencias de los péptidos expresados. De esta manera puede determinarse la parte lineal mínima de la secuencia que se une al antígeno deseado. El procedimiento puede repetirse usando una biblioteca parcial con insertos que contienen parte o toda la parte mínima lineal más uno o más restos degenerados adicionales aguas arriba o aguas abajo del mismo. Estas técnicas pueden identificar péptidos con mayor afinidad aún por las citocinas o sus receptores. La tecnología de presentación de fagos se describe, por ejemplo, en Scott y col. Science 249: 386 (1990); Devlin y col., Science 249: 404 (1990); Patente de Estados Unidos N° 5.223.409; Patente de Estados Unidos N° 5.733.731; Patente de Estados Unidos N° 5.498.530; Patente de Estados Unidos N° 5.432.018; Patente de Estados Unidos N° 5.338.665; Patente de Estados Unidos N° 5.922.545; documento WO 96/40987 y en el documento WO 98/15833. Opcionalmente, las bibliotecas para mutagénesis se crean y exploran como se ha descrito anteriormente para optimizar adicionalmente la secuencia de los que mejor se unen (Lowman, Ann Rev Biophys Biomol Struct 26:401-24 (1997)).

Otros procedimientos para generar péptidos de unión incluyen técnicas de selección por afinidad, conocidas en el campo técnico, que incluyen procedimientos de "presentación de *E. coli*", "presentación de ribosomas" que emplean enlace químico de péptidos al ARN conocido conjuntamente como "exploración de péptido-ARN". Para identificar péptidos de la invención que se unen a citocinas o a sus receptores pueden usarse procedimientos de exploración de doble híbrido en levaduras. Además, se han desarrollado bibliotecas de péptidos derivados químicamente en las que los péptidos se inmovilizan en materiales estables, no biológicos, tales como varillas de olietileno o resinas permeables-disolventes. Otros usos de bibliotecas de péptidos derivados químicamente usan fotolitografía para explorar péptidos inmovilizados en portaobjetos de vidrio. En lo sucesivo en el presente documento, estos procedimientos y relacionados se denominan en su conjunto "exploración química de péptidos". La exploración química de péptidos puede ser ventajosa ya que permite el uso de aminoácidos D y otros análogos, así como elementos no peptídicos. En Wells y Lowman, Curr Opin Biotechnol 3: 355-62 (1992), se revisan los dos procedimientos biológicos y químicos.

Adicionalmente, los péptidos y peptidomiméticos seleccionados que pueden unirse a citocinas y a receptores de citocinas pueden mejorarse más mediante el uso del "diseño de fármacos fundamentales". En una estrategia, la estructura tridimensional de un polipéptido de la invención, un ligando o compañero de unión, o de un complejo compañero de unión-polipéptido, se determina por cristalografía con rayos x, por resonancia magnética nuclear o por modelado por homología informatizado o, más típicamente, por una combinación de estas estrategias. Para diseñar moléculas análogas se usa información estructural de interés, para identificar inhibidores eficaces, tales como moléculas pequeñas que pueden unirse a un polipéptido de la invención. En la publicación PCT WO107579, se describen ejemplos de algoritmos, programas informáticos y procedimientos para modelar sustratos o agentes de

unión basados en la estructura tridimensional de una proteína.

Antagonistas tales como péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, anticuerpos, dominios solubles, se seleccionan por exploración para detectar la unión a la citocina diana o a dianas de receptores de citocina seguido de elución no específica y específica. En la técnica se conocen diversos ensayos de unión e incluyen ensayos de unión no competitivos y competitivos. Posteriormente, usando ensayos basados en células u otros, pueden determinarse parámetros inhibidores tales como la CI_{50} (concentración a la cual se inhibe el 50% de una actividad específica) y la afinidad de unión medida por K_D (constante de disociación) o K_a (constante de asociación). La CI_{50} puede determinarse usando ensayos basados en células, por ejemplo, empleando cultivos de células que expresan receptores de citocina en la superficie de las células, así como un indicador de la señalización sensible a citocina tal como un vector indicador pLuc-MCS (Stratagene cat n° 219087). Para determinar la CI_{50} puede usarse la inhibición de señalización cuando existen cantidades en aumento de inhibidor en el cultivo celular junto con la citocina. Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente" se refiere a una afinidad de unión de al menos $10^6 M^{-1}$, en una realización, $10^7 M^{-1}$ o superior. La constante del equilibrio K_D o K_a también puede determinarse usando sistemas de ensayo BIAcore® tales como BIAcore®3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) usando diversas concentraciones de inhibidores candidatos de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Después, el valor terapéutico de los antagonistas puede ensayarse en diversos modelos animales, tales como, modelos murinos descritos más adelante en el Ejemplo.

Se conocen antagonistas específicos contra factores profibróticos. Además de inhibidores contra la actividad de LPET, los procedimientos y composiciones de la presente invención pueden usar antagonistas específicos que incluyen la proteína de fusión de Fc del receptor de TNF- α conocida como etanercept (ENBREL®), sTNF-R1, onercept, D2E7 y Remicade™ y anticuerpos que reaccionan específicamente con TNF- α y el receptor de TNF- α . Adicionalmente los antagonistas incluyen moléculas antagonistas de IL-1 α tales como anakinra, Kineret®, moléculas de tipo IL-1 α , tales como, IL-1Hy1 e IL-1Hy2; inhibidores de polipéptidos contra IL-1 α y el receptor de IL-1 α , antagonista del receptor soluble de IL-1. En la Patente de Estados Unidos N° 6.599.873 se describen inhibidores polipeptídicos de IL-1, que describe secuencias polipeptídicas glucosiladas y no glucosiladas, que se incorporan por referencia en el presente documento. Kineret® se diferencia de IL-1 α humana natural en que tiene añadido un solo resto de metionina en su extremo amino. Kineret® bloquea la actividad biológica de IL-1 mediante la inhibición competitiva de la unión de IL-1 al receptor de tipo I de interleucina 1 (IL-1rI). Inhibidores adicionales conocidos incluyen anticuerpos que se unen a IL-4 y al receptor de IL-4, anticuerpos que se unen a IL-5 y a receptores de IL-5 y anticuerpos que se unen a IL-13 y a receptores de IL-13.

Independientemente de la manera en la que se preparen los péptidos o polipéptidos, puede generarse una molécula de ácido nucleico que codifique cada péptido o polipéptido usando procedimientos convencionales de ADN recombinantes. La secuencia de nucleótidos de dichas moléculas puede manipularse según sea apropiado sin cambiar la secuencia de aminoácidos que codifica teniendo en cuenta la degeneración del código de ácidos nucleicos así como la preferencia de codones en células huéspedes particulares. Las técnicas de ADN recombinante también proporcionan un procedimiento conveniente para preparar agentes polipeptídicos de la presente invención o fragmentos de los mismos que incluyen, por ejemplo, dominios de receptores solubles. Un polinucleótido que codifica el polipéptido o fragmento puede insertarse en un vector de expresión, que a su vez puede insertarse en una célula huésped para la producción de los polipéptidos de la presente invención.

Para expresar los agentes peptídicos y polipeptídicos puede usarse una diversidad de sistemas de vectores/huéspedes de expresión. Estos sistemas incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN recombinante de bacteriófagos, plásmidos o cósmidos, levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión virales (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células de plantas transfectadas con vectores de expresión virales (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, VMCA; virus del mosaico del tabaco, VMT) o transformarse con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, el plásmido Ti o pBR322); o sistemas de células animales. Las células de mamíferos que son útiles en la producción de proteínas recombinantes incluyen, pero sin limitación, células VERO, células HeLa, líneas de células de ovario de hámster chino (CHO), células COS (tales como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293.

La expresión "vector de expresión" se refiere a un plásmido, fago, virus o vector, para expresar un polipéptido a partir de una secuencia de polinucleótidos. Un vector de expresión puede comprender una unidad transcripcional que comprende un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen una función reguladora en la expresión de genes, por ejemplo, promotores o amplificadores, (2) una estructura o secuencia que codifica al agente polipeptídico que se transcribe al ARNm y se traduce en proteína, y (3) secuencias apropiadas de inicio y terminación de la transcripción. Las unidades estructurales destinadas para su uso en sistemas de expresión en levaduras o eucariotas incluyen preferentemente una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped. Como alternativa, cuando una proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o transportadora, esta puede incluir un resto metionilo amino terminal. Posteriormente, este resto puede escindirse o no de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto polipeptídico final. Por ejemplo, los péptidos y pepticuerpos pueden expresarse de manera recombinante en levaduras usando un sistema de expresión disponible en el mercado, por ejemplo, el Sistema de Expresión de *Pichia* (Invitrogen, San Diego, CA),

siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema también se basa en la secuencia pre-pro-alfa para la secreción directa, aunque la transcripción del inserto se realiza por el promotor de alcohol oxidasa (AOX1) tras la inducción por metanol. El polipéptido secretado se purifica del medio de crecimiento de la levadura usando los procedimientos que se usan para purificar el polipéptido de sobrenadantes de células de mamíferos y de bacterias.

5 Como alternativa, el ADNc que codifica el péptido y los polipéptidos puede clonarse en el vector de expresión de baculovirus pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). Este vector puede usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante (PharMingen) para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en medios con sF9 sin proteínas y para producir proteínas recombinantes. La proteína recombinante puede purificarse y concentrarse del medio usando una columna de Sepharosa-Heparina (Farmacia).

10 Como alternativa, el péptido o polipéptido puede expresarse en un sistema de insecto. Los expertos en la materia conocen bien sistemas de insecto para la expresión de proteínas. En un sistema de este tipo, puede usarse el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (VPNAc) como un vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. La secuencia que codifica al péptido puede clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de polihedrina y colocarse bajo control del promotor de polihedrina. La inserción exitosa del péptido inactivará el gen de polihedrina y producirá virus recombinantes sin proteína de cubierta. Los virus recombinantes pueden usarse para infectar células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que se expresa el péptido (Smith y col., J Virol 46: 584 (1983); Engelhard y col., Proc Nat Acad Sci (USA) 91: 3224-7 (1994)).

20 En otro ejemplo, la secuencia de ADN que codifica el péptido puede amplificarse por PCR y clonarse en un vector apropiado, por ejemplo, pGEX-3X (Farmacia). El vector pGEX-3X se diseña para producir una proteína de fusión que comprende glutatión-S-transferasa (GST), codificada por el vector y una proteína codificada por un fragmento de ADN insertado en el sitio de clonación del vector. Los cebadores para la PCR pueden generarse para incluir, por ejemplo, un sitio de escisión apropiado.

25 Como alternativa, puede clonarse una secuencia de ADN que codifica el péptido en un plásmido que contiene un promotor deseado y, opcionalmente, una secuencia líder (Better y col., Science 240:1041-43 (1988)). La secuencia de esta construcción puede confirmarse por secuenciación automatizada. Después el plásmido puede transformarse en la cepa de *E. coli* MC1061 usando procedimientos convencionales que emplean incubación con CaCl₂ y tratamiento con choque térmico de la bacteria (Sambrook y col., anteriormente). La bacteria transformada puede cultivarse en medio LB complementado con carbenicilina y la producción de la proteína expresada puede inducirse por cultivo en un medio adecuado. Si está presente, la secuencia líder puede efectuar la secreción del péptido y escindirse durante la secreción.

30 Los expertos en la materia conocen bien sistemas en huéspedes mamíferos para la expresión de péptidos y polipéptidos recombinantes. Pueden seleccionarse cepas de células huéspedes para una capacidad particular de procesar la proteína expresada o para producir determinadas modificaciones postraduccionales que serán útiles proporcionando actividad a la proteína. Dichas modificaciones de la proteína incluyen, pero sin limitación, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Distintas células huéspedes tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38 y similares tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y pueden seleccionarse para garantizar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña introducida.

35 Es preferible que las células transformadas se usen para una producción de la proteína a alto rendimiento, a largo plazo. Una de estas células se transforma con vectores que contienen marcadores de selección así como el casete de expresión deseado, antes de cambiar a un medio selectivo se puede permitir el cultivo de las células durante 1 – 2 días en un medio enriquecido. El marcador de selección se diseña para permitir el cultivo y recuperar células que expresan satisfactoriamente las secuencias introducidas. Usando técnicas de cultivo en tejidos apropiadas para la línea celular empleada, pueden proliferar agregados resistentes de células transformadas de manera estable.

40 Para recuperar las células que se han transformado para la producción de proteína recombinante pueden usarse diversos sistemas de selección. Dichos sistemas de selección incluyen, pero sin limitación, genes de timidina quinasa del VHS, de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y de adenina fosforribosiltransferasa, en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. También puede usarse resistencia anti-metabolitos como base de selección para dhfr que confiere resistencia a metotrexato, gpt que confiere resistencia al ácido micofenólico, neo que confiere resistencia al aminoglucósido G418 y confiere resistencia a clorsulfurón e hgro que confiere resistencia a higromicina. Genes de selección adicionales que pueden ser útiles incluyen trpB, que permite a las células usar indol en lugar de triptófano o hisD, que permite a las células usar histinol en lugar de histidina. Los marcadores que proporcionan una indicación visual para la identificación de transformantes incluyen antocianinas, β-glucuronidasa y su sustrato, GUS, y luciferasa y su sustrato, luciferina.

55 En algunos casos, puede ser necesario “replegar” los polipéptidos expresados de la presente invención y oxidarlos en una estructura terciaria apropiada y generar enlaces disulfuro para ser biológicamente activos. El replegamiento puede conseguirse usando diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, la exposición del agente polipeptídico solubilizado a un pH normalmente superior a 7 en presencia de

un agente caotrópico. La selección del caotropo es similar a las selecciones usadas para la inclusión de solubilización de anticuerpos, sin embargo, un caotropo se usa típicamente a una menor concentración. Son agentes caotrópicos ejemplares la guanidina y la urea. En la mayoría de los casos, la solución para el replegamiento/oxidación también contendrá un agente reductor más su forma oxidada en una proporción específica para generar un potencial rédox particular que permita que se produzca la redistribución de enlaces disulfuro para la formación de puentes de cisteína. Algunos pares rédox normalmente usados incluyen cisteína/cistamina, glutatión/ditiobisGSH, cloruro de cobre, ditiotreitolo DTT/ditiano DTT y 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-bME. En muchos casos, puede usarse un co-disolvente para aumentar la eficacia del replegamiento. Los co-disolventes normalmente usados incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares y arginina.

Es necesario purificar los péptidos y polipéptidos de la presente invención. Los expertos en la materia conocen bien técnicas de purificación de proteínas. Estas técnicas implican, a un nivel, el fraccionamiento en bruto de las fracciones proteicas y no proteicas. Separando los péptidos o polipéptidos de otras proteínas, el péptido o polipéptido de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para conseguir la purificación parcial o completa (o purificación para la homogeneizar). Son procedimientos analíticos particularmente adecuados para la preparación de polipéptidos y péptidos la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por exclusión; electroforesis en gel de poliacrilamida e isoelectroenfoque. Un procedimiento particularmente eficaz de purificación de péptidos es la cromatografía líquida de proteínas acelerada o incluso la HPLC. La expresión "polipéptido o péptido purificado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una composición, que puede aislarse de otros componentes, en la que el polipéptido o péptido se purifica a cualquier grado en relación con su estado que puede obtenerse de origen natural. Por lo tanto, un péptido o polipéptido purificado también se refiere a un polipéptido o péptido que está libre del entorno en el que puede producirse de manera natural. Generalmente, "purificado" se referirá a una composición peptídica o polipeptídica que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar otros componentes diversos y cuya composición conserva sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa la expresión "sustancialmente purificado", esta se referirá a una composición peptídica o polipeptídica en la que el polipéptido o péptido forma el componente principal de la composición, tal como una constitución de aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o más de las proteínas en la composición.

A la luz de la presente divulgación, los expertos en la materia conocerán ahora diversos métodos para cuantificar el grado de purificación del péptido o polipéptido. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad de unión específica de una fracción activa o evaluar la cantidad de péptido o polipéptido dentro de una fracción por análisis SDS/PAGE. Un procedimiento preferido para evaluar la pureza de una fracción peptídica o polipeptídica es calcular la actividad de unión de la fracción, compararla con la actividad de unión del extracto inicial y calcular así el grado de purificación, evaluado en el presente documento por un "número de purificación de - veces". Las unidades reales usadas para representar la cantidad de afinidad de unión dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo particular seleccionada seguida para la purificación y de si el polipéptido o péptido muestra o no una actividad de unión detectable.

Los expertos en la técnica conocerán bien diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos (inmunoprecipitación) y similares o por termo-desnaturalización, seguido de centrifugación; etapas de cromatografía tales como cromatografía por afinidad (por ejemplo Proteína-A-Sepharosa), cromatografía de intercambio iónico, de filtración en gel, de fase inversa, de hidroxapatita y afinidad; isoelectroenfoque; electroforesis en gel y combinaciones de estas y otras técnicas. Como se conoce generalmente en la técnica, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de purificación puede modificarse o que determinadas etapas pueden omitirse y aún así darán como resultado un procedimiento adecuado para la preparación de un polipéptido sustancialmente purificado.

Antagonistas de polinucleótidos

Los antagonistas de LPET y otras citocinas profibróticas incluyen antagonistas que impiden o reducen la expresión de la citocina o de su receptor. Estos incluyen oligonucleótidos antisentido o con sentido que comprenden una secuencia de polinucleótidos monocatenaria (ARN o ADN) que puede unirse a secuencias diana de ARNm (sentido) o ADN (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o con sentido, comprenden fragmentos de la secuencia de polinucleótidos diana que codifica a la citocina o a su receptor. Dicho fragmento generalmente comprende al menos aproximadamente 14 nucleótidos, típicamente de aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos. Por ejemplo, Stein y Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988), y van der Krol y col. (BioTechniques 6:958,1988), describen como obtener un oligonucleótido antisentido o con sentido, basándose en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína determinada. La unión de oligonucleótidos antisentido o con sentido a secuencias de ácidos nucleicos diana da como resultado la formación de dúplex que bloquean o inhiben la expresión de proteínas mediante uno de diversos medios, que incluyen degradación potenciada del ARNm por RNAsa H, inhibición de corte y empalme, terminación prematura de la transcripción o traducción, o por otros medios. Por tanto, los oligonucleótidos antisentido pueden usarse para bloquear la expresión de proteínas. Los oligonucleótidos antisentido o con sentido comprenden adicionalmente oligonucleótidos que tienen estructuras de azúcar-fosfodiéster modificadas (u otros enlaces de azúcar, tales como los descritos en el documento WO 91/06629) y en los que dichos enlaces de azúcar son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con enlaces de azúcar

resistentes son estables *in vivo* (es decir, pueden resistir la degradación enzimática), pero conservan la especificidad de secuencia para poder unirse a secuencias de nucleótidos diana.

5 Otros ejemplos de oligonucleótidos con sentido o antisentido incluyen aquellos oligonucleótidos que se unen covalentemente a restos orgánicos, tales como los descritos en el documento WO 90/10448, y otros restos que aumentan la afinidad del oligonucleótido para una secuencia de ácido nucleico diana, tal como poli-(L)-lisina. Adicionalmente aún, agentes intercalantes, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos pueden unirse a oligonucleótidos con sentido o antisentido para modificar especificidades de unión del oligonucleótido antisentido o con sentido para la secuencia de nucleótidos diana.

10 Los oligonucleótidos antisentido o con sentido pueden introducirse en una célula que contiene el ácido nucleico diana mediante cualquier procedimiento de transferencia de genes, incluyendo, por ejemplo, lipofección, transfección de ADN mediada por CaPO_4 , electroporación o usando vectores de transferencia de genes tales como virus de Epstein-Barr o adenovirus.

15 Los oligonucleótidos con sentido o antisentido también pueden introducirse en una célula que contiene el ácido nucleico diana mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión a ligando, como se describe en el documento WO 91/04753. Las moléculas de unión a ligando adecuadas incluyen, pero sin limitación, receptores en la superficie de las células, factores de crecimiento, otras citocinas, u otros ligandos que se unen a receptores en la superficie de las células. Preferentemente, la conjugación de la molécula de unión a ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión a ligando para unirse a su molécula o receptor correspondiente o para bloquear la entrada en la célula del oligonucleótido con sentido o antisentido o su versión conjugada.

20 Como alternativa, un oligonucleótido con sentido o antisentido puede introducirse en una célula que contiene el ácido nucleico diana mediante la formación de un complejo lípido-oligonucleótido, como se describe en el documento WO 90/10448. Preferentemente, dentro de la célula, una lipasa endógena disocia el complejo lípido-oligonucleótido con sentido o antisentido.

25 Otros procedimientos para impedir la expresión de citocinas o receptores de citocinas diana es la interferencia de ARN o ARN producido por la introducción de ARN bicatenario (ARNbc) específico, como se describe, por ejemplo, en Boshier y col., Nature Cell Biol 2, E31-E36 (2000).

Composiciones Farmacéuticas

30 Las composiciones farmacéuticas que contienen uno o más antagonistas de LPET de acuerdo con la presente invención se encuentran dentro del ámbito de la presente invención. Se proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que contienen uno o más antagonistas de LPET además de antagonistas contra factores profibróticos. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de cada antagonista en mezcla con materiales farmacéuticamente aceptables. Una cantidad eficaz, como se usa en el presente documento, es una cantidad suficiente para tratar un sujeto que padece un trastorno fibrótico. Típicamente, los antagonistas se purificarán suficientemente para la administración a un animal.

35 La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, transparencia, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); agentes antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o sulfito sódico de hidrógeno), tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, otros ácidos orgánicos); agentes formadores de volumen (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiamina tetraacético (EDTA)); agentes formadores de complejos (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa o dextrinas);
40 proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes; saporíferos y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sales (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol);
45 agentes de suspensión; agentes tensioactivos o humectantes (tal como pluronics, PEG, ésteres de sorbitan, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos (preferentemente cloruro de sodio o de potasio, sorbitol manitol); vehículos para la administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990).

50 Un experto en la materia determinará la composición farmacéutica óptima dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración deseada, formato de administración y dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, anteriormente. Dichas composiciones pueden afectar al estado físico, estabilidad,

velocidad de liberación *in vivo*, y velocidad de eliminación *in vivo* de la molécula terapéutica.

En una composición farmacéutica, el vehículo o transportador primario puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o transportador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales habituales en las composiciones para la administración parenteral. Otros vehículos ejemplares son solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero. Otras composiciones farmacéuticas ejemplares comprenden tampón Tris con un pH de aproximadamente 7,0-8,5, o tampón de acetato con un pH de aproximadamente 4,5-5,5, que adicionalmente puede incluir sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En una realización de la presente invención, las composiciones antagónicas pueden prepararse para almacenamiento mezclando la composición seleccionada, que tiene un grado de pureza deseado, con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, anteriormente) en forma de una masa liofilizada o una solución acuosa. Además, el antagonista terapéutico puede formularse como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas pueden seleccionarse para la afección a tratar. El tratamiento de trastornos fibróticos puede administrarse, por ejemplo, por vía tópica oral o por inyección. Como alternativa, las composiciones pueden administrarse, por ejemplo, mediante terapia por inhalación, por vía oral o por inyección. La preparación de dichas composiciones farmacéuticamente aceptables se incluye en la metodología de la técnica.

Los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables en el sitio de administración. Por ejemplo, se usan tampones para mantener la composición a un pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso en la presente invención pueden estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, sin pirógeno, que comprende el antagonista deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente aceptable para inyección parenteral es agua estéril destilada en la que se formula un antagonista como una solución isotónica, estéril, conservada adecuadamente. Otra preparación adicional puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (ácido poliláctico, ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que proporcionan la liberación controlada o prolongada del producto que después puede proporcionarse mediante una inyección de liberación prolongada. También puede usarse ácido hialurónico y este puede tener el efecto de promover una duración prolongada en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos implantables de administración de fármacos.

En otro aspecto, las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer o solución salina fisiológicamente tamponada. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones oleaginosas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como etil oleato, triglicéridos o liposomas. Para la administración también pueden usarse polímeros poli-amino catiónicos no lipídicos. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados para aumentar la solubilidad de los compuestos y permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. En otra realización, para inhalación, puede formularse una composición farmacéutica. Por ejemplo, un antagonista puede formularse como un polvo seco para inhalación. Los antagonistas que incluyen soluciones de polipéptidos o moléculas de ácido nucleico para inhalación también pueden formularse con un propulsor para administrar por aerosol. En otra realización adicional, las soluciones pueden nebulizarse. La administración pulmonar se describe adicionalmente en la solicitud PCT N° PCT/US94/001875, que describe la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

También se contempla que determinadas formulaciones puedan administrarse por vía oral. En una realización de la presente invención, las moléculas que se administran de esta manera pueden formularse con o sin estos vehículos habitualmente usados en la preparación de compuestos de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, puede diseñarse una cápsula para liberar la parte activa de la formulación en el punto en el tracto gastrointestinal en el que la biodisponibilidad es máxima y la degradación pre-sistémica es mínima. Para facilitar la absorción de la molécula antagonista pueden incluirse agentes adicionales. También pueden emplearse diluyentes, saporíferos, ceras de punto de fusión bajo, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral también pueden formularse usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para administración oral. Dichos vehículos permiten formular las composiciones farmacéuticas como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares para ingestión por parte del paciente.

Las preparaciones farmacéuticas para el uso oral pueden obtenerse por medio de la combinación de compuestos activos con excipientes sólidos y procesando la mezcla de gránulos resultante (opcionalmente, después de moler)

5 para obtener núcleos de comprimidos o grageas. Si se desea, pueden añadirse auxiliares adecuados. Los excipientes adecuados incluyen cargas de hidratos de carbono o de proteínas, tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; almidón de maíz, de trigo, de arroz, de patata o de otras plantas; celulosa, tal como, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa de sodio; gomas, incluyendo goma arábica y tragacanto y proteínas, tales como gelatina y colágeno. Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar y ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

10 Pueden usarse núcleos de grageas junto con revestimientos adecuados, tales como soluciones de azúcar concentradas, que también pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Pueden añadirse materias colorantes o pigmentos a los revestimientos de los comprimidos o grageas para la identificación del producto o para distinguir la cantidad de compuesto activo, es decir, la dosificación.

15 Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral también incluyen cápsulas duras de gelatina así como cápsulas blandas de gelatina, selladas, y un revestimiento, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener ingredientes activos mezclados con cargas o aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o resuspenderse en líquidos adecuados, tales como ácidos grasos, líquidos o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

20 Otra composición farmacéutica puede incorporar una cantidad eficaz de antagonista en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Disolviendo los comprimidos en agua estéril u otro vehículo apropiado, las soluciones pueden prepararse en formas de dosis unitarias. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábica; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

25 Para los expertos en la materia, serán obvias composiciones farmacéuticas adicionales, incluyendo formulaciones que incorporan moléculas en formulaciones de administración prolongada o controlada. Los expertos en la materia también conocen técnicas para formular otros medios diversos de administración controlada o prolongada, tales como transportadores liposomales, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de liberación prolongada. Véase, por ejemplo, el documento WO 9315722 que describe liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. Los ejemplos adicionales de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos con forma de, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación prolongada pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (documentos U. S. 3.773.919 y EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman y col., Biopolymers, 22:547-556 (1983), poli (2-hidroxiethyl-metacrilato) (Langer y col., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, (1981); Langer y col., Chem. Tech., 12:98-105(1982)), vinil acetato de etileno (Langer y col., anteriormente) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). Las composiciones de liberación prolongada también incluyen liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de los diversos procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Eppstein y col., PNAS (Estados Unidos), 82:3688 (1985); y los documentos EP 36.676; EP 88.046 y EP 143.949.

40 Las composiciones farmacéuticas que se usan para la administración *in vivo* deben ser típicamente estériles. Esto puede conseguirse por filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización, usando este procedimiento, puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. La composición para la administración parenteral puede conservarse en forma liofilizada o en solución. Además, las composiciones parenterales generalmente se incluyen en un envase que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial para solución intravenosa con un tapón perforable por una aguja para inyección hipodérmica.

50 Una vez formulada la composición farmacéutica, esta puede conservarse en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o un polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden conservarse en una forma lista para su uso o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiere la reconstitución antes de la administración.

Cada uno de los kits para producir una unidad de administración monodosis, puede contener un primer envase con una proteína seca y un segundo envase con una formulación acuosa. Los kits pueden contener jeringas sencillas o multi-cámara previamente cargadas (por ejemplo, jeringas para composiciones líquidas y jeringas para composiciones liofilizadas).

55 Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y de los objetivos terapéuticos. Por tanto, un experto en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, del síntoma para el cual se usa la molécula, de la vía de administración y del tamaño (peso corporal, superficie corporal y tamaño del órgano) y estado (edad y salud general) del paciente. Por consiguiente, el especialista clínico puede calcular la dosificación y

modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Los anticuerpos pueden inyectarse o administrarse preferentemente por vía intravenosa.

5 Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede calcularse inicialmente tanto en ensayos de cultivo de células como en modelos animales, tales como, ratones, ratas, conejos, perros, cerdos o monos. También puede usarse un modelo animal para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Después, dicha información puede usarse para determinar dosis y vías de administración útiles en seres humanos.

10 La dosificación exacta se determinará debido a factores relacionados con el tratamiento necesario para el sujeto. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del compuesto activo o para mantener el efecto deseado. Deben tenerse en cuenta factores que incluyen la gravedad de la afección inflamatoria, tanto si la afección es aguda o crónica, la salud general del sujeto, la edad, peso y el sexo del sujeto, el tiempo y la frecuencia de administración, la combinación (o combinaciones) del fármaco, sensibilidades en cuanto a la reacción, y respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada pueden administrarse cada 3 o 4 días, cada semana, o cada dos semanas dependiendo de la semivida y velocidad de eliminación de la formulación particular.

15 La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula antagonista terapéutica en la formulación usada. Típicamente, se administra una composición hasta que se alcanza una dosificación que consiga el efecto deseado. La composición por lo tanto puede administrarse como una monodosis o como dosis múltiples (a las mismas concentraciones/dosificaciones o diferentes) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua. Adicionalmente, el perfeccionamiento de la dosificación apropiada se realiza de manera rutinaria. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante el uso de datos de respuesta a dosis apropiados. Además, las composiciones pueden administrarse de manera profiláctica.

20 La vía de administración de la composición farmacéutica coincide con procedimientos conocidos, por ejemplo vía oral, mediante inyección por administración intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, intralesional, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, uretral, vaginal o rectal, sistemas de liberación prolongada o por implante de dispositivos. Cuando se desee, las composiciones pueden administrarse por inyección en embolada o de manera continua por infusión o por implante de un dispositivo.

25 De manera alternativa o adicional, la composición puede administrarse por vía local mediante implante de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado y la administración de la molécula deseada puede realizarse mediante difusión, bolo de liberación temporalizada o administración continua.

30 En algunos casos, un antagonista de la presente invención puede administrarse implantando determinadas células que se han modificado genéticamente, usando procedimientos tales como los descritos en el presente documento, para expresar y secretar el polipéptido. Dichas células pueden ser células de animales o de seres humanos y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. Opcionalmente, las células pueden inmortalizarse. Para disminuir el riesgo de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para impedir la infiltración de tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son típicamente cápsulas o membranas poliméricas biocompatibles, semipermeables que permiten la liberación del producto (o productos) proteicos pero impiden que el sistema inmunológico del paciente u otros factores perjudiciales destruyan las células procedentes de los tejidos circundantes.

35 Las composiciones farmacéuticas que contienen los antagonistas terapéuticos de la presente invención se administran a un sujeto que padece un trastorno fibrótico para prevenir o reducir la fibrosis en el sujeto. Los trastornos fibróticos incluyen esclerodermia local y sistémica, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis producida por hepatitis B o C crónica, fibrosis inducida por radiación y fibrosis producida por cicatrización de heridas.

Habiéndose descrito la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos a modo ilustrativo y no limitativo.

Ejemplo

50 De acuerdo con el siguiente protocolo, se administró LPET murina (R&D Systems) a 15 ratones hembra Balb/c de 8 semanas (Charles River). Los ratones se dividieron en tres grupos de 5 ratones cada uno. El Grupo 1 recibió una inyección tres veces a la semana durante una semana (tres inyecciones en total); el Grupo 2 recibió una inyección tres veces a la semana durante dos semanas (seis inyecciones en total) y el Grupo 3 recibió una inyección tres veces a la semana durante seis semanas (18 inyecciones en total). La inyección a los ratones fue por vía intradérmica con 10 ug de LPET en 100 ul de PBS en el costado izquierdo y como control 100 ul de PBS en el costado derecho. Setenta y dos horas después de la inyección final, los animales se anestesiaron, se realizaron extracciones sanguíneas terminales y el suero se aisló para un análisis futuro. La dermis se recuperó, se fijó en formalina y se preparó en portaobjetos para tinción con H y E (Hematoxilina y Eosina) para evaluación patológica.

5 El examen histopatológico determinó que después de una o dos semanas de inyecciones intradérmicas de muLPET, la piel de los ratones contenía infiltrados de células mononucleares y eosinófilos en la hipodermis, con extensión en el músculo del tronco cutáneo y solapamiento adiposo. Los sitios tratados con LPET también mostraron edema leve a moderado e hiperplasia epitelial mínima a moderada en la piel. Sin embargo, las secciones de piel a las que se había inyectado PBS solo mostraron infiltrados mínimos de células mononucleares y eosinófilos en los sitios de inyección. Las lesiones en la piel tendieron de ser multifocales a localmente amplias. La gravedad de la lesión aumentó con el aumento de la duración del tratamiento. Sin embargo, después de 6 semanas de inyecciones, la piel a la que se inyectó LPET no presentó síntomas de desarrollo de escamosidades ni lesiones.

10 Las secciones de piel se tiñeron con tricrómico de Masson, que tiñe el colágeno de verde. La tinción mostró que a las dos semanas el colágeno comenzaba a depositarse en la piel tratada con LPET frente a la tratada con PBS. Este depósito de colágeno no se observó durante una semana, pero apareció a las dos y seis semanas.

15 La histopatología mostró que después de seis semanas de administración intradérmica de muLPET, la hipodermis contenía infiltrados difusos de moderados a graves de células mononucleares y eosinófilos; la dermis contenía mastocitos, eosinófilos y células mononucleares y el epitelio era ligeramente hiperplásico. La piel a la que se le inyectó PBS solo mostró infiltrados difusos de células mononucleares y eosinófilos en la dermis, posiblemente causado por una reacción sistémica de muLPET o inespecífica frente a inyecciones repetidas.

20 A las seis semanas de tratamiento con LPET se produjo fibrosis moderada en la hipodermis, caracterizada por proliferación de fibroblastos y deposición de colágeno. Esta observación se confirmó con tinción con tricrómica. En la hipodermis tratada con PBS, no se observó proliferación de fibroblastos ni deposición de colágeno. La tinción de muestras tomadas a las seis semanas mostró un número aumentado de mastocitos en la dermis de piel inflamada a la que se inyectó muLPET en relación con una población escasa de mastocitos en la dermis de la piel tratada con PBS.

25 A continuación, en las Tablas 2 a 5, se muestra un resumen de los resultados de la patología para la piel de los ratones tratados con LPET durante 1 semana, 2 semanas, y 6 semanas después de 3 inyecciones a la semana en comparación con la piel de los ratones tratados con PBS a las 6 semanas.

Tabla 2: tratamiento con LPET, 1 semana

Tratamiento Animal N°	Grupo 1						
	LPET, 1 semana						
	1-1	1-2†	1-3†	1-4†	1-5	Media	ET
Inflamación	0	3	1	2	0	1,2	0,6
Neutrófilos	0	1	1	1	0	0,6	0,2
Células mononucleares	0	3	1	2	0	1,2	0,6
Eosinófilos	0	3	1	2	0	1,2	0,6
Edema	0	2	2	2	0	1,2	0,5
Hiperplasia epitelial	0	2	1	1	0	0,8	0,4
*Total	0	7	4	5	0		
*Puntuación Media del Grupo						3,2	1,4

Tabla 3: tratamiento con LPET, 2 semanas

Tratamiento Animal N°	Grupo 2						
	LPET, 2 semanas						
	2-1	2-2†	2-3†	2-4†	2-5	Media	ET
Inflamación	3	2	2	3	4	2,8	0,4
Neutrófilos	1	1	1	1	1	1,0	0,0
Células mononucleares	3	2	2	3	4	2,8	0,4
Eosinófilos	3	2	2	3	4	2,8	0,4
Edema	2	2	2	2	3	2,2	0,2
Hiperplasia epitelial	1	1	2	2	2	1,6	0,2
*Total	6	5	6	7	9		
*Puntuación media del grupo						6,6	0,7

Tabla 4: tratamiento con LPET, 6 semanas

Tratamiento Animal N°	Grupo 3A						
	LPET, 6 semanas						
	3-1	3-2†	3-3†	3-4†	3-5	Media	ET
Inflamación	3	3	4	4	3	3,4	0,2
Neutrófilos	1	1	2	1	1	1,2	0,2
Células mononucleares	3	3	4	4	3	3,4	0,2
Eosinófilos	2	2	3	3	2	2,4	0,2
Edema	2	2	3	3	2	2,4	0,2
Hiperplasia epitelial	2	2	3	3	2	2,4	0,2
Fibrosis, subcuticular	3	3	3	3	3	3,0	0,0
*Total	10	10	13	13	10		
*Puntuación media del grupo						11,2	0,7

Tabla 5: control con PBS, 6 semanas

Tratamiento Animal N°	Grupo 3 B						
	PBS 6 semanas						
	3-1	3-2†	3-3†	3-4†	3-5	Media	ET
Inflamación	2	1	1	1	2	1,4	0,2
Neutrófilos	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Células mononucleares	2	1	1	1	2	1,4	0,2
Eosinófilos	2	1	1	1	2	1,4	0,2
Edema	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Hiperplasia epitelial	2	1	0	0	2	1,0	0,4
Fibrosis, subcuticular	0	1	0	0	0	0,2	0,2
*Total	4	3	1	1	4		
Códigos y símbolos 0 = Sin hallazgos 1 = Mínimo 2 = Leve 3 = Moderado 4 = Marcado * = Se excluyen las puntuaciones de componentes de inflamación celular (neutrófilos, células mononucleares, eosinófilos) † = Infiltrado celular mixto y edema en hipodermis							

- 5 Estos resultados demuestran que la inyección de LPET purificada en la piel de ratones conduce a acumulación sub-epitelial de fibroblastos y deposición de colágeno tan pronto como dos semanas después de la inyección. Esta respuesta aumenta durante el transcurso de seis semanas y viene acompañada por engrosamiento de la piel, edema y acumulación celular significativa en la epidermis, dermis e hipodermis. Esta respuesta demuestra la participación de la LPET en la promoción de enfermedad fibrótica.
- 10 En un experimento complementario, se trataron cinco grupos de ratones hembra Balb/c de 8 semanas (Charles River) de acuerdo con el siguiente protocolo. Cada grupo contenía 5 ratones. Los grupos recibieron inyecciones por vía intradérmica en distintas partes del dorso con un volumen total de 100 ul, como se ha descrito anteriormente. El Grupo 1 recibió una inyección durante una semana (1 inyección en total) de 10 ug de ASR (albúmina de suero de ratón, como un control negativo) 10 ug de LPET y PBS en distintas partes del dorso. Al Grupo 2 se le inyectaron, una vez a la semana durante dos semanas (2 inyecciones en total), 10 ug de ASR, 10 ug de LPET y PBS en distintas partes del dorso. Al Grupo 3 se le inyectaron, 3 veces a la semana durante dos semanas (6 inyecciones en total), 10 ug de ASR, 10 ug de LPET, y PBS en distintas partes del dorso. Al Grupo 4 se le inyectó, tres veces a la semana durante dos semanas (6 inyecciones en total), 1 ug de ASR, 1 ug de LPET y PBS en distintas partes del

5 dorso. Al Grupo 5 se le inyectó, 3 veces a la semana durante dos semanas (6 inyecciones en total), 0,1 ug de ASR, 0,1 ug de LPET y PBS en distintas partes del dorso. Setenta y dos horas después de la inyección final, los animales de cada grupo se sacrificaron, se extrajo la piel, se fijó en formalina y se preparó en portaobjetos para tinción con H y E para evaluación patológica. En una escala de 1 a 4, se puntuó la aparición de fibrosis subcuticular en las muestras de piel. La fibrosis se puntuó visualmente basándose en la acumulación de fibroblastos en la región subcuticular de las secciones de piel. Los resultados se proporcionan en las Figuras 1 y 2. Como se observa en la Figura 1, la única dosificación semanal de LPET durante una semana (Figura 1A, Grupo 1) o durante dos semanas (Figura 1B, Grupo 2) no dio como resultado la aparición de fibrosis. Como se observa en la Figura 2, la dosificación de 10 ug de LPET administrada tres veces a la semana durante dos semanas (Grupo 3) indujo el mayor grado de fibrosis observado en la piel, dando como resultado una puntuación de 3. Como se observa en la Figura 2B, la dosificación de 1 ug de LPET administrada tres veces a la semana durante dos semanas (Grupo 4) dio como resultado una puntuación de 2 y, como se observa en la Figura 2C, la dosificación de 0,1 ug de LPET administrada tres veces a la semana durante dos semanas (Grupo 5) dio como resultado una puntuación de 1. El control solo con ASR y PBS no indujo ningún síntoma de fibrosis en la piel de los ratones en ninguno de los grupos, excepto un animal con una puntuación de 1 para PBS en el Grupo 4 (Figura 2C). Este segundo experimento demuestra que la LPET induce fibrosis en animales de una manera dependiente de la dosis.

10

15

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> AMGEN INC.
 Comeau, Michael, R.
 Fitzpatrick, David R.
 <120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS
 FIBRÓTICOS
 <130> A-958 (WO)
 <140> A asignar
 10 <141> 1-2-2006
 <150> US 60/649.287
 <151> 1-2-2005
 <160> 4
 <170> PatentIn versión 3.3
 15 <210> 1
 <211> 743
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 20 <221> CDS
 <222> (200)..(676)
 <400> 1

```

gcagccagaa agctctggag catcagggag actccaactt aaggcaacag catgggtgaa      60
taagggcttc ctgtggactg gcaatgagag gcaaaacctg gtgcttgagc actggcccct      120
aaggcaggcc ttacagatct cttacactcg tgggtgggaag agtttagtgt gaaactgggg      180
tggaattggg tgtccacgt atg ttc cct ttt gcc tta cta tat gtt ctg tca      232
                Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser
                1                    5                    10

gtt tct ttc agg aaa atc ttc atc tta caa ctt gta ggg ctg gtg tta      280
Val Ser Phe Arg Lys Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu
                15                    20                    25

act tac gac ttc act aac tgt gac ttt gag aag att aaa gca gcc tat      328
Thr Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr
                30                    35                    40

ctc agt act att tct aaa gac ctg att aca tat atg agt ggg acc aaa      376
Leu Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys
                45                    50                    55

agt acc gag ttc aac aac acc gtc tct tgt agc aat cgg cca cat tgc      424
Ser Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys
                60                    65                    70                    75

ctt act gaa atc cag agc cta acc ttc aat ccc acc gcc ggc tgc gcg      472
Leu Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala
                80                    85                    90

tcg ctc gcc aaa gaa atg ttc gcc atg aaa act aag gct gcc tta gct      520
Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala
                95                    100                    105

atc tgg tgc cca ggc tat tcg gaa act cag ata aat gct act cag gca      568
Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala
                110                    115                    120

atg aag aag agg aga aaa agg aaa gtc aca acc aat aaa tgt ctg gaa      616
Met Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu
                125                    130                    135

caa gtg tca caa tta caa gga ttg tgg cgt cgc ttc aat cga cct tta      664
Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu
                140                    145                    150                    155

ctg aaa caa cag taaaccatct ttattatggt catatttcac agocccaaat      716
Leu Lys Gln Gln

aatcatctt tattaagtaa aaaaaaa      743

```

<210> 2
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

5

ES 2 363 162 T3

Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser Val Ser Phe Arg Lys
 1 5 10 15

Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr
 20 25 30

Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser
 35 40 45

Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn
 50 55 60

Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln
 65 70 75 80

Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu
 85 90 95

Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly
 100 105 110

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg
 115 120 125

Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu
 130 135 140

Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln
 145 150 155

5 <210> 3
 <211> 1116
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1116)

10 <220>
 <221> péptido de señal
 <222> (1)..(66)
 <220>

15 <221> misc_feature
 <222> (694)..(756)
 <400> 3

ES 2 363 162 T3

atg ggg cgg ctg gtt ctg ctg tgg gga gct gcc gtc ttt ctg ctg gga	48
Met Gly Arg Leu Val Leu Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe Leu Leu Gly	
1 5 10 15	
ggc tgg atg gct ttg ggg caa gga gga gca gca gaa gga gta cag att	96
Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly Val Gln Ile	
20 25 30	
cag atc atc tac ttc aat tta gaa acc gtg cag gtg aca tgg aat gcc	144
Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp Asn Ala	
35 40 45	
agc aaa tac tcc agg acc aac ctg act ttc cac tac aga ttc aac ggt	192
Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe Asn Gly	
50 55 60	
gat gag gcc tat gac cag tgc acc aac tac ctt ctc cag gaa ggt cac	240
Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His	
65 70 75 80	
act tca ggg tgc ctc cta gac gca gag cag cga gac gac att ctc tat	288
Thr Ser Gly Cys Leu Leu Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp Ile Leu Tyr	
85 90 95	
ttc tcc atc agg aat ggg acg cac ccc gtt ttc acc gca agt cgc tgg	336
Phe Ser Ile Arg Asn Gly Thr His Pro Val Phe Thr Ala Ser Arg Trp	
100 105 110	
atg gtt tat tac ctg aaa ccc agt tcc ccg aag cac gtg aga ttt tcg	384
Met Val Tyr Tyr Leu Lys Pro Ser Ser Pro Lys His Val Arg Phe Ser	
115 120 125	

tgg cat cag gat gca gtg acg gtg acg tgt tct gac ctg tcc tac ggg	432
Trp His Gln Asp Ala Val Thr Val Thr Cys Ser Asp Leu Ser Tyr Gly	
130 135 140	
gat ctc ctc tat gag gtt cag tac cgg agc ccc ttc gac acc gag tgg	480
Asp Leu Leu Tyr Glu Val Gln Tyr Arg Ser Pro Phe Asp Thr Glu Trp	
145 150 155 160	
cag tcc aaa cag gaa aat acc tgc aac gtc acc ata gaa ggc ttg gat	528
Gln Ser Lys Gln Glu Asn Thr Cys Asn Val Thr Ile Glu Gly Leu Asp	
165 170 175	
gcc gag aag tgt tac tct ttc tgg gtc agg gtg aag gct atg gag gat	576
Ala Glu Lys Cys Tyr Ser Phe Trp Val Arg Val Lys Ala Met Glu Asp	
180 185 190	
gta tat ggg cca gac aca tac cca agc gac tgg tca gag gtg aca tgc	624
Val Tyr Gly Pro Asp Thr Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu Val Thr Cys	
195 200 205	
tgg cag aga ggc gag att cgg gat gcc tgt gca gag aca cca acg cct	672
Trp Gln Arg Gly Glu Ile Arg Asp Ala Cys Ala Glu Thr Pro Thr Pro	
210 215 220	
ccc aaa cca aag ctg tcc aaa ttt att tta att tcc agc ctg gcc atc	720
Pro Lys Pro Lys Leu Ser Lys Phe Ile Leu Ile Ser Ser Leu Ala Ile	
225 230 235 240	
ctt ctg atg gtg tct ctc ctc ctt ctg tct tta tgg aaa tta tgg aga	768
Leu Leu Met Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Trp Lys Leu Trp Arg	
245 250 255	
gtg aag aag ttt ctc att ccc agc gtg cca gac ccg aaa tcc atc ttc	816
Val Lys Lys Phe Leu Ile Pro Ser Val Pro Asp Pro Lys Ser Ile Phe	
260 265 270	
ccc ggg ctc ttt gag ata cac caa ggg aac ttc cag gag tgg atc aca	864
Pro Gly Leu Phe Glu Ile His Gln Gly Asn Phe Gln Glu Trp Ile Thr	
275 280 285	
gac acc cag aac gtg gcc cac ctc cac aag atg gca ggt gca gag caa	912
Asp Thr Gln Asn Val Ala His Leu His Lys Met Ala Gly Ala Glu Gln	
290 295 300	
gaa agt ggc ccc gag gag ccc ctg gta gtc cag ttg gcc aag act gaa	960
Glu Ser Gly Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Gln Leu Ala Lys Thr Glu	
305 310 315 320	
gcc gag tct ccc agg atg ctg gac cca cag acc gag gag aaa gag gcc	1008
Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu Lys Glu Ala	
325 330 335	
tct ggg gga tcc ctc cag ctt ccc cac cag ccc ctc caa ggc ggt gat	1056
Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu Gln Gly Gly Asp	
340 345 350	
gtg gtc aca atc ggg ggc ttc acc ttt gtg atg aat gac cgc tcc tac	1104
Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn Asp Arg Ser Tyr	
355 360 365	
gtg gcg ttg tga	1116

Val Ala Leu
370

ES 2 363 162 T3

<210> 4
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

5

```

Met Gly Arg Leu Val Leu Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe Leu Leu Gly
 1                               5                               10                               15

Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly Val Gln Ile
                               20                               25                               30

Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp Asn Ala
 35                               40                               45

Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe Asn Gly
 50                               55                               60

Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His
 65                               70                               75                               80

Thr Ser Gly Cys Leu Leu Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp Ile Leu Tyr
                               85                               90                               95

Phe Ser Ile Arg Asn Gly Thr His Pro Val Phe Thr Ala Ser Arg Trp
                               100                              105                              110

Met Val Tyr Tyr Leu Lys Pro Ser Ser Pro Lys His Val Arg Phe Ser
 115                               120                               125

Trp His Gln Asp Ala Val Thr Val Thr Cys Ser Asp Leu Ser Tyr Gly
 130                               135                               140

Asp Leu Leu Tyr Glu Val Gln Tyr Arg Ser Pro Phe Asp Thr Glu Trp
 145                               150                               155                               160

Gln Ser Lys Gln Glu Asn Thr Cys Asn Val Thr Ile Glu Gly Leu Asp
                               165                               170                               175

Ala Glu Lys Cys Tyr Ser Phe Trp Val Arg Val Lys Ala Met Glu Asp
 180                               185                               190

Val Tyr Gly Pro Asp Thr Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu Val Thr Cys
 195                               200                               205
    
```

ES 2 363 162 T3

Trp Gln Arg Gly Glu Ile Arg Asp Ala Cys Ala Glu Thr Pro Thr Pro
 210 215 220

Pro Lys Pro Lys Leu Ser Lys Phe Ile Leu Ile Ser Ser Leu Ala Ile
 225 230 235 240

Leu Leu Met Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Trp Lys Leu Trp Arg
 245 250 255

Val Lys Lys Phe Leu Ile Pro Ser Val Pro Asp Pro Lys Ser Ile Phe
 260 265 270

Pro Gly Leu Phe Glu Ile His Gln Gly Asn Phe Gln Glu Trp Ile Thr
 275 280 285

Asp Thr Gln Asn Val Ala His Leu His Lys Met Ala Gly Ala Glu Gln
 290 295 300

Glu Ser Gly Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Gln Leu Ala Lys Thr Glu
 305 310 315 320

Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu Lys Glu Ala
 325 330 335

Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu Gln Gly Gly Asp
 340 345 350

Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn Asp Arg Ser Tyr
 355 360 365

Val Ala Leu
 370

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de la linfopoyetina estromal tímica (LPET) para su uso en reducir o prevenir fibrosis en un sujeto que padece un trastorno fibrótico, en el que el antagonista:
- 5 a) se une a la linfopoyetina estromal tímica o se une a un receptor de la linfopoyetina estromal tímica; y
b) se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un péptido o un polipéptido.
2. Un antagonista de la LPET, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona de un anticuerpo anti-LPET, un receptor soluble de la LPET y un heterodímero de un receptor soluble de IL-7/receptor de la LPET.
3. Un antagonista de la linfopoyetina estromal tímica, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que es un anticuerpo antagonista seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario o un fragmento de unión de anticuerpo.
- 10 4. Un agente de linfopoyetina estromal tímica, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el agente de unión del péptido o del polipéptido, el receptor soluble o receptor soluble heterodímero comprende adicionalmente un dominio Fc.
5. Un antagonista de la linfopoyetina estromal tímica, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antagonista es un antagonista de receptores de la linfopoyetina estromal tímica.
- 15 6. Un antagonista de la linfopoyetina estromal tímica, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en esclerodermia, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis resultante de una hepatitis B o C crónica, fibrosis inducida por radiación y fibrosis resultante de una cicatrización.
- 20 7. Un antagonista de la linfopoyetina estromal tímica, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso con un segundo antagonista de una citocina profibrótica, en el que la citocina se selecciona de factor de crecimiento transformante β (TGF- β), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-9 (IL-9), interleucina-13 (IL-13), factor de estimulación de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de crecimiento del tejido conjuntivo (FCTC), interleucina-6 (IL-6), oncostatina M (OSM), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), proteína 1 quimiotáctica de monocitos (CCL2/MCP-1) y quimiocina pulmonar y regulada por activación (CCL18/PARC).
- 25 8. Un antagonista de la linfopoyetina estromal tímica, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en forma de una composición farmacéutica, en la que el antagonista de la linfopoyetina estromal tímica se mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 9. El uso de un agente que reduce la cantidad o la actividad de la linfopoyetina estromal tímica en un tejido, en la fabricación de un medicamento para modular la acumulación de fibroblastos y deposición de colágeno en un sujeto que padece un trastorno fibrótico, en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-LPET, un receptor soluble de la LPET, un heterodímero de un receptor soluble de IL-7/receptor de la LPET, un oligonucleótido antisentido que reconoce a la LPET o a un receptor de la LPET y ARN interferente.
- 35 10. El uso de un agente de acuerdo con la reivindicación 9, en el que se reduce la cantidad de linfopoyetina estromal tímica o del receptor de la linfopoyetina estromal tímica.
11. El uso de un antagonista de la linfopoyetina estromal tímica en la fabricación de un medicamento para reducir o prevenir fibrosis en un sujeto que padece un trastorno fibrótico, en el que el antagonista:
- 40 a) se une a la linfopoyetina estromal tímica o se une a un receptor de la linfopoyetina estromal tímica; y
b) se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un péptido o un polipéptido.

Ajuste de la dosis de LPET por I.D: Grupo 2

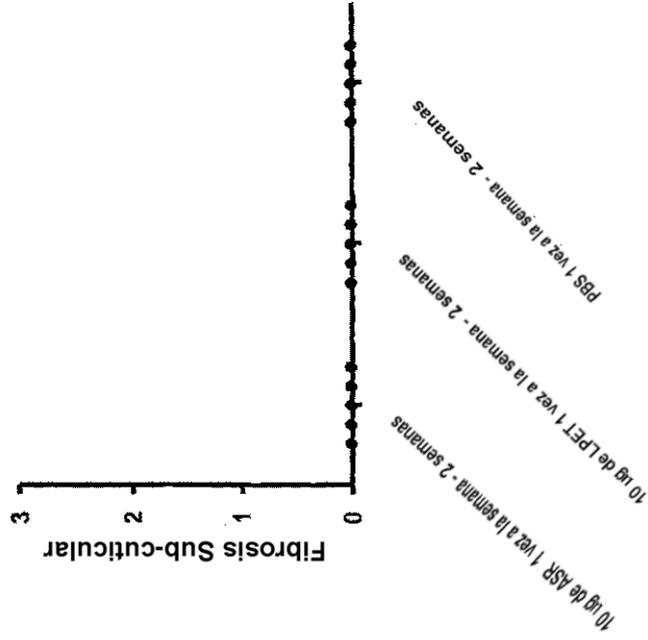


Figura 1B

Ajuste de la dosis de LPET por I.D: Grupo 1

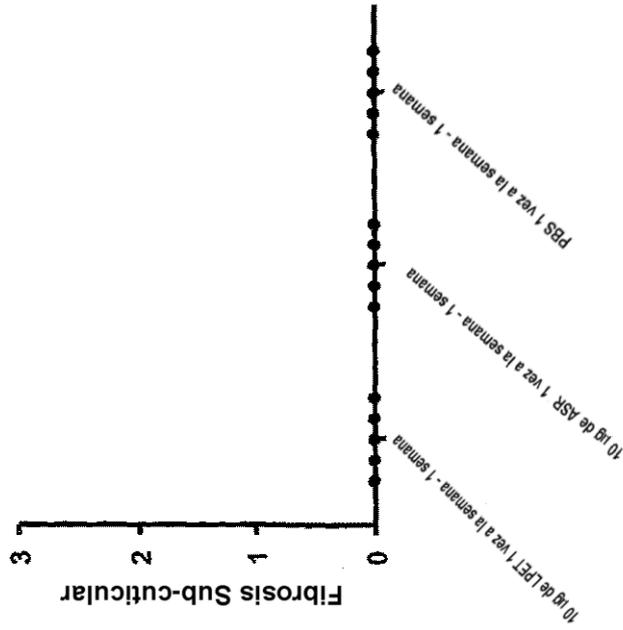


Figura 1A

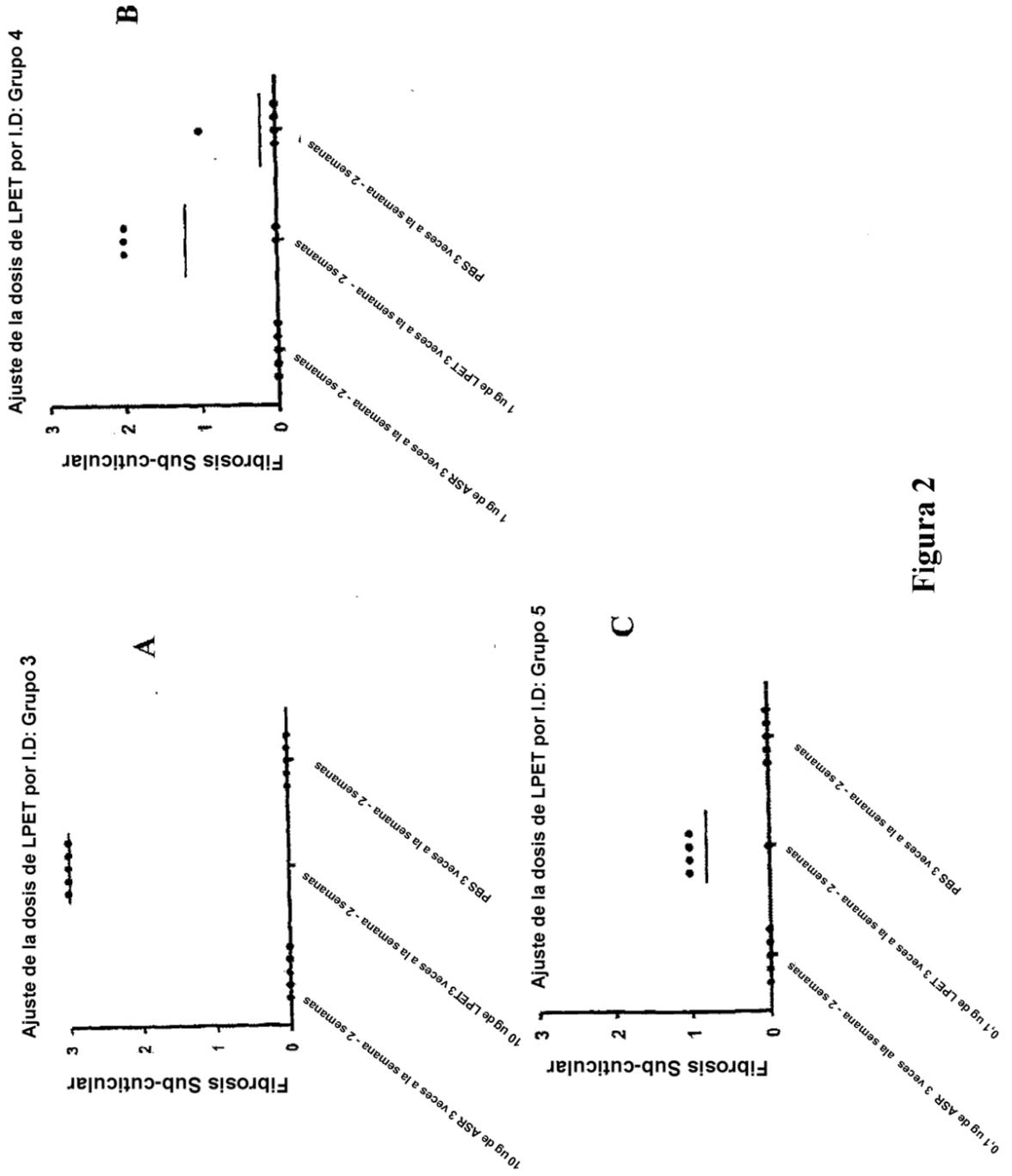


Figura 2