

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 756**

51 Int. Cl.:

A61K 31/401	(2006.01)	A61P 11/00	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)	A61P 13/00	(2006.01)
A61P 9/12	(2006.01)		
A61P 9/00	(2006.01)		
A61P 27/00	(2006.01)		
A61P 27/12	(2006.01)		
A61P 19/00	(2006.01)		
A61P 19/02	(2006.01)		
A61P 17/02	(2006.01)		
A61P 1/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2007 E 07862545 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 2094289**

54 Título: **Combinación de SAP y de enalapril para su uso en tratamiento de trastornos fibróticos o fibroproliferativos**

30 Prioridad:

04.12.2006 US 872730 P

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

27.06.2013

73 Titular/es:

**PROMEDIOR, INC. (100.0%)
371 PHOENIXVILLE PIKE
MALVERN, PA 19355, US**

72 Inventor/es:

PELURA, TIMOTHY J.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 409 756 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

Combinación de SAP y de enalapril para su uso en tratamiento de trastornos fibróticos o fibroproliferativos

5 Antecedentes de la invención

El proceso de reparación tisular como parte de la cicatrización implica dos fases. La primera fase es la fase regenerativa, en la que las células heridas se sustituyen por células del mismo tipo. La segunda fase es la formación de tejidos fibrosos, también llamada fibroplasia o fibrosis, en la que el tejido conjuntivo sustituye a tejidos parenquimatosos normales. El proceso de reparación tisular se puede volver patológico si la fase de fibrosis continúa sin restricción, lo que produce remodelación tisular extensiva y la formación de tejido cicatricial permanente.

Se ha estimado que hasta el 45% de las muertes en los Estados Unidos se pueden atribuir a enfermedades fibroproliferativas, que pueden afectar a muchos tejidos y sistemas de órganos. Las enfermedades fibróticas de los órganos principales incluyen enfermedad pulmonar intersticial (EPI), caracterizada por la inflamación y fibrosis pulmonares. Se sabe que la EPI tiene un número de causas tales como sarcoidosis, silicosis, enfermedades vasculares de colágeno y esclerodermia sistémica. Sin embargo, la fibrosis pulmonar idiopática, un tipo común de EPI, no tiene causa conocida. Los trastornos fibróticos de otros órganos incluyen cirrosis hepática, fibrosis hepática resultante de infección por hepatitis B o C crónica, enfermedad renal, cardiopatía, y enfermedades oculares incluyendo degeneración macular y retinopatía retiniana y vítrea. Los trastornos fibroproliferativos también incluyen esclerodermia sistémica y local, queloides y cicatrices hipertróficas, aterosclerosis y restenosis. Las enfermedades hiperproliferativas adicionales incluyen cicatrización excesiva resultante de cirugía, fibrosis inducida por fármacos quimioterapéuticos, fibrosis inducida por radiación y lesiones y quemaduras.

Actualmente, hay tratamientos disponibles para trastornos fibróticos incluyendo fármacos inmunosupresores generales, tales como corticosteroides, y otros tratamientos antiinflamatorios. Sin embargo, los mecanismos implicados en la regulación de la fibrosis parecen ser distintos de los de inflamación y las terapias antiinflamatorias no son siempre eficaces en la reducción o prevención de la fibrosis. Por tanto, permanece una necesidad para el desarrollo de tratamientos para reducir y prevenir la fibrosis y controlar trastornos fibróticos.

La cicatrización y los sucesos desregulados que producen fibrosis implican ambos la proliferación y diferenciación de fibroblastos y la acumulación de matriz extracelular. No está claro si estos fibroblastos derivan localmente o de una población precursora circulante. Los fibrocitos son una población distinta de células similares a fibroblastos derivados de monocitos de sangre periférica que entran en sitios de lesión tisular para fomentar la angiogénesis y la cicatrización.

Recientemente, se ha descrito que los monocitos de sangre periférica CD14[+] cultivados en ausencia de suero o plasma se diferencian a fibroblastos en 72 horas, pero que el amiloide P de suero (SAP) era capaz de inhibir la diferenciación a fibrocitos a niveles similares a los encontrados en plasma. En contraste, la eliminación de SAP reduce la capacidad del plasma de inhibir la diferenciación a fibrocitos. Comparados con sueros de individuos sanos y pacientes con artritis reumatoide, los sueros de pacientes con esclerodermia y enfermedad del tejido conjuntivo mixta, dos enfermedades fibróticas sistémicas, eran menos capaces de inhibir la diferenciación a fibrocitos in vitro y tenían igualmente niveles menores en suero de SAP. Estos resultados sugieren que los niveles bajos de SAP pueden aumentar, por tanto, los procesos patológicos que producen fibrosis. Estos datos también sugieren mecanismos para inhibir la fibrosis en afecciones inflamatorias crónicas, o a la inversa para fomentar la cicatrización.

Como SAP se une a los receptores de Fc para inmunoglobulina G (IgG; FcR), se demostró posteriormente que la activación de FcR era una señal inhibitoria para la diferenciación a fibrocitos. Los FcR se activan por IgG agregadas, y se ha mostrado que la IgG humana agregada, pero no monomérica, inhibe la diferenciación a fibrocitos humanos. Los anticuerpos monoclonales que se unen a FcRI (CD64) o FcRII (CD32) también inhiben la diferenciación a fibrocitos. La IgG agregada que carece de los dominios Fc o IgA, IgE o IgM agregadas no inhibe la diferenciación a fibrocitos. La incubación de monocitos con IgG agregada, como SAP, inhibe la diferenciación a fibrocitos. Usando inhibidores de enzimas proteínas quinasas, se ha mostrado que las tirosinas quinasas relacionadas con Syk y Src participan en la inhibición de la diferenciación a fibrocitos. Estas observaciones sugieren que la diferenciación a fibrocitos se puede producir en situaciones donde los niveles de SAP e IgG agregada son bajos, tal como la fase de resolución de la inflamación.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION

60 La invención se define mediante las reivindicaciones.

Se describe el uso de terapias conjuntas para tratar trastornos fibróticos y fibroproliferativos, que implican la administración de una combinación de agentes que suprimen la formación de fibrocitos ("supresores de fibrocitos") con agentes que inhiben la activación de células productoras de colágeno residentes tales como fibroblastos, miofibroblastos o miofibrocitos, tales como antagonistas de TGF- β y otros factores profibróticos (colectivamente "antagonistas de factores fibróticos", esto se puede sustituir con un agente antifibrótico.

El método y las composiciones descritas se pueden practicar usando tales supresores de fibrocitos como amiloide P de suero (SAP), IL-12, laminina-1, anticuerpos anti-FcγR que pueden entrecruzar FcγR, IgG agregada, IgG entrecruzada y/o combinaciones de los mismos. Las designaciones para "SAP", IL-12", "laminina-1", IgG y anticuerpos anti-FcγR como se usan en el presente documento también se refieren a fragmentos funcionales de estas proteínas a menos que esté claro que tales fragmentos se excluyen del uso en un contexto determinado. En un caso, el supresor de fibrocitos es un agente que induce apoptosis de monocitos, tal como un antagonista de IL-15. Según la invención el supresor de fibrocitos es SAP.

Los antagonistas de factores profibróticos descritos se pueden seleccionar de los antagonistas de factores de crecimiento peptídicos, citoquinas, quimioquinas y similares. Los ejemplos de tales factores que pueden estar antagonizados por los antagonistas del factor profibrótico objeto incluyen factor de crecimiento transformante de tipo beta (TGF-β), VEGF, EGF, PDGF, IGF, RANTES, miembros de la familia de interleuquina (por ejemplo, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-13), factor de necrosis tumoral de tipo alfa (TNF-α), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), proteína quimiotrayente de monocitos de tipo 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos (por ejemplo, MIP-1α, MIP-2), factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), endotelina-1, angiotensina-II, leptina, quimioquinas (por ejemplo, CCL2, CCL12, CXCL12, CXCR4, CCR3, CCR5, CCR7, SLC/CCL21), integrinas (por ejemplo, α1β1, α2β1, αvβ6, αvβ3), inhibidores tisulares de metaloproteínasa de matriz (por ejemplo, TIMP-1, TIMP-2) y otros factores que se sabe que fomentan o están relacionados con la formación, crecimiento o mantenimiento de tejido fibrótico.

Los antagonistas de factores profibróticos se pueden sustituir con, o aumentar con, una citoquina que se sabe que tiene efectos antifibróticos ella misma, tales como IFN-γ, BMP-7, HGF o IL-10.

Tales componentes del tratamiento combinado se pueden administrar en una localización diana como parte de una única formulación, en la que la formulación única incluye componentes que se dirigen a ambos sucesos. Los componentes se pueden administrar como formulaciones separadas.

Una disminución en o la supresión tanto de diferenciación de fibrocitos como la formación y mantenimiento de tejido fibrótico puede aliviar los síntomas de numerosas enfermedades fibrosantes u otros trastornos causados por fibrosis. Por ejemplo, se puede usar para tratar fibrosis en el hígado, riñón, pulmón, corazón y pericardio, ojo, piel, boca, páncreas, aparato digestivo, cerebro, mama, médula ósea, hueso, aparato genitourinario, un tumor o una herida.

También se describen métodos para modular la acumulación de fibroblastos y la acumulación de colágeno en un tejido.

Descripción detallada de las figuras

La figura 1 representa el grado de tinción tricrómica en un modelo de lesión de obstrucción unilateral de uréter (OUU) en riñón de rata.

Descripción detallada

I. Visión de conjunto

La regulación de sucesos que producen fibrosis implica al menos dos sucesos principales. Uno es la proliferación y diferenciación de fibrocitos. Los fibrocitos son una población distinta de células similares de fibroblastos derivados de monocitos de sangre periférica que normalmente penetran en los sitios de lesión tisular para fomentar la angiogénesis y la cicatrización. Los fibrocitos se diferencian a partir de monocitos de sangre periférica CD14+, y se pueden diferenciar de otras células PBMC. La presencia de SAP, IL-12, laminina-1, anticuerpos anti-FcγR, IgG entrecruzada y/o IgG agregada pueden inhibir o al menos retrasar parcialmente este proceso.

El segundo hecho principal es la formación de mantenimiento de tejido fibrótico. El tejido fibrótico se puede formar y mantener por el reclutamiento y proliferación de células fibroblastos, la formación de nueva matriz extracelular, y el crecimiento de tejido vascular nuevo. En fibrosis patológica, tal como después de inflamación crónica, lesión o fibrosis idiopática, es este exceso de tejido fibrótico el que puede producir daño y destrucción de tejido.

Ya que ambos de los sucesos anteriores son necesarios para la fibrosis, los tratamientos de la presente invención incluyen composiciones combinadas y métodos que se dirigen a ambos de estos sucesos. En formas de realización seleccionadas, la presente invención incluye al menos una composición, o la administración de la misma a una localización diana, que es adecuada para la inhibición o el retraso de la diferenciación de fibrocitos, y al menos un componente, o la administración del mismo a la localización diana, que es adecuado para la inhibición o el antagonismo de factores profibróticos. En formas de realización seleccionadas, estos componentes se pueden formular o administrar como una composición combinada, o se pueden administrar por separado y/o independientemente a las localizaciones diana.

Se describen métodos para el tratamiento de trastornos fibróticos y fibroproliferativos. El método generalmente implica administrar una cantidad eficaz de un supresor de fibrocitos en combinación con una cantidad eficaz de un antagonista de un factor profibrótico. Los métodos proporcionan el tratamiento de enfermedades fibróticas, incluyendo las que afectan a los pulmones, el hígado, el corazón, los riñones y los ojos. Para ilustrar adicionalmente, el método objeto se puede usar para tratar tales enfermedades fibroproliferativas como glomerulonefritis (GN); neuropatía diabética; fibrosis intersticial renal; fibrosis renal resultante de complicaciones de exposición a fármacos; nefropatía asociada al VIH; necropatía de trasplante; cirrosis hepática debido a todas las etiologías; trastornos del árbol biliar; disfunción hepática atribuible a infecciones; fibrosis pulmonar; síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); fibrosis pulmonar idiopática (FPI); lesión pulmonar aguda (LPA); fibrosis pulmonar debida a agentes infecciosos o tóxicos; insuficiencia cardiaca congestiva; cardiomiopatía dilatada; miocarditis; estenosis vascular; esclerosis sistémica progresiva; polimiositis; esclerodermia; enfermedad de Grave; dermatomiositis; fascitis; síndrome de Reynaud; artritis reumatoide; vitreoretinopatía proliferativa; fibrosis asociada con cirugía ocular; degeneración macular aguda; y cicatrización excesiva o hipertrófica o formación de queloides en la dermis que se produce durante la cicatrización resultante de traumatismo o heridas quirúrgicas. Aún otros trastornos fibróticos ejemplares que se pueden tratar con la terapia conjunta objeto se describen en más detalle posteriormente. La etiología se puede deber a cualquier agresión aguda o crónica incluyendo agentes tóxicos, metabólicos, genéticos e infecciosos.

Una cantidad eficaz del supresor de fibrocitos y una cantidad eficaz del antagonista de factor profibrótico pueden ser cantidades que, cuando se administran en terapia de combinación, son eficaces para reducir la fibrosis en al menos aproximadamente el 10%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o incluso al menos aproximadamente el 50%, o más, comparado con el grado de fibrosis en el individuo antes del tratamiento con la terapia de combinación.

También se describen métodos que implican administrar una combinación sinérgica de supresor de fibrocitos y antagonista de una citoquina profibrótica. Como se usa en el presente documento, “una combinación sinérgica” de supresor de fibrocitos y antagonista de una citoquina profibrótica es una dosis combinada que es más eficaz en el tratamiento terapéutico o profiláctico que la mejora incremental en el desenlace del tratamiento que se podría predecir o esperar de una combinación meramente aditiva de (i) el beneficio terapéutico o profiláctico de un supresor de fibrocitos cuando se administra a la misma dosis como una monoterapia y (ii) el beneficio terapéutico o profiláctico del antagonista de la citoquina profibrótica cuando se administra a la misma dosis como una monoterapia.

II. Definiciones

Como se usan en el presente documento, los términos “tratamiento”, “tratar” y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente un trastorno o un síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para un trastorno fibrótico o fibroproliferativo y/o efectos adversos atribuibles al trastorno. “Tratamiento”, como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) aumento del tiempo de supervivencia; (b) disminución del riesgo de muerte debido a la enfermedad; (c) prevenir que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero no ha sido diagnosticado aún como que la tiene; (d) inhibición de la enfermedad, es decir, parar su desarrollo (por ejemplo, reducir la velocidad de la progresión de la enfermedad); y (e) remediar la enfermedad, es decir, producir regresión de la enfermedad.

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 domesticados incluyendo perros, gatos, ovejas, ganado, cabras, cerdos, ratones, ratas, conejos, cobayas, animales cautivos tales como animales de zoo, y animales salvajes. Como se usa en el presente documento el término “tejido” se refiere a un órgano o conjunto de células especializadas tales como tejido de piel, tejido pulmonar, tejido renal, y otros tipos de células.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” quiere decir una cantidad de un supresor de fibrocitos o antagonista de un factor profibrótico, o una velocidad de administración de tales agentes terapéuticos, eficaz para facilitar un efecto terapéutico deseado. El efecto terapéutico deseado preciso variará según la afección fibrótica o fibroproliferativa que se va a tratar, la formulación que se va a administrar, y una variedad de otros factores que aprecian los expertos en la materia.

Como se usan en el presente documento los términos “trastorno fibroproliferativo” y “trastorno fibrótico” se refieren 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 un tejido fibroso como un proceso reparativo o reactivo, más que a un constituyente normal de un órgano o tejido. La fibrosis se caracteriza por la acumulación de fibroblastos y el depósito de colágeno en exceso del depósito normal en cualquier tejido particular. Como se usa en el presente documento el término “fibrosis” se usa de forma sinónima con “acumulación de fibroblastos y depósito de colágeno”. Los fibroblastos son células del tejido conjuntivo, que están dispersas en el tejido conjuntivo en 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 a un tejido,

los fibroblastos cercanos migran a la herida, proliferan y producen grandes cantidades de matriz extracelular colagenosa. El colágeno es una proteína fibrosa rica en glicina y prolina que un componente principal de la matriz extracelular y el tejido conjuntivo, cartílago y hueso. Las moléculas de colágeno son estructuras helicoidales tricatenarias llamadas cadenas α , que se enrollan unas alrededor de las otras en una hélice similar a un cuerda. El colágeno existe en varias formas o tipos; de estos, el tipo I, el más común, se encuentra en la piel, el tendón, y el hueso; y el tipo III se encuentra en la piel, los vasos sanguíneos y órganos internos.

Los trastornos fibróticos incluyen, pero no están limitados a, esclerodermia sistémica y local, queloides y cicatrices hipertróficas, aterosclerosis, restenosis, inflamación y fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, fibrosis como resultado de infección por hepatitis B o C crónica, enfermedad renal, cardiopatía resultante de tejido cicatricial, y enfermedades oculares tales como degeneración macular y retinopatía retiniana y vítrea. Las enfermedades fibróticas adicionales incluyen fibrosis resultante de fármacos quimioterapéuticos, fibrosis inducida por radiación, y lesiones y quemaduras.

“Esclerodermia” es un trastorno fibrótico caracterizado por un engrosamiento y endurecimiento de la piel causado por la sobreproducción de colágeno nuevo por los fibroblastos en la piel y otros órganos. La esclerodermia se puede producir como una enfermedad local o sistémica. La esclerodermia sistémica puede afectar a un número de 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 los tejidos subyacentes, especialmente de las manos y la cara. La enfermedad también se puede caracterizar por disfagia debido a la pérdida de peristaltismo y fibrosis submucosa del esófago, disnea debido a fibrosis pulmonar, fibrosis de miocardio y cambios vasculares renales. La fibrosis renal afecta del 30 al 70% de los pacientes de esclerodermia, con frecuencia produce enfermedad pulmonar restrictiva.

La “fibrosis pulmonar idiopática” es un trastorno pulmonar crónico, progresivo y habitualmente letal, que se piensa que es una consecuencia de un proceso inflamatorio crónico.

Como se usa en el presente documento el término “factores profibróticos” se refiere a citoquinas, factores de crecimiento o quimioquinas que se ha observado que fomentan la acumulación de fibroblastos y el depósito de colágeno en varios tejidos. Se ha descrito que un número de citoquinas y factores de crecimiento están implicados en la regulación de la remodelación de tejido y fibrosis. Estas incluyen las “citoquinas profibróticas” tales como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-5 (IL-5) e interleuquina-13 (IL-13), que se ha mostrado que estimulan la síntesis de colágeno y la fibrosis en tejidos fibróticos (Letterio et al. Ann Rev. Immunol. 16, 137-161 (1998), Fertin et al., Cell Mol. Biol. 37, 823-829 (1991), Doucet et al., J. Clin. Invest. 101, 2129-2139 (1998). Se ha mostrado que la interleuquina-9 (IL-9) induce fibrosis en las vías respiratorias en los pulmones de ratones (Zhu et al., J. Clin. Invest. 103, 779-788(1999)). Además de TGF- β , otras citoquinas o factores de crecimiento que se ha descrito que aumentan la fibrosis en el trastorno fibrótico fibrosis pulmonar idiopática (FPI) incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina-1- beta (IL-1 β), y el factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) (Kelly et al. Curr Pharmaceutical Des 9: 39-49 (2003)). Las citoquinas y factores de crecimiento descritos que están implicados en fomentar la fibrosis pulmonar que se produce en esclerodermia incluyen TGF- β , interleuquina-1 beta (IL-1 β), interleuquina-6 (IL-6), oncostatina M (OSM), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), las citoquinas de tipo 2 IL-4 e IL-13, IL-19, proteína quimiotáctica de monocitos 1 (CCL2/MCP-1) y quimioquina pulmonar y regulada por activación (CCL18/PARC) (Atamas et al., Cyto Growth Fact Rev 14: 537-550 (2003)).

Como se usa en el presente documento, los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos camelizados, anticuerpos monocatenarios o Fv monocatenarios (scFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por disulfuro (sdFv) e intracuerpos. Además, a menos de se indique de otra manera (tal como en el caso de IgG agregada), el término incluye fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulinas y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno. Las moléculas de inmunoglobulinas pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase o subclase.

Como se usan en el presente documento, los términos “Fv monocatenario” o “scFv” se refieren a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. En formas de realización específicas, los scFv incluyen scFv humanizados.

Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo humanizado” se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en la que residuos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, conejo o primate no

humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas de las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc) que se ha alterado mediante la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones). En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado es un derivado. Tal anticuerpo humanizado comprende sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos en una o más CDR humanas. El derivado de anticuerpo humanizado puede tener sustancialmente la misma unión, mejor unión o peor unión cuando se compara a un anticuerpo humanizado no derivado. En formas de realización específicas, uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos de aminoácidos de la CDR se han sustituido, deleccionado o añadido (es decir, mutado).

III. Descripción ejemplar

A. Supresores de proliferación y diferenciación de fibrocitos

Un componente de las terapias conjuntas de la presente divulgación, que comprende la invención, son agentes que suprimen la formación de fibrocitos. Estos supresores de fibrocitos, como se denominan genéricamente en el presente documento, son agentes que pueden actuar sobre los monocitos de sangre periférica CD14[+] de una manera que bien suprimen la formación de fibrocitos (por ejemplo, inhiben la diferenciación o proliferación), o en otras formas de realización, producen la ablación (muerte celular) de los monocitos.

En un caso de la presente divulgación, el supresor de fibrocitos puede ser un agente que produce la activación dependiente de FcγR de tirosinas quinasas relacionadas con Syk y Src en monocitos. En otro caso, el supresor de fibrocitos puede ser un agente que funciona después del complejo FcγR, lo que produce activación de tirosinas quinasas relacionadas con Syk y Src independiente de FcγR en monocitos de una manera que suprime la formación de fibrocitos. Varios activadores de molécula pequeña de la quinasa syk, tales como péptidos de fosfo-ITAM y peptidomiméticos de los mismos, pueden ser útiles para este fin.

El supresor de fibrocitos usado en la presente invención es:

(i) Amiloide P de suero

Se ha identificado previamente que los fibrocitos se pueden diferenciar a partir de monocitos de sangre periférica CD14+, y la presencia de suero humano retrasa drásticamente este proceso. El factor en el suero humano que inhibe la diferenciación de fibrocitos es el amiloide P de suero (SAP). SAP, un miembro de la familia pentraxina de proteínas que incluye proteína C-reactiva (CRP), se produce por el hígado, se secreta a la sangre y circula en la sangre como pentámeros estables. SAP se une a los receptores para la parte Fc de los anticuerpos IgG (FcγR) en una variedad de células y puede entrecruzar eficazmente FcγR sin proteínas adicionales ya que SAP es una proteína pentamérica con cinco sitios potenciales de unión a FcγR por molécula. Según se une SAP a FcγR, se inician los sucesos intracelulares de señalización consistentes con la activación de FcγR.

Las composiciones que contienen SAP pueden ser operables para aumentar la concentración de SAP en localizaciones diana hasta aproximadamente al menos 0,5 µg/ml. En seres humanos, se ha administrado previamente SAP radiomarcada con ¹²⁵I a pacientes de estudio con amiloidosis. En los tratamientos, se administraron aproximadamente 600 µg de SAP a un ser humano adulto. Según esto, la administración de aproximadamente 600 µg de SAP sistémicamente a un ser humano adulto es segura. Dosis mayores también pueden ser seguras en las condiciones apropiadas.

SAP suministrada en ciertas composiciones de la presente invención pueden incluir la proteína SAP entera o una parte de la misma, preferiblemente la parte funcional en la supresión de la formación de fibrocitos. En una forma de realización, la parte funcional de SAP se selecciona de la región que no comparte homología de secuencia con CRP, que no tiene efecto sobre la formación de fibrocitos. Por ejemplo, los aminoácidos 65-89 (KERVGEYSLYIGRHKVTPKVIKFP-SEQ ID NO.1) de SAP no son homólogos a CRP. Los aminoácidos 170-181 (ILSAYAYQGTPLPA-SEQ ID NO.2) y 192-205 (IRGYVIIKPLV-SEQ ID NO.3) tampoco son homólogos. Además se conocen un número de diferencias de aminoácidos únicos entre las dos proteínas y pueden producir diferencias funcionales.

Otros supresores de fibrocitos adecuados para su uso según la presente divulgación son:

(ii) IL-12

IL-12 se ha implicado previamente en fibrosis y enfermedades fibrosantes, pero la mayoría de los estudios se han enfocado en el papel de IL-12 en el fomento de la respuesta inmune Th1 o desencadenando la producción de interferón- γ .

- 5 Las composiciones que contienen IL-12 pueden ser operables para aumentar la concentración de IL-12 en localizaciones diana hasta aproximadamente de 0,1 a 10 ng/ml.

(iii) *Laminina-1*

- 10 Las lamininas son proteínas de la matriz extracelular implicadas en el movimiento de monocitos de la circulación en los tejidos. Para que los leucocitos penetren en los tejidos, deben cruzar a través de células endoteliales y la membrana basal circundante de la pared de los vasos sanguíneos. Este proceso implica el anclaje, rodadura y parada de los leucocitos sobre las células endoteliales. Después de la adhesión a las células endoteliales, los leucocitos cruzan entre las células endoteliales, a través de la pared de los vasos sanguíneos y dentro de los tejidos.
- 15 El proceso de extravasación de células a través de las paredes de los vasos sanguíneos altera su fenotipo y función.

Estos sucesos están controlados por una serie de receptores de adhesión de la superficie celular, incluyendo las integrinas. Las integrinas se unen a una amplia variedad de ligandos, incluyendo proteínas de la matriz extracelular (MEC), tales como fibronectina, vitronectina, colágeno y laminina. Las proteínas de la matriz están presentes en la base de la pared de los vasos sanguíneos, incluyendo las lamininas. Las lamininas son una gran familia de glicoproteínas, con una estructura heterotrimérica de cadenas α , β y γ . El uso de las diferentes cadenas α , β y γ produce la expresión de al menos 12 isoformas de lamininas diferentes. Las diferentes lamininas se expresan en diferentes estadios del desarrollo y en diferentes sitios en el cuerpo.

- 25 Las composiciones que contienen laminina-1 pueden ser operables para aumentar la concentración de laminina-1 en localizaciones diana hasta aproximadamente 1 a 10 μg .

(iv) *Anticuerpos anti-Fc γ R*

- 30 También se ha identificado que anticuerpos anti-Fc γ R pueden prevenir la diferenciación de monocitos de sangre periférica a fibrocitos. Los anticuerpos anti-Fc γ R son anticuerpos IgG que se unen a los receptores para la parte Fc de los anticuerpos IgG (Fc γ R). Los anticuerpos anti-Fc γ R se unen a través de su región variable, y no a través de su región constante (Fc). Sin embargo, IgG de la fuente apropiada (por ejemplo, IgG humana para receptores humanos) normalmente se puede unir a Fc γ R a través de su región Fc. Los Fc γ R se encuentran en la superficie de una variedad de células hematopoyéticas. Hay cuatro clases distintas de Fc γ R. Fc γ RI (CD64) es expresado por monocitos de sangre periférica y se une a IgG monomérica con una alta afinidad. Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16) son receptores de baja afinidad para IgG y solo se unen eficazmente a IgG agregada. Fc γ RII se expresa en células B y monocitos de sangre periférica, mientras que Fc γ RIII se expresa en células NK y una subpoblación de monocitos. Fc γ RIV se ha identificado recientemente en ratones y está presente en monocitos y neutrófilos de sangre periférica murina, macrófagos y células dendríticas y se une eficazmente a anticuerpos IgG2a e IgG2b murinos. Hay un gen putativo de Fc γ RIV humano, pero la función biológica de la proteína, tal como la especificidad de ligando y la expresión celular, es aún desconocida.

45 Los monocitos de sangre periférica expresan tanto Fc γ RI como Fc γ RII (una subpoblación de monocitos expresa Fc γ RIII), mientras que los macrófagos tisulares expresan los tres Fc γ R clásicos. El agrupamiento de Fc γ R en monocitos por IgG, bien unidas a patógenos o como parte de un complejo inmune, inicia una amplia variedad de sucesos bioquímicos.

50 La activación de Fc γ R y la inducción de rutas intracelulares de señalización se pueden producir cuando múltiples Fc γ R se entrecruzan o agregan. Esta activación de Fc γ R produce una cascada de sucesos de señalización iniciada por dos quinasas principales. Los sucesos iniciales después de la activación de Fc γ R implican la fosforilación de motivos de activación de tirosina del inmunorreceptor intracelular (ITAM) presentes en la cola citoplásmica de Fc γ RII o la cadena FcR- γ asociada con Fc γ RI y Fc γ RIII, por las tirosinas quinasas relacionadas con Src (SRTK). En monocitos, las principales quinasas Src asociadas con Fc γ RI y Fc γ RII son hck y lyn. Los ITAM fosforilados reclutan después quinasas que contienen SH2 citoplásmicas, especialmente Syk, hacia los ITAM y Syk activa entonces una serie de moléculas señalizadoras posteriores.

60 Los anticuerpos anti-Fc γ R para Fc γ RI (anti-Fc γ RI) y para Fc γ RII (anti-Fc γ RII) son capaces de unirse bien a Fc γ RI o Fc γ RII, respectivamente. Estos Fc γ R se pueden entrecruzar después mediante la unión de anticuerpos adicionales u otros medios. Este proceso inicia sucesos de señalización intracelular consistentes con la activación de Fc γ R.

Las composiciones que contienen anticuerpos anti-Fc γ RI y/o anticuerpos anti-Fc γ RII, y/o IgG entrecruzadas o agregadas, que se pueden unir a Fc γ R a través de la región Fc, se pueden usar para suprimir la diferenciación a fibrocitos en localizaciones inapropiadas y en trastornos fibrosantes y afecciones inflamatorias crónicas, entre otros.

65

Las composiciones que contienen aproximadamente 1 µg/ml de anticuerpos anti-FcγR pueden ser eficaces para inhibir la diferenciación de fibrocitos en aproximadamente el 50%. En otras formas de realización, las composiciones pueden contener una cantidad suficiente para administrar 1 µg/ml de anticuerpos anti-FcγR al tejido diana. En otras formas de realización específicas, las composiciones pueden contener tan poco como 0,1 µg/ml de IgG entrecruzada o agregada.

Los anticuerpos anti-FcγR se pueden administrar a una dosis de aproximadamente 1,0 µg/ml, en una cantidad suficiente para administrar 1 µg/ml de anticuerpos anti-FcγR al tejido diana, o en otra dosis suficiente para inhibir la diferenciación de fibrocitos sin causar una cantidad indeseable de muerte celular en el paciente. Se puede administrar IgG entrecruzada o agregada en una cantidad suficiente para administrar al menos 0,1 µg/ml de IgG al tejido diana, o en otra dosis suficiente para inhibir la diferenciación a fibrocitos sin causar una cantidad indeseable de muerte celular en el paciente.

Los anticuerpos anti-FcγR usados en los ejemplos de la presente divulgación incluyen anticuerpos anti-FcγRI y anticuerpos anti-FcγRII.

Los anticuerpos anti-FcγR pueden incluir cualquier isotipo de anticuerpo.

(v) *Dominios Fc agregados y anticuerpos que contienen Fc*

Las IgG entrecruzadas o agregadas pueden incluir cualquier IgG capaz de unirse al FcγR diana a través de su región Fc, siempre que al menos dos de tales anticuerpos IgG estén físicamente conectados entre sí.

Los anticuerpos de ambos tipos pueden incluir anticuerpos enteros o una parte de los mismos, preferiblemente la parte funcional en la supresión de la diferenciación a fibrocitos. Por ejemplo, pueden incluir cualquier parte de anticuerpo capaz de entrecruzar FcγR. Esto puede incluir anticuerpos agregados o entrecruzados o fragmentos de los mismos, tales como anticuerpos enteros, fragmentos F(ab')₂ y posible incluso fragmentos Fc agregados o entrecruzados.

La agregación o el entrecruzamiento de anticuerpos se pueden lograr por cualquier método conocido, tal como agregación por calor o química. Cualquier nivel de agregación o entrecruzamiento puede ser suficiente, aunque la agregación aumentada puede producir supresión de fibrocitos aumentada. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, tal como anticuerpos producidos a partir de células de hibridoma. Las composiciones o métodos pueden emplear mezclas de anticuerpos, tales como mezclas de anticuerpos monoclonales múltiples, que pueden estar entrecruzados o agregados a anticuerpos similares o diferentes.

(vi) *Antagonistas de interleuquina-15*

Los antagonistas de IL-15 abarcados por la presente invención incluyen una amplia variedad de moléculas que antagonizan o inhiben la actividad de IL-15 (es decir, anti-apoptosis mediada por IL-15) incluyendo, pero no limitados a, anticuerpos anti-IL-15, anticuerpos anti IL-i 5R, IL-15R solubles, muteínas de IL-15, moléculas pequeñas anti-IL-15 y moléculas pequeñas anti-IL-15R. Otros antagonistas, tales como proteínas de unión y peptidomiméticos, que son capaces de inhibir la actividad de IL-15, también están incluidos. En una forma de realización particular, el antagonista es capaz de interferir con el ensamblaje de las subunidades IL-15Rα, β y γ, por ejemplo, el antagonista se une a un epítipo localizado en el dominio de interacción de la cadena β o γ de IL-15. En otra forma de realización particular, el antagonista es una muteína de IL-15, por ejemplo, un mutante de IL-15 que es capaz de unirse a IL-15Rα pero que no es capaz de unirse a alguna o ambas de las subunidades β y/o γ de IL-15R y, por tanto, no es capaz de efectuar señalización.

B. Antagonistas de factores profibróticos

Otro componente de los agentes de las terapias conjuntas objeto que inhiben o antagonizan factores profibróticos, tales como agentes que antagonizan uno o más factores de crecimiento o citoquinas implicados en la formación o mantenimiento de tejido fibrótico. De esta manera, las composiciones y métodos se dirigen tanto a la diferenciación a fibrocitos como a la formación y mantenimiento del tejido fibrótico como parte de un tratamiento combinado.

Los factores profibróticos a los que se pueden dirigir los antagonistas como parte de las terapias de la presente invención incluyen, sin limitación sin limitación, un factor de crecimiento de tipo beta (TGF-β, incluyendo TGF-β1-5), VEGF, EGF, PDGF, IGF, RANTES, miembros de la familia de interleuquina (por ejemplo, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-13), factor de necrosis tumoral de tipo alfa (TNF-α), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), proteína quimiotrayente de monocitos de tipo 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos (por ejemplo, MIP-1α, MIP-2), factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), endotelina-1, angiotensina-II, leptina, quimioquinas (por ejemplo, CCL2, CCL12, CXCL12, CXCR4, CCR3, CCR5, CCR7, SLC/CCL21), integrinas (por ejemplo, α1β1, α2β1, αvβ6, αvβ3), inhibidores tisulares de metaloproteinasas de matriz (por ejemplo, TIMP-1, TIMP-2) y otros factores que se sabe fomentan o están relacionados con la formación,

crecimiento o mantenimiento de tejido fibrótico. También se describen composiciones o métodos que se dirigen a uno o más de los factores y citoquinas anteriores.

5 Un componente adecuado de la composición puede incluir anticuerpos dirigidos a uno más de los factores profibróticos. Tales anticuerpos pueden estar purificados, sin purificar o parcialmente purificados. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales, derivados de cualquier fuente animal adecuada, tal como ratón, conejo, rata, ser humano, caballo, cabra, bovino y similares. Tales anticuerpos pueden incluir fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos polimerizados, y similares.

10 Una composición adecuada puede incluir antagonistas del correspondiente receptor de uno o más de los factores profibróticos. Tales antagonistas pueden incluir formas inactivas de uno o más de los factores y/o citoquinas profibróticos, tales como fragmentos de los mismos. Tales formas en concentraciones adecuadas pueden competir con sus correspondientes factores y/o citoquinas profibróticos para la unión a su receptor. De forma similar, ciertos anticuerpos contra el receptor se pueden usar para interferir con o prevenir la unión al mismo de los correspondientes factores y/o citoquinas profibróticos.

15 Las composiciones pueden incluir formas solubles del receptor de uno o más factores y/o citoquinas profibróticos, de modo que el receptor soluble compita con su correspondiente receptor celular nativo por el ligando diana.

20 Los componentes adecuados de la composición pueden incluir compuestos que compiten con o de otra manera interfieren con la unión de uno o más de los factores y/o citoquinas profibróticos con su receptor. Por ejemplo, se sabe que el proteoglicano decorina se une a TGF- β , reduciendo de esta manera su disponibilidad para unirse a su receptor. También se sabe que la manosa-6-fosfato compite con TGF- β por la unión a su correspondiente receptor. Otros inhibidores de la unión de TGF- β conocidos incluyen la proteína de unión al factor de crecimiento transformante latente beta (LTBP) y el péptido asociado con latencia (LAP), ambos se unen nativamente al precursor intracelular de TGF- β .

30 Un componente adecuado de la composición puede incluir uno o más oligorribonucleótidos que contengan al menos una secuencia que sea antisentido con respecto a uno o más de los factores y/o citoquinas profibróticos. Tales componentes también pueden incluir uno o más plásmidos de expresión que tienen secuencias de control transcripcional adecuadas que producen secuencias antisentido. En un caso, un componente adecuado puede incluir uno o más oligorribonucleótidos bicatenarios, o plásmidos de expresión que codifican los mismos, que son adecuados para degradar transcritos de uno o más de los factores y/o citoquinas profibróticos a través de interferencia mediada por ARN.

35 Un antagonista de un factor profibrótico adecuado de la composición puede incluir componentes que se sabe que inhiben, atenúan o interfieren con uno o más componentes de las rutas de señalización intracelulares activadas por uno o más de los factores profibróticos tras la unión a su correspondiente receptor.

40 Por ejemplo, una composición puede incluir componentes que inhiben o atenúan moléculas de la ruta de señalización posteriores tales como miembros de la familia SMAD o SARA.

45 Un componente adecuado de la composición puede incluir una o más moléculas que sean adecuadas para inhibir o interferir con las adhesiones celulares requeridas para la fibrosis. Por ejemplo, un componente adecuado puede incluir anticuerpos de interferencia contra las moléculas ICAM y/o CD11, la matriz extracelular y/o integrina $\alpha 1\beta 1$, la matriz extracelular y/o integrina $\alpha 2\beta 1$, interfiriendo de esta manera con la interacción de adhesión entre ellas.

50 Un antagonista de un factor profibrótico adecuado puede incluir inhibidores de la síntesis de colágeno, tales como análogos de prolina que interfieren con el procesamiento postraduccional de los precursores de colágeno. Por ejemplo, pirfenidona es un fármaco de molécula pequeña activo por vía oral que puede inhibir la síntesis de colágeno, disminuir la producción de múltiples citoquinas y bloquear la proliferación de fibroblastos.

a. Antagonistas de TGF- β

55 Las citoquinas de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF) beta desempeñan un papel central en la cicatrización y en la reparación de tejidos, y se encuentran en todos los tejidos. TGF- β se produce por muchos tipos de células parenquimatosas, así como por células infiltrantes tales como linfocitos, monocitos/macrófagos y plaquetas. Después de una herida o inflamación, tales células son fuentes potenciales de TGF- β . En general, el TGF- β estimula la producción de varias proteínas de la matriz extracelular, inhibe la degradación de estas proteínas de la matriz, y fomenta fibrosis tisular, todos los cuales contribuyen a la reparación y restauración del tejido afectado. En muchas enfermedades, el TGF- β excesivo contribuye a un exceso patológico de fibrosis tisular que puede comprometer la función normal del órgano.

65 El término "TGF- β " como se usa en el presente documento incluye TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$, TGF- $\beta 3$, TGF- $\beta 4$ y TGF- $\beta 5$. También se incluyen otras proteínas relacionadas con propiedades similares.

Como se usa en el presente documento, un "antagonista de TGF- β " es cualquier molécula que sea capaz de disminuir la cantidad o actividad de TGF- β , bien dentro de una célula o dentro de un sistema fisiológico. Preferiblemente, el antagonista de TGF- β actúa para disminuir la cantidad o actividad de TGF- β 1, 2 o 3. Por ejemplo, un antagonista de TGF- β puede ser una molécula que inhibe la expresión de TGF- β a nivel de transcripción, traducción, procesamiento o transporte; puede afectar la estabilidad de TGF- β o la conversión de la molécula precursora a la forma activa, madura; puede afectar la capacidad de TGF- β de unirse a uno o más receptores celulares (por ejemplo, de tipo I, II o III); o puede interferir con la señalización de TGF- β .

En la técnica se conocen una variedad de antagonistas de TGF- β y métodos para su producción y muchos más están actualmente en desarrollo. El antagonista de TGF- β específico empleado no es una característica limitante; cualquier antagonista de TGF- β eficaz como se define en el presente documento puede ser útil en los métodos y composiciones de esta invención. Preferiblemente, el antagonista de TGF- β es un antagonista de TGF- β 1, TGF- β 2 o TGF- β 3. Lo más preferiblemente el antagonista es un antagonista de TGF- β 1.

Los ejemplos de antagonistas de TGF- β incluyen, pero no están limitados a: anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra una o más isoformas de TGF- β (Dasch et al., patente en EE UU No. 5.571.714; véanse también, los documentos WO 97/13844 y WO 00/66631); receptores de TGF- β , formas solubles de tales receptores (preferiblemente receptor TGF- β de tipo III soluble), o anticuerpos dirigidos contra receptores de TGF- β (Segarini et al., patente en EE UU No. 5.693.607; Lin et al., patente en EE UU No. 6.001.969, patente en EE UU No. 6.010.872, patente en EE UU No. 6.086.867, patente en EE UU No. 6.201.108; documentos WO 98/48024; WO 95/10610; WO 93/09223; WO 92/00330); péptido asociado a latencia (documento WO 91/08291); TGF- β latente grande (documento WO 94/09812); fetuína (patente en EE UU No. 5.821.227); decorina y otros proteoglicanos tales biglicano, fibromodulina, lumicano y endogлина (documento WO 91/10727; Ruoslahti et al., patente en EE UU No. 5.654.270, patente en EE UU No. 5.705.609, patente en EE UU No. 5.726.149; Border, patente en EE UU 5.824.655; documento WO 91/04748; Letarte et al., patente en EE UU No. 5.830.847, patente en EE UU No. 6.015.693; documentos WO 91/10727; WO 93/09800; y WO 94/10187); somatostatina (documento WO 98/08529); manosa-6-fosfato o manosa-1-fosfato (Ferguson, patente en EE UU No. 5.520.926); prolactina (documento WO 97/40848); factor de crecimiento similar a insulina II (documento WO 98/17304); 1P-10 (documento WO 97/00691); péptidos que contienen arg-gly-asp (Pfeffer, patente en EE UU No. 5.958.411; documento WO 93/10808); extractos de plantas, hongos y bacterias (documento EP-A-813 875; JP 8119984; y Matsunaga et al., patente en EE UU No. 5.693.610); oligonucleótidos antisentido (Chung, patente en EE UU No. 5.683.988; Fakhray et al., patente en EE UU No. 5.772.995; Dzau, patente en EE UU No. 5.821.234, patente en EE UU No. 5.869.462; y documento WO 94/25588); proteínas implicadas en la señalización de TGF- β , incluyendo las SMAD y MAD (documentos EP-A-374 046; WO 97/31020; WO 97/38729; WO 98/03663; WO 98/07735; WO 98/07849; WO 98/45467; WO 98/53068; WO 98/55512; WO 98/56913; WO 98/53830; WO 99/50296; Falb, patente en EE UU No. 5.834.248; Falb et al., patente en EE UU No. 5.807.708; y Gimeno et al., patente en EE UU No. 5.948.639), Ski y Sno (Vogel, 1999, Science, 286:665; y Stroschein et al., 1999, Science, 286:771-774); y cualquier mutante, fragmento o derivado de las moléculas identificadas anteriormente que mantienen la capacidad de inhibir la actividad de TGF- β .

El antagonista de TGF- β puede ser un anticuerpo monoclonal humano o humanizado que bloquea la unión de TGF- β a su receptor (o fragmentos del mismo tales como fragmentos F(ab)₂, fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios y otras formas o fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de unirse a TGF- β). Un anticuerpo monoclonal preferido es una forma humana o humanizada del anticuerpo monoclonal murino obtenido del hibridoma 1D11.16 (No. de acceso en la ATCC HB 9849 descrito en Dasch et al., patente en EE UU No. 5.783.185).

Los receptores de TGF- β y los fragmentos que se unen a TGF- β de los receptores de TGF- β , especialmente los fragmentos solubles son útiles como antagonistas de TGF- β en los métodos. El inhibidor preferido de la función de TGF- β puede ser un receptor soluble de TGF- β , especialmente un receptor de TGF- β de tipo II (TGFBIIR) o un receptor de TGF- β de tipo III (TGFBIIR, o betaglicano) que comprende, por ejemplo, el dominio extracelular de TGFBIIR o TGFBIIR, lo más preferiblemente un receptor soluble recombinante de TGF- β (rsTGFBIIR o rsTGFBIIR). Los receptores de TGF- β y los fragmentos que se unen a TGF- β de los receptores de TGF- β , especialmente los fragmentos solubles son útiles como antagonistas de TGF- β en los métodos de la presente invención. Los receptores de TGF- β y los ácidos nucleicos que los codifican se conocen bien en la técnica. La secuencia de ácido nucleico que codifica el receptor de TGF- β de tipo I se divulga en el número de acceso de GENBank L15436 y en la patente en EE UU No. 5.538.892 de Donahoe et al. La secuencia de ácido nucleico del receptor de TGF- β de tipo 2 está públicamente disponible en los números de acceso de GENBank AW236001; AI35790; AI279872; AJ074706; y AA808255. La secuencia de ácido nucleico del receptor de TGF- β de tipo 3 también está públicamente disponible en los números de acceso de GENBank NM 003243; AI887852; AI817295; y AI681599.

Los antagonistas de TGF- β adecuados también incluirán mutantes funcionales, variantes, derivados y análogos de los antagonistas de TGF- β anteriormente mencionados, siempre que su capacidad para inhibir la cantidad o actividad de TGF- β se retenga. Como se usa en el presente documento, "mutantes, variantes, derivados y análogos" se refiere a moléculas con forma o estructura similar al compuesto parental y que retienen la capacidad de actuar como antagonistas de TGF- β . Por ejemplo, cualquiera de los antagonistas de TGF- β divulgados en el presente documento se puede cristalizar, y los análogos útiles se pueden diseñar racionalmente basándose en las coordenadas responsables de la forma del/de los sitio(s) activo(s). De forma alternativa, el experto en la materia

puede, sin experimentación excesiva, modificar los grupos funcionales de un antagonista conocido y cribar tales moléculas modificadas para actividad, semivida, biodisponibilidad aumentadas u otras características deseables. Donde el antagonista de TGF- β es un polipéptido, se pueden producir fragmentos y modificaciones del polipéptido para aumentar la facilidad de administración, actividad, semivida, etc. (por ejemplo, anticuerpos humanizados o fragmentos funcionales de anticuerpos, como se ha discutido anteriormente). Dado el nivel de pericia en la técnica de producción de polipéptidos sintéticos y recombinantes, tales modificaciones se pueden lograr sin experimentación excesiva. Los expertos en la materia también pueden diseñar inhibidores novedosos basados en la estructura cristalina y/o el conocimiento de los sitios activos de los inhibidores de TGF- β descritos en el presente documento.

Los inhibidores polipeptídicos tales como los receptores solubles de TGF- β también se pueden introducir eficazmente a través de transferencia génica. Según esto, el método presente puede implicar el uso de un vector adecuado para la expresión de un receptor o compañero de unión de TGF- β , preferiblemente un receptor o compañero de unión soluble. En un caso, la administración de un antagonista soluble de TGF- β se puede efectuar por transferencia génica usando un vector que comprende el ADNc que codifica el antagonista soluble, lo más preferiblemente el ADNc que codifica el dominio extracelular del receptor de TGF- β de tipo II (rsTGFBIIIR) o de tipo III (rsTGFBIIIR), vector que se administra, preferiblemente por vía tópica, a un órgano donante para producir la expresión *in situ* del antagonista soluble de TGF- β en células del órgano transfectado con el vector. Tal expresión *in situ* inhibe la actividad de TGF- β y reprime la fibrogénesis mediada por TGF- β . Se puede usar cualquier vector adecuado. Los vectores preferidos incluyen adenovirus, lentivirus, virus de Epstein Barr (EBV), virus adenoasociados (AAV) y vectores retrovíricos que se han desarrollado para el fin de transferencia génica. Otros métodos sin vectores de transferencia génica también se pueden usar, por ejemplo, complejos lípidos/ADN, conjugados proteína/ADN, métodos de transferencia de ADN desnudo, y similares.

Antagonistas de TGF- β adecuados adicionales desarrollados para la administración a través de transferencia génica adenovírica incluyen, pero no están limitados a: un ADNc quimérico que codifica un dominio extracelular del receptor de TGF- β de tipo II fusionado al dominio Fc de Ig (Isaka et al., 1999, *Kidney Int.*, 55:465-475), vector de transferencia génica de adenovirus de un mutante dominante negativo de receptor de TGF- β de tipo II (Zhao et al, 1998, *Mech. Dev.*, 72:89-100), y un vector de transferencia génica de adenovirus para decorina, un proteoglicano que se une a TGF- β (Zhao et al., 1999, *Am. J. Physiol.*, 277:L412- L422). La transferencia génica mediada por adenovirus es muy eficaz comparada con otras modalidades de administración génica.

C. Agentes antifibróticos

Los antagonistas de factores profibróticos se pueden sustituir con, o aumentar con, una citoquina que se sabe que tiene efectos antifibróticos, tales como IFN- γ , BMP-7, HGF o IL-10.

Se puede acceder a las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos IFN- γ desde bases de datos públicas, por ejemplo, Genbank, publicaciones de revistas, etc. Mientras que varios polipéptidos de IFN- γ mamíferos son de interés, para el tratamiento de la enfermedad humana, generalmente se usará la proteína humana. La secuencia que codifica el IFN- γ humano se puede encontrar en Genbank, números de acceso X13274; V00543; y NM000619. La secuencia genómica correspondiente se puede encontrar en Genbank, números de acceso J00219; M37265; y V00536. Véase, por ejemplo, Gray et al. (1982) *Nature* 295:501 (Genbank X13274); y Rinderknecht et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:6790.

IFN- γ 1b (Actimmune™; interferón humano) es un polipéptido monocatenario de 140 aminoácidos. Está hecho de forma recombinante en *E. coli* y está sin glicosilar. Rinderknecht et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:6790-6797.

El IFN- γ que se va a usar en las composiciones puede ser cualquiera de los IFN- γ naturales, IFN- γ recombinantes y los derivados de los mismos siempre que tengan una actividad de IFN- γ , particularmente actividad de IFN- γ humano. Aunque el IFN- γ se basa en las secuencias proporcionadas anteriormente, la producción de la proteína y el procesamiento proteolítico puede producir variantes de procesamiento de las mismas. La secuencia sin procesar proporcionada por Gray et al., anteriormente, consiste en 166 aminoácidos (aa). Aunque se creyó originalmente que el IFN- γ recombinante producido en *E. coli* tenía 146 aminoácidos (empezando en el aminoácido 20) se encontró posteriormente que el IFN- γ humano nativo se corta después del residuo 23, para producir una proteína de 143 aa, o 144 aa si la metionina terminal está presente, según se requiera para la expresión en bacterias. Durante la purificación, la proteína madura se puede cortar además en el extremo C después del residuo 162 (con respecto a la secuencia de Gray et al.), lo que produce una proteína de 139 aminoácidos, o 140 aminoácidos si la metionina inicial está presente, por ejemplo, si se requiere para la expresión bacteriana. La metionina N-terminal es un artefacto codificado por la señal de "inicio" de traducción del ARNm AUG que, en el caso particular de expresión en *E. coli* no se elimina en el procesamiento. En otros sistemas microbianos o sistemas de expresión eucariotas, la metionina se puede eliminar.

Para su uso en los métodos objeto, se puede usar cualquiera de los péptidos de IFN- γ , modificaciones y variantes de los mismos, o una combinación de uno o más péptidos que puede tener actividad antifibrótica. Los péptidos de IFN- γ de interés incluyen fragmentos, y pueden estar truncados de diversos modos en el extremo carboxi terminal relativo a la secuencia completa. Tales fragmentos siguen mostrando las propiedades características del interferón

gamma humano, siempre que estén presentes los aminoácidos del 24 hasta aproximadamente el 149 (numeración a partir de los residuos del polipéptido sin procesar). Se pueden sustituir las secuencias extrañas para la secuencia de aminoácidos después del aminoácido 155 sin perder actividad. Véase, por ejemplo, la patente en EE UU No. 5.690.925. Los grupos de IFN- γ nativos incluyen moléculas que se extienden de diversos modos desde los residuos de aminoácidos 24-150; 24-151; 24-152; 24-153; 24-155 y 24-157. Cualquiera de estas variantes, y otras variantes conocidas en la técnica y que tienen actividad de IFN- γ , se puede usar en los métodos presentes.

La secuencia del polipéptido de IFN- γ se puede alterar de varias maneras conocidas en la técnica para generar cambios dirigidos en la secuencia. Un polipéptido variante será sustancialmente similar a las secuencias proporcionadas en el presente documento, es decir, se diferenciarán en al menos un aminoácido, y pueden ser diferentes en al menos dos pero no más de aproximadamente diez aminoácidos. Los cambios de secuencia pueden ser sustituciones, inserciones o deleciones. Se pueden usar mutaciones de barrido que sistemáticamente introducen alanina, u otros residuos, para determinar aminoácidos clave. Las sustituciones de aminoácidos específicos de interés incluyen cambios conservadores y no conservadores. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos típicamente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: (glicina, alanina); (valina, isoleucina, leucina); (ácido aspártico, ácido glutámico); (asparragina, glutamina); (serina, treonina); (lisina, arginina); o (fenilalanina, tirosina).

Las modificaciones de interés que pueden o no alterar la secuencia primaria de aminoácidos incluyen derivación química de polipéptidos, por ejemplo, acetilación o carboxilación; cambios en la secuencia de aminoácidos que introducen o eliminan un sitio de glicosilación; cambios en la secuencia de aminoácidos que hacen la proteína susceptible a PEGilación; y similares. En una forma de realización, la invención contempla el uso de variantes de IFN- γ con uno o más sitios de glicosilación y/o pegilación no naturales que se manipulan para proporcionar polipéptidos glicosil y/o PEG-derivados con depuración en suero reducida, tales como las variantes del polipéptido IFN- γ descritas en la publicación de patente internacional No. WO01/36001. También se incluyen modificaciones de glicosilación, por ejemplo, las hechas modificando los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en pasos de procesamiento adicionales; por ejemplo, exponiendo el polipéptido a enzimas que afectan la glicosilación, tales como enzimas de glicosilación o deglicosilación de mamíferos. También se abarcan secuencias que tienen residuos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

El agente antifibrótico puede ser un agonista de HGF. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, Refanalin (Angion Biomedica).

El agente antifibrótico puede ser un bloqueante de canales de calcio, tal como verapamilo. Tales agentes pueden tener un efecto antifibrótico debido no solo a su capacidad para disminuir la síntesis de colágeno de tipo I, sino también como consecuencia de la estimulación de la degradación de fibras de colágeno de tipo I. Estudios in vitro de fibroblastos muestran que el transporte extracelular de colágeno depende de la presencia de calcio. El verapamilo, un bloqueante de canales de calcio, reduce la concentración intracelular de calcio y aumenta la actividad colagenasa. También inhibe la proliferación de fibroblastos.

El agente antifibrótico puede ser un inhibidor de ECA (enzima convertidora de angiotensina) tal como alacepril, benazepril, captopril, cilazapril, ceranapril, delapril, enalapril, enalaprilat, fosinopril, fosinoprilat, imidapril, lisinopril, moexipril, perindoprilat, perindoprilat, quinapril, quinaprilat, ramipril, acetato de saralasin, espirapril, temocapril,trandolapril, fasidotrilat, dipropionato de beclometasona, FPL-66564, idrapril, MDL-100240, y S-5590. Según la invención, el agente antifibrótico es enalapril.

El agente antifibrótico puede ser un antagonista del receptor de angiotensina, tal como candesartán, irbesartán, losartán, valsartán, telmisartán, o eprosartán.

El agente antifibrótico puede ser un inhibidor de la ruta de señalización de VEGF. Los antagonistas del receptor de VEGF ejemplares incluyen inhibidores de un VEGF (por ejemplo, VEGF-A, -B o -C), moduladores de la expresión de VEGF (por ejemplo, INGN-241, tetratiomolibdato oral, 2-metoxiestradiol, dispersión de nanocristales de 2-metoxiestradiol, bevasiranib sódico, PTC-299, Veglin), inhibidores de un receptor de VEGF (por ejemplo, KDR o receptor III de VEGF (Flt4), por ejemplo, anticuerpos anti-KDR, anticuerpos contra VEGFR2 tales como CDP-791, IMC-1121B), anticuerpos contra VEGFR3 tales como mF4-31C1 de Imclone Systems, moduladores de la expresión de VEGFR (por ejemplo, el modulador de la expresión de VEGFR1 Sirna-027) o inhibidores de la señalización posterior al receptor de VEGF.

Los inhibidores de VEGF ejemplares incluyen bevacizumab, pegaptanib, ranibizumab, NEOVASTAT™, AE-941, VEGF Trap, y PI-88.

Los antagonistas del receptor de VEGF ejemplares incluyen inhibidores de la actividad tirosina quinasa del receptor de VEGF. 4-[4-(1-Amino-1-metiletil)fenil]-2-[4-(2-morfolin-4-il-etil)fenilam-inolpirimidina-5-carbonitrilo (JNJ-17029259) es uno de una clase estructural de 5-cianopirimidinas que están oralmente disponibles, inhibidores selectivos nanomolar del receptor-2 de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-R2). Ejemplos adicionales incluyen: PTK787/ZK222584 (Astra-Zeneca), SU5416, SU11248 (Pfizer), y ZD6474 ([N-(4-bromo-2- fluorofenil)-6-metoxi-7-[(1-

metilpiperidin-4-il)metoxi-]quinazolin-4-amina)), vandetanib, cediranib, AG-013958, CP-547632, E-7080, XL-184, L-21649, y ZK-304709. Otros agentes antagonistas de VEGF son inhibidores de tirosinas quinasas de amplia especificidad, por ejemplo, SU6668 (véase, por ejemplo, Bergers, B. et al., 2003 J. Clin. Invest. 111:1287-95), sorafenib, sunitinib, pazopanib, vatalanib, AEE-788, AMG-706, axitinib, BIBF-1120, SU-14813, XL-647, XL-999, ABT-869, BAY-57-9352, BAY-73-4506, BMS-582664, CEP-7055, CHIR-265, OSI-930, y TKI-258. También son útiles agentes que disminuyen los receptores de VEGF en la superficie celular, tal como fenretinida, y agentes que inhiben la señalización posterior al receptor de VEGF, tal como escualamina.

El agente antifibrótico puede ser un inhibidor de una quinasa. Los ejemplos de inhibidores de MEK incluyen, pero no están limitados a, PD325901, ARRY-142886, ARRY-438162 y PD98059. Los ejemplos de inhibidores de EGFR incluyen, pero no están limitados a, Iressa™ (gefitinib, AstraZeneca), Tarceva™ (erlotinib o OSI-774, OSI Pharmaceuticals Inc.), Erbitux™ (cetuximab, Imclone Pharmaceuticals, Inc.), EMD-7200 (Merck AG), ABX-EGF (Amgen Inc. y Abgenix Inc.) HR3 (Gobierno Cubano), anticuerpos IgA (Universidad de Erlangen-Nuremberg), TP-38 (IVAX), proteína de fusión de EGFR, vacuna de EGF, inmunoliposomas anti-EGFr (Hermes Biosciences Inc.) y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de inhibidores ErbB2 incluyen, pero no están limitados a, CP-724-714, CI-1033 (canertinib), Herceptin™ (trastuzumab), Omnitarg™ (2C4, petuzumab), TAK-165, GW-572016 (lonafamib), GW-282974, EKB-569, PI-166, dHER2 (vacuna de HER2), APC8024 (vacuna de HER2), anticuerpo biespecífico anti-HER2/neu, anticuerpos biespecíficos trifuncionales B7.her2lgG3, AS HER2, ACm AR-209 y ACm 2B-1. Los anticuerpos específicos contra IGFIR que se pueden usar en la presente invención incluyen los descritos en la solicitud de patente internacional No. WO 2002/053596. Los ejemplos de inhibidores del PDGFR incluyen, pero no están limitados a, SU9518, CP-673.451 y CP-868596. Los ejemplos de inhibidores de AXL incluyen, pero no están limitados a, SGI-AXL-277 (SuperGen) así como los inhibidores divulgados en la publicación de patente en EE UU 20050186571. Los ejemplos de inhibidores de FGFR incluyen, pero no están limitados a, PD17034, PD166866, y SU5402. Los ejemplos de inhibidores de TIE2 incluyen, pero no están limitados a, los descritos en Kissau, L. et. al., J Med Chem, 46:2917-2931 (2003).

Los inhibidores de quinasas también abarcan inhibidores con dianas múltiples. Los inhibidores del receptor pan ERBB incluyen, pero no están limitados a GW572016, CI-1033, EKB-569 y Omnitarg. MP371 (SuperGen) es un inhibidor de c-Kit, Ret, PDGFR y Lck, así como de la tirosina quinasa no receptor c-src. MP470 (SuperGen) es un inhibidor de c-Kit, PDGFR, y c-Met. Imatinib (Gleevec™) es un inhibidor de c-kit, PDGFR, y ROR, así como de la tirosina quinasa no receptor bcl/abl. Lapatinib (Tykerb™) es un inhibidor de tirosina quinasa dual del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y ERBB2 (Her2/neu). Los inhibidores de PDGFR y VEGFR incluyen, pero no están limitados a, Nexavar™ (sorafenib, BAY43-9006), Sutent™ (sunitinib, SU11248), y ABT-869. Zactima™ (vandetanib, ZD-6474) es un inhibidor de VEGFR y EGFR. En un caso, el agente antifibrótico puede ser un antioxidante. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, Heptax (Hawaii Biotech), N-acetilcisteína (Pierre Fabre), tocoferol, silimarina y Sho-saiko-To (H-09).

El agente antifibrótico puede ser inhibidores de la expresión de colágeno. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, Pirfenidona (InterMune), Halofuginona (Collgard) y F351 (Shanghai Genomics).

El agente antifibrótico puede ser agonistas del receptor activado por el proliferador del peroxisoma (PPAR) gamma. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, farglitazar (GSK), pioglitazona (Takeda), rosiglitazona (GSK).

El agente antifibrótico puede ser agonistas del receptor farnesoide X. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, INT-747 (Intercept Pharmaceuticals).

El agente antifibrótico puede ser inhibidores de caspasa. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, PF-3491390 (Pfizer, anteriormente IDN-6556), y LB84318 (LG Life Sciences).

El agente antifibrótico puede ser inhibidores de de productos finales de glicación avanzada (AGE) o sus receptores tal como RAGE. Los ejemplos de inhibidores de AGE incluyen, pero no están limitados a, piridoxamina (Biostratum). Los ejemplos de inhibidores de RAGE incluyen, pero no están limitados a, TTP-488 (Trantech Pharma) y TTP-4000 (Trantech Pharma).

El agente antifibrótico puede ser una heparina de bajo peso molecular o un análogo de heparina. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, Sulodexida (Keryx).

El agente antifibrótico puede ser un inhibidor de proteína quinasa C (PKC). Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, ruboxistaurina, mesilato hidrato (Lilly).

El agente antifibrótico puede ser un inhibidor de ADAM-10. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a XL-784 (Exelixis).

El agente antifibrótico puede ser un quelante de cobre. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, trientina (Protex) y Coprexa (Pipex).

El agente antifibrótico puede ser un inhibidor de la quinasa rho. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, SLx-2119 y SLx-3060 (Surface Logix).

D. Condiciones ejemplares para el tratamiento

5 La fibrosis generalmente se caracteriza por la acumulación patológica o excesiva de tejido conjuntivo colagenoso. Los trastornos fibróticos que pueden ser susceptibles de curarse con el método objeto incluyen, pero no están limitados a, enfermedad de colágeno, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad pulmonar fibrótica humana (por ejemplo, bronquiolitis obstructiva, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar de una etiología conocida, estroma tumoral en enfermedad pulmonar, esclerosis sistémica que afecta a los pulmones, síndrome de Hermansky-Pudlak, 10 neumocoñosis del minero de carbón, asbestosis, silicosis, hipertensión pulmonar crónica, hipertensión pulmonar asociada con SIDA, sarcoidosis, y similares), enfermedad vascular fibrótica, esclerosis arterial, aterosclerosis, venas varicosas, infartos coronarios, infartos cerebrales, fibrosis de miocardio, fibrosis musculoesquelética, adhesiones posquirúrgicas, enfermedad renal humana (por ejemplo, síndrome nefrítico, síndrome de Alport, 15 nefropatía asociada con VIH, enfermedad renal poliquística, enfermedad de Fabry, nefropatía diabética, glomerulonefritis crónica, nefritis asociada con lupus sistémico, y similares), formación de queloides cutáneos, esclerosis sistémica progresiva (ESP), colangitis esclerosante primaria (CEP), fibrosis hepática, cirrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, fibrosis quística, enfermedad del injerto contra el huésped crónica, esclerodermia (local y sistémica), oftalmopatía de Grave, retinopatía diabética, glaucoma, enfermedad de Peyronie, fibrosis del pene, uretroestenosis después de la prueba usando un cistoscopio, adherencia interna después de cirugía, cicatrización, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal idiopática, fibrosis peritoneal de etiología conocida, ergotismo inducido por fármacos, fibrosis asociada a cáncer benigno o maligno, fibrosis asociada a infección microbiana (por ejemplo, vírica, bacteriana, parasítica, fúngica, etc.), enfermedad de Alzheimer, fibrosis relacionada con enfermedad intestinal inflamatoria (incluyendo formación de constricción en la enfermedad de Crohn y colitis microscópica), 20 fibrosis inducida por agresión química o medioambiental (por ejemplo, quimioterapia contra el cáncer, pesticidas, radiación (por ejemplo, radioterapia contra el cáncer), y similares), y similares.

Las composiciones se pueden aplicar local o sistémicamente. Las composiciones también se pueden suministrar en combinaciones o con cofactores. Las composiciones se pueden administrar en una cantidad suficiente para 30 restablecer los niveles normales, si la composición está normalmente presente en la localización diana, o se pueden administrar en una cantidad para subir los niveles por encima de los niveles normales en la localización diana.

Las composiciones de la presente invención se pueden suministrar a una localización diana desde una fuente exógena, o se pueden hacer *in vivo* por células en la localización diana o células en el mismo organismo que la 35 localización diana.

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

Las mismas composiciones y metodologías descritas anteriormente para suprimir o inhibir la formación y mantenimiento de fibrosis excesiva también se pueden usar para suprimir o inhibir la formación de fibrosis inapropiada. Por ejemplo, pueden tratar o prevenir una afección que se produce en el hígado, riñón, pulmón, corazón y pericardio, ojo, piel, boca, páncreas, aparato digestivo, cerebro, mama, médula ósea, aparato 45 genitourinario, un tumor o una herida.

Generalmente, pueden tratar o prevenir fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, artritis reumatoide, lupus, fibrosis patogénica, enfermedad fibrosante, lesiones fibróticas tales como las formadas después de infección por *Schistosoma japonicum*, daño por radiación, enfermedades autoinmunes, enfermedad de Lyme, 50 fibrosis inducida por quimioterapia, esclerosis focal inducida por VIH o infección, síndrome postlaminectomía debido a la cicatrización de la cirugía vertebral, adhesión abdominal tras la cicatrización quirúrgica y formaciones fibroquísticas.

Específicamente, en el hígado, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, cirrosis inducida por alcohol, drogas o químicamente, isquemia-reperfusión, lesión después de trasplante hepático, hepatitis necrotizante, hepatitis B, hepatitis C, cirrosis biliar primaria, y colangitis esclerosante primaria. 55

Respecto al riñón, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, glomerulonefritis proliferativa y esclerosante, dermatopatía fibrosante nefrogénica, nefropatía diabética, fibrosis tubulointersticial renal, y glomeruloesclerosis segmental focal. 60

Respecto al pulmón, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, fibrosis intersticial pulmonar, sarcoidosis inducida por fármacos, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad por daño alveolar difuso, hipertensión pulmonar, 65 displasia broncopulmonar neonatal, asma crónica y enfisema.

Respecto al corazón y/o el pericardio, pueden tratar o prevenir fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, fibrosis de miocardio, aterosclerosis, restenosis de arteria coronaria, cardiomiopatía congestiva, insuficiencia cardíaca y otras afecciones posisquémicas.

5 Respecto al ojo, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, exoftalmos de la enfermedad de Grave, vitrorretinopatía proliferativa, catarata capsular anterior, degeneración macular aguda, fibrosis corneal, cicatrización de la córnea debido a cirugía, fibrosis inducida por trabeculectomía, y otras fibrosis oculares.

10 Respecto a la piel, pueden tratar o prevenir la fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, contractura de Dupuytren, esclerodermia, cicatrización queloide, psoriasis, cicatrización hipertrófica debido a quemaduras, aterosclerosis, restenosis y pseudoesclerodermia causada por lesión en la médula espinal.

15 Respecto a la boca, pueden tratar o prevenir fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, cicatrización de enfermedad periodontal e hipertrofia gingival secundaria a fármacos.

Respecto al páncreas, pueden tratar o prevenir fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, fibrosis pancreática, pancreatitis con remodelación estromal y fibrosis estromal.

20 Respecto al aparato digestivo, pueden tratar o prevenir fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, colitis colagenosa, atrofia vellosa, hiperplasia de criptas, formación de pólipos, fibrosis de la enfermedad de Crohn, y cicatrización de úlcera gástrica.

25 Respecto al cerebro, pueden tratar o prevenir fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, tejido cicatricial glial.

Respecto a la mama, pueden tratar o prevenir fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, enfermedad fibroquística y reacción desmoplásica al cáncer de mama.

30 Respecto a la médula ósea, pueden tratar o prevenir fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, fibrosis en mielodisplasia y enfermedades neoplásicas.

35 Respecto al hueso, pueden tratar o prevenir fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, formación de paño reumatoide.

Respecto al sistema genitourinario, pueden tratar o prevenir fibrosis resultante de afecciones que incluyen, pero no limitadas a, endometriosis, fibroides uterinos y fibroides ováricos.

40 Se incluyen los siguientes ejemplos. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas que los inventores han descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención.

(i) *Tratamiento de fibrosis pulmonar idiopática*

45 La presente invención proporciona la composición reivindicada para su uso en el tratamiento de fibrosis pulmonar idiopática (FPI). El tratamiento generalmente implica administrar a un individuo que tiene FPI una combinación de una cantidad eficaz de un supresor de fibrocitos y una cantidad eficaz de un antagonista de una citoquina profibrótica.

50 En un caso, la dosis y la eficacia del tratamiento se pueden seguir mediante la inhibición o ralentización de la progresión de neumonía intersticial usual (NIU) en evaluación histopatológica del tejido pulmonar obtenido por biopsia quirúrgica. Los criterios para un diagnóstico de FPI son conocidos. Ryu et al. (1998) Mayo Clin. Proc. 73:1085-1101.

55 En otro caso, un diagnóstico de FPI es una FPI confirmada o probable hecho mediante tomografía computarizada de alta resolución (TCAR). En un diagnóstico por TCAR, se advierte la presencia de las siguientes características: (1) presencia a anomalía reticular y/o bronquiectasia de tracción con predominancia basal y periférica; (2) presencia de estructura en panal de abeja con predominancia basal y periférica; y (3) ausencia de características atípicas tales como micromódulos, nódulos peribroncovasculares, consolidación, quistes aislados (sin panal de abeja), atenuación de vidrio esmerilado (o, si está presente, es menos extensa que la opacidad reticular), y adenopatía mediastínica (o, si está presente, no es lo suficientemente extensa para ser visible en radiografía del tórax). Se hace un diagnóstico de FPI confirmada si se satisfacen las características (1), (2) y (3). Se hace un diagnóstico de FPI probable si se satisfacen las características (1) y (3).

65 En ciertas formas de realización preferidas, la terapia de combinación objeto produce un aumento, tal como un aumento estadísticamente significativo, en la función pulmonar. Los valores de la función pulmonar se conocen bien

en la técnica. Lo siguiente es un ejemplo de valores de la función pulmonar que se pueden usar. Se pretende que otros valores de la función pulmonar, o combinaciones de los mismos, estén dentro del ámbito de esta invención. Los valores incluyen, pero no están limitados a, VEF (volumen espiratorio forzado), CVF (capacidad vital forzada), FEF (flujo espiratorio forzado), Vmax (flujo máximo), FEP (flujo espiratorio pico), CRF (capacidad residual funcional), VR (volumen residual), CPT (capacidad pulmonar total). El VEF mide el volumen de aire exhalado durante un periodo de tiempo predeterminado por una espiración forzada inmediatamente después de una inspiración completa. La CVF mide el volumen total de aire exhalado inmediatamente después de una inspiración completa. El flujo espiratorio forzado mide el volumen de aire exhalado durante una CVF dividido por el tiempo en segundos. Vmax es el flujo máximo medido durante la CVF. FEP mide la velocidad de flujo máxima durante una exhalación forzada empezando de una inspiración completa. VR es el volumen de aire que permanece en los pulmones después de una espiración completa.

(ii) *Tratamiento de fibrosis hepática*

La presente invención proporciona la composición reivindicada para su uso en el tratamiento de fibrosis hepática, incluyendo reducir la fibrosis hepática clínica, reducir la probabilidad de que se produzca fibrosis hepática y reducir un parámetro asociado con la fibrosis hepática. De interés particular en muchas formas de realización es el tratamiento de seres humanos.

La fibrosis hepática es un precursor a las complicaciones asociadas con la cirrosis hepática, tal como hipertensión portal, insuficiencia hepática progresiva, y carcinoma hepatocelular. Por tanto, una reducción en la fibrosis hepática reduce la incidencia de tales complicaciones. Según esto, la presente invención proporciona además métodos de reducir la probabilidad de que un individuo desarrolle complicaciones asociadas con cirrosis del hígado mediante terapia conjunta que implica la administración de supresores de fibrocitos y antagonistas de citoquinas profibróticas.

Si el tratamiento con una combinación de un supresor de fibrocitos y un antagonista de citoquinas profibróticas es eficaz en reducir la fibrosis hepática se determina por cualquiera de un número de técnicas bien establecidas para medir la fibrosis hepática y la función hepática. Si la fibrosis hepática se reduce se determina analizando una muestra de biopsia hepática. Un análisis de un biopsia hepática comprende evaluaciones de dos componentes principales: necroinflamación evaluada mediante el "grado" como una medida de la gravedad y actividad de la enfermedad en curso, y a lesiones de fibrosis y la remodelación parenquimatosa o vascular evaluadas mediante el "estadio" que es reflejo de la progresión de la enfermedad a largo plazo. Véase, por ejemplo, Brunt (2000) Hepatology, 31:241-246; y METAVIR (1994) Hepatology 20:15-20. Basándose en el análisis de la biopsia hepática, se asigna una puntuación. Existe un número de sistemas de puntuación normalizados que proporcionan una evaluación cuantitativa del grado de gravedad de la fibrosis. Estos incluyen los sistemas de puntuación METAVIR, de Knodell, Scheuer, Ludwig e Ishak.

El sistema de puntuación METAVIR se basa en un análisis de varias características de una biopsia hepática, incluyendo fibrosis (fibrosis portal, fibrosis centrilobulillar y cirrosis); necrosis (necrosis fragmentaria y lobulillar, retracción acidófila y degeneración globoide); inflamación (inflamación del espacio porta, agregados linfoides portales, y distribución de la inflamación portal); cambios en los conductos biliares; y el índice de Knodell (puntuaciones de la necrosis periportal, necrosis lobulillar, inflamación portal, fibrosis y actividad de la enfermedad global). Las definiciones de cada estadio en el sistema METAVIR son como sigue: puntuación: 0, sin fibrosis; puntuación: 1, agrandamiento estrellado del espacio porta pero sin formación de tabiques; puntuación: 2, agrandamiento del espacio porta con formación rara de tabiques; puntuación 3: numerosos tabiques sin cirrosis; y puntuación 4: cirrosis.

El sistema de puntuación de Knodell, también llamado índice de actividad de la hepatitis, clasifica las muestras basándose en puntuaciones en cuatro categorías de características histológicas: I. Necrosis periportal y/o en puente; II. Degeneración intralobulillar y necrosis focal; III. Inflamación portal; y IV. Fibrosis. En el sistema de estadios de Knodell, las puntuaciones son como sigue: puntuación 0: sin fibrosis; puntuación 1: fibrosis leve (expansión portal fibrosa); puntuación: 2, fibrosis moderada; puntuación 3, fibrosis grave (fibrosis en puente); y puntuación: 4, cirrosis. Cuanto más alta sea la puntuación, más grave es el daño al tejido hepático. Knodell (1981) Hepatology, 1:431.

Las puntuaciones en el sistema de puntuación de Scheuer las puntuaciones son como sigue: puntuación: 0, sin fibrosis; puntuación: 1, espacios porta fibróticos, aumentados; puntuación: 2, tabiques periportales o porta-porta, pero arquitectura intacta; puntuación: 3, fibrosis con distorsión arquitectónica, pero sin cirrosis obvia; puntuación: 4, cirrosis probable o confirmada. Scheuer (1991) J. Hepatology, 13:372.

El sistema de puntuación de Ishak se describe en Ishak (1995) J. Hepatology, 22:696-699. Estadio 0, sin fibrosis; estadio 1, expansión fibrosa de algunas áreas porta, con o sin tabiques fibrosos cortos; estadio 2, expansión fibrosa de la mayoría de las áreas porta, con o sin tabiques fibrosos cortos; estadio 3 expansión fibrosa de la mayoría de las áreas porta con puentes porta a porta (P--P) ocasionales; estadio 4 expansión fibrosa de las áreas porta con puentes porta a porta (P--P) marcados así como porta-central (P--C); estadio 5, puentes marcados (P--P y/o P--C) con nódulos ocasionales (cirrosis incompleta); estadio 6, cirrosis, probable o confirmada. El beneficio de la terapia antifibrótica también se puede medir y evaluar usando el sistema de puntuación de Child-Pugh que comprende un

sistema de puntos multicomponente basado en anomalías en el nivel de bilirrubina en suero, nivel de albúmina en suero, tiempo de protrombina, la presencia y gravedad de ascitis, y la presencia y gravedad de encefalopatía. Basándose en la presencia y gravedad de la anomalía de estos parámetros, los pacientes se pueden colocar en una de tres categorías de gravedad creciente de enfermedad clínica: A, B o C.

5

(iii) *Tratamiento de fibrosis renal*

La fibrosis renal se caracteriza por la acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular (MEC). Se cree que la sobreproducción de TGF- β subyace a la fibrosis tisular causada por el exceso de depósito de MEC, lo que produce la enfermedad. La acción fibrogénica del TGF- β resulta de la estimulación simultánea de la síntesis de proteínas de la matriz, inhibición de la degradación de la matriz y expresión aumentada de integrinas que facilita el ensamblaje de la MEC.

10

La presente invención proporciona la composición reivindicada para su uso en el tratamiento de fibrosis renal. Los métodos generalmente implican administrar a un individuo que tiene fibrosis renal una combinación de un supresor de fibrocitos y un antagonista de citoquinas profibróticas. Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un supresor de fibrocitos en combinación con una "cantidad eficaz" de un antagonista de citoquinas profibróticas es una dosis combinada que es eficaz en la reducción de la fibrosis renal; y/o que es eficaz en reducir la probabilidad de que un individuo desarrolle fibrosis renal; y/o que es eficaz en reducir un parámetro asociado con la fibrosis renal; y/o que es eficaz en reducir un trastorno asociado con fibrosis del riñón.

15

20

En un caso de la presente divulgación, una combinación eficaz de supresor de fibrocitos y antagonista de citoquinas profibróticas es una combinación que es suficiente para reducir la fibrosis renal en al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, comparado con el grado de fibrosis renal en el individuo antes del tratamiento con la terapia de combinación de la presente invención.

25

Si se reduce la fibrosis en el riñón se determina usando cualquier método conocido. Por ejemplo, se realiza un análisis histoquímico de muestras de biopsia de riñón para el grado de depósito de MEC y/o fibrosis. Otros métodos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Masseroli et al. (1998) Lab. Invest. 78:511-522; patente en EE UU No. 6.214.542.

30

En otro caso de la presente divulgación, una combinación eficaz de supresor de fibrocitos y antagonista de citoquinas profibróticas es una combinación que es eficaz para aumentar la función del riñón en al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, comparado con el nivel basal de la función del riñón en el individuo antes del tratamiento con la terapia de combinación de la presente invención.

35

40

En aún otro caso de la presente divulgación, una combinación eficaz de supresor de fibrocitos y antagonista de citoquinas profibróticas es una combinación que es eficaz para ralentizar la disminución en la función del riñón en al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, comparado con la disminución en la función del riñón que se produciría en ausencia del tratamiento con la terapia de combinación de la presente invención.

45

La función renal se puede medir usando cualquier ensayo conocido incluyendo, pero no limitado a, nivel de creatinina en plasma (donde los niveles normales generalmente están en un intervalo de aproximadamente 0,6 hasta aproximadamente 1,2 mg/dl); depuración de creatinina (donde el intervalo normal para la depuración de creatinina es desde aproximadamente 97 hasta aproximadamente 137 ml/min en hombres, y desde aproximadamente 88 hasta aproximadamente 128 ml/min en mujeres); la velocidad de filtración glomerular (bien calculada u obtenida de la depuración de inulina u otros métodos), nitrógeno de urea en sangre (donde el intervalo normal es desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 20 mg/dl); y niveles de proteína en orina.

50

Además se describe un método para el tratamiento de la fibrosis renal en un individuo que comprende administrar al individuo una combinación de un supresor de fibrocitos y un antagonista de citoquinas profibróticas que es eficaz para la profilaxis o terapia de fibrosis renal en el individuo, por ejemplo, aumentando el tiempo hasta la duplicación de los niveles de creatinina en suero, aumentando el tiempo hasta la enfermedad renal en estadio final que requiere terapia de reemplazo (por ejemplo, diálisis o trasplante), aumentando la probabilidad de supervivencia, reduciendo el riesgo de muerte, mejorando la carga de la enfermedad o ralentizando la progresión de la enfermedad en el individuo, al tiempo que se reduce la incidencia o gravedad de uno o más efectos secundarios que normalmente surgirían del tratamiento con una cantidad eficaz del supresor de fibrocitos o antagonista de citoquinas profibróticas solo.

60

65

(iv) Dosis de fármacos ejemplares

FÁRMACO	DOSIS	INDICACIÓN	REFERENCIA
Pirfenidona	40 mg/kg	FPI	Nagai, S, Hamada, K., et al., Intern Med. (2002) 41(12): 1118-1123.
Pirfenidona	50 mg/kg	FPI	Raghu, G., Johnson, WC., Lockhart, D., Mageto, Y., Am J Respir. Crit Care Med., (1999) 159(4 Parte 1):1061-1069.
Gefitinib (anticuerpo anti-EGFR)	200 mg/kg (ratones)	Modelo pulmonar con bleomicina	Ishii, Y., Fujimoto, S., Fukuda, T., Am J Respir Crit Care Med., (2006) Vol 174:550-556.
AG1478 (tirfostina, inhibidor de EGF TI)	12 mg/kg	Modelo pulmonar con bleomicina	Ishii, Y., Fujimoto, S., Fukuda, T., Am J Respir Crit Care Med., (2006) Vol 174:550-556.
Mesilato de imatinib (inhibidor de quinasas PDGFR/cAbl/cKit)	50 mg/kg	Modelo pulmonar con bleomicina	Chaudhary, N., Schnapp, A., y Park, J., Am J Respir Crit Care Med., (2006) Vol 173:769-776.
Anticuerpo anti-receptor de TGF beta	4 nmol	Modelo pulmonar con bleomicina	Wang, Q., Wang, Y., Hyde, DM., et al, Thorax (1999):54:805-812.
Losartán (antagonista del receptor de angiotensina)	27 mg/kg	Modelo pulmonar con bleomicina	Yao, M., Zhu, J., Zhao, M., y Lu, Y., Respiration (2006):73:236-242.

5 Ejemplos de referencia

E. Sistemas modelo ejemplares para ensayar combinaciones de fármacos

(i) Fibrosis pulmonar inducida por bleomicina

10 La fibrosis pulmonar se produce en ratas Sprague-Dawley machos que pesan 200-250 gramos. Se administra una dosis endotraqueal (a través de la vía transoral) de 2,5-6,67 U/kg de bleomicina disuelta en cloruro de sodio al 0,9% en un volumen de 1,5 ml/kg el día 0. En los días de estudio 1, 3, 5, 7 y 9, las ratas en el grupo tratado se dosifican por vía intravenosa a través de la vena de cola con 1,6 mg/kg de SAP en un volumen de dosis de 1,3 ml/kg. Las ratas sin tratar se dosifican con 1,3 ml/kg de solución salina. El día 14 se evalúa la función pulmonar midiendo la saturación de oxígeno en sangre (oximetría de pulso) y/o PO₂ (analizador de gas sanguíneo). Los animales se sacrifican después, y el pulmón izquierdo se procesa para el contenido total de colágeno (ensayo Sircol) y el pulmón derecho se fija en formalina al 10%, se hacen secciones y se tiñen con rojo sirio y hematoxilina y eosina para evaluar el depósito de colágeno (véase, Cortijo, et al. Attenuation by oral N-acetylcystein of bleomycin-induced lung injury in rats. *Eur Respir J* 17:1228-1235, 2001).

25 En un estudio de tratamiento de combinación, la fibrosis pulmonar se induce en ratones C57BL/6 (6-8 semanas de edad) mediante la instilación intratraqueal quirúrgica de 0,05 U de bleomicina (Blenoxano, sulfato de bleomicina estéril, Bristol-Meyers Pharmaceuticals, Evansville, IN) disuelto en PBS (aproximadamente 1,7 U/kg) y denominado día 0. Los grupos se sacrifican y los tejidos pulmonares se analizan el día 21 después de la inyección de bleomicina. Los ratones control recibirán PBS intratraqueal. Para los estudios tanto de IFNg como anti-IL-13, los ratones recibieron hSAP en un programa de dosificación (5 o 20 mg/kg, ip., c2d durante 5 dosis empezando el día 11).

30 Para el estudio de combinación de IFNg, los ratones recibieron bleomicina el día 0 e IFNg los días -1, 1 y 2 (im, 10.000 U/ratón, véase la tabla 2). A los ratones que no recibieron IFNg pero recibieron hSAP (grupos 4 y 5), se les dio solución salina por vía intramuscular los días -1, 1 y 2.

35 Para el estudio de hSAP/anti-IL-13, los ratones recibieron anti-IL-13 (reactivo UMich, 200 ug/dosis, Acp, ip; véase la tabla 3) los días 14, 16, 18 y 20 solo.

40 Los ratones se sacrificaron con sobredosis de anestesia; se elimina la sangre por punción cardiaca y se recoge en tubos que contienen EDTA para permitir el procesamiento a plasma. Los pulmones se perfunden a través del ventrículo izquierdo in situ con PBS estéril (aproximadamente 2-3 ml hasta la perfusión adecuada), después se eliminan en bloque y se congelan rápidamente hasta ser procesados para análisis de proteínas. El colágeno soluble total se mide en homogenizados de pulmón usando el ensayo de hidroxiprolina y se analiza histológicamente usando tinción tricrómica de Masson.

Tabla 2: Diseño de estudio para el estudio de combinación de hSAP/IFNg en ratones C57Bl/6 hembras.

Grupo	Nombre del grupo	Exposición intratraqueal	hSAP (ip c2d durante 5 dosis empezando el día 11)	IFNg (im cd -1, 1, 2)
1	Control	PBS	No	No
2	Control Bleo	Bleomicina	HSA	No
3	Control Bleo + IFN	Bleomicina	HSA	IFNg
4	Bleo + SAP baja	Bleomicina	hSAP 5 mg/kg	Solución salina
5	Bleo + SAP alta	Bleomicina	hSAP 20 mg/kg	Solución salina
6	Bleo + IFN bajo	Bleomicina	hSAP 5 mg/kg	IFNg
7	Bleo + IFN alto	Bleomicina	hSAP 20 mg/kg	IFNg

Tabla 3: Diseño de estudio para el estudio de combinación de hSAP/anti-IL-13 en ratones C57Bl/6 macho

5

Grupo	Nombre del grupo	Exposición intratraqueal	hSAP (ip c2d durante 5 dosis empezando el día 11)	Anti-IL-13 (200 ug ip c2d a partir del día 14)
1	Control	PBS	No	No
2	Control Bleo	Bleomicina	Solución salina	No
3	Control Bleo + anti-IL13	Bleomicina	Solución salina	Si
4	Bleo + SAP baja	Bleomicina	hSAP 5 mg/kg	No
5	Bleo + SAP alta	Bleomicina	hSAP 20 mg/kg	No
6	Bleo + anti IL-13 bajo	Bleomicina	hSAP 5 mg/kg	Si
7	Bleo + anti IL-13 alto	Bleomicina	hSAP 20 mg/kg	Si

(ii) *Fibrosis hepática, administración de tetracloruro de carbono*

10 Se produce fibrosis hepática en ratas Wistar macho que pesan 200-250 gramos. El día 0, las ratas reciben una dosis intragástrica de CCl₄ en aceite de oliva (0,08 ml de CCl₄/ml de aceite de oliva; dosis inicial de 412 mg de CCl₄/kg) o aceite de oliva solo (controles). Las ratas se dosifican con CCl₄ dos veces a la semana durante la duración del estudio, con dosis semanales ajustadas basándose en los cambios del peso corporal para reducir la mortalidad. Las ratas tratadas se dosifican IP con 1,6 mg/kg de SAP en días alternos empezando el día 1; las ratas control se dosifican con volúmenes iguales de vehículo. El día 24, las ratas se sacrifican, se evalúan los pesos del cuerpo y el hígado, y el tejido hepático se recoge para análisis. Se mide el contenido de colágeno total con el ensayo Sircol, y se mide el depósito de colágeno con la tinción tricrómica de Masson y de rojo sirio. Se determina la activación de miofibroblastos por inmunotinción para α-SMA. (Véase, Parsons CJ, et al. Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. *Hepatology* **40**:1106-1115, 200 y Rivera CA, et al. Attenuation of CCL₄-induced hepatic fibrosis by GdCl₃ treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**:G200-G207, 2001).

(iii) *Fibrosis hepática, ligadura del conducto biliar*

25 Se induce lesión hepática en ratas macho adultas mediante ligadura del conducto biliar común el día 0. Las ratas tratadas se dosifican IP con 1,6 mg/kg de SAP en días alternos empezando el día 1; las ratas control se dosifican con volúmenes iguales de vehículo. El día 14, las ratas se sacrifican, se evalúan los pesos del cuerpo y el hígado, y el tejido hepático se recoge para análisis. Se mide el contenido de colágeno total con el ensayo Sircol, y se mide el depósito de colágeno con la tinción tricrómica de Masson y de rojo sirio. Se determina la activación de miofibroblastos por inmunotinción para α-SMA. (Véase, Kisseleva T, et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatology* **45**:429-438, 2006; Hellerbrand C, et al. Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. *Hepatology* **24**:670-676, 1996; y Tramas EG, Symeonidis A. Morphologic and functional changes in the livers of rats after ligation and excision of the common bile duct. *Am J Pathol* **33**:13-27, 1957).

35 (iv) *Fibrosis renal inducida por OUU*

40 La obstrucción unilateral del uréter (OUU) en la rata es un modelo adecuado de fibrosis renal. La fibrosis renal se indujo en ratas Sprague-Dawley que pesaban 200-250 gramos. Las ratas se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg). Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron usando técnicas asépticas.

El riñón izquierdo, la arteria y vena renales expusieron y el uréter se ocluyó usando una sutura. A continuación el sitio quirúrgico se cerró con sutura.

Se dio seroalbúmina humana en PBS (grupo 1) o hSAP en PBS (grupos 2-5) a los animales mediante inyección intravenosa (iv) en días alternos desde el día 0 hasta el día 12 como se detalla en la tabla 4. Se añadió enalapril al agua de bebida de los animales en los grupos 2, 5 y 6, empezando el día del estudio y siguiendo hasta el sacrificio (día 14).

5 El día 14, los animales se sacrificaron y se extirparon tanto el riñón ocluido izquierdo ocluido como el control contralateral derecho.

Tabla 4. Diseño de estudio para fibrosis renal inducida por OUU.

Grupo	Número de animales	Tratamiento	Programa de tratamiento de hSAP	Programa de sacrificio	Volumen
1	6 machos Sprague Dawley	HSA, ip, c2d	Días 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12	Día 14	Ajustado por peso corporal
2	6 machos Sprague Dawley	Enalapril en el agua de bebida a 200 mg/ml	Día -1 a 14	Día 14	
3	6 machos Sprague Dawley	hSAP en PBS, iv, c2d, 2 mg/kg	Días 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12	Día 14	Ajustado por peso corporal
4	6 machos Sprague Dawley	hSAP en PBS, iv, c2d, 2 mg/kg	Días 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12	Día 14	Ajustado por peso corporal
		Enalapril en el agua de bebida a 200 mg/ml	Día -1 a 14		

10 (Véase, M. El Chaar *et al.*, *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F1291 (Abr., 2007) y M. D. Burdick *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 261 (1 Feb., 2005))

15 Para determinar el grado de fibrosis inducida por 14 días de OUU, se tiñeron secciones de riñones de todos los grupos de animales con tricrómica de Masson y el grado de positividad tricrómica se determinó usando análisis de imágenes (véase la figura 1). En el riñón sin lesión, había aproximadamente el 5% de depósito de colágeno, mientras que la lesión mediada por OUU produjo un aumento en el depósito de colágeno en el riñón en los animales control tratados con HSA (aproximadamente el 22% de tinción tricrómica). Bien el enalapril solo (aproximadamente el 15%) o 2 mg/kg de hSAP solo (aproximadamente el 25%) no inhibieron estadísticamente el aumento en el depósito de colágeno. Sin embargo, hubo una inhibición significativa en la tinción tricrómica en los animales tratados con la combinación de enalapril y hSAP ($p < 0,05$; aproximadamente el 10%). Además, el grado de depósito de colágeno en los animales tratados con la combinación de enalapril y hSAP estaba estadísticamente atenuado en comparación con hSAP solo ($p < 0,01$). En conjunto estos datos indican que la combinación de enalapril + hSAP proporciona mayor actividad terapéutica en comparación bien con enalapril solo o hSAP solo en un modelo de rata de fibrosis renal inducida por OUU.

25

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de proteína amiloide P de suero (SAP) y enalapril para su uso en un método de tratamiento de un trastorno fibrótico o fibroproliferativo.
- 5
2. La combinación para uso de la reivindicación 1, en donde el trastorno fibrótico o fibroproliferativo se selecciona de artritis reumatoide, lupus, fibrosis patogénica, enfermedad fibrosante, lesión fibrótica, daño por radiación, enfermedad autoinmune, enfermedad de Lyme, fibrosis inducida por quimioterapia, esclerosis focal inducida por infección de VIH, síndrome postlaminectomía, adhesión abdominal tras cicatrización quirúrgica, formación fibroquística, cirrosis inducida por alcohol, cirrosis inducida por fármacos, cirrosis químicamente inducida, isquemia-reperfusión, lesión después de trasplante hepático, hepatitis necrotizante, hepatitis B, hepatitis C, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, glomerulonefritis proliferativa, glomerulonefritis esclerosante, dermatopatía fibrosante nefrogénica, nefropatía diabética, fibrosis tubulointersticial renal, glomeruloesclerosis segmental focal, fibrosis intersticial pulmonar, sarcoidosis inducida por fármacos, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis renal, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad por daño alveolar difuso, hipertensión pulmonar, displasia broncopulmonar neonatal, asma crónica, enfisema, fibrosis de miocardio, aterosclerosis, restenosis de arteria coronaria, cardiomiopatía congestiva, insuficiencia cardíaca, exoftalmos de la enfermedad de Grave, vitrorretinopatía proliferativa, catarata capsular anterior, fibrosis de la córnea, cicatrización de la córnea debido a cirugía, fibrosis inducida por trabeculectomía, contractura de Dupuytren, esclerodermia, cicatrización queloide, psoriasis, cicatrización hipertrófica, restenosis, pseudoesclerodermia, cicatrización por enfermedad periodontal, hipertrofia gingival, fibrosis pancreática, pancreatitis con remodelado estromal, fibrosis estromal, colitis colagenosa, atrofia vellosa, hiperplasia de criptas, formación de pólipos, fibrosis de la enfermedad de Crohn, cicatrización de úlcera gástrica, tejido cicatricial glial, enfermedad fibroquística, reacción desmoplásica a cáncer de mama, mielodisplasia, enfermedades neoplásicas, formación de paño reumatoide, endometriosis, fibroides uterinos y fibroides ováricos.
- 10
- 15
- 20
- 25

Figura 1

