

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 516**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2004 E 04761394 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 1677816**

54 Título: **Folistatina para usar en la regulación negativa de una respuesta inflamatoria**

30 Prioridad:

**06.10.2003 AU 2003905461**

**16.04.2004 AU 2004902056**

**24.08.2004 AU 2004904834**

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

**16.06.2014**

73 Titular/es:

**PARANTA BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)**

**40 City Road**

**Southbank VIC 3006 , AU**

72 Inventor/es:

**DE KRETZER, DAVID MORRITZ;**

**PHILLIPS, DAVID JAMES;**

**JONES, KRISTIAN LEE;**

**O'HEHIR, ROBYN, DEP. OF PATHOLOGY AND**

**IMMUNOLOGY y**

**PATELLA, SHANE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 468 516 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

Folistatina para usar en la regulación negativa de una respuesta inflamatoria

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a agentes para usar en la modulación de una respuesta inflamatoria en un mamífero. Más particularmente, la presente invención se refiere a la modulación de una respuesta inflamatoria en un mamífero modulando la actividad funcional de la activina y, de este modo, modulando la cascada de mediadores proinflamatorios. El uso de la presente invención es útil, entre otros, en el tratamiento y/o profilaxis de afecciones caracterizadas por una respuesta inflamatoria aberrante, indeseada o, de otro modo, inadecuada, incluyendo, entre otros, sepsis e inflamación de las vías respiratorias. También se describen procedimientos para identificar y/o diseñar agentes capaces de modular la regulación mediada por la activina de la respuesta inflamatoria.

15 **Antecedentes de la invención**

Los detalles bibliográficos de las publicaciones a las que el autor hace referencia en la presente memoria descriptiva se recogen alfabéticamente al final de la descripción.

20 La referencia a cualquier técnica anterior en la presente memoria descriptiva no es un reconocimiento o cualquier forma o sugerencia de que la técnica anterior forma parte del conocimiento común general en Australia y no debe interpretarse como tal.

25 Los mamíferos tienen que defenderse contra muchos patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos y parásitos, así como agresiones no patogénicas tales como tumores y agentes tóxicos o dañinos de algún otro modo. En respuesta, han desarrollado mecanismos efectores que son capaces de montar una defensa contra dichos antígenos. Estos mecanismos están mediados por moléculas solubles y/o por células.

30 En el contexto de estos, mecanismos efectores, la inflamación es un proceso complejo de múltiples caras en respuesta a una enfermedad o lesión que está regulado por la liberación de una serie de citocinas (Alexander et al, 2001, J Endotoxin Res 7:167 - 202). Estas citocinas se clasifican en términos generales como citocinas pro o antiinflamatorias y el equilibrio crítico entre la liberación y la actividad de las citocinas con acciones opuestas regula la respuesta inflamatoria para impedir que se convierta en franco o se subestime.

35 Si la respuesta inflamatoria continúa sin comprobarse y es franca, el huésped puede sufrir daños tisulares asociados y, en los casos graves, esto puede presentarse como shock séptico y se puede producir insuficiencia multiorgánica (Ulevitch et al., 1999, Curr Opin Immunol 11:19 - 22). Por el contrario, una respuesta inflamatoria mala o subestimada puede significar infección incontrolada, que tiene como resultado enfermedad crónica y daños en el huésped. La regulación de la respuesta inflamatoria es importante tanto a nivel sistémico como a nivel local.

40 El descubrimiento de los procesos de inflamación detallados ha revelado una estrecha relación entre la inflamación y la respuesta inmunitaria. Existen cinco indicadores básicos de inflamación, siendo estos enrojecimiento (rubor), inflamación (tumor), calor (*calor*), dolor (*dolor*) y función alterada (*functio laesa*). Estos indicadores aparecen por extravasación de plasma e infiltración de leucocitos en el sitio de la inflamación. Consistente con estos indicadores, las principales características de la respuesta inflamatoria son, por tanto:

(i) vasodilatación, ensanchamiento de los vasos sanguíneos para aumentar el flujo de sangre en el área infectada;

50 (ii) aumento de la permeabilidad vascular, esto permite que los componentes difundibles entren en el sitio;

(iii) infiltración celular, siendo esto el movimiento dirigido de las células inflamatorias a través de las paredes de los vasos sanguíneos en el sitio de la lesión;

55 (iv) cambios en los perfiles biosintéticos, metabólicos y catabólicos de muchos órganos; y

(v) activación de las células del sistema inmunitario, así como sistemas enzimáticos complejos de plasma sanguíneo.

60 La extensión a la cual estas características se producen generalmente es proporcional a la gravedad de la lesión y/o a la extensión de la infección.

65 La respuesta inflamatoria puede clasificarse ampliamente en varias fases. El acontecimiento macroscópico más temprano de una respuesta inflamatoria es la vasoconstricción temporal, es decir estrechamiento de los vasos sanguíneos causada por la contracción del músculo liso en las paredes de los vasos, lo que se puede ver como un blanqueamiento de la piel. A esto le sigue varias fases que se producen en minutos, horas y días después, del

siguiente modo:

- 5 (i) La respuesta vascular aguda sigue en segundos a una agresión tisular y dura unos minutos. Se caracteriza por vasodilatación e incremento de la permeabilidad capilar debido a las alteraciones en el endotelio vascular, lo que conduce a un incremento del flujo sanguíneo (hiperemia) que produce enrojecimiento (eritema) y la entrada de flujo en los tejidos (edema).
- 10 (ii) Si se ha producido daño suficiente en los tejidos o si se ha producido infección, la respuesta celular aguda tiene lugar en las siguientes horas. La característica principal de esta fase es la aparición de granulocitos, en particular neutrófilos, en el tejido. Estas células se unen primero a las células endoteliales dentro de los vasos sanguíneos (marginación) y después cruzan al tejido circundante (diapedesis). Si el vaso está dañado, el fibrinógeno y la fibronectina se depositan en el lugar de la lesión, las plaquetas se agregan y se activan y se forman coágulos.
- 15 (iii) Si el daño es lo bastante grave, en los siguientes días se puede producir una respuesta celular crónica. Una característica de esta fase de inflamación es la aparición de un infiltrado de células mononucleares compuesto por macrófagos y linfocitos. Los macrófagos están implicados en la muerte de los microbios, en la limpieza de los residuos celulares y tisulares, y también se piensa que desempeñan un papel significativo en el remodelado tisular.
- 20 (iv) En las siguientes semanas se puede producir resolución, en la que se restablece la arquitectura del tejido normal. Los coágulos sanguíneos se eliminan mediante fibrinólisis. Si no es posible devolver el tejido a su forma original se puede producir cicatrización por llenado con fibroblastos, colágeno y nuevas células endoteliales. En general, para este momento cualquier infección se habrá superado, aunque este no siempre es el caso y puede dar lugar a otras respuestas inmunológicas, tales como formación de granulomas.
- 25

30 La inflamación a menudo se considera en términos de inflamación aguda, que incluye todos los acontecimientos de la respuesta vascular aguda y celular aguda (1 y 2 anteriores) e inflamación crónica, que incluye los acontecimientos durante la respuesta celular crónica y resolución o cicatrización (3 y 4).

No obstante, debe entenderse que además de la aparición de respuesta inflamatorias de un modo localizado en el tejido que está dañado, infectado o sometido a una respuesta autoinmunitaria, las respuestas inflamatorias también se pueden producir sistémicamente, como en el caso de la sepsis.

35 De acuerdo con esto, a la luz del amplio impacto de las respuestas inflamatorias, existe una necesidad constante de aclarar los mecanismos complejos por los cuales funcionan. Identificando estos mecanismos, de este modo se proporciona un alcance para desarrollar medios de modulación adecuada de respuestas inflamatorias.

40 Inhibina, activina y folistatina son tres familias de polipéptidos aislados inicialmente y caracterizados de fluido ovárico folicular basándose en su modulación de la liberación de la hormona estimulante del folículo de cultivos de células hipofisarias. Además de sus efectos sobre la síntesis y secreción de la hormona estimulante del folículo, la inhibina y la activina tienen otras funciones biológicas. Por el contrario, el significado fisiológico de la folistatina era oscuro, hasta que se descubrió que la folistatina es una proteína de unión a la activina.

45 Las activinas, compuestas por dos subunidades  $\beta$ ,  $\beta_A$ ,  $\beta_B$ ,  $\beta_C$  y/o  $\beta_E$  son miembros de la superfamilia del factor transformante del crecimiento (TGF)- $\beta$  [Vale et al., 1990, Handbook of Experimental Physiology, Vol. 95, Eds. Sporn & Roberts, Springer-Verlag, Berlín pág. 211 - 248]. Las formas de proteína multimérica de la activina incluyen las formas homodiméricas (Activina A -  $\beta_A\beta_A$ , Activina B -  $\beta_B\beta_B$ , Activina C -  $\beta_C\beta_C$ , y Activina E -  $\beta_E\beta_E$ ) y las formas heterodiméricas (por ejemplo, Activina AB -  $\beta_A\beta_B$ , Activina AC -  $\beta_A\beta_C$ , o Activina AE -  $\beta_A\beta_E$ ). Las activinas son proteínas multifuncionales. Por ejemplo, la activina A, aunque identificada inicialmente como un regulador de la liberación de la hormona estimulante del folículo, ahora se sabe que exhibe la gama pleiotrópica de actividades funcionales que son características de la mayoría de las citocinas. Las activinas, como sus proteínas relacionadas, las inhibinas (que consisten en un dímero de una subunidad  $\alpha$  distinta aunque estructuralmente relacionada y una subunidad  $\beta$  de la activinas) se pueden unir a los receptores de tipo II de la activina. No obstante, solo las activinas son capaces de reclutar los receptores de tipo I para formar un complejo activo, desencadenando vías de señalización Smad intracelulares y, de este modo, influyendo sobre la función celular a nivel transcripcional. En la actualidad, se ha mostrado la activina A, AB y B demuestran actividad agonista típica mediada por receptores. Se ha comunicado que la activina B muestra menos actividad biológica que la activina A [Nakamura et al., Journal of Biological Chemistry, 267, 16385 - 16389, 1992]. Esto se puede asociar con una variación en la disponibilidad de receptores de tipo I específicos, reclutados de forma diferencial por la activina A y B [Tsuchida et al., 2004 Molecular and Cellular Endocrinology 220, 50 - 65].

60

65 La folistatina funciona como regulador biológico de la activina. De hecho, inicialmente se identificó por su capacidad para suprimir la secreción de la hormona estimulante del folículo, que después se ha mostrado que se debe a su propiedad como proteína de unión a la activina. La folistatina es una proteína monomérica que se une a la activina con una afinidad elevada y se cree que después conduce a la degradación lisosomal de la activina en complejo. La

folistatina comprende una serie de variantes postraduccionales y de glicosilación. No obstante, las dos isoformas principales son la folistatina 315 de longitud completa, que se cree que es la isoforma circulante predominante, y la isoforma 288, que tiene una fuerte afinidad por los proteoglicanos de heparina sulfato y es, considerablemente, una isoforma asociada a la membrana celular (Phillips y de Kretser, 1998, *Frontiers in Neuroendocrinology* 19:287 - 322).

5 La activina afecta al crecimiento y diferenciación de muchos tipos celulares, estimula la secreción de la hormona estimulante del folículo de la hipófisis e inhibe la hormona de crecimiento, la prolactina, y la liberación de adrenocorticotropina [Billestrup et al., *Molecular Endocrinology* 1990 4:356 - 362; Kitaoka et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1988 157:48 - 54; Vale et al., *Nature* 1986, 321:776 - 779]. La activina A se caracterizó por primera vez por su capacidad para estimular la hormona estimulante del folículo (FSH) en la hipófisis, una capacidad compartida por la activina B [Nakamura et al., 1992, *supra*; Van Dijk et al., 1995, *Annals of the New York Academy of Science* 762, 319 - 330]. No obstante, ahora se sabe que la activina A posee muchas más propiedades además de su función inicial para la que se aisló por primera vez. Tanto la activina A como la B participan en el desarrollo del feto, presentando sus respectivas desactivaciones en ratones [Vassalli et al., 1994, *Genes and Development*, 8:414 - 427] distintas anomalías fenotípicas. La desactivación de la activina A exhiben defectos fenotípicos letales en neonatos [Vassalli et al., 1994, *supra*; Matzuk et al., 1995, *Nature* 374: 354 - 356] pero la sustitución del gen  $\beta_A$  con  $\beta_B$  proporciona rescate parcial de este fenotipo [Brown et al., 2000, *Nature Genetics*, 25:453 - 457], lo que sugiere algún solapamiento en las actividades de la activina A y B. En contraste con estas observaciones, existen pruebas de que la activina B puede tener papeles específicos en procesos tales como la inducción del mesodermo embrionario [Thomsen et al., 1990, *Cell* 63:485 - 493] y el desarrollo de las glándulas mamarias [Robinson et al., 1997, *Development* 124:2701 - 2708]. De particular interés es que se supone que la activina B es la activina de relevancia en la regulación intrahipofisaria de la FSH, como muestran los estudios de neutralización [Corrigan et al., 1991, *Endocrinology* 128:1682 - 1684]. Adicionalmente, son evidentes claras diferencias en los patrones de expresión de la activina A y B durante la reparación tisular [Hübner et al., 1996, *Developmental Biology* 173:490 - 498] y en asociación con modelos de fibrosis hepática [De Bleser et al., 1997, *Hepatology*, 26:905 - 912]. Dichas pruebas sugieren que la activina A y B desempeñan papeles diferentes en una serie de procesos biológicos y patológicos.

30 La folistatina se une específicamente a varios miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  pero, como mucho, posee la afinidad más alta de unión a la activina. Como resultado, la folistatina circulante 315 neutraliza la actividad de la activina impidiendo la interacción de la citocina con sus receptores de tipo II [de Winter et al., *Molecular and Cellular Endocrinology* 1996 116:105 - 114] y, además, la folistatina 288 unida a la superficie celular facilita la degradación lisosómica de la activina [Hashimoto et al., *Journal of Biological Chemistry* 1997 272:13835 - 13842]. Los ARNm de la folistatina y de la activina muestran una amplia distribución tisular [Meunier et al., *PNAS* 1988 85:247 - 251; Michel et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1990 173:401 - 407; Schneider et al., *European Journal of Endocrinology* 2000 142:537 - 544]. La folistatina y la activina son detectables en suero [Demura et al., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993 76:1080 - 1082; Demura et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992 185:1148 - 1154; Gilfillan et al., *Clinical Endocrinology* 1994 41:453 - 461; Khoury et al., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995 80:1361 - 1368; Knight et al., *Journal of Endocrinology* 1996 148:267 - 279; McFarlane et al., *European Journal of Endocrinology* 1996 134:481 - 489; Sakai et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992 188:921 - 926; Sakamoto et al., *European Journal of Endocrinology* 1996 135:345 - 351; Tilbrook et al., *Journal of Endocrinology* 1996 149:55 - 63; Wakatsuki et al., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996 81:630 - 634], y sus concentraciones en suero aumentan con la edad [Wakatsuki et al. 1996, *supra*; Loria et al., *European Journal of Endocrinology* 1998 139:487 - 492]. No obstante, en la actualidad, se desconocen las fuentes exactas de folistatina y activina en suero. Los datos actuales sugieren que los equilibrios específicos de tejido de la folistatina y la activina dirigen el crecimiento y diferenciación de los tipos de células respondedoras de un modo autocrino/paracrino [Michel et al., *Acta Endocrinologica* 1993 129:525 - 531; Phillips, *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2001 12:94 - 96].

50 Se ha documentado un papel emergente de la folistatina y la activina en la respuesta inmunitaria innata del cuerpo. Por ejemplo, la folistatina y la activina son secretadas por varios tipos de células en respuesta a los compuestos inflamatorios *in vitro* [Hübner et al., *Experimental Cell Research* 1996 228:106 - 113; Jones et al., *Endocrinology* 2000 141:1905 - 1908; Keelan et al., *Placenta* 2000 21:38 - 43; Michel et al., *Endocrinology* 1996 137:4925 - 4934; Phillips et al., *Journal of Endocrinology* 1998 156:77 - 82; Yu et al., *Immunology* 1996 88:368 - 374; Erämaa et al., *Journal of Experimental Medicine* 1992 176:1449 - 1452; Shao et al., *Cytokine* 1998 10:227 - 235; Mohan et al., *European Journal of Endocrinology* 2001 145:505 - 511]. Además, en algunos ejemplos de los procesos inflamatorios tales como cicatrización de heridas, enfermedad inflamatoria intestinal y artritis reumatoide, se ha observado un incremento de la expresión de la activina y/o folistatina [Hübner et al., *Laboratory Investigation* 1997 77:311 - 318; Hübner et al., 1996, *supra*; Yu et al., *Clinical and Experimental Immunology* 1998 1,12:126 - 132]. No obstante, desde estos hallazgos muy tempranos y preliminares, el papel de la activina y la folistatina en el contexto de la inflamación *per se* no se ha aclarado adicionalmente, ni en el contexto de sus actividades precisas o en el contexto del alcance de las afecciones inflamatorias en las que funcionan. A la luz de la extrema diversidad en términos de la naturaleza y la extensión de las respuestas inflamatorias que se pueden producir y las actividades extremadamente pleiotrópicas de las citocinas, tales como las diversas formas de activina, no es sorprendente que los hallazgos preliminares de mediados a últimos de la década de 1990 no han progresado a teorías más sustanciales. En particular, la activina A, la activina B y la folistatina se expresan en una amplia variedad de tipos

celulares y la mayoría de los órganos del cuerpo en respuesta a una amplia gama de estímulos. De acuerdo con lo anterior, su papel en el contexto de la inflamación no se puede predecir y, por tanto, está lejos de estar claro.

5 En los trabajos que han llevado a la presente invención, sorprendentemente se ha determinado que la activina A funciona como componente crucial de la cascada de las citocinas que regula la respuesta inflamatoria. Específicamente, la activina A inicia la liberación *in vivo* de las citocinas proinflamatorias y, de hecho, pueden modular los niveles de citocinas proinflamatorias que se liberan después frente a un estímulo adecuado. De acuerdo con lo anterior, aunque anteriormente se ha observado que los niveles de activina A se modulan durante el inicio y la progresión de una respuesta inflamatoria, hasta el advenimiento de la presente invención no se han realizado  
10 progresos para aclarar el papel preciso de esta molécula en el contexto de inflamación.

Sorprendentemente, todavía se ha determinado además que los niveles de activina B se modulan incluso más espectacularmente en el contexto de una respuesta inflamatoria que son niveles de activina A. Esto es particularmente sorprendente a la luz de lo que se sabe hasta la fecha en relación con los distintos papeles de las activinas A y B. Todavía más, mientras que los inmunoensayos dirigidos a la medición de la activina A han estado disponibles para usar durante algún tiempo, el análisis de la activina B se ha inhibido por la ausencia de un inmunoensayo específico para esta especie concreta de activina. Se dispone de un conjunto limitado de datos que sugiere que los niveles de activina B circulantes se alteran durante el embarazo o con la función ovárica [Petraglia et al., 1993, *Endocrine Journal* 1:323 - 327; Woodruff et al., 1997, *Journal of Endocrinology* 152:167 - 174; Vihko et al., 1998, *Human Reproduction* 13:841 - 846; Vihko et al., 2003, *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 80:570 - 574] Kobayashi et al. (2000) [Biol. Pharm. Bull. 23(6):755 - 757] demostraron que un incremento del ARNm de la activina- $\beta_B$  se asocia con regeneración hepática y el desarrollo de fibrosis, aunque los autores no postulan si esto está unido con cambios en los niveles de activina AB, activina B o inhibina. Un estudio de Rosendahl et al. 2001 [Am J Respir Cell Mol Biol 25:60 - 68] analizó un modelo de ratón de exposición de las vías respiratorias inducida por alérgeno en los pulmones y se centró en analizar los cambios asociados en la expresión y distribución de la superfamilia del TGF- $\beta$  y receptores de TGF- $\beta$  /activina. Este grupo indicó que los alérgenos de las vías respiratorias inducidas solo produjeron una elevación muy modesta de la expresión del ARNm de la activina  $\beta_B$  sobre los niveles control. Los análisis histológicos no proporcionaron información sobre la síntesis de proteínas diméricas de activina mdura o la distribución (activinaA o B) ni se proporcionó pruebas de que el modesto incremento de los niveles de ARNm de activina- $\beta_B$  no estaban, de hecho, ligados a cambios en los niveles de inhibina. De acuerdo con lo anterior, la determinación de que los niveles de activina B aumentan, de hecho, de forma espectacular durante la inflamación respecto a los niveles de activina A es extremadamente inesperada a la luz de la información muy limitada que disponible sobre el funcionamiento de las moléculas de activina A y activina B.  
15  
20  
25  
30

35 Los hallazgos de la presente invención han facilitado ahora el desarrollo de metodología dirigida a la modulación de la respuesta inflamatoria regulando los niveles de activina A y activina B funcionalmente activas y, por tanto, la liberación de citocinas proinflamatorias. De acuerdo con lo anterior, ahora se proporcionan ambos procedimientos para el tratamiento terapéutico y profiláctico de afecciones caracterizadas por una respuesta inflamatoria indeseada o inadecuada y medios para la detección selectiva de reguladores de la liberación de citocinas proinflamatorias, tales como miméticos de activina A y activina B, agonistas o antagonistas.  
40

### Sumario de la invención

45 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entiende que la palabra "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

50 La especificación sujeto contiene información sobre secuencias de nucleótidos preparadas usando el programa Patentln Version 3,1, presentadas en el presente documento después de la bibliografía. Cada secuencia de nucleótidos se identifica en el listado de secuencias por el indicador numérico <210> seguido del identificador de secuencias (p. ej., <210>1, <210>2, etc). La longitud, el tipo de secuencia (ADN, etc) y el organismo fuente para cada secuencia de nucleótidos se indica en la información proporcionada en los campos del indicador numérico <211>, <212> y <213>, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas a las que se hace referencia en la especificación se identifican con el indicador SEC ID N° seguido del identificador de la secuencia (p. ej., SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, etc.). El identificador de la secuencia al que se hace referencia en la especificación se correlaciona con la información proporcionada en el campo del indicador numérico <400> en el listado de secuencias, seguido del identificador de la secuencia (p. ej., <400>1, <400>2, etc). Es decir, la SEC ID N° como se detalla en la especificación se correlaciona con la secuencia indicada como <400> 1 en el listado de secuencias.  
55  
60

La presente invención proporciona, en un primer aspecto, folistatina para usar en un procedimiento de regulación negativa de una respuesta inflamatoria en un mamífero, en el que la respuesta inflamatoria se produce en el contexto de un trasplante de pulmón, síndrome de dificultad respiratoria aguda grave o asma.

65 La presente invención proporciona además folistatina para usar en un procedimiento de tratamiento de una afección caracterizada por una respuesta inflamatoria aberrante, indeseada o, de otro modo, inadecuada, en un mamífero, en

el que la respuesta inflamatoria se produce en el contexto de un trasplante de pulmón, síndrome de dificultad respiratoria aguda grave o asma.

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona folistatina para usar en un procedimiento de regulación negativa de una respuesta inflamatoria en un mamífero mediante la regulación negativa de la actividad funcional de la activina A y/o la activina B en dicho mamífero, en el que la respuesta inflamatoria se produce en el contexto de una inflamación aberrante, indeseada o, de otro modo, inadecuada, de las vías respiratorias.

10 En la presente invención, cuando la respuesta inflamatoria es una respuesta a una cascada proinflamatoria, la cascada proinflamatoria se caracteriza por la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 y/o IL-6, y la respuesta inflamatoria se regula por disminución mediante la regulación negativa de la actividad funcional de la activina A y/o la activina B en dicho mamífero hasta un nivel ineficaz para inhibir o retrasar la cascada proinflamatoria.

15 También se describe un método de modulación de la respuesta inflamatoria en un mamífero, comprendiendo dicho método modular la actividad funcional de la activina en la que la regulación por aumento los fragmentos de activina, derivados, mutantes o variantes de la misma hasta un nivel eficaz en dicho mamífero induce, mantiene o aumenta la cascada de mediadores proinflamatorios y disminuye la activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz en dicho mamífero en dicho mamífero inhibe o retrasa la la cascada de mediadores proinflamatorios.

20 También se describe un procedimiento de modulación de la respuesta inflamatoria en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento la modulación de la actividad funcional de la activina, en la que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos, derivados, mutantes o variantes de la misma, en la que la regulación por aumento de dicha activina hasta un nivel eficaz en dicho mamífero induce, mantiene o aumenta la cascada de mediadores proinflamatorios y disminuye dicha activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz en dicho mamífero en dicho mamífero inhibe o retrasa la la cascada de mediadores proinflamatorios.

30 También se describe un método de modulación de la respuesta inflamatoria local en un mamífero, comprendiendo dicho método la modulación de la actividad funcional de la activinam en la que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos, derivados, mutantes o variantes de la misma, en la que la regulación por aumento de dicha activina hasta un nivel eficaz en dicho mamífero induce, mantiene o aumenta la cascada de mediadores proinflamatorios y disminuye dicha activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz en dicho mamífero en dicho mamífero inhibe o retrasa la la cascada de mediadores proinflamatorios locales.

35 También se describe un método de modulación de la respuesta inflamatoria sistémica en un mamífero, comprendiendo dicho método la modulación de la actividad funcional de la activinam en la que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos, derivados, mutantes o variantes de la misma, en la que la regulación por aumento de dicha activina hasta un nivel eficaz en dicho mamífero induce, mantiene o aumenta la cascada de mediadores proinflamatorios y disminuye dicha activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz en dicho mamífero en dicho mamífero inhibe o retrasa la la cascada de mediadores proinflamatorios sistémicos.

45 También se describe un método de modulación de la respuesta inflamatoria en un mamífero, comprendiendo dicho método la modulación de la actividad funcional de la activina, en la que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos, derivados, mutantes o variantes de la misma, en la que la regulación por aumento de dicha activina hasta un nivel eficaz en dicho mamífero induce, mantiene o aumenta la cascada de mediadores proinflamatorios y disminuye dicha activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz en dicho mamífero en dicho mamífero inhibe o retrasa la cascada de citocinas proinflamatorias. También se describe un método de modulación de la respuesta inflamatoria local en un mamífero, en la que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos, derivados, mutantes o variantes de la misma, en la que la regulación por aumento de dicha activina hasta un nivel eficaz en dicho mamífero induce, mantiene o aumenta la cascada de mediadores proinflamatorios y disminuye dicha activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz en dicho mamífero en dicho mamífero inhibe o retrasa la la cascada de citocinas proinflamatorias locales.

55 También se describe un método de modulación de la respuesta inflamatoria sistémica en un mamífero, comprendiendo dicho método la modulación de la actividad funcional de la activina, en la que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos, derivados, mutantes o variantes de la misma, en la que la regulación por aumento de dicha activina hasta un nivel eficaz en dicho mamífero induce, mantiene o aumenta la cascada de mediadores proinflamatorios y disminuye dicha activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz en dicho mamífero en dicho mamífero inhibe o retrasa la cascada de citocinas proinflamatorias sistémicas.

60 También se describe un método de regulación negativa de la respuesta inflamatoria en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un agente durante un tiempo y en condiciones suficientes para inducir un nivel funcionalmente ineficaz de la activina, en el que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos, derivados, mutantes o variantes de la misma, en dicho mamífero.

5 También se describe un método de regulación por aumento de la respuesta inflamatoria en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un agente durante un tiempo y en condiciones suficientes para inducir un nivel funcionalmente eficaz de la activina, en el que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos, derivados, mutantes o variantes de la misma, en dicho mamífero.

10 También se describe un método de tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una afección o una predisposición al desarrollo de una afección, caracterizada por una respuesta inflamatoria aberrante, indeseada o, de otro modo, inadecuada en un mamífero, comprendiendo dicho método modular el nivel de la activina en dicho mamífero, en el que la regulación por aumento de los fragmentos de activina, derivados, mutantes o variantes de la misma hasta un nivel funcionalmente eficaz regula por aumento la cascada de mediadores proinflamatorios y la regulación negativa la activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz inhibe o retrasa la cascada de mediadores proinflamatorios.

15 También se describe un método de tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una afección o una predisposición al desarrollo de una afección, caracterizada por una respuesta inflamatoria aberrante, indeseada o, de otro modo, inadecuada en un mamífero, comprendiendo dicho método modular el nivel de la activina, en el que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos de activina, derivados, mutantes o variantes de la misma, en el que la regulación por aumento de dicha activina hasta un nivel funcionalmente eficaz en dicho mamífero induce, mantiene o regula por aumento la cascada de mediadores proinflamatorios y la regulación negativa de dicha activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz inhibe o retrasa la cascada de citocinas proinflamatorias.

25 También se describe un método de tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una afección o una predisposición al desarrollo de una afección, caracterizada por una respuesta inflamatoria aguda indeseada en un mamífero, comprendiendo dicho método la regulación negativa del nivel de la activina, en el que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos de activina, derivados, mutantes o variantes de la misma, en el que la regulación negativa de dicha activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz inhibe o retrasa la cascada de citocinas proinflamatorias.

30 También se describe un método de tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una afección o una predisposición al desarrollo de una afección, caracterizada por una respuesta inflamatoria inadecuada en un mamífero, comprendiendo dicho método modular el nivel de la activina, en el que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos de activina, derivados, mutantes o variantes de la misma, en el que la regulación por aumento de dicha activina hasta un nivel funcionalmente eficaz en dicho mamífero induce, mantiene o regula por aumento la cascada de mediadores proinflamatorios y la regulación negativa de dicha activina hasta un nivel funcionalmente eficaz regula por aumento la cascada de citocinas proinflamatorias.

40 También se describe el uso de un agente capaz de modular el nivel funcionalmente eficaz de activina, fragmentos, derivados, mutantes o variantes de la misma, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una afección o una predisposición al desarrollo de una afección, caracterizado por una respuesta inflamatoria aberrante, indeseada o, de otro modo, inadecuada en un mamífero, en el que la regulación por aumento de la activina hasta un nivel funcionalmente eficaz regula por aumento la cascada de mediadores proinflamatorios y la regulación negativa la activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz inhibe o retrasa la cascada de mediadores proinflamatorios.

50 También se describe el uso de un agente capaz de modular el nivel funcionalmente eficaz de activina en el que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos, derivados, mutantes o variantes de la misma, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una afección o una predisposición al desarrollo de una afección, caracterizado por una respuesta inflamatoria aberrante, indeseada o, de otro modo, inadecuada en un mamífero, en el que la regulación por aumento de dicha activina hasta un nivel funcionalmente eficaz en dicho mamífero induce, mantiene o regula por aumento la cascada de mediadores proinflamatorios y la regulación negativa de dicha activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz inhibe o retrasa la cascada de citocinas proinflamatorias.

55 También se describe una composición farmacéutica que comprende el agente modulador como se ha definido anteriormente en el presente documento junto con uno o más vehículos y / o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

60 **Breve descripción de las figuras**

La **Figura 1A** es una representación gráfica de la liberación de activina A después de una exposición inflamatoria, en la forma de lipopolisacárido (LPS), en ratones.

65 La **Figura 1B** es una representación gráfica de la liberación de folistatina en respuesta a LPS.

La **Figura 1C** es una representación gráfica de la liberación de TNF $\alpha$  en respuesta a LPS.

La **Figura 1D** es una representación gráfica de la liberación de IL-6 en respuesta a LPS.

5 La **Figura 1E** es una representación gráfica de la liberación de IL-1 $\beta$  en respuesta a LPS.

La **Figura 2A** es una representación gráfica de la liberación de activina A después de una inyección de LPS en ratones que recibieron una inyección de folistatina 288 humana recombinante (rhfolistatina-288) 30 minutos antes del LPS.

10 La **Figura 2B** es una representación gráfica de la liberación de folistatina en ratones después de la administración de rhfolistatina-288 30 minutos antes del LPS.

15 La **Figura 2C** es una representación gráfica de del nivel de TNF $\alpha$  liberado en ratones después de la administración de rhfolistatina-288 30 minutos antes del LPS.

La **Figura 2D** es una representación gráfica del nivel de interleucina-6 liberada después de la inyección de rhfolistatina-288 seguido de una inyección de LPS.

20 La **Figura 2E** es una representación gráfica del nivel de de IL-1 $\beta$  liberada después de la inyección de folistatina seguido de LPS.

25 La **Figura 3** es una imagen de la expresión de activina A en (A) epitelio bronquial y infiltrado inflamatorio, (B) expresión difusa en el músculo liso de la submucosa y las estructuras vasculares (flechas) y (C) expresión en el epitelio bronquial y células inflamatorias discretas (flechas). A y B, el asma; C, la fibrosis quística. Inmunoperoxidasa, aumento original x 400.

30 La **Figura 4** es una representación gráfica de la cinética de de la expresión de activina A y la inflamación pulmonar en el modelo murino de OVA de los inventores. (A) la concentración de la activina en BALF medida mediante ELISA, (B) el número absolute de eosinófilos en el LBA y (C) la frecuencia de células de ganglios linfáticos mediastínicos productores de IL-4 medida mediante ELISPOT. Varón  $\pm$  SEM, n = 5 ratones por grupo por punto de tiempo.

35 La **figura 5** es una imagen de la expresión de activina A en solución salina de control (A) y ratones OVA sensibilizados tras 4 exposiciones (B), y 10 días después de la 4<sup>a</sup> exposición (C). Las flechas indican pérdida de expresión de activina A en el epitelio bronquial hipertrofiado (B), y expresión parcheada el día 17 (C).

40 La **figura 6** es una representación gráfica de los niveles de ARNm cuantitativos para las subunidades  $\beta_A$  (panel superior) y  $\beta_B$  (panel inferior) en hígados de ratones expuestos a una sola inyección intraperitoneal de LPS. Los ratones se trataron con LPS solo (sin pretratamiento con folistatina, círculos sólidos) o 1  $\mu$ g de folistatina recombinante humana 288 treinta minutos antes del LPS (pretratamiento con folistatina, círculos abiertos). Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM en cada punto de tiempo evaluado en relación con LPS, con niveles de expresión expresados en relación con la expresión del gen doméstico, GAPDH. Todos los datos a tiempo se normalizaron a un valor de 1 y los datos en los puntos de tiempo posteriores se expresaron en relación a ese punto de tiempo.

50 La **figura 7** es una representación gráfica de los niveles de ARNm cuantitativos para las subunidades  $\beta_A$  (panel superior) y  $\beta_B$  (panel inferior) en hígados de ratones expuestos a una sola inyección intraperitoneal de CCl<sub>4</sub>. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM en cada punto de tiempo evaluado en relación con CCl<sub>4</sub>, con niveles de expresión expresados en relación con la expresión del gen doméstico, GAPDH. Todos los datos a tiempo se normalizaron a un valor de 1 y los datos en los puntos de tiempo posteriores se expresaron en relación a ese punto de tiempo.

55 La **Figura 8** es una imagen de la inmunolocalización de la subunidad  $\beta_A$  de la activinas en los hígados de ratones en varios puntos de tiempo después del tratamiento con LPS. Los subunidad  $\beta_A$  de la activinas se localice en los hepatocitos de animales no tratados (t = 0 h), pero principalmente alrededor de las venas hepáticas centrales. La inmunolocalización pareció disminuida a las 5 horas después de la exposición a LPS, pero regresó a los patrones de localización pretratamiento a las 12 horas (X 50).

60 La **Figura 9** es una imagen de la inmunolocalización de la subunidad  $\beta_B$  de la activinas en los hígados de ratones en varios puntos de tiempo después del tratamiento con LPS. Los subunidad  $\beta_B$  de la activinas se localice en los hepatocitos de animales no tratados (t = 0 h), en las zonas que rodean los espacios porta, pero no en las venas centrales. La inmunolocalización pareció disminuida a las 5 horas después de la exposición a LPS, pero regresó a los patrones de localización pretratamiento a las 12 horas. Tenga en cuenta también la pérdida de la localización en los hepatocitos periféricos (asteriscos) (X 50).

65



La **Figura 10** es una imagen de la inmunolocalización de la subunidad  $\beta_A$  de la activina (paneles a y b) y la subunidad  $\beta_B$  de la activina (paneles c y d) en los hígados de los ratones a 0 o 36 horas después de la exposición a CCL<sub>4</sub>. En cuanto al tratamiento con LPS, la subunidad  $\beta_B$  de la activina se localizó en las zonas que rodean el tracto portal, pero no en las venas centrales, mientras que la subunidad  $\beta_A$  de la activinas se localiza en los hepatocitos que rodean las venas centrales. Obsérvense también que la localización de la subunidad  $\beta_A$  de la activina en el punto de tiempo de 36 horas en las zonas de apoptosis/necrosis de hepatocitos, mientras que la localización de la subunidad  $\beta_B$  de la activina está ausente de estas áreas (asteriscos) (X50).

La **Figura 11** es una representación gráfica de las concentraciones en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de la activina A y la folistatina en pacientes de traumatismo craneal (paneles A - E) tomadas varios días después de la incidencia del traumatismo.

La **Figura 12** es una representación gráfica de la liberación de citocinas en ratones a los que se ha administrado 0,5  $\mu$ g de folistatina antes de LPS.

La **Figura 13** es una representación gráfica de la liberación de citocinas en ratones a los que se ha administrado 2  $\mu$ g de folistatina antes de LPS.

La **Figura 14** es una representación gráfica de la liberación de IL-6 en ratones a los que se ha administrado 0 - 2  $\mu$ g de folistatina antes de LPS.

La **Figura 15** es una representación gráfica de las concentraciones en plasma de folistatina y activina A en cuatro pacientes (paneles A - D) con lesiones de quemaduras moderadas. El día de la obtención de las muestras se refiere al primer día en que se tomó una muestra y no necesariamente en relación con el día de la quemadura.

La **Figura 16** es una imagen de la piel que muestra la inmunocitoquímica de la inmunocitoquímica de activina A ( $\beta_A$ ) y de folistatina (FS) se muestra en color marrón. H y E representa una sección teñida con hematoxilina y eosina (H y E). SL = estrato lúcido; SGR = estrato granuloso; SSp = estrato espinoso; SGE = estrato germinativo; INF = células inflamatorias.

La **Figura 17** es una imagen de una sección que muestra áreas epitelializadas y desnudas de quemaduras que muestran fibrosis dérmica marcada con fibroblastos, los macrófagos y los vasos sanguíneos marcados con flechas. El producto de color marrón indica positividad a activinas o a folistatina.

La **Figura 18** es una imagen de una biopsia de la zona que carece de epitelio y que muestra fibrosis marcada, indicando las flechas vasos sanguíneos pequeños que muestran la localización de la activina A y un área de células inflamatorias (INF). Obsérvense que la folistatina muestra una intensidad de la tinción marcadamente menor.

La **Figura 19** es una imagen de un mayor aumento que muestra zonas dérmicas de la fibrosis con zonas de aspecto amorfas de colágeno (C). Fibroblastos (F) que muestran activina A y marcadamente menos intensidad de folistatina. Los vasos sanguíneos también muestran la localización (V).

La **Figura 20** es una imagen de una sección teñida con H & E que muestra la colección de células moribundas (D) e inflamatorias. Otras áreas muestran la localización de la activina A y la folistatina en fibroblastos (F) y células inflamatorias (INF).

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en la determinación sorprendente que el papel de las activinas A y B en la respuesta inflamatoria se produce en el contexto de estas moléculas siendo moduladores de la liberación de citocinas proinflamatorias. Específicamente, se ha encontrado que la activina A inicia el inicio de la cascada de citocinas proinflamatorias. De manera similar, pero aún más sorprendente, ahora también se ha encontrado que las moléculas de activina que comprenden la subunidad  $\beta_B$  regulan las etapas muy tempranas de la respuesta inflamatoria, a pesar de que, por lo demás, exhiben un distintivo funcional significativo de la activina A. Más sorprendentemente, sin embargo, esta molécula exhibe niveles significativamente más altos de expresión que la activina A en este momento. De acuerdo con esto, estos hallazgos han facilitado ahora el diseño racional de los medios para la modulación de la respuesta inflamatoria y, en particular, para tratar afecciones terapéuticamente o profilácticamente que se caracterizan por una respuesta inflamatoria inadecuada. Además, no se facilita la identificación y / o diseño de agentes que interaccionan específicamente con o imitan la activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$  para modular su funcionalidad y, de ese modo, la aparición o progresión de una respuesta inflamatoria.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la presente invención está dirigido a la folistatina para uso en un procedimiento de regulación negativa de una respuesta inflamatoria en un mamífero, en el que la respuesta

inflamatoria se produce en el contexto de un trasplante de pulmón, síndrome de dificultad respiratoria aguda grave o asma.

5 Más particularmente, la presente invención está dirigida a la folistatina para uso en un procedimiento de regulación negativa de una respuesta inflamatoria en un mamífero mediante la regulación negativa de la actividad funcional de la activina A y/o la activina B, en el que la respuesta inflamatoria se produce en el contexto de una inflamación aberrante, indeseada o, de otro modo, inadecuada, de las vías respiratorias.

10 La respuesta inflamatoria es una respuesta compleja que se caracteriza por una serie de eventos fisiológicos y / o inmunológicos que se inducen mediante la liberación de una cascada de citocinas en respuesta a uno cualquiera de varios estímulos incluyendo, entre otros, lesión tisular, infección, una respuesta inmunitaria (tal como un patógeno o un agente inocuo, como ocurre con las alergias) o enfermedad (tales como la formación de tumores o una respuesta autoinmunitaria).

15 Los acontecimientos fisiológicos que caracterizan la inflamación incluyen

- (i) vasodilatación
- (ii) aumento de la permeabilidad vascular
- (iii) infiltración celular
- 20 (iv) cambios en los perfiles biosintéticos, metabólicos y catabólicos de los órganos afectados
- (v) activación de las células del sistema inmune.

25 Se debe entender que la referencia a una "respuesta inflamatoria" es una referencia a uno cualquiera o más de los acontecimientos fisiológicos y / o inmunológicos o fases inducidas en el contexto de la inflamación y, específicamente, en respuesta a las señales generadas por la cascada de citocinas que dirige la respuesta inflamatoria. Por ejemplo IL-1, TNF-alfa e IL-6 son bien conocidos por sus funciones como mediadores proinflamatorios. También debe entenderse que una respuesta inflamatoria en el contexto de la presente invención incluye esencialmente una referencia a una respuesta parcial, tal como una respuesta que acaba de comenzar o a cualquier fase o acontecimiento específico de una respuesta (tales como las fases y acontecimientos que se detallan en los puntos (i) - (v), anteriormente, o cualquier otro efecto relacionado con la inflamación, incluyendo, entre otros, la producción de proteínas de fase aguda, incluyendo los componentes del complemento, fiebre y una respuesta inmunitaria sistémica). Además, también debe entenderse que dependiendo de cualquier conjunto dado de circunstancias específicas, el punto final de una respuesta inflamatoria puede variar. Por ejemplo, en algunas situaciones no sólo se puede producir una respuesta vascular aguda. En la medida en que se produce una inflamación "aguda", esto generalmente se entiende que incluye los acontecimientos de una respuesta vascular aguda y una respuesta celular aguda. Algunas respuestas inflamatorias se resolverán en la fase aguda, mientras que otras pueden progresar hasta convertirse en respuestas celulares crónicas.

40 En ciertas circunstancias, el proceso agudo, caracterizado por la infiltración de neutrófilos y edema, da paso a un predominio de los fagocitos mononucleares y linfocitos. Se cree que esto se produce en algún grado con el proceso de cicatrización normal, pero se convierte en exagerada y crónica cuando hay eliminación ineficaz de materiales extraños como en ciertas infecciones (por ejemplo, tuberculosis) o después de la introducción de cuerpos extraños (por ejemplo, amianto) o deposición de cristales de cristales de urato). La inflamación crónica se asocia a menudo con la fusión de las células mononucleares para formar células gigantes multinucleadas, que eventualmente se convierten en un granuloma. La inflamación crónica también se observa en condiciones de hipersensibilidad retardada. La respuesta inflamatoria sujeta puede ser sistémica o localizada. Ejemplos de respuestas inflamatorias sistémicas incluyen aquellas que entran en el ámbito de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, como el shock séptico, shock tóxico o septicemia.

50 Ejemplos de respuestas inflamatorias localizadas incluyen las que se producen en el contexto de la inflamación de las vías respiratorias (por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis quística, el trasplante de pulmón, bronquiolitis obliterante, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva, asbestosis, apnea del sueño obstructiva, hipoxia o hipertensión pulmonar), artritis reumatoide, esclerosis múltiple, encefalitis, síndrome de dificultad respiratoria aguda grave, enfermedad inflamatoria intestinal, pancreatitis, aterosclerosis, meningitis, apendicitis, angiogénesis, psoriasis, protección neuronal, necrosis tubular renal, lesión cerebral traumática, respuestas alérgicas y cicatrización de heridas (por ejemplo, tras cirugía, quemaduras u otras lesiones de tejidos). Sin embargo, se debe entender que algunas respuestas inflamatorias localizadas pueden llegar a ser sistémicas, por ejemplo, como puede ocurrir cuando el inicio del choque séptico se produce como complicación de quemaduras graves o heridas abdominales. En otro ejemplo, la septicemia puede ser resultado de la transición de una infección bacteriana más localizada a una infección circulatoria.

De acuerdo con ello, en una realización preferida, la presente invención comprende regulación negativa de dicha activina a un nivel funcionalmente ineficaz en dicho mamífero para inhibir o retardar la cascada de mediadores proinflamatorios locales.

65 Más preferentemente, dicha respuesta inflamatoria local es aguda.

En otra realización preferida, la presente invención comprende regulación negativa de dicha activina a un nivel funcionalmente ineficaz en dicho mamífero para inhibir o retardar la cascada de mediadores proinflamatorios sistémicos.

5 Más preferentemente, dicha respuesta inflamatoria sistémica es aguda.

De acuerdo con estos aspectos preferidos de la presente invención, dicha respuesta inflamatoria aguda está, preferentemente, regulada por disminución y se produce en el contexto de, o está asociado de otro modo con, shock séptico, septicemia, inflamación de las vías respiratorias, apendicitis, meningitis, respuesta hepática a toxinas o virus, angiogénesis, psoriasis, protección de los nervios, aterosclerosis, necrosis tubular renal, encefalitis, cicatrización de heridas o lesiones traumáticas, como ocurre con lesiones, cirugía y quemaduras (por ejemplo, lesiones cerebrales traumáticas).

10 Preferentemente, dicha inflamación de las vías respiratorias se produce en el contexto de asma, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis quística, trasplante de pulmón, SDRA, bronquiolitis obliterante, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva, asbestosis, apnea obstructiva del sueño, hipoxia o hipertensión pulmonar.

15 Preferentemente, dicha respuesta inflamatoria sistémica aguda se produce en el contexto de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y aún más particularmente sepsis, septicemia, shock tóxico, shock séptico, traumatismo tisular, meningitis o apendicitis.

En otra realización preferida, dicha enfermedad inflamatoria es crónica.

25 Aún más preferentemente, dicha respuesta inflamatoria crónica se produce en el contexto de, o está asociado de otro modo con, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, asma, psoriasis o cicatrización de heridas.

Se debe entender que algunas afecciones y enfermedades, tales como enfermedad inflamatoria intestinal o cicatrización de heridas, pueden estar asociados con las fases tanto aguda como crónica y, por lo tanto, se detallan en el presente documento en ambos contextos.

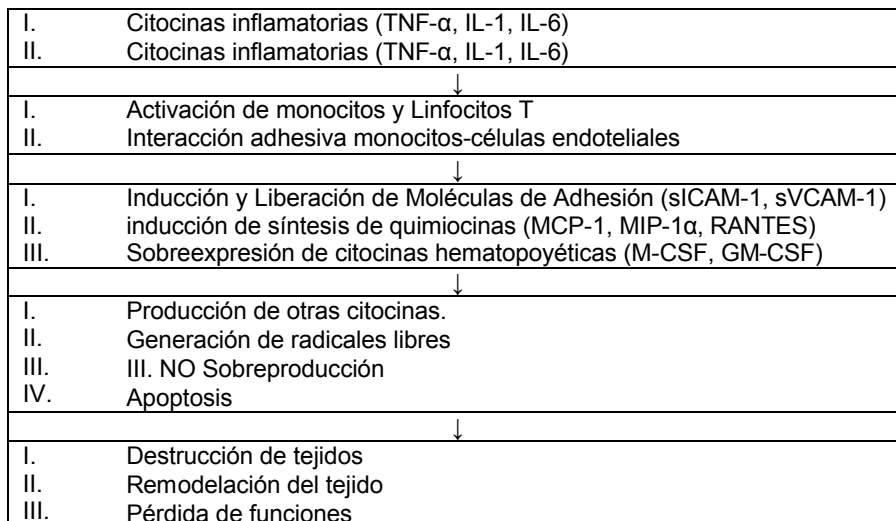
30 La referencia a "la activina A" debe entenderse como una referencia a todas las formas de activina A. La activina A es una proteína dimerica que comprende dos subunidades  $\beta_A$  de la activina. También debe entenderse que incluye la referencia a un dímero que comprende cualquier isoforma que pueda derivarse de corte y empalme del ARNm de  $\beta_A$  de la activina o mutante o formas polimórficas de  $\beta_A$  de la activina. La referencia a "la activina A" debe entenderse que incluye la referencia a todas las formas de estas moléculas, incluyendo todos los precursores, proproteínas o formas intermedias de los mismos. La referencia a la activina A también debe entenderse que se extiende a cualquier proteína de activina A, existente como un dímero, multímero o como proteína de fusión.

40 La referencia a "una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ " debe entenderse como una referencia a una molécula monomérica o multimérica, preferentemente un dímero, que comprende al menos una subunidad  $\beta_B$  de la activina. La referencia a "activina $\beta_B$ " debe entenderse como una referencia a todas las formas de activina  $\beta_B$ . "Subunidad  $\beta_B$  de activina" también se denomina indistintamente "activina  $\beta_B$ ". Debe entenderse que incluye la referencia a cualquier isoforma que pueda derivarse de corte y empalme del ARNm de la activina  $\beta_B$  o mutante o formas polimórficas de la activina  $\beta_B$ . Con la referencia a "activina  $\beta_B$ " no se pretende que sea limitante y debe leerse como que incluye una referencia a todas las formas de  $\beta$  activina  $\beta_B$  incluyendo cualquier proteína codificada por el gen de la subunidad  $\beta_B$  de la activina, cualquier polipéptido de la subunidad, tales como formas precursoras que pueden generarse, y cualquier proteína  $\beta_B$ , existente monómero, multímero o proteína de fusión. Las formas de proteína multimérica de la activina  $\beta_B$  incluye, por ejemplo, las proteínas activina B homodimérica ( $\beta_B$ - $\beta_B$ ) o la activina AB heterodimérica ( $\beta_{La}$ - $\beta_B$ ), activina BC ( $\beta_B$ - $\beta_C$ ), activina BD ( $\beta_B$ - $\beta_D$ ) o activina BE ( $\beta_B$ - $\beta_E$ ). Preferentemente, dicha molécula de activina es activina B.

55 La referencia a "modulación" debe entenderse como una referencia a la regulación por aumento o a la regulación por disminución de la respuesta inflamatoria sujeto. La referencia a "regulación negativa" de una respuesta inflamatoria se debe entender, por tanto, como una referencia a la prevención, reducción (por ejemplo, ralentización) o, de otra manera, inhibición de uno o más aspectos de una respuesta inflamatoria, mientras que la referencia a "regulación por aumento" debe entenderse que tiene el sentido inverso. En el contexto de la presente invención, la modulación de la respuesta inflamatoria se logra a través de la regulación por aumento o la regulación negativa de la cascada de citocinas proinflamatorias. Aunque el método preferido es el de regular negativa la respuesta inflamatoria en el contexto de afecciones caracterizadas por una respuesta inflamatoria no deseada, tales como inflamación de las vías respiratorias, sepsis, septicemia, meningitis, artritis reumatoide o traumatismo de los tejidos, la presente invención, sin embargo, se extiende a la regulación por aumento de la respuesta inflamatoria en circunstancias en las que se desea que se produzca una respuesta inflamatoria. Esto puede ocurrir, por ejemplo, en situaciones en las que se requiere una respuesta inflamatoria para proporcionar una actividad de tipo adyuvante. Esto puede ser particularmente útil en el contexto de la terapia anti-tumoral. En otra forma de realización, la regulación por aumento de los mecanismos de defensa del huésped puede ser deseable.

La inflamación es un proceso biológico complejo que implica la interacción, en forma de cascada, de numerosos mediadores solubles. Brevemente, la cascada de citocinas y otros mediadores inflamatorios que actúan para inducir una respuesta inflamatoria se puede representar esquemáticamente del siguiente modo:

5



De acuerdo con lo anterior, la referencia a "cascada de mediadores proinflamatorios" o "cascada de citocinas proinflamatorias" debe entenderse como una referencia a la interacción secuencial de moléculas solubles que caracterizan la aparición y progresión de una respuesta inflamatoria. En particular, el inicio de una cascada de mediadores inflamatorios se caracteriza por la regulación por aumento secuencial de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. Sin embargo, todo el proceso inflamatorio se caracteriza, no obstante, por cambios secuenciales en los niveles de varias citocinas (el término "citocinas" debe entenderse ampliamente que incluye referencia a las interleucinas, quimiocinas, monocinas, factores estimulantes de colonias y otras hormonas proteicas de este tipo). A pesar de las observaciones anteriores de que los niveles de activina están modulados en mamíferos que experimentan una respuesta inflamatoria, no se entiende el papel preciso de la activina en este contexto. Para este fin, todavía se entiende en general que las citocinas proinflamatorias están constituidas por TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. Aún más, y sin limitar la presente invención de ninguna manera, el TNF- $\alpha$  se secreta en respuesta a diversos estímulos proinflamatorios y ejerce una amplia variedad de efectos. A bajas concentraciones, actúa como una molécula paracrina y autocrina, regulando por incremento las moléculas de adhesión vascular, activando los neutrófilos y estimulando los monocitos para que secreten interleucina 1, 6 y más TNF- $\alpha$ . A concentraciones más altas, el TNF- $\alpha$  entra en el suero y se convierte en una hormona endocrina. Aquí, actúa como un pirógeno, estimula aún más la liberación de citocinas a partir de células mononucleares, activa el sistema de coagulación y suprime la maduración de las células madre de la médula ósea. A concentraciones aún más altas, el TNF- $\alpha$  tiene muchos efectos nocivos, incluyendo la hipotensión (probablemente a través de la inducción de la síntesis de óxido nítrico [NO]) y la inducción de coagulación intravascular diseminada (CID).

10

15

20

25

La IL-1 también se produce en las células mononucleares activadas en respuesta a estímulos proinflamatorios. La IL-1 tiene dos formas: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . La IL-1 $\alpha$  es activa como su molécula de 33 kDa; la IL-1 $\beta$  necesita ser escindido adicionalmente en un péptido biológicamente activo de 17 kDa. Los efectos endocrinos de dosis altas de IL-1 $\beta$  son similares al TNF- $\alpha$ , y causan fiebre, CID y desgaste metabólico. Los monocitos activados también producen IL-6 en respuesta a la estimulación de IL-1 y TNF- $\alpha$ . La IL-6 actúa después sobre los hepatocitos y las células B para propagar el proceso inflamatorio. Con estimulación de IL-6, los hepatocitos secretan mayores niveles de reactantes de fase aguda, tales como el fibrinógeno. La IL-6 también actúa como factor de crecimiento de células B, de modo que estimula la formación y la liberación de anticuerpos.

30

35

En términos de la modulación de la respuesta inflamatoria (particularmente regulación negativa de la respuesta), la modulación de la cascada de citocinas ha sido un foco principal. Se han hecho intentos de alterar la cascada de citocinas proinflamatorias para bloquear una molécula inflamatoria en particular, alterando de este modo, teóricamente, la cascada y beneficiando potencialmente al paciente. El TNF- $\alpha$  y la IL-1 son dos de tales moléculas dirigidas a la modulación.

40

Las terapias con anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  y antagonista del receptor de la IL-1 se han probado. Sin embargo, hasta la fecha, usar como objetivo una citocina o mediador inflamatorio específico para inmunoterapia generalmente no se ha demostrado que sea una propuesta útil para el tratamiento. En este sentido, generalmente se ha considerado que, puesto que cualquier citocina o mediador es sólo un componente de la cascada, la neutralización de un agente es poco probable que regule por disminución toda la cascada. Es por estas razones por lo que los presentes hallazgos son tan sorprendentes. En primer lugar, se ha determinado que la cascada de mediador proinflamatorio,

45

desde sus fases más tempranas, implica la modulación del nivel de expresión de activina A. Específicamente, los niveles de activina A se incrementan poco después del estímulo inflamatorio y antes de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. De acuerdo con lo anterior, la activina A parece estar implicada en la iniciación de la cascada de citocinas proinflamatorias. Aún más, se ha determinado que la regulación negativa de la funcionalidad de la de activina A, de hecho, puede lograr el resultado favorable de regular por disminución la respuesta inflamatoria. Un papel para la activina B durante las primeras etapas de la cascada de citocinas proinflamatorias también se ha aclarado sorprendentemente. Aún más sorprendentemente, sin embargo, ha sido la determinación de que los niveles de activina B que se observan durante esta fase de una respuesta inflamatoria son significativamente mayores que los correspondientes niveles de activina A.

En el presente documento se describe un procedimiento de modulación de la respuesta inflamatoria en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento la modulación de la actividad funcional de la activina, en la que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende la subunidad  $\beta_B$ , fragmentos, derivados, mutantes o variantes de la misma, en la que la regulación por aumento de dicha activina hasta un nivel funcionalmente eficaz en dicho mamífero induce, mantiene o aumenta la cascada de citocinas proinflamatorias y la disminución de dicha activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz en dicho mamífero inhibe o retrasa la cascada de citocinas proinflamatorias.

Preferentemente, dicha activina es activina A y / o activina B.

En una realización, la presente invención está dirigida a la folistatina para uso en un método de regulación negativa, una respuesta inflamatoria local en un mamífero, comprendiendo dicho método la regulación negativa de la actividad funcional de la activina A y/o la activina B, para inhibir o retrasar la cascada de citocinas proinflamatorias locales.

Preferentemente, dicha respuesta inflamatoria local es aguda.

En otra realización preferida, la presente invención está dirigida a la folistatina para uso en un método de regulación negativa, una respuesta inflamatoria sistémica en un mamífero, comprendiendo dicho método la regulación negativa de la actividad funcional de la activina A y/o la activina B, para inhibir o retrasar la cascada de citocinas proinflamatorias sistémicas.

Preferentemente, dicha respuesta inflamatoria sistémica es aguda.

De acuerdo con estos aspectos preferidos de la presente invención, dicha respuesta inflamatoria aguda está, preferentemente, regulada por disminución y se produce en el contexto de, o está asociado de otro modo con, shock séptico, septicemia, inflamación de las vías respiratorias, apendicitis, meningitis, respuesta hepática a toxinas o virus, angiogénesis, psoriasis, protección de los nervios, aterosclerosis, necrosis tubular renal, encefalitis o cicatrización de heridas o lesiones traumáticas, como ocurre con lesiones, cirugía y quemaduras (por ejemplo, lesiones cerebrales traumáticas).

Preferentemente, dicha inflamación de las vías respiratorias se produce en el contexto de asma, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis quística, trasplante de pulmón, SDRA, bronquiolitis obliterante, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva, asbestosis, apnea obstructiva del sueño, hipoxia o hipertensión pulmonar.

Preferentemente, dicha respuesta inflamatoria sistémica aguda se produce en el contexto de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y aún más particularmente sepsis, septicemia, shock tóxico, shock séptico, traumatismo tisular, meningitis o apendicitis.

En otra realización preferida, dicha enfermedad inflamatoria es crónica.

Aún más preferentemente, dicha respuesta inflamatoria crónica se produce en el contexto de, o está asociado de otro modo con, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, asma, psoriasis o cicatrización de heridas.

De acuerdo con estas realizaciones preferidas, dicha cascada de citocinas proinflamatorias corresponde a la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 y / o IL-6.

Debe entenderse que, en términos de modulación de la cascada de citocinas proinflamatorias, esto puede lograrse ya sea mediante la modulación de los niveles reales de estas citocinas o por la modulación de su funcionalidad. Por ejemplo, y sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, se ha demostrado que la administración de folistatina (esta molécula funciona como un antagonista de la activina) antes de la exposición a LPS de un mamífero, no obstante, resulta en la expresión de un pico de activina A a una concentración que es la misma que se observa normalmente durante la inflamación. Sin embargo, debido a la unión de la folistatina a la activina A, bloqueando de este modo la funcionalidad de activina A, la concentración de TNF- $\alpha$  que se expresa desciende en un 50 %. Es interesante el hecho de que se observa que la concentración de IL-6 aumenta 6 veces en un punto de tiempo significativamente más temprano. En total, estos cambios en el perfil de citocinas

proinflamatorias, sin embargo, dan lugar a una disminución en la respuesta inflamatoria observada. Estos hallazgos se basan en la medición de proteínas y, por tanto, indican la secreción y / o liberación de activina madura proteína dimérica. Por consiguiente, el tratamiento previo con folistatina no parece afectar este proceso. Sin embargo, cuando se mide el ARNm de la activina  $\beta$ A y / o  $\beta$ B, el pretratamiento con folistatina mejora, de hecho, los mecanismos de síntesis de los genes de las subunidades de activina. Con respecto a la subunidad  $\beta$ A de la activina, la inhibición del ARNm no se refleja en la liberación de proteínas. El mismo mecanismo se postula para aplicar en el contexto de la activina  $\beta$ B. De acuerdo con lo anterior, todavía sin limitar la presente invención de ninguna manera, se produce una rápida liberación de la proteína esencialmente prealmacenada y después una vía de síntesis regulada por folistatina que está separada de este mecanismo de liberación. No obstante, de más importancia es la determinación inesperada de que se observa un pequeño aumento del ARNm de la activina después de la estimulación inflamatoria, pero un aumento masivo del ARNm de la activina  $\beta$ B mediante la misma estimulación.

En el presente documento, la referencia a la consecución de un "nivel funcionalmente eficaz" o "nivel funcionalmente ineficaz" de activina debe entenderse como una referencia a la consecución de ese nivel de activina en el que la modulación de la respuesta inflamatoria se puede lograr, ya sea regulación por aumento o la regulación negativa. A este respecto, está dentro de la habilidad del experto en la técnica para determinar, utilizando procedimientos de rutina, el nivel de umbral de expresión de activina encima del cual o por debajo del cual la inflamación se modula.

Se debe entender que la referencia a un "nivel eficaz" significa el nivel necesario para lograr al menos en parte, la respuesta deseada. La cantidad puede variar dependiendo de la salud y el estado físico de la población celular y / o el individuo que se va a tratar, el grupo taxonómico de la población celular y / o individuo que se está tratando, el grado de regulación por aumento o por disminución que se desee, la formulación de la composición que se utiliza, la evaluación de la situación médica y otros factores relevantes. De acuerdo con lo anterior, cabe esperar que este nivel puede variar entre las situaciones individuales, de modo que entran en un amplio intervalo, que puede determinarse mediante ensayos de rutina.

La modulación de los niveles de activina se puede conseguir mediante cualquier medio adecuado incluyendo, entre otros:

(i) La modulación de los niveles absolutos de activina de tal manera que haya más o menos activina presente en el entorno celular.

(ii) El agonismo o antagonismo de la actividad funcional de la proteína activina de un modo tal que la eficacia funcional de la activina se aumenta o se reduce. Por ejemplo, el aumento de la semivida de la activina puede lograr un aumento en el nivel funcionalmente eficaz de activina sin llegar a necesitar realmente un aumento en la concentración absoluta de la activina. Del mismo modo, el antagonismo parcial de la activina puede actuar para reducir, aunque no necesariamente eliminar, la eficacia funcional de dicho activina.

De acuerdo con lo anterior, esto puede proporcionar un medio de regulación negativa de la activina sin necesariamente regular por disminución las concentraciones absolutas de activina.

En términos de lograr la regulación por aumento o por disminución de la activina, medios para alcanzar este objetivo serían bien conocidos por la persona experta en la técnica e incluyen, entre otros:

(i) Introducir en una célula una molécula de ácido nucleico que codifica la activina o con el fin de regular por incremento la capacidad de dicha célula para expresar la activina.

(ii) Introducir en una célula una molécula proteica o no proteica que modula la regulación de la transcripción y / o traducción de un gen, en el que este gen puede ser el gen de la activina o una parte funcional del mismo o algún otro gen o región del gen (por ejemplo, región promotora) que directa o indirectamente modula la expresión del gen de la activina.

(iii) Introducir en una célula el producto de expresión de activina (esto debe entenderse que incluye el uso de homólogos de la activina).

(iv) Introducción de una molécula proteica o no proteica que funciona como antagonista del producto de expresión de la activina.

(v) Introducción de una molécula proteica o no proteica que funciona como agonista del producto de expresión de la activina.

Las moléculas proteicas descritas anteriormente se pueden derivar de cualquier fuente adecuada, tal como fuentes naturales, recombinantes o sintéticos e incluye proteínas de fusión o moléculas que se han identificado después de, por ejemplo, detección selectiva de productos naturales. La referencia a moléculas no proteicas puede ser, por ejemplo, una referencia a una molécula de ácido nucleico o puede ser una molécula derivada de fuentes naturales, tales como por ejemplo, detección selectiva de productos naturales o puede ser una molécula sintetizada químicamente. La presente invención contempla análogos del producto de expresión de la activina o pequeñas

moléculas capaces de actuar como agonistas o antagonistas. Agonistas químicos pueden no necesariamente derivar del producto de expresión de la activina, pero pueden compartir ciertas similitudes conformacionales. Alternativamente, los agonistas químicos pueden diseñarse específicamente para satisfacer ciertas propiedades fisicoquímicas. Los antagonistas pueden ser cualquier compuesto capaz de bloquear, inhibir o, de otro modo, prevenir que la activina lleve a cabo su función biológica normal. Los antagonistas incluyen anticuerpos monoclonales y ácidos nucleicos antisentido que impiden la transcripción o traducción de los genes o el ARNm de la activina en células de mamífero. La modulación de la expresión también puede conseguirse utilizando antígenos, ARN, ribosomas, ADNzimas, aptámeros, anticuerpos o moléculas adecuadas para su uso en cosupresión. Las secuencias de oligonucleótidos antisentido adecuadas (fragmentos de ADN de cadena sencilla) de la activina pueden crearse o identificarse por su capacidad para suprimir la expresión de la activina. La producción de oligonucleótidos antisentido para una proteína dada se describe en, por ejemplo, Stein and Cohen, 1988 (Cancer Res 48:2659 - 68) and van der Krol et al., 1988 (Biotechniques 6:958 - 976).

En el contexto de los anticuerpos, en el presente documento se describe el uso de cualquier forma adecuada de anticuerpos, incluyendo anticuerpos catalíticos o derivados, homólogos, análogos o miméticos de dichos anticuerpos. Tales anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden ser de origen natural seleccionado de activina o de sus subunidades o pueden producirse específicamente para el dímero activina o sus monómeros (en el presente documento se hace referencia como el "antígeno"). En el caso de este último, el antígeno puede primero necesitar asociarse con una molécula portadora. Alternativamente, los fragmentos de anticuerpos se pueden usar, tales como fragmentos Fab o Fab<sub>2</sub>. Además, la presente invención se extiende a anticuerpos recombinantes y sintéticos y a híbridos de anticuerpos. Un "anticuerpo sintético" se considera en el presente documento que incluye fragmentos e híbridos de anticuerpos. El antígeno también se puede utilizar para la detección de anticuerpos de origen natural.

Ambos anticuerpos policlonales y monoclonales se pueden obtener por inmunización con el antígeno o derivado, homólogo, análogo, mutante, o mimético del mismo y cualquier tipo es utilizable terapéuticamente. Los métodos para obtener ambos tipos de sueros son bien conocidos en la técnica. Los sueros policlonales son menos preferidos pero se preparan de manera relativamente fácil por inyección de un animal de laboratorio adecuado con una cantidad eficaz de antígeno, o partes antigénicas de los mismos, recogida de suero del animal, y aislando sueros específicos por cualquiera de las técnicas inmunoabsorbentes conocidas. Aunque los anticuerpos producidos por este método son utilizables, por lo general son menos favorecidos debido a la heterogeneidad potencial del producto.

El uso de anticuerpos monoclonales se prefiere particularmente debido a la capacidad para producirlos en grandes cantidades y la homogeneidad del producto. La preparación de líneas celulares de hibridoma para la producción de anticuerpo monoclonal derivado por fusión de una línea celular inmortal y linfocitos sensibilizados contra la preparación inmunogénica se puede hacer mediante técnicas que son bien conocidas por aquellos que son expertos en la técnica. (Véase, por ejemplo Douillard y Hoffman, ABC de hibridomas, en Compendio de Inmunología Vol. II, ed. por Schwartz, 1981; Kohler y Milstein, Nature 256: 495-499, 1975; European Journal of Immunology 6: 511-519, 1976).

Preferentemente, el anticuerpo se une específicamente al antígeno. Por "se une específicamente" se quiere decir alta avidéz y / o alta afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno específico. La unión a su epítipo en este antígeno de anticuerpos específicos es más fuerte que la unión del mismo anticuerpo a cualquier otro epítipo, particularmente aquellos que pueden estar presentes en moléculas en asociación con, o en la misma muestra, como el antígeno específico de interés. Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de interés pueden ser capaces de unirse a otros polipéptidos a un débil, todavía detectable, nivel (por ejemplo, 10 % o menos de la unión mostrada al polipéptido de interés). Tal débil fondo vinculante o vinculante, es fácilmente discernible desde el anticuerpo específico de unión al polipéptido de interés, por ejemplo, mediante el uso de controles apropiados.

Las moléculas proteicas y no proteicas a las que se hace referencia en los puntos (i) - (v) anteriores, en lo sucesivo en el presente documento se denominan "agentes moduladores". En la medida en que se busca disminuir la actividad de activina, dicho agente modulador puede ser:

(ii) cualquier agente que regula por aumento la expresión o función de la subunidad  $\alpha$  de la inhibina. La subunidad  $\alpha$  puede dimerizar con las subunidades  $\beta$  de la activina para formar inhibina, de este modo regula por disminución eficazmente los niveles de activina.

(iii) inhibina. Esta molécula puede unirse a la  $\beta$ -glucano e inhibir las acciones de la activina través de su receptor. Véase por ejemplo el mecanismo descrito por Xuet y col. (1995) o el uso del antagonista Smad7 (Bernard et al. 2004).

(iv) cualquier agente que regula por aumento los niveles de  $\beta_c$ , ya que esto resulta en la formación de la forma inactiva de CA de la activina.

(v) anticuerpo neutralizante de activina. Por ejemplo, como se describe en Poulakiet al. (2004)

(vii) mutantes de activina que inhiben la activina nativa de la unión a su receptor. Por ejemplo, como se describe en Harrison et al. 2004.

(vii) transfección o el tratamiento con un receptor de activina mutante que impide la señalización normal de la activina. Véase, por ejemplo, el sistema descrito por Maeshima et al. (2004)

La folistatina se puede administrar ya sea como una proteína o su sobreexpresión puede ser inducida *in vivo* total como a través del sistema mediada por adenovirus descrito por Takabe *et al.* 2003.

5 A este respecto, la referencia a "folistatina" se debe leer como incluyendo la referencia a todas las formas de folistatina incluyendo, a modo de ejemplo, los tres núcleos de proteínas y seis formas de peso molecular que se han identificado como derivado del ARNm empalmados alternativamente FS288 FS315 y .En consecuencia, también debe entenderse que incluye la referencia a cualquier isoformas que puedan derivarse de corte y empalme alternativo de ARNm folistatina o formas mutantes o polimórficos de folistatina. Debe entenderse aún más para  
10 extender a cualquier proteína codificada por el gen de la folistatina, cualquier polipéptido de la subunidad, tales como formas precursoras que pueden ser generadas, y cualquier proteína folistatina, existente como un monómero, multímero o proteína de fusión. Una definición análoga se aplica a "inhibina".

15 La detección de los agentes moduladores se han definido anteriormente se puede lograr por cualquiera de varios métodos adecuados, incluyendo, pero de ninguna manera limitada a, en contacto una célula que comprende el gen de la activina o equivalente funcional o derivado del mismo con un agente y la detección de la modulación de la proteína activina producción o la actividad funcional, la modulación de la expresión de un ácido nucleico que codifica la activina molécula o la modulación de la actividad o expresión de una diana celular activina corriente abajo. La detección de esta modulación se puede lograr utilizando técnicas tales como transferencia Western, ensayos de  
20 cambio de movilidad electroforética y / o de la lectura de los reporteros de la actividad activina como luciferasas, CAT y similares.

Se debe entender que el gen de la activina o equivalente funcional o derivado de la misma pueden ser de origen natural en la célula que es el sujeto de prueba o puede haber sido transfectado en una célula huésped para fines de  
25 ensayo. Además, el gen de origen natural o transfectada puede ser expresado constitutivamente - proporcionando de esta manera un modelo útil para, entre otras cosas, la detección de agentes que regulan a la baja la actividad de activina, en ya sea el ácido nucleico o la expresión de los niveles de productos, o el gen puede requerir la activación - por lo tanto proporcionar un modelo útil para, entre otras cosas, la detección de agentes que hasta de regular la expresión de la activina. Además, en la medida en que una molécula de ácido nucleico activina se transfecta en una  
30 célula, esa molécula puede comprender todo el gen activina o puede comprender simplemente una porción del gen tal como la parte que regula la expresión del producto activina. Por ejemplo, la región promotora activina puede transfectarse en la célula, que es el objeto de ensayos. En este respecto, cuando se utiliza sólo el promotor, la detección de la modulación de la actividad del promotor se puede lograr, por ejemplo, ligando el promotor a un gen reportero. Por ejemplo, el promotor puede ser ligado a la luciferasa o un informador CAT, la modulación de la  
35 expresión de gen que se puede detectar a través de la modulación de la intensidad de la fluorescencia o actividad de reportero CAT, respectivamente. En otro ejemplo, el tema de la detección podría ser un objetivo de regulación activina corriente abajo, en lugar de activina en sí. Sin embargo, otro ejemplo incluye los sitios de unión de activina ligó a un reportero mínima. Modulación de la actividad activina puede ser detectado por la detección de la modulación de la liberación de citocinas proinflamatorias. Este es un ejemplo de un sistema indirecto en donde la  
40 modulación de la expresión de la activina, per se, no es el tema de la detección. Más bien, la modulación de la actividad corriente abajo que regula la activina se controla.

Estos métodos proporcionan un mecanismo para la realización de cribado de alto rendimiento de agentes moduladores putativos, tales como los agentes proteicos o no proteicos que comprenden sintética, combinatoria,  
45 química y bibliotecas naturales. Estos métodos también facilitar la detección de agentes que se unen ya sea la molécula de activina de ácido nucleico o producto de expresión en sí o que modulan la expresión de una molécula de corriente arriba, que posteriormente molécula de corriente arriba modula la expresión o actividad de activina producto de expresión. De acuerdo con ello, estos métodos proporcionan un mecanismo de agentes que ya sea directamente o indirectamente modulan la expresión y / o actividad de activina detectar.

50 Los agentes que se utilizan de acuerdo con el método de la presente invención pueden tomar cualquier forma adecuada. Por ejemplo, los agentes proteicos pueden ser glicosilada o no glicosilada, fosforilada o defosforilado en diversos grados y / o pueden contener otras varias moléculas usadas, ligados, ligados o asociados de otro modo con las proteínas, tales como aminoácidos, lípidos, carbohidratos u otros péptidos, polipéptidos o proteínas. Del mismo  
55 modo, los sujetos moléculas no proteínicas también pueden tomar cualquier forma adecuada. Tanto los agentes proteicos y no proteicos descritos en este documento pueden estar unidos, con destino asociado de otro modo con otras moléculas proteináceas o no proteináceas. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, dicho agente se asocia con una molécula que permite su orientación a una región localizada.

60 La molécula proteica o no proteíno sujeto puede actuar directa o indirectamente para modular la expresión de la activina o la actividad del producto de expresión activina. Dicha molécula actúa directamente si se asocia con la molécula de ácido nucleico o la expresión del producto de activina para modular la expresión o actividad, respectivamente. Dicha molécula actúa indirectamente si se asocia con una molécula distinta de la molécula de ácido  
65 nucleico activina o producto de expresión que modula otra molécula, ya sea directamente o indirectamente la expresión o actividad de la molécula de ácido nucleico activina o producto de expresión, respectivamente. Por consiguiente, el método de la presente invención abarca la regulación de la activina expresión molécula de ácido



nucleico o la actividad del producto de expresión a través de la inducción de una cascada de pasos de regulación.

El término "expresión" se refiere a la transcripción y traducción de una molécula de ácido nucleico. La referencia a "producto de expresión" es una referencia al producto producido a partir de la transcripción y traducción de una molécula de ácido nucleico. La referencia a la "modulación" debe ser entendida como una referencia a la regulación o baja regulación.

"Derivados" de las moléculas descritas en este documento (por ejemplo, activina A, activina B, folistatina o otros agentes proteicos o no proteicos) incluyen fragmentos, partes, porciones o variantes de fuentes naturales o no naturales. Las fuentes no naturales incluyen, por ejemplo, recombinantes o de fuentes sintéticas. Por "fuentes recombinantes" se entiende que la fuente celular de la que se cosecha la molécula sujeto ha sido alterado genéticamente. Esto puede ocurrir, por ejemplo, con el fin de aumentar o de otra manera mejorar la velocidad y el volumen de producción por esa fuente celular particular. Las partes o fragmentos incluyen, por ejemplo, las regiones activas de la molécula. Los derivados se pueden derivar de la inserción, delección o sustitución de aminoácidos. Los derivados por inserción de aminoácidos incluyen amino y / o fusiones terminales carboxílicos así como inserciones intrasecuencia de aminoácidos individuales o múltiples. Variantes de la secuencia de aminoácidos de inserción son aquellas en las que uno o más residuos de aminoácidos se introducen en un sitio predeterminado en la proteína aunque la inserción aleatoria también es posible con el cribado adecuado del producto resultante. Las variantes de delección se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia. Variantes de aminoácidos por sustitución son aquellas en las que al menos un residuo en una secuencia ha sido eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar. Adiciones a secuencias de aminoácidos incluyen fusiones con otros péptidos, polipéptidos o proteínas, como se detalla más arriba.

Los derivados también incluyen fragmentos que tienen epítopos particulares o partes de toda la proteína fusionada a péptidos, polipéptidos u otras moléculas proteináceas o no proteináceas. Por ejemplo, folistatina, o derivado del mismo se pueden fusionar a una molécula para facilitar su localización a un sitio en particular. Los análogos de las moléculas contempladas en este documento incluyen, pero no se limitan a, modificación a cadenas laterales, incorporación de aminoácidos no naturales y / o sus derivados durante el péptido, polipéptido o la síntesis de proteínas y el uso de reticulantes y otros métodos que imponen restricciones conformacionales sobre las moléculas proteináceas o sus análogos.

Los derivados de secuencias de ácidos nucleicos contempladas en este documento pueden de manera similar pueden derivar de sustituciones simples o múltiples nucleótidos, delecciones y / o adiciones incluida la fusión con otras moléculas de ácido nucleico. Los derivados de las moléculas de ácido nucleico utilizadas incluyen oligonucleótidos, cebadores de PCR, moléculas antisentido, moléculas adecuadas para su uso en cosupresión y la fusión de moléculas de ácido nucleico. Los derivados de las secuencias de ácidos nucleicos también incluyen variantes degeneradas.

Una "variante" o "mutante" de activina o folistatina deben entenderse en el sentido de las moléculas que muestran al menos parte de la actividad funcional de la forma de activina o folistatina de la que es una variante o mutante. Una variación o mutación puede adoptar cualquier forma y puede ser natural o no natural.

Un "homólogo" se quiere decir que la molécula se deriva de una especie distinta de la que está siendo tratado. Esto puede ocurrir, por ejemplo, donde se determina que una especie distinta de la que está siendo tratada produce una forma de activina o folistatina, por ejemplo, que presenta características funcionales similares y adecuados a la de la activina o folistatina que se produce naturalmente por el tratamiento sujeto sometido a estudio.

Química y equivalentes funcionales deben entenderse como moléculas que exhiben una o más de las actividades funcionales de la molécula sujeto, que los equivalentes funcionales pueden ser derivados de cualquier fuente tales como ser sintetizado o identificado a través de procesos de selección, tales como el cribado de productos naturales químicamente. Por ejemplo equivalentes químicos o funcionales pueden ser diseñados y / o identificarse utilizando métodos bien conocidos tales como la química combinatoria o cribado de alto rendimiento de bibliotecas recombinantes o posterior a la selección de productos naturales. Agentes antagonistas también pueden ser examinados para la utilización de tales métodos.

Por ejemplo, bibliotecas que contienen moléculas orgánicas pequeñas pueden ser examinados, en el que se utilizan moléculas orgánicas que tienen un gran número de sustituciones de grupos de padres específicos. Un esquema sintético general puede seguir los métodos publicados (por ejemplo, Bunin BA, et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU., 91:4708-4712; DeWitt SH, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU., 90:6909-6913). En pocas palabras, en cada etapa de síntesis sucesiva, uno de una pluralidad de diferentes sustituyentes seleccionado se añade a cada uno de un subconjunto seleccionado de tubos en una matriz, con la selección de subconjuntos de tubo son tales como para generar todas las permutaciones posibles de los diferentes sustituyentes empleados en la producción de la biblioteca. Una estrategia de permutación adecuada se describe en US. Patent No. 5,763,263.

En la actualidad existe un gran interés en el uso de bibliotecas combinatorias de moléculas orgánicas al azar para

buscar compuestos biológicamente activos (véase, por ejemplo U.S. Patent No. 5,763,263). Los ligandos descubiertos por la selección de bibliotecas de este tipo pueden ser útiles en la imitación o el bloqueo de los ligandos naturales o interferir con los ligandos de origen natural de una diana biológica. En el presente contexto, por ejemplo, se pueden utilizar como punto de partida para el desarrollo de análogos de activina que presentan propiedades tales como efectos farmacológicos más potentes. La activina o una parte del mismo pueden funcionar de acuerdo con la presente invención se usa en las bibliotecas de combinación formada por diversos métodos de síntesis en fase sólida o en fase de solución (véase, por ejemplo U.S. Patent No. 5,763,263 y las referencias citadas en el mismo). Mediante el uso de técnicas, tales como el descrito en U.S. Patent No. 5,753,187, millones de nuevos compuestos químicos y biológicos y / o pueden ser examinados de manera rutinaria en menos de un par de semanas. Del gran número de compuestos identificados, se analizó adicionalmente aquellos que tengan actividad biológica apropiada.

Con respecto a los métodos de cribado de bibliotecas de alto rendimiento, oligomérico o compuestos de la biblioteca de moléculas pequeñas capaces de interactuar específicamente con un agente biológico seleccionado, tal como una biomolécula, un complejo de macromolécula, o célula, se tamizan utilizando un dispositivo de biblioteca combinatoria que es fácilmente elegido por la persona experta en la técnica a partir de la variedad de métodos bien conocidos, tales como los descritos anteriormente. En un procedimiento de este tipo, cada miembro de la biblioteca se proyectó por su capacidad para interactuar específicamente con el agente seleccionado. En la práctica del método, un agente biológico se introduce en tubos que contienen compuestos y se deja interactuar con el compuesto de biblioteca individual en cada tubo. La interacción está diseñada para producir una señal detectable que se puede utilizar para controlar la presencia de la interacción deseada. Preferentemente, el agente biológico está presente en una solución acuosa y otras condiciones están adaptadas en función de la interacción deseada. La detección puede llevarse a cabo por ejemplo mediante cualquier método basado funcional o no funcional bien conocido para la detección de sustancias.

Además de la detección de moléculas que imitan la actividad de activina uno puede identificar y utilizar moléculas que funcionan de forma agonista o antagónicamente a la activina con el fin regular por aumento o por disminución la actividad funcional de la activina en relación a modular el crecimiento celular. El uso de tales moléculas se describe con más detalle a continuación. En la medida en que la molécula sujeta es proteínica, que se puede derivar, por ejemplo, a partir de fuentes naturales o recombinantes, incluyendo proteínas de fusión o sigüientes, por ejemplo, los métodos de selección descritos anteriormente. La molécula no proteínica puede ser, por ejemplo, un producto químico o molécula sintética que también ha sido identificado o generada de acuerdo con la metodología anteriormente identificado. Por consiguiente, se contempla aquí es el uso de análogos químicos de la activina capaces de actuar como agonistas o antagonistas. Agonistas químicos pueden no necesariamente ser derivados de la activina, pero pueden compartir ciertas similitudes conformacionales. Alternativamente, los agonistas químicos se pueden diseñar específicamente para imitar ciertas propiedades fisicoquímicas de la activina. Los antagonistas pueden ser cualquier compuesto capaz de bloquear, inhibir o de otro modo la prevención de activina de llevar a cabo sus funciones biológicas normales. Los antagonistas incluyen anticuerpos monoclonales específicos para la activina o partes de la activina.

Análogos de activina o de agonista activina o agentes antagónicos contemplados en este documento incluyen, pero no se limitan a, modificaciones de cadenas laterales, la incorporación de ácidos y / o derivados de aminoácidos no naturales durante el péptido, polipéptido o la síntesis de proteínas y el uso de reticulantes y otros métodos que imponen restricciones conformacionales sobre los análogos. La forma específica que dichas modificaciones pueden tomar dependerá de si la molécula objeto es proteico o no proteico. La naturaleza y / o de la idoneidad de una modificación particular se pueden determinar rutinariamente por la persona experta en la técnica.

Por ejemplo, ejemplos de modificaciones de cadena lateral contempladas por la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tales como por alquilación reductora por reacción con un aldehído seguido por reducción con NaBH<sub>4</sub>; amidinación con metilacetimidato; acilación con anhídrido acético; carbamoilación de grupos amino con cianato; trinitrobencilación de grupos amino con 2, 4, 6-ácido sulfónico trinitrobenzeno (TNBS); acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; y piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido por reducción con NaBH<sub>4</sub>.

El grupo guanidina de residuos de arginina puede ser modificado por la formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilgloxal y glioxal.

El grupo carboxilo puede modificarse por activación de carbodiimida a través de la formación de O-acilisourea seguido de derivatización posterior, por ejemplo, a una amida correspondiente.

Los grupos sulfhidrilo pueden modificarse por métodos tales como carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; oxidación de ácido per fórmico a ácido cisteico; formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol; reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; formación de derivados mercuriales utilizando 4-cloromercuribenzoato, ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, cloruro de fenilmercurio, 2-cloromercurio-4-nitrofenol y otros mercuriales; carbamoilación con cianato a pH alcalino.

Residuos de triptófano pueden modificarse mediante, por ejemplo, oxidación con N-bromosuccinimida o alquilación del anillo de indol con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo o haluros de sulfenilo. Los residuos de tirosina por otro lado, pueden ser alterados por nitración con tetranitrometano para formar un derivado de 3-nitrotirosina.

- 5 La modificación del anillo de imidazol de un residuo de histidina puede realizarse por alquilación con derivados de ácido yodoacético o N-carboetoxilación con dietilpirocarbonato.

- 10 Los ejemplos de incorporación de aminoácidos no naturales y derivados durante la síntesis de proteínas incluyen, pero no se limitan a, uso de norleucina, ácido butírico 4-amino,-3-hidroxi-5-fenilpentanoico 4-amino ácido, ácido 6-aminohexanoico, t-butilglicina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina,-3-hidroxi-6-metilheptanoico 4-amino ácido, 2-tienil alanina y / o isómeros D de aminoácidos. Una lista de aminoácidos no naturales contemplados aquí se muestra en la Tabla 1.

**TABLA 1**

Aminoácidos no convencionales	Código	Aminoácidos no convencionales	Código
Ácido α-aminobutírico	Abu	L-N-metilalanina	Nmala
α-amino-α-metilbutirato	Mgab	L-N-metilarginina	Nmarg
Aminociclopropano-carboxilato	Cpro	L-N-metilasparagina	Nmasn
		Ácido L-N-methylaspartic	Nmasp
Ácido aminoisobutírico	Aib	L-N-metilcisteína	Nmcys
Aminonorbomil-carboxilato	Norb	L-N-metilglutamina	Nmgln
		Ácido L-N-metilglutámico	Nmglu
Ciclohexilalanina	Chexa	L-N-metilhistidina	Nmhis
Ciclopentilalanine	CPES	L-N-metilisoleucine	Nmile
D-alanina	Dal	L-N-metilleucina	Nmleu
D-arginina	Darg	L-N-metilisina	Nmlys
Ácido D-aspartico	DASP	L-N-metilmetionina	Nmmet
D-cisteína	Dcys	L-N-metilorleucina	Nmnle
D-glutamina	Dgln	L-N-methylnorvalina	Nmnva
Ácido D-glutámico	Dglu	L-N-metilornitina	Nmom
D-histidina	DHIS	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
D-isoleucina	Dile	L-N-metilprolina	Nmpro
D-leucina	DLeu	L-N-metilserina	Nmser
D-lisina	DLys	L-N-metiltreonina	Nmthr
D-metionina	DMET	L-N-metiltryptófano	Nmtrp
D-ornitina	Dorn	L-N-metiltirosina	Nmtyr
D-fenilalanina	DPhe	L-N-metilvalina	Nmval
D-prolina	Dpro	L-N-metiletilglicina	Nmetg
D-serina	DSER	L-N-metil-t-butilglicina	Nmtbug
D-treonina	DTHR	L-norleucina	Nle
D-triptófano	DTrp	L-norvalina	Nva
D-tirosina	Dtyr	α-metil-aminoisobutirato	Maib
D-valina	Dval	α-metil--aminobutirato	Mgab
D-α-metilalanina	Dmala	α-metilciclohexilalanina	Mchexa
D-α-metilarginina	Dmarg	α-metilciclopentilalanina	Mcpen
D-α-metilasparagina	Dmasn	α-metil-α-naftilalanina	Manap
D-α-metiaspartato	Dmasp	α-metilpenicilamina	MPes
D-α-metilcisteína	Dmcys	N-(4-aminobutol)glicina	Nglu
D-α-metilglutaminea	Dmgln	N-(2-aminoetil)glicina	Naeg
D-α-metilhistidina	Dmhis	N-(3-aminopropil)glicina	Nom
D-α-metilisoleucina	Dmile	N-amino-α-metilbutirato	Nmaabu
D-α-metilleucina	Dmleu	α-naftilalanina	Anap
D-α-metilisina	Dmlys	N-bencilglicina	Nphe
D-α-metilmetionina	Dmmet	N-(2-carbamilet)glicina	Ngln
D-α-metilornitina	Dmom	N-(carbamilmetil)glicina	Nasn
D-α-metilfenilalanina	Dmfe	N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
D-α-metilprolina	Dmpro	N-(carboximetil)glicina	Nasp
D-α-metilserina	Dmser	N-ciclobutilglicina	Ncbut
D-α-metiltreonina	Dmtr	N-cicloheptilglicina	Nchep
D-α-metiltryptofan	Dmtrp	N-ciclohexilglicina	Nchex
D-α-metiltirosina	Dmti	N-ciclododeciliglicina	Ncdec
D-α-metilvalina	Dmval	N-cilcododeciliglicina	Ncdod
D-N-metilalanina	Dnmala	N-ciclooctilglicina	Ncoct
D-N-metilarginina	Dnmarg	N-ciclopropilglicina	Ncpro
D-N-metilasparagina	Dnmasn	N-cicloundeciliglicina	Ncund
D-N-metilaspartato	Dnmasp	N-(2,2-difenilet)glicina	Nbhm

D-N-metilcisteína	Dnmcis	N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe
D-N-metilglutamina	DnmglN	N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
D-N-metilglutamato	Dnmglu	N-(1-hidroxietil)glicina	Nthr
D-N-metilhistidina	Dnmhis	N-(hidroxietil)glicina	Nser
D-N-metilisoleucina	Dnmile	N-(imidazolietil)glicina	Nhis
D-N-metilleucina	Dnmleu	N-(3-indolilietil)glicina	Nhtrp
D-N-metilisina	Dnmmls	N-metil-γ-aminobutirato	Nmgabu
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	D-N-metilmetionina	Dnmmet
D-N-metilornitina	Dnmom	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
N-metilglicina	Nala	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	D-N-metilprolina	Dnmpro
N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metilriptófano	Dnmtrp	N-(1-metiletil)glicina	Nval
D-N-metil tirosina	Dnmtr	N-metila-naptilalanina	Nmanap
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicillamina	Nmpen
Ácido γ-aminobutírico	Gabu	N-(p-hidroxifenil)glicina	Nhtyr
L-t-butilglicina	Tbug	N-(tiometil)glicina	Ncys
L-etilglicina	Etg	penicillamina	Pen
L-homofenilalanina	Hfe	L-α-metilalanina	Mala
L-α-metilarginina	Marg	L-α-metilasparagina	Masn
L-α-metilaspartato	Masp	L-α-metil-t-butilglicina	Mtbug
L-α-metilcisteína	Mcis	L-metiletilglicina	Metg
L-α-metilglutamina	MglN	L-α-metilglutamato	Mglu
L-α-metilhistidina	Mhis	L-α-metilhomofenilalanina	Mhphe
L-α-metilisoleucina	Mile	N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
L-α-metilleucina	Mleu	L-α-metilisina	Mlys
L-α-metilmetionina	Mmet	L-α-metilnorleucina	Mnle
L-α-metilnorvalina	Mnva	L-α-metilornitina	Mom
L-α-metilfenilalanina	Mphe	L-α-metilprolina	Mpro
L-α-metilserina	Mser	L-α-metiltreonina	Mthr
L-α-metiltritófano	Mtrp	L-α-metiltirosina	Mtyr
L-α-metilvalina	Mval	L-N-metilhomofenilalanina	Nmhph
N-(N-(2,2-difeniletil) carbamilmetil)glicina 1-carboxi-1-(2,2-difenil-Nmbc etilamino)ciclopropano	Nnbhm	N-(N-(3,3-difenilpropil) carbamilmetil)glicina	Nnbhe

5 Los reticuladores se pueden usar para, por ejemplo, estabilizar las conformaciones 3D usando reticuladores homobifuncionales tales como los ésteres imido bifuncionales que tienen grupos espaciadores (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> con n=1 a n=6, glutaraldehído, ésteres N-hidroxisuccinimida y reactivos heterobifuncionales que normalmente contiene un resto aminoreactivo tal como N-hidroxisuccinimida y otro resto reactivo específico de grupo.

10 La modulación de dichos niveles funcionales de activina se puede conseguir mediante la administración de dicha activina, una molécula de ácido nucleico que codicia dicha activina o un agente que efectúa la modulación de dicha actividad de activina o dicha expresión del gen de activina (en lo sucesivo denominado de forma colectiva "agentes moduladores"). Preferentemente, el método sujeto se usa para regular por disminución la respuesta inflamatoria en un mamífero.

15 De acuerdo con lo anterior, la presente invención está dirigida a folistatina para uso en un método de regulación negativa de la respuesta inflamatoria en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de folistatina durante un tiempo y en condiciones suficientes para inducir un nivel funcionalmente ineficaz de la activina, en el que la activina es activina A y/o activina B.

20 Preferentemente, dicha respuesta inflamatoria se modula a través de la modulación de la cascada de citocinas proinflamatorias. Todavía más preferentemente, dicha cascada de citocinas proinflamatorias se caracteriza por la expresión de TNF-α, IL-1 y / o IL-6.

Más preferentemente, dicha respuesta inflamatoria es una respuesta inflamatoria local aguda o una respuesta inflamatoria sistémica aguda.

25 De acuerdo con estas realizaciones preferidas de la presente invención, dicha respuesta inflamatoria aguda se produce en el contexto de, o está asociado de otro modo con, shock séptico, septicemia, inflamación de las vías respiratorias, apendicitis, meningitis, respuesta hepática a toxinas o virus, angiogénesis, psoriasis, protección de los nervios, aterosclerosis, necrosis tubular renal, encefalitis o cicatrización de heridas o lesiones traumáticas, como ocurre con lesiones, cirugía y quemaduras (por ejemplo, lesiones cerebrales traumáticas).

30 Preferentemente, dicha inflamación de las vías respiratorias se produce en el contexto de asma, enfermedad

pulmonar intersticial, fibrosis quística, trasplante de pulmón, SDRA, bronquiolitis obliterante, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva, asbestosis, apnea obstructiva del sueño, hipoxia o hipertensión pulmonar.

5 Preferentemente, dicha respuesta inflamatoria sistémica aguda se produce en el contexto de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y aún más particularmente sepsis, septicemia, shock tóxico, shock séptico, traumatismo tisular, meningitis o apendicitis.

En otra realización preferida, dicha enfermedad inflamatoria es crónica.

10 Aún más preferentemente, dicha respuesta inflamatoria crónica se produce en el contexto de, o está asociado de otro modo con, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, asma, psoriasis o cicatrización de heridas.

15 También se describe un método de regulación por aumento de la respuesta inflamatoria en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un agente durante un tiempo y en condiciones suficientes para inducir un nivel funcionalmente eficaz de la activina, en el que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos, derivados, mutantes o variantes de la misma, en dicho mamífero.

20 Preferentemente, dicha activina es activina A y / o activina B.

Preferentemente, dicho agente es el producto de expresión activina A o activina B.

25 El término "mamífero", como se usa en el presente documento, incluye seres humanos, primates, animales granja (por ejemplo, caballos, ganado vacuno, ovejas, cerdos, burros), animales de ensayo en laboratorio (p. ej., ratones, ratas, cobayas), animales de compañía (p. ej., perros, gatos) y animales salvajes cautivos (p. ej., canguros, ciervos, zorros). Preferentemente, el mamífero es un ser humano o un animal de ensayo en laboratorio. Incluso más preferentemente, el mamífero es un ser humano.

30 La referencia a "inducir" deberá entenderse como referencia a alcanzar el nivel deseado de activina, sea un nivel funcionalmente eficaz o un nivel funcionalmente ineficaz. Más probablemente, dicha inducción se consiga mediante la regulación por aumento o la regulación negativa de la expresión de activina, como se ha descrito anteriormente, aunque cualquier otro medio de alcanzar inducción está, no obstante, abarcado por el procedimiento de la presente invención.

35 Como se ha detallado anteriormente en el presente documento, un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de la invención en relación con el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades o de otras afecciones indeseadas.

40 Por tanto, la presente invención contempla la folistatina para usar en un procedimiento de tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una afección, o una predisposición al desarrollo de una afección, caracterizada por una respuesta inflamatoria aberrante, indeseada o, de otro modo, inadecuada, en un mamífero, en el que la respuesta inflamatoria se produce en el contexto de un trasplante de pulmón, síndrome de dificultad respiratoria aguda grave o asma.

45 Más particularmente, por tanto, la presente invención contempla la folistatina para usar en un procedimiento de regulación negativa de una respuesta inflamatoria en un mamífero mediante la regulación negativa de la actividad funcional de la activina A y/o la activina B en dicho mamífero, en el que la respuesta inflamatoria se produce en el contexto de una inflamación aberrante, indeseada o, de otro modo, inadecuada, de las vías respiratorias.

50 Preferentemente, dicha activina es activina A y / o activina B.

Preferentemente, la respuesta inflamatoria es una respuesta a una cascada proinflamatoria, en la que dicha cascada de citocinas proinflamatorias se caracteriza por la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 y / o IL-6.

55 La referencia a una respuesta inflamatoria aberrante, no deseada o de otra manera inapropiada" deberá entenderse como una referencia a una respuesta excesiva, una respuesta inadecuada o a una respuesta fisiológicamente normal, que es inadecuada en cuanto a que es indeseada o, de otro modo, inadecuada. Ejemplos de respuestas inflamatorias aberrantes o de otro modo indeseadas incluyen las que se producen en el contexto del shock séptico, septicemia, inflamación de las vías respiratorias, apendicitis, meningitis, respuesta hepática a toxinas o virus, angiogénesis, psoriasis, protección de los nervios, aterosclerosis, necrosis tubular renal o cicatrización de heridas o lesiones traumáticas, como ocurre con la cirugía y las quemaduras. No obstante, a este respecto, algunas formas de inflamación de las vías respiratorias reflejan, de hecho, respuestas fisiológicas normales que son indeseadas, tales como las que se producen en el contexto de alergia o asma. Ejemplos de respuestas inadecuadas incluyen el fallo de cualquier respuesta inflamatoria inadecuada para producirse como parte de un régimen de inmunización.

65 De acuerdo con lo anterior, la respuesta inflamatoria sujeto es, preferentemente, una respuesta inflamatoria aguda

indeseada de tipo local o sistémica.

Por tanto, se proporciona, preferentemente, un método de tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una afección o una predisposición al desarrollo de una afección, caracterizada por una respuesta inflamatoria aguda indeseada en un mamífero, comprendiendo dicho método la regulación negativa del nivel de la activina, en el que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una subunidad  $\beta_B$ , fragmentos de activina, derivados, mutantes o variantes de la misma, en el que la regulación negativa de dicha activina hasta un nivel funcionalmente ineficaz inhibe o retrasa la cascada de citocinas proinflamatorias.

10 Preferentemente, dicha activina es activina A y / o activina B.

De acuerdo con esta descripción, dicha afección es shock séptico, septicemia, inflamación de las vías respiratorias, apendicitis, meningitis, encefalitis, respuesta hepática a toxinas o virus, angiogénesis, psoriasis, protección de los nervios, aterosclerosis, necrosis tubular renal, o cicatrización de heridas o lesiones traumáticas, como ocurre con la lesión, la cirugía y quemaduras (por ejemplo, de lesiones cerebrales traumáticas).

En la invención, dicha inflamación de las vías respiratorias se produce en el contexto de asma, enfermedad pulmonar intersticial, la fibrosis quística, el trasplante pulmonar, bronquiolitis obliterante, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva, el SARS, la asbestosis, la apnea obstructiva del sueño, la hipoxia o la hipertensión pulmonar.

Más preferentemente, dicha condición es el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y aún más particularmente la sepsis, la septicemia, choque tóxico, choque séptico, traumatismo de los tejidos, la meningitis o apendicitis.

En otra realización preferida, dicha enfermedad inflamatoria es crónica.

Aún más preferentemente, dicha respuesta inflamatoria crónica se produce en el contexto de, o está asociado de otro modo con la esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, asma, psoriasis o la cicatrización de heridas.

También se describe un método para tratar terapéuticamente y / o profilácticamente una condición, o una predisposición al desarrollo de una condición, que se caracteriza por una respuesta inflamatoria inadecuada en un mamífero, comprendiendo dicho método modular el nivel de activina, que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una  $\beta_B$  de subunidades, fragmentos, derivados, mutantes o variantes de la misma, en dicho mamífero, en el que hasta la regulación de la activina dijo a un nivel funcionalmente eficaz hasta regula la cascada de citocinas proinflamatorias.

Preferentemente, dicho activina es activina A y / o activina B.

Estos aspectos terapéuticos y profilácticos de la presente invención se consiguen preferentemente mediante la administración de una cantidad eficaz del agente modulador, como se define anteriormente, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para modular adecuadamente la cascada de citocinas proinflamatorias.

Una "cantidad eficaz" significa una cantidad necesaria al menos en parte para lograr la respuesta deseada, o para retrasar la aparición o inhibir la progresión o detener del todo, la aparición o progresión de la condición particular que se trata. La cantidad varía dependiendo de la condición de salud y física del individuo a tratar, el grupo taxonómico del individuo a tratar, el grado de protección deseado, la formulación de la composición, la evaluación de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos de rutina.

Las referencias a "tratamiento" y "profilaxis" se han de considerar en su contexto más amplio. El término "tratamiento" no implica necesariamente que un sujeto se trate hasta la recuperación total. Del mismo modo, "profilaxis" no significa necesariamente que el tema no será finalmente contraer una enfermedad. En consecuencia, el tratamiento y profilaxis incluyen la mejoría de los síntomas de una condición particular o prevención o reducción de otro modo el riesgo de desarrollar una condición particular. El término "profilaxis" se puede considerar como la reducción de la gravedad o la aparición de una condición particular. "Tratamiento" también puede reducir la gravedad de una condición existente.

La presente invención contempla además una combinación de terapias, tales como la administración del agente modulador junto con otras moléculas proteínicas o no proteínicas que pueden facilitar el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Por ejemplo, se puede combinar el método de la presente invención con radioterapia o quimioterapia.

Administración de folistatina de la presente invención se ha descrito anteriormente, en la forma de una composición farmacéutica, puede realizarse por cualquier medio conveniente. La folistatina de la composición farmacéutica se contempla para mostrar una actividad terapéutica cuando se administra en una cantidad que depende del caso particular. La variación depende, por ejemplo, en el ser humano o animal. Un amplio rango de dosis puede ser aplicable. Considerando un paciente, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 mg de

folistatina se pueden administrar por kilogramo de peso corporal por día. Regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, varias dosis divididas se pueden administrar diariamente, intervalos de tiempo adecuados semanales, mensuales o otros o la dosis se puede reducir proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación.

5 La folistatina se puede administrar de una manera conveniente tal como por vía oral, intravenosa (en donde soluble en agua), respiratoria, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intradérmica o supositorio o implante (por ejemplo, utilizando moléculas de liberación lenta). La folistatina se puede administrar en la forma de sales farmacéuticamente aceptables no tóxicas, tales como sales de adición de ácido o complejos metálicos, por ejemplo  
10 con zinc, hierro o similares (que se consideran como sales para propósitos de esta solicitud). Ejemplos ilustrativos de tales sales de adición de ácido son clorhidrato, bromhidrato, sulfato, fosfato, maleato, acetato, citrato, benzoato, succinato, malato, ascorbato, tartrato y similares. Si el ingrediente activo es para ser administrado en forma de comprimido, el comprimido puede contener un aglutinante tal como goma de tragacanto, almidón de maíz o gelatina; un agente disgregante, tal como ácido algínico; y un lubricante, tal como estearato de magnesio.

15 Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, respiratoria, por vía transdérmica, por vía intratraqueal, nasofaríngea y, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intracraneal, intradérmica, intramuscular, intraocular, intratecal, intracerebral, intranasal, infusión, vía oral, rectal, a través de goteo i.v., parche y el implante. Preferentemente, dichos medios de administración es la inhalación con respecto al tratamiento de la inflamación de  
20 la vía aérea y por vía intravenosa, intramuscular o transdérmica para otras condiciones.

De acuerdo con estos métodos, el agente definido de acuerdo con la presente invención se pueden coadministrar con uno o más de otros compuestos o moléculas. Por "coadministrado" se entiende la administración simultánea en la misma formulación o en dos formulaciones diferentes a través de las mismas o diferentes rutas o administración  
25 secuencial por las mismas o diferentes rutas. Por ejemplo, el agente sujeto se puede administrar junto con un agente agonístico con el fin de mejorar sus efectos. Por la administración "secuencial" se entiende una diferencia de tiempo de segundos, minutos, horas o días entre la administración de los dos tipos de moléculas. Estas moléculas se pueden administrar en cualquier orden.

30 De acuerdo con la presente invención, aunque el método preferido es tratar terapéuticamente las respuestas inflamatorias agudas no deseadas, en determinadas circunstancias, uno puede también buscar para tratar las enfermedades inflamatorias crónicas. Se aprecia que es poco probable que revertir cualquier remodelación tisular (formación de cicatrices), que ya se ha producido el logro de la baja regulación de la respuesta inflamatoria crónica. Sin embargo, tal método podría prevenir la aparición de cualquier daño tisular adicional. Con respecto a las  
35 aplicaciones profilácticas de la presente invención, hay muchas circunstancias en las que se puede desear establecer un régimen de tratamiento preventivo. Por ejemplo, se puede establecer un régimen de este tipo en pacientes con predisposición a desarrollar una enfermedad autoinmune, los pacientes que han sufrido un traumatismo de los tejidos, tales como quemaduras graves, los pacientes sometidos a un trasplante de órganos, los pacientes con fibrosis quística, que sufren asma / alergia o aquellos propensos a trastornos como la apnea del  
40 sueño la respiración.

También se describe el uso de un agente capaz de modular el nivel funcionalmente eficaz de activina fragmentos, derivados, mutantes o variantes de los mismos, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y / o profiláctico de una condición, o una predisposición para el desarrollo de una condición, que se caracteriza por  
45 una respuesta inflamatoria aberrante, no deseada o de otra manera inapropiada en un mamífero en el que hasta la regulación de la activina a un nivel funcionalmente eficaz hasta regula la cascada de mediador pro-inflamatorio y activina abajo de la regulación a un nivel inhibe funcionalmente ineficaces o retarda la cascada de mediadores proinflamatorios.

50 También se describe el uso de un agente capaz de modular el nivel funcionalmente eficaz de activina, que la activina es activina A o una molécula de activina que comprende una  $\beta_B$  de subunidades, fragmentos, derivados, mutantes o variantes de los mismos, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y / o profiláctico de una condición, o una predisposición al desarrollo de una condición, caracterizada por una respuesta inflamatoria aberrante, no deseado o de otra manera inadecuada en un mamífero, en el que hasta la regulación de dicho activina  
55 a un nivel funcionalmente eficaz hasta regula la cascada de citocinas proinflamatorias y abajo-regulación dijo activina a un nivel funcionalmente ineficaz inhibe o retarda la cascada de citocinas proinflamatorias.

Preferentemente, dicha respuesta inflamatoria es una respuesta inflamatoria aguda de cualquiera del tipo agudo o sistémica.

60

De acuerdo con estos aspectos preferidos, dijo se regula hacia abajo-respuesta inflamatoria aguda y preferentemente dicha condición es el shock séptico, la septicemia, la inflamación de las vías respiratorias, la apendicitis, la meningitis, la respuesta hepática a toxinas o virus, la angiogénesis, la psoriasis, la protección de los nervios, aterosclerosis, tubular renal necrosis, la curación de heridas o lesiones traumáticas, como ocurre con la lesión, la cirugía y quemaduras, y dijeron que se regula por disminución de respuesta inflamatoria.

Preferentemente, dicha inflamación de las vías respiratorias se produce en el contexto de asma, enfermedad pulmonar intersticial, la fibrosis quística, el trasplante pulmonar, bronquiolitis obliterante, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva, el SARS, la asbestosis, la apnea obstructiva del sueño, la hipoxia o la hipertensión pulmonar.

Preferentemente, dicha respuesta inflamatoria sistémica aguda se produce en el contexto de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y aún más particularmente la sepsis, la septicemia, choque tóxico, choque séptico, traumatismo de los tejidos, la meningitis o apendicitis.

En otra realización preferida, dicha enfermedad inflamatoria es crónica.

Aún más preferentemente, dicha respuesta inflamatoria crónica se produce en el contexto de, o está asociado de otro modo con la esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, asma, psoriasis o la cicatrización de heridas.

También se describe una composición farmacéutica que comprende el agente modulador como se ha definido anteriormente junto con vehículos y / o diluyentes uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los agentes dijeron que se les conoce como los ingredientes activos

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (donde soluble en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles o puede ser en forma de una crema u otra forma adecuada para la aplicación tópica. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. Las prevenciones de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y la técnica de liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Cuando los ingredientes activos están protegidos convenientemente pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o puede encerrarse en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos, o se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos 1 % en peso de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente 5 a aproximadamente 80 % del peso de la unidad. Se elabora la cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles de tal manera que en una dosificación adecuada. Composiciones o preparaciones preferidas de acuerdo con la presente invención se preparan de modo que una forma unitaria de dosificación oral contiene entre aproximadamente 0,1 mg y 2000 mg de compuesto activo.

El agente también se puede preparar para la administración a través de la vía aérea, ya sea en una forma soluble o en partículas. Por ejemplo, el agente puede administrarse a través de un inhalador oral o un nebulizador.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener los componentes como se enumeran a continuación: un aglutinante tal como goma, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o



sacarina pueden añadirse o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria, o aroma de cereza. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propil parabenos como conservantes, un colorante y un aromatizante tal como aroma de cereza o de naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo (s) se puede incorporar en preparaciones de liberación sostenida y formulaciones.

La composición farmacéutica puede comprender también moléculas genéticas tales como un vector capaz de transfectar células diana, donde el vector lleva una molécula de ácido nucleico que codifica la activina A o un agente modulador como se ha definido anteriormente. El vector puede, por ejemplo, ser un vector viral.

La presente invención se define por los siguientes ejemplos no limitativos.

## EJEMPLO 1

### Materiales y Métodos

#### *Animales y detalles experimentales generales*

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el Código Australiano NHMRC de Prácticas para el Cuidado de animales con fines científicos (1997) y fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Monash.

Ciento veintiséis hombres C57Bl / 6 ratones (4-8 semanas), se asignaron al azar en dos grupos; Grupo 1 consistió en nueve subgrupos de ocho animales (N total = 72) mientras que el grupo 2 consistía en nueve subgrupos de seis animales (n = 54). Todos los animales fueron mantenidos en estabulación animal estándar con acceso a comida y agua durante todo el experimento. El lipopolisacárido (LPS) (*E. coli* serotipo 0127: B8, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) se purificó usando un método de extracción de fenol-agua como se ha descrito anteriormente (Manthey et al. 1994, J Immunol 153:2653-63), Y se administra como una inyección en bolo por vía intraperitoneal de 100 mg en 100 l de solución salina isotónica, no pirogénica por ratón. La folistatina-288 recombinante humana (rhfolistatina-288; Biotech, Australia) se administró como una inyección intraperitoneal de 1 g en 100 l de solución salina isotónica, no pirogénica, 30 minutos antes de la LPS. El grupo 1 recibió inyecciones de LPS y rfolistatina-288 mientras que el Grupo 2 recibió una inyección de LPS solo. Los ratones se anestesiaron a continuación con una forma de inhalante de isoflurano (Abbott Australasia LTD, Kurnell, Australia), y se sacrificaron para la recogida de sangre a los 30 minutos, 1, 2, 3, 5, 8, 12 y 24 horas y un grupo fue sacrificado sin inyección para actuar como controles para los niveles basales. La sangre se recogió en un tubo de 1,5 ml de centrifuga que contiene 50µl de etileno ácido diaminotetraacético (EDTA, material de laboratorio BDH, Poole, Reino Unido) y se centrifugó a 250 g a temperatura ambiente con el plasma retirados y almacenados a -20 ° C hasta que se ensayaron para la activina A, folistatina , TNFa, IL-6 e IL-1β.

#### *Ensayos*

La activina A se midió por ELISA como se describió previamente usando activina A humana recombinante como un estándar (Knight et al., J Endocrinol 148:267-79). Mide ELISA tanto gratuitos como de activina folistatina fijo y no se cruza de forma significativa con otras isoformas de activina (Knight y col., *supra*). La sensibilidad media fue de 0,01 ng / ml, y la media de los coeficientes de inter-ensayo intra-e de las variaciones (CV) fueron 3,9 % y 5,1 % respectivamente.

Concentraciones folistatina en suero se midieron con un radioinmunoensayo como se describió anteriormente (O'Connor et al., Hum Reprod. 14:827-832). La norma y el trazador empleado fue rfolistatina-288. Al igual que con la activina A ELISA, este RIA medidas ambas formas encuadradas de follistatins libres y. La sensibilidad del ensayo media fue de 2,7 ng / ml. ED<sub>50</sub> fue de 13,3 ng / ml, y los CV inter-ensayo intra-e fueron 6,4 % y 10,2 %, respectivamente.

Ratón citocinas TNFa, IL-1β y IL-6 se midieron por ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). Estos ensayos utilizan proteínas recombinantes de ratón como estándares y anticuerpos monoclonales para la detección. La sensibilidad del ensayo de TNF fue 0,5 ng / ml, y los CV inter-ensayo de intra-y fueron < 10 %. La sensibilidad del ensayo de IL-6 fue de 0,2 ng / ml y los CV inter-ensayo de intra-y fueron < 10 % y 12 % respectivamente. La sensibilidad de la IL-1β era ng / ml y los CV inter-ensayo de intra-y fueron < 10 % y < 11 %, respectivamente.

### Análisis de Datos

Todos los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía con una prueba t pareada se utiliza para comparar las diferencias entre los puntos de tiempo en los diferentes grupos de tratamiento.

5

### Resultados

#### *El papel de la activina A en ratones después de una exposición a LPS intraperitoneal*

10 Se observó una versión robusta de activina A en los ratones después de la inyección de LPS volvió a extraer. Los niveles de activina A aumentó dentro de 30 minutos después de la administración de LPS y alcanzó su punto máximo en 1 hora de regresar a los niveles basales entre 3 a 8 horas, seguido de un aumento posterior a las 12 horas antes de volver de nuevo a los niveles basales a las 24 horas (Fig.1A). Después de la administración de LPS, folistatina se libera en la circulación, pero se retrasó en comparación con activina A, aumentando a 3 horas y permaneciendo elevada hasta 24 horas (Fig.1B). Se observó la liberación de TNF en la circulación de seguir el pico monofásico clásico, aumentando en 0.5 horas ( $p < 0,01$ ) después de la administración de LPS, alcanzando un máximo de 1 hora y regresar a los niveles basales a las 5 a 8 horas (Fig.1C). Concentraciones séricas de IL-6 fue elevada posterior a elevaciones en TNFa, el aumento de entre 1 y 2 horas, alcanzando un máximo a las 2 horas ( $p < 0,01$ ) y permaneciendo elevada hasta entre 5 ( $p < 0,01$ ) y 8 horas (Fig.1D). Los niveles de IL-1 $\beta$  en la circulación fueron significativamente menores que TNFa o IL-6 (30-50 veces) con IL-1 $\beta$  creciente después de la inyección de 1 hora y alcanzando un máximo de 5 horas ( $p < 0,01$ ), antes de regresar a los niveles basales a las 8 horas (Fig.1E).

25 El pico de liberación de activina A no se vio afectada por la administración de rfolistatina-288. Después de la administración de LPS activina A liberación en la circulación fue todavía un pico rápido y robusto en 1 hora y regresar a los niveles basales dentro de 5 horas (Fig.2A). Curiosamente, la concentración de ratón circulatorio folistatina-288 fue suprimida significativamente a lo largo de todo el período de pico, 5-8 horas ( $p < 0,03$ ) después de la administración de LPS en ratones inyectados con rfolistatina-288 (fig.2B). Además, la liberación de TNFa se suprimió significativamente (50 % de supresión) mediante la administración de rfolistatina-288 antes de la inyección de LPS ( $p < 0,01$ ), aunque el perfil de liberación no se alteró significativamente (Fig.2C). Por el contrario, la IL-6 liberación fue alterado en ambos cantidades absolutas y temporalmente. Curiosamente, la IL-6 concentraciones máximas se incrementaron significativamente ( $p < 0,01$ ) en ratones administrados rfolistatina-288 antes de LPS en aproximadamente 2 veces (Fig.2D). Además, el aumento de IL-6 se produjeron anteriormente en la presencia de rfolistatina-288, alcanzando un máximo de 1 hora, en comparación con 2 horas en ratones que recibieron LPS solo. Liberación de IL-1 $\beta$  no era tan evidente en la presencia de rfolistatina-288 en comparación con los ratones que recibieron LPS solo (Fig.2E). Además, el perfil también se movió de tal manera que las elevaciones en las concentraciones séricas se produjeron anteriormente en la presencia de rfolistatina-288, alcanzando un máximo de 2 horas en comparación con 5 horas en ratones que recibieron LPS solo ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, hay que señalar que no había una diferencia significativa en las concentraciones de IL-1 $\beta$  en cualquier punto de tiempo.

### 40 EJEMPLO 2

#### **ACTIVINA Y FOLISTATINA EN UN MODELO MURINO DE ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

45 Datos piloto de nuestra ovoalbúmina (OVA) la sensibilización y el modelo de desafío de asma alérgica destaca los principales cambios en la expresión de activina durante la evolución de la respuesta inflamatoria pulmonar.

La compartimentación de la activina y folistatina se observa en un modelo murino de asma alérgica, y la expresión de la activina en varios sitios celulares en el tejido pulmonar de los pacientes con fibrosis quística y asma (Figura 3). La cinética de la secreción de activina se han mapeado encontrar que la concentración pico en BALF (Fig. 4A) coincide con la inflamación pico y eosinofilia (Fig. 4B), y la producción de IL-4 (Fig. 4C).

50 El análisis inmunohistoquímico de la expresión de la activina en el pulmón muestra que la activina se expresa en el epitelio de las vías respiratorias de los ratones de control (solución salina) (Fig. 5A). Sin embargo, después de 4 retos OVA (día 8) de la vía aérea se someten a cambios profundos, con hipertrofia de las células epiteliales y marcada pérdida de la expresión de activina (Fig. 5B). Estas alteraciones persisten hasta el día 17 (10 días después de la exposición final), aunque la expresión activina pasa a ser variable entre la vía aérea adyacente e incluso dentro de la misma de las vías respiratorias (Fig. 5C). Colectivamente, estos hallazgos indican que la activina pre-almacenada se libera en el tejido circundante durante la respuesta inflamatoria. Una tendencia general hacia la morfología de las vías respiratorias normal y expresión activina en los puntos de tiempo posteriores sugiere que este proceso de remodelación es reversible. Finalmente, el análisis inmunohistoquímico preliminar revela la pérdida de expresión folistatina en el epitelio bronquial después de OVA desafío muy similar al patrón visto para la activina.

60

**EJEMPLO 3****CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN PULMONAR DE ACTIVINA Y FOLISTATINA**5 *Expresión de ARNm de Activina y folistatina y compartimentación del receptor de la activina en el ratón*

El uso de un protocolo de sensibilización y desafío con OVA como alérgeno que hemos encontrado una correlación entre la magnitud de la respuesta inflamatoria y la regulación diferencial de la activina y expresión folistatina en el epitelio bronquial frente BALF se ha encontrado. El hallazgo de que la proteína activina se reduce drásticamente en células epiteliales bronquiales mandatos que activina y expresión folistatina se fije en múltiples puntos de tiempo durante y siguiendo el protocolo de inmunización. Los ratones se sensibilizó con OVA (50 mg en hidróxido de aluminio) en los días 0 y 12, y desafió a través de la intubación intratraqueal con OVA (25 g) en los días 24, 26, 28 y 30 (Hardy et al., 2003, Am J Respir Crit Care Med 167:1393-1399). Los ratones de control reciben solución salina en lugar de OVA. Los ratones se mataron (n = 6 por grupo) después de cada uno de 4 retos de alérgenos, y en los días 2, 4, 7, 10 y 20 después de la exposición a la ovalbúmina final. La inmunohistoquímica se realiza en pulmón fijado con formalina. Activina y folistatina se detectan con anticuerpos específicos (E4, generado contra la EPB subunidad de activina humano; 2E6, producido contra folistatina recombinante humano), que reaccionan de forma cruzada con el ratón; isotipo anticuerpos emparejados sirven como controles. Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos anti-peroxidasa de rábano picante-ratón apropiadas. Medición de la activina A en BALF y el suero es de acuerdo a una enzima establecido protocolo de ELISA conectado (Knight et al., 1996, supra) Utilizando recombinante humano activina A estándar. Concentración folistatina en BALF y el suero se midió usando un radioinmunoensayo discontinua (O'Connor et al., 1999, supra). Un protocolo en tiempo real de RT-PCR establecido se utiliza para cuantificar la activina y folistatina ARNm en el tejido pulmonar. La inmunohistoquímica (Santa Cruz Biotechnology) también se utiliza para evaluar la expresión de tipo I y receptores de activina II para determinar que las células pueden ser sensibles a la activina. En un número menor de puntos de tiempo no radiactivo *in situ* hibridación se realiza para determinar la localización de los ARNm de los receptores de activina para medir cualquier cambio en la compartimentación de los ARNm concomitante con el cambio en la localización de la proteína. Activina y folistatina intensidad de la tinción en el epitelio y la submucosa bronquial se obtuvo mediante análisis doble ciego en una escala de 0 = ausente, 1 = débil, 2 = moderado, 3 = Alta intensidad. Diez bronquiolos de diámetro interno 150-200 micras de cada ratón se analizan para llegar a las puntuaciones para los ratones individuales.

*Expresión de activina y folistatina en la enfermedad de las vías respiratorias humanas*

Se realizó un análisis inmunológico detallada de la activina y de expresión folistatina en el tejido normal, asmático y quística pulmonar fibrosis y BAL (ver métodos anteriores). Las muestras de tejido se obtuvieron a partir de muestras de tejido pulmonar resecado almacenados y potenciales en el momento del trasplante (fibrosis quística severa n = 20), con la cooperación del Servicio de pulmón Trasplante Cardíaco del Hospital Alfred, de Melbourne. Tejido asmática están disponibles a partir de almacenado tejido pulmonar resecado y prospectivo tejido de la biopsia endobronquial de pacientes asmáticos sometidos a broncoscopia por razones de diagnóstico intercurrentes (n = 10). De las vías respiratorias de control emparejados por edad de los no fumadores sin antecedentes conocidos de enfermedad de las vías respiratorias se recogen de nuevo *post mortem* muestras proporcionadas por el Departamento de Anatomía Patológica (n = 20). El tejido se obtiene de la vía aérea proximal (bronquio del lóbulo inferior derecho) en el momento de la resección pulmonar. Las muestras se fijan en cada uno de: (1) de acetona enfriada con inhibidores de la proteasa a -20 ° C para su posterior incorporación en glicol metacrilato (GMA), y (2) etanol y formalina para su posterior inclusión en parafina.

**EJEMPLO 4**50 **DEFINICIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE ACTIVINA Y FOLISTATINA Y LA INFLAMACIÓN PULMONAR**

Los aspectos clave de la respuesta inflamatoria alérgica se miden con el fin de caracterizar la relación entre activinas y folistatina y la magnitud de la respuesta inflamatoria. Los ratones (n = 6 por grupo) están sensibilizados y desafiados con OVA (como se indica en Objetivo 1), y asesinado después de cada uno de los 4 retos de alérgenos, y en los días 2, 4, 7, 10 y 20 después de la OVA desafío final. Se recoge suero de la sangre entera, y la prueba de presencia de OVA-IgE específica e IgG<sub>1</sub> por ELISA de tipo sándwich. El tejido pulmonar se fija en formol antes de la inclusión en parafina; secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina y ácido periódico de Schiff para la evaluación microscópica de la inflamación y para la determinación de la producción de moco-frecuencia de células. BAL y mediastínicos ganglios linfáticos sola célula suspensiones se cuentan. Cytospots celular del LBA se Giemsa manchadas y recuentos diferenciales realizaron en 200 células por ratón ≥; las células se identifican por criterios morfológicos. Frecuencia de IFN-γ células productoras en los ganglios linfáticos del mediastino estimuladas con OVA IL-4, IL-5, IL-13 y están determinados por ELISPOT (BD Biosciences y R & D Systems). Placas de ELISPOT se leyeron en un lector de ELISPOT AID. BALF se recoge después de haber realizado los recuentos de células, y se almacenaron a -70 ° C para su posterior análisis de las citocinas anteriores por ELISA de tipo sándwich. Además, tejido fijado con formalina de pulmón de control, asmático y pacientes con fibrosis quística se tiñeron inmunohistoquímicamente para detectar mastocitos (AA1, Dako), eosinófilos (proteína básica principal de

eosinófilos, peroxidasa de eosinófilos, BD Biosciences), los linfocitos T (CD3, Dako) y macrófagos (CD68, PGM1, Dako). Las células se contaron usando un sistema de amplificación de 3 capas con estreptavidina-biotina-peroxidasa y AEC (Sigma-Aldrich) como el sustrato. Los recuentos se realizaron utilizando un analizador de imágenes (Image-Pro Plus, MediaCybernetics) a una profundidad de 150 micras por debajo de la membrana basal y se expresaron como células por mm<sup>2</sup>. La expresión de citocinas Th2 clave se mide en BALF de los pacientes y los controles (BD Biosciences).

#### EJEMPLO 5

#### 10 CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ACTIVINA Y FOLISTATINA CON LA REMODELACIÓN DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS

Se analizan los acontecimientos de remodelación en las muestras almacenadas y potenciales de la normal (n = 20), asma (n = 10) y la fibrosis quística (n = 20) de pulmón humano. Análisis de imágenes morfométrico e inmunohistoquímica se utilizan para medir los índices clave de la respuesta de remodelación, incluyendo: (i) el engrosamiento de la membrana basal subepitelial, (ii) proliferación de fibroblastos, (iii) la hiperplasia de miofibroblastos, (iv) de las vías respiratorias hipertrofia del músculo liso / hiperplasia, y (v) la angiogénesis. Grosor de la membrana basal subepitelial y la angiogénesis se miden utilizando protocolos bien establecidos (Li et al., 1997, Am J Respir Crit Care Med 156:229-233; Wilson et al., 1997, Clin Exp Allergy 27:363-371; Orsida et al., 1999, Thorax 54:289-295). Hipertrofia del músculo liso de la vía aérea y la hiperplasia se evalúan en hematoxilina y eosina secciones teñidas (Image-Pro Plus) mediante la medición de diámetro de células de músculo liso en micras (diámetro a través del núcleo) y el porcentaje de músculo liso en la submucosa bronquial (Benayoun et al., 2003, Am J Respir Crit Care Med 167:1360-1368). Además, hipertrofia del músculo liso de las vías respiratorias se evaluó por inmunohistoquímica al anotar intensidad de actina de músculo liso  $\alpha$ -y miosina quinasa expresión de la cadena ligera (Sigma-Aldrich) en una escala de 0-3 (ver Objetivo 1) (Benayoun et al., 2003, *supra*). La proliferación de fibroblastos se evaluó por inmunohistoquímica en secciones fijadas en formalina utilizando anticuerpos específicos para la proliferación de células antígeno nuclear (PCNA, Dako). Los fibroblastos se identifican mediante criterios morfológicos y tinción de prolil-4-hidroxilasa (Dako). El número de fibroblastos PCNA-positivos por debajo de la membrana basal se cuentan, normalizado a la longitud de la membrana basal y se expresa por mm<sup>2</sup> área de la biopsia del cuantificable (Image-Pro Plus). Todos los parámetros se miden en al menos 2 secciones seriadas de cada paciente.

#### EJEMPLO 6

#### 35 INVESTIGACIÓN DE SI EL TRATAMIENTO CON FOLISTATINA PREVIENE LA INFLAMACIÓN PULMONAR Y POTENCIA LA RESOLUCIÓN EN UN MODELO MURINO

*Modulación por folistatina de expresión y liberación de activina- modelo murino de asma aguda*

La función de la activina está regulada por un número de proteínas de unión, el mejor estudiado siendo su interacción con la alta afinidad de la proteína de unión folistatina. La unión a folistatina recombinante humano efectivamente bloquea la interacción con el receptor de activina, neutralizando de ese modo las acciones biológicas de la activina A (Phillips, 2000, 22:689-696 Bioensayos). El uso de modelos de ratón de asma, la capacidad de la folistatina para modular la expresión de activina y la liberación en el pulmón, BAL y el suero se evalúa, la comparación de diferentes dosis de folistatinas y vías de administración. La inyección intraperitoneal de 1 mg folistatina por adulto de ratón 0,5 horas antes de la inyección de LPS bloquea la subida en folistatina visto 4 horas más tarde, y suprime la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), mientras que activin liberación es irreprochable. Bloques Así folistatinas tratamiento de efectos inducidos activina, pero no de su lanzamiento. Inicialmente, los ratones (n = 6 por grupo) reciben IP 1 mg por ratón folistatina, 0,5 horas antes de cada uno de los cuatro retos OVA. Esta vía de administración folistatina se compara con intranasal y ensayo administración intratraqueal diferentes dosis y tiempos de administración. Los ratones de control reciben solución salina. Activina A y la expresión folistatina se controla mediante ELISA en BALF, y por RT-PCR e inmunohistoquímica en el pulmón (ver Objetivo 1) después de cada una de las cuatro desafíos OVA, y en los días 2, 4, 7, 10 y 20 después de la última OVA desafío. El último punto de tiempo revela si activina A expresión devuelve los niveles de pre-exposición en los ratones no tratados OVA, y da una indicación sobre la duración del bloqueo inducido folistatina de activina.

En segundo lugar, una determinación de si se hace de si la neutralización de la activina A por folistatina disminuye la gravedad y la duración de la inflamación pulmonar alérgica. La capacidad de la folistatina para atenuar la inflamación pulmonar mediante la medición de parámetros de clave 'alérgicas' incluyendo específica de IgE e IgG<sub>1</sub>, Eosinofilia, la hipersecreción de moco, y la producción de citocinas se investiga. Los ratones se mataron después de cada uno de los cuatro retos OVA, y en los días 2, 4, 7, 10 y 20 después de la exposición a la ovalbúmina final. De sangre, BAL, los pulmones y ganglios linfáticos mediastínicos se recogen para la enumeración de células inflamatorias, específica de OVA IgE e IgG<sub>1</sub>, Eosinofilia, la producción de moco y el análisis ELISPOT de IL-4, IL-5, IL-13, e IFN- $\gamma$ . (métodos como por Objetivo 1). Puesto que el TGF- $\beta$  también está involucrado en la inmunorregulación y la remodelación de tejidos, la concentración de TGF- $\beta$  en BALF se mide (R & D Systems) y la expresión de TGF- $\beta$  en secciones de

tejido se mide mediante técnicas de inmunohistoquímica (Santa Cruz Biotechnology) para determinar si su producción está modulada por activina / folistatina (Lee et al., 2001, J. Exp. Med. 194:809-821). Estos datos proporcionan información sobre la capacidad de neutralización de activina para mejorar la inflamación pulmonar alérgica.

5

#### *Modulación por folistatina de la expresión y liberación de activina- modelo murino de asma crónica*

Repita el antígeno de dosificación a intervalos de tiempo no tolerogénicos para hasta seis semanas se lleva a cabo en un modelo murino de asma crónica (2 retos / semana el lunes y jueves) para inducir la inflamación de la vía aérea sostenida y remodelación crónica (Coyle et al., 1996, J Immunol 156:2680-2685). Los ratones se tratan con folistatina de acuerdo con la dosis y la vía optimizado anteriormente. Los efectos del tratamiento folistatina sobre la remodelación en este modelo de ratón se evalúan mediante la medición de: (i) la membrana basal engrosamiento sub-epitelial, (ii) la angiogénesis, (iii) la hipertrofia del músculo liso, y (iv) la inducción de células de moco (Lee et al., 2001, *supra*; Kumar et al., 2002, Clin Exp Allergy 32:1104-1111). Espesor Sub-epitelial de la membrana basal, la angiogénesis y la hipertrofia del músculo liso son evaluados. La metaplasia y / o hiperplasia de células caliciformes secretoras de moco se evalúa. Estos datos proporcionan información sobre la capacidad de la folistatina para inhibir la respuesta de remodelación de las vías respiratorias.

#### **Análisis estadístico**

La distribución de cada conjunto de datos es la prueba de la normalidad antes del análisis. Datos normalmente distribuidos se analizó usando ANOVA de una vía con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Comparaciones individuales entre los grupos se hace utilizando la prueba t de Student de dos colas. Las relaciones entre la expresión de la activina / folistatina y, o bien la inflamación o índices de remodelación se analiza mediante la correlación de Pearson.

Los datos que no se distribuyen normalmente se analizan utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de Dunn Comparaciones múltiples de la prueba post-hoc. Comparaciones individuales entre los grupos se realizan mediante una prueba U de Mann-Whitney de dos colas para datos no paramétricos. Las relaciones entre la expresión de la activina / folistatina y, o bien la inflamación o índices de remodelación se exploran mediante correlación de Spearman. La *P*valor de  $\leq 0,05$  se consideró significativo.

#### **EJEMPLO 7**

### **CAMBIOS PROFUNDOS EN LA ACTIVINA $\beta_B$ DURANTE LA INFLAMACIÓN LOCALIZADA Y SISTÉMICA**

#### **Materiales y Métodos**

##### *Diseño experimental*

Para el modelo sistémica de LPS, los ratones machos C57/BL se inyectaron por vía intraperitoneal (ip) con 100 mg de LPS de fenol purificado (Sigma: *E. Coli*). Los ratones de control, inyectados con PBS, se sacrificaron en el tiempo 0 y animales restantes (6/time punto) en 0,5, 1, 3, 5, 8, 12 y 24 horas y después de la inyección de LPS. En un experimento independiente, los efectos de las activinas se neutralizaron por el pretratamiento de los ratones con la proteína de unión a activina, folistatina, que es capaz de unirse y la ablación de los efectos de las formas de activina [Nakamura et al., 1990, Science 247:836-838]. En este experimento, los ratones fueron pretratados ip con folistatina recombinante humano 288 (1 g) 30 minutos antes de una inyección de LPS. Los ratones se sacrificaron 30 minutos después de la inyección folistatina (tiempo 0) y en los mismos tiempos, relativa a LPS, como se indica anteriormente. En el momento del sacrificio, los tejidos a ser examinados para niveles de expresión se colocaron en hielo frío de Trizol (Invitrogen Life Technologies) y se almacenaron a -80 C para la extracción de ARN más tarde. Los tejidos también se colocaron en formalina antes de la transferencia a etanol al 70 % para la fijación más tarde y estudios inmunohistoquímicos.

Para el modelo de inflamación hepática aguda, los ratones macho C57/BL6 fueron inyectados ip con 750 l / kg BW  $CCl_4$ . Los ratones de control, inyectados con PBS, se sacrificaron en el tiempo 0 y animales restantes se sacrificaron a las 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas siguientes  $CCl_4$  inyección. Los tejidos se recogieron como se describe anteriormente para la extracción de RNA y los estudios inmunohistoquímicos.

Extracciones de ARN se realizaron en 3-5 muestras de tejido de cada punto de tiempo se ha descrito anteriormente. Se extrajo el ARN utilizando Trizol de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para cada muestra, aproximadamente 10 g de ARN se trató con DNasa I (Ambion Inc) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las concentraciones de ARN para cada muestra se determinaron y 1 g se transcriben de forma inversa para dar ADNc utilizando el kit de transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen Life Technologies) y usando el protocolo suministrado por el fabricante. Análisis en tiempo real de los niveles de expresión se hicieron para los siguientes genes: GAPDH,  $\beta$  activina<sub>L</sub> $\beta$  subunidades y activina<sub>B</sub> subunidad. La inhibina  $\alpha$ -subunidad de la expresión de ARNm también se examinó utilizando métodos termociclador convencional, pero los niveles de expresión fueron

consistentemente demasiado bajo para permitir el análisis cuantitativo (datos no mostrados).

Los cebadores específicos utilizados para la cuantificación en tiempo real de los genes fueron (5'-a 3'):

GAPDH	F tactggcatcttcaccacca (producto de 394 pb)	(SEC ID N° 1)
Activina $\beta_a$	Fggctaacagaaccaggacca (producto de 325bp )	(SEC ID N° 2)
Activina $\beta_B$	F gacacgcatgccagactca (producto de 399bp)	(SEC ID N° 3)
Subunidad $\alpha$ de inhibina	F cttatgtattccggccatcc (producto de 326bp)	(SEC ID N° 4)
GAPDH	R gtgagcttcccattcagctc (productote 394 pb)	(SEC ID N° 5)
Activina $\beta_a$	R cttctcccattcctcatcca (producto de 325bp)	(SEC ID N° 6)
Activina $\beta_B$	R acttgccctccaagaaca (producto de 399bp)	(SEC ID N° 7)
Subunidad $\alpha$ de inhibina	R cctagtggtggctaccagga (producto de 326bp)	(SEC ID N° 8)

5

Los cebadores fueron diseñados específicamente para su uso con el termociclador luz en tiempo real sistema de PCR de Roche. Los productos de PCR se aislaron y secuenciaron y análisis de BLAST utilizan para confirmar que representaban los productos de los genes deseados. Análisis en tiempo real se realizaron utilizando SYBR Roche mastermix verde (termociclador Light Fast Start principal DNA SYBR verde, Roche Diagnostics GmbH) con condiciones optimizadas para la sensibilidad máxima. Temperaturas de recocido para todos los cebadores fueron 60 C. Normas y QC utilizados en los análisis se prepararon a partir de ADNc combinada derivada de las muestras experimentales en los que los niveles de expresión de los genes de interés eran altas. Diluciones seriadas del cDNA estándar era para cubrir un rango de expresión de 300 veces. CDNA muestras experimentales se diluyeron en el rango de la curva estándar y todos los ADNc se dividió en alícuotas y se almacenaron a -20. Cada muestra se analizó para los tres productos de genes de interés, al menos dos veces en carreras de análisis independientes. Entre reproducibilidad QC ensayo para todos los productos de los genes dio CV de < 22 %.

10

15

#### Immunohistoquímica

20

Secciones de parafina se dewaxed y antígenos obtenidos por deslizamientos inmersión en 0,01 M de tampón citrato, pH 6,0, el calentamiento en un horno de microondas (alta durante 2,5 minutos o 5 minutos para  $\beta_A$  o  $\beta_B$  respectivamente, entonces bajo durante 5 minutos para ambos), la refrigeración a 4 ° C durante ~ 20 minutos, y el lavado en agua durante 5 minutos. Peroxidasa endógena fue bloqueada en 3 % de  $H_2O_2$  durante 10 minutos, y se desliza bloqueados durante 1 hora (10 % de suero normal de conejo + bloque de CAS, Zymed Laboratories Inc., CA, # 00-8120) para activina  $\beta_A$  o 20 % de Tween normal de cabra serum/0.1 % 20 en tamponada con Tris solución salina (TBS) durante 1 hora para activina  $\beta_B$ . La solución de bloqueo fue extraída y las secciones se incubaron con anticuerpos específicos para la activina  $\beta_A$ -subunidad (E4, 10 g / ml en 1 % de albúmina de suero bovino (BSA) / TBS, Universidad de Oxford Brookes) o  $\beta_B$  activina subunidad (2 g / ml diluido en solución de bloqueo, Jones *et al.* 2000) durante la noche a 4 ° C. Después del lavado, las diapositivas  $\beta_A$  activina se incubaron en conejo anti-IgG de ratón<sub>2b</sub>-HRP (Zymed, # 61 a 0320) diluido 1:500 durante 2 horas y se lavó dos veces en NaCl tamponada con Tris (TBS) 0,05 % de Tween-20, pH 7,5, a continuación, MilliQ  $H_2$ Producto de reacción O. fue desarrollado con 3,3'-diaminobencidina (DAB) kit de sustrato (Zymed # 00-2014), y las secciones counterstained en hematoxilina durante 15 segundos. Todos los pasos de lavado estaban en TBS/0.05 % de Tween-20. Para las diapositivas  $\beta_B$  activina, las secciones se lavaron y después se incubaron con Dako Envision con HRP (de conejo, # K4003) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron de nuevo en TBS / Tween y el producto de reacción se desarrolló con DAB, seguido de tinción de contraste como para activina  $\beta_A$ . Control negativo secciones fueron incubadas con la proteína IgG2B de mieloma de ratón purificada (Zymed # 02-6300) en lugar del anticuerpo- $\beta_A$  específica activina o IgG de conejo no inmunizado (Dako # X0903) en lugar del anticuerpo- $\beta_B$  específica activina.

25

30

35

#### 40 Análisis de los datos

Para cada muestra, los niveles de expresión de activina  $\beta_A$  y  $\beta_B$  de ARNm se expresan en relación con el nivel de expresión de GAPDH para esa muestra. A partir de entonces, todos los tiempos 0 datos se normalizaron a 1 y datos en puntos de tiempo posteriores se expresó en relación a ese punto del tiempo. Todos los datos se representan como la media  $\pm$  SEM valores. Los valores se derivan normalmente de las 3 muestras de tejido evaluadas por punto de tiempo, pero más muestras se evaluaron en los controles y en algunos momentos de la hora temprana.

45

#### Resultados

50

En un modelo de ratón de la inflamación después de la exposición sistémica aguda con LPS, los niveles de mRNA de hígado para la activina se examinaron  $\beta_A$  y  $\beta_B$  subunidades. Activina  $\beta_A$  subunidad mRNA mostró un aumento menor (< niveles de control 2 veces) en el nivel de expresión de 1 hora después de LPS, pero los niveles de entre 1 y 3 horas de expresión disminuyó notablemente y de 3 a 8 horas de supresión clara (a < 25 % de control Niveles) fue evidente (Figura 6, panel superior). Por 12 horas, la expresión se acercaba a los niveles de control y a las 24 horas se había vuelto a los niveles previos al tratamiento. El tratamiento con la proteína de unión activina y antagonista, folistatina, dio lugar a una supresión inmediata de activina  $\beta_A$  niveles de mRNA de la subunidad.

55

- En contraste, los niveles de mRNA de la subunidad  $\beta$ B hígado muestran un perfil completamente diferente a la subunidad  $\beta$ A activa, el aumento inmediatamente después de LPS para alcanzar un nivel de expresión máximo a 5 horas, en cuyo momento, la expresión de media sobre los niveles de control 35 veces (Figura 6, menor panel). Entre 5 y 12 horas de esta expresión se redujo progresivamente, pero a las 12 horas, la expresión era todavía elevado (en promedio, los niveles de control de 7 veces). A las 24 horas después de tratamiento con LPS, los niveles de activina  $\beta$ B de mRNA fueron todavía de  $\sim 5$  - veces por encima de los niveles de control. En cuanto a la activina  $\beta$ A expresión de la subunidad, activina  $\beta$ B patrones de expresión de las subunidades fueron alterados por el tratamiento previo folistatina, con clara supresión de los efectos asociados con LPS en  $\beta$ B expresión de la subunidad.
- 10 En el modelo de la inflamación después de la estimulación hepática aguda con  $\text{CCl}_4$ , Activina  $\beta$ A expresión de la subunidad cayó ligeramente tras la  $\text{CCl}_4$  tratamiento (Figura 7, panel superior), de tal manera que en 1 y 2 horas, los niveles de expresión promedio fueron de sólo 40-50 % de los niveles de control. Por el contrario, a las 4 horas después de la inyección, el ARNm promedio  $\beta$ A fue moderadamente (80 %) elevó y luego disminuyó a los niveles previos al tratamiento en torno a las 36 horas. En contraste con la subunidad  $\beta$ A activa, activina  $\beta$ B mostró los mayores cambios en la expresión a las 24 y 36 horas después de la  $\text{CCl}_4$  inyección, con un aumento de 13,5 veces por encima de los niveles de control (Figura 7, panel inferior).

- En ambos modelos inflamatorios, se examinó la expresión de la inhibina  $\alpha$ -subunidad, pero los niveles de expresión fueron consistentemente demasiado bajo para permitir el análisis cuantitativo. Por lo tanto es poco probable que los cambios profundos en la activina  $\beta$ B subunidad ARNm dieron como resultado la formación de dímeros de inhibina elevadas (un dímero de  $\alpha$ - $\beta$  o inhibina B), pero dimerizados para formar activina B (un dímero de  $\beta$ B- $\beta$ B). Teniendo en cuenta los únicos cambios marginales en la activina  $\beta$ A ARNm, es relativamente poco probable que el aumento de la expresión de ARNm  $\beta$ B resultó en la formación significativa del heterodímero, activina AB ( $\beta$ A- $\beta$ B).
- 25 El uso de anticuerpos específicos para el  $\beta$ A activina y subunidades  $\beta$ B, la inmunolocalización de hígado se investigó tanto en el modelo sistémica aguda de la exposición a LPS y el modelo inflamatoria hepática aguda usando  $\text{CCl}_4$ . La localización de la subunidad  $\beta$ A activa en el hígado normal fue en los hepatocitos y, más específicamente los predominantemente alrededor de las venas centrales (Figura 8). Después de la exposición LPS, la localización apareció a disminuir alrededor de 5 horas después de LPS y regresó a una distribución de pre-tratamiento por 12 horas. Para la subunidad  $\beta$ B activa, sin embargo, la localización fue más evidente en los hepatocitos que rodean las áreas del tracto portal del hígado y por lo menos alrededor de las venas centrales (Figura 9). Sin embargo, la localización parecía disminuir a las 5 horas siguientes LPS y regresó patrones previos al tratamiento por 12 horas. También parece ser una pérdida de la localización de hepatocitos en las zonas periféricas del hígado (Figura 9). En la Comisión de Climatología modelo de inflamación hepática aguda, sub-unidades localizadas en los hepatocitos que rodean la vena central y espacios porta para las subunidades  $\beta$ A y  $\beta$ B respectivamente (Figura 10a y 10b). Sin embargo, 36 horas después de la  $\text{CCl}_4$  tratamiento, no parecía ser la localización de la subunidad  $\beta$ A activa (Figura 10c) en los hepatocitos, que están destinadas a convertirse en apoptosis / necrosis, mientras que hubo poca o ninguna localización para la subunidad  $\beta$ B activa en estas áreas (Figura 10d).

## 40 EJEMPLO 8

### ACTIVINA Y FOLISTATINA ESTÁN ELEVADAS EN PACIENTES CON LESIÓN CEREBRAL TRAUMÁTICA GRAVE

#### 45 Antecedentes

- Lesión cerebral traumática (TBI) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los adultos jóvenes (Van Baalen et al., 2003, de la Discapacidad y Rehabilitación 25 9-18). La activación de diversas vías inmunológicas se produce después de la lesión cerebral traumática, incluyendo la liberación de varias citocinas, la activación de las células gliales del cerebro y las diversas respuestas de lesiones celulares y tisulares. Un número de citocinas inflamatorias de respuesta se han detectado en el suero y el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con TCE, derivados de la respuesta inflamatoria post-traumático. La medición de la activina A y su proteína de unión, folistatina, no se ha determinado en esta configuración y fue el propósito de este estudio. Estos resultados muestran que ambas proteínas y, en particular, activina, son sensibles y elevada en el LCR de pacientes con lesión cerebral traumática. Como consecuencia, estos hallazgos proporcionan nuevas posibilidades de nuevas oportunidades de diagnóstico y terapéuticos basados en torno a este componente de la respuesta inflamatoria iniciada por TBI.

#### Materiales y Métodos

- 60 Los pacientes fueron ingresados en el Alfred Hospital, Melbourne, después de TBI, debido en gran parte a los accidentes de tráfico. Los seis pacientes evaluados en este subgrupo de un estudio más amplio eran todos hombres, y tenían edades comprendidas entre 16 a 50 años. Ellos tenían una puntuación de coma de Glasgow (GCS) de 3-7 a su ingreso al Servicio de Urgencias Alfred. En la mayoría de los casos, se obtuvieron muestras pareadas de suero y LCR de estos pacientes tras el consentimiento ético está firmado por un pariente más cercano. Las muestras se recogieron en relación diaria con el TBI. Las muestras se centrifugaron a 170 g durante 10 minutos, dividen en partes alícuotas y se congelaron hasta su análisis.

Activina concentraciones en suero se determinaron como se ha descrito anteriormente utilizando una enzima-ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Knight *et al.* 1996, *supra*). "Total" activina A El ensayo mide, que es a la vez componentes unidos gratuito y.El estándar de ensayo fue recombinante humana activina A (Programa pituitaria (PPNH) National hormonal y, Torrance, CA, EE.UU.).La sensibilidad del ensayo media fue de 0,01 ng / ml, y la media-ensayo coeficientes intra-e inter de variación (CV) fueron ambos < 9 %.

Concentraciones folistatina en suero se midieron con un radioinmunoanálisis validado para folistatina humana como se describe previamente (O'Connor *et al.* 1999, *supra*), que también mide tanto las formas unidas y libres.El estándar utilizado fue folistatina recombinante humana 288, la sensibilidad del ensayo fue 2,0 ng / ml y los coeficientes intraensayo e interensayo de variación fueron ambos < 4,9 %.

Para las muestras de LCR, los ensayos de activina y folistatinas fueron como se describe anteriormente.Sin embargo, el diluyente estándar utilizado fue de 0,05 % de BSA en PBS para que coincida con la concentración de proteína en las muestras.Una solución de 20 % de BSA en PBS (25 l) se añadió a los pocillos en la activina A de ELISA antes de la adición de las muestras de LCR, ya que esto se encontró para mejorar la reproducibilidad de los ensayos.

## Resultados

El análisis de este conjunto de pacientes con TCE mostró que las concentraciones de activina se elevaron después de TBI (Figura 11).Este fue especialmente el caso de la activina A en el líquido cefalorraquídeo. El patrón temporal y los niveles de la activina en el LCR varió ligeramente para cada paciente, pero en general los niveles fueron más altos en un paciente individual 1-2 días después del incidente de TBI.Para folistatina, había en algunos de los pacientes un aumento de menor importancia en los niveles de suero o LCR, pero no hasta el punto de visto activina CSF.Como las concentraciones de activina CSF mostraron una elevación después de TBI, esto probablemente refleja la activación de las vías inflamatorias en el sistema nervioso central (SNC) y particularmente el cerebro, y sugiere el trauma y la inflamación se limita en gran medida a este órgano y no parte de un inflamatoria sistémica respuesta.

## EJEMPLO 9

### PAPEL DE LA ACTIVINA Y LA FOLISTATINA EN LA LIBERACIÓN DE CITOCINAS INDUCIDA POR LIPOPOLISACÁRIDOS

#### Antecedentes

La activina A se libera en respuesta a la administración de lipopolisacárido (LPS) en ratones.Este lanzamiento se produce temprano en la cascada de citocinas que sigue y parece preceder a la liberación del tumor citocinas proinflamatorias factor de necrosis  $\alpha$  clave (TNF) y la interleucina-6 (IL-6).Cuando el antagonista de la activina, folistatina, se administró antes de la inyección de LPS, se alteró la liberación de estas citocinas-.Esto indicó que la activina tiene un papel en la modulación de la liberación de estas citocinas como parte de la respuesta inflamatoria y que folistatina podría ser utilizado como un adyuvante terapéutico para modificar la liberación de citocinas durante la enfermedad inflamatoria.

#### Métodos

Los métodos empleados para los siguientes experimentos son los mismos que los descritos en el Ejemplo 1 con la excepción de que se utilizaron dos dosis diferentes de folistatina para identificar efectos de dosis depende de la actividad de activina en la modulación de la liberación de citocinas en una respuesta inflamatoria inducida por LPS.Las dos dosis utilizadas tras la exampled 1 experimento, que utilizó 1 g de folistatina, fueron de 2 mg y 0,5 mg.

#### Resultados

Activina y perfil de liberación folistatina no cambian significativamente entre las dosis de 0,5 mg, 1 $\mu$ g o 2 $\mu$ g de folistatina antes de la estimulación con LPS.El nivel de supresión de la liberación de TNF como los mismos siguientes tres dosis separadas de folistatina (0,5, 1 y 2 microgramos) antes de la administración de LPS. La liberación de IL-6 aumenta aproximadamente 250 % en los ratones administró 1 g de folistatina antes de LPS en comparación con el aumento observado en los ratones LPS administrado solo.Sin embargo, la IL-6 liberación sólo se incrementa en 50 % en los ratones administrados 0,5 g de folistatina previo a LPS. La liberación de IL-6 en ratones administró 2 g de folistatina previo a LPS es el mismo que el observado en los ratones inyectados con LPS solo.

#### Conclusiones

La liberación de TNF fue similar tras la administración de la dosis de 0,5, 1 y 2 g de folistatina.(Figuras 12, 13 y 2A y 2B).



IL-6 liberación en ratones administró 1 g de folistatina antes de LPS aumentado ( $\approx 50.000$  pg / ml) en comparación con la liberación de IL-6 en los ratones que se les administró LPS solo ( $\approx 20.000$  pg / ml). Cuando la dosis de folistatina se duplicó a 2 g, la liberación de IL-6 no aumentó. Más bien, en realidad se redujo de nuevo a los niveles observados en los ratones LPS administrado solo ( $\approx 20.000$  pg / ml). Sin embargo, en los ratones administrados 0,5 g de folistatina antes de la administración de LPS, IL-6 aumentó de liberación ( $\approx 30.000$  pg / ml) a niveles por encima de la observada en ratones LPS administrados, pero no aumentó en la misma medida como se observa en los ratones administrados 1 g de la folistatina previo a LPS. Esto demuestra un efecto de la folistatina sobre la modulación de la liberación de citocinas por activina en una manera dependiente de la dosis hasta una dosis de 1 g / ratón con la dosis más alta de 2 microgramos que conducen a una supresión de los niveles encontrados en los ratones que recibieron LPS solo. La dosis de folistatina utilizado para modular la respuesta de citocinas es un componente crítico de cualquier aplicación terapéutica.

Parece que la dosis de folistatina requerida para bloquear la capacidad de activina para modular la liberación de TNF no es tan alta como la que se requiere para modular la liberación de IL-6. Esto puede estar relacionado con los diferentes patrones de liberación temporales de TNF e IL-6, con TNFα ser de liberación antes que la IL-6 y por lo tanto potencialmente más sensible a la presencia de un factor estimulador temprano en la respuesta inflamatoria tales como la activina.

## EJEMPLO 10

### ACTIVINA Y FOLISTATINA SE EXPRESAN DURANTE EL PROCESO DE CURACIÓN DE LAS QUEMADURAS

#### Antecedentes

Quemaduras representan una lesión grave con su dependiente de la gravedad en el área de la superficie del cuerpo afectada por la quemadura, así como la profundidad de la quemadura, a saber, parcial o de grosor completo. Las quemaduras menores producen una lesión local con una respuesta inflamatoria local seguido por un proceso de curación. Este último puede restaurar la piel a su estado pre-quemadura o puede resultar en una cicatriz debido a un proceso fibrótico que implica la deposición de colágeno.

En las quemaduras más graves, se produce una profunda respuesta inflamatoria que implica la trasudación de fluido, así la muerte de tejido de la lesión térmica. No puede haber cambios profundos en el equilibrio de líquidos que conduce a shock y muerte. Durante el proceso de curación, con grandes quemaduras, hay insuficiente de la piel para los propósitos dejando las superficies abiertas susceptibles a la infección y la inflamación de injerto. A menudo la inflamación conduce a procesos fibróticos que dan como resultado la deposición de colágeno y la cicatrización severa.

Los niveles actuales ejemplo de análisis de activina A y folistatina en la circulación de pacientes con quemaduras. También estudió son la expresión local de la activina A y folistatina en biopsias tomadas de pacientes con quemaduras en diferentes etapas de curación.

#### Material y Métodos

Los niveles de activina A y folistatina se midieron en muestras de suero de 4 pacientes con quemaduras en las diferentes etapas después de la lesión térmica. Además, las muestras de tejido tomadas de la zona de la lesión en los pacientes (n = 3) con quemaduras como parte de su tratamiento habitual en la Unidad de Quemados del Hospital Alfred fueron examinadas por microscopía de luz utilizando secciones teñidas por haematoxylin y eosina, así como por inmunocitoquímica para determinar la expresión de la activina A y folistatina.

Activina concentraciones en suero se determinaron como se ha descrito anteriormente utilizando una enzima-ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Knight *et al.* 1996, *supra*). "Total" activina A El ensayo mide, que es a la vez componentes unidos gratuito y. El estándar de ensayo fue de activina A humana recombinante a partir de Biotech Australia (Robertson *et al.* 1992). La sensibilidad del ensayo media fue de 0,01 ng / ml, y la media-ensayo coeficientes intra-e inter de variación (CV) fueron ambos < 4,9 %.

Concentraciones folistatina en suero se midieron con un radioinmunoanálisis validado para folistatina humana como se describe previamente (O'Connor *et al.* 1999, *supra*), que también mide tanto las formas libres y ligados. El estándar empleado y que se utiliza como trazador era folistatina recombinante humano 288 (Programa de pituitaria (PPNH) Nacional de Hormonas y, Torrance, CA, EE.UU.), la sensibilidad del ensayo fue 2,0 ng / ml y los coeficientes intraensayo e interensayo de variación fueron ambos < 4,9 %.

Para la inmunolocalización de secciones de tejido para la activina y folistatina, las secciones de parafina se dewaxed y antígenos recuperados por diapositivas inmersión en tampón de citrato 0,01 M, pH 6,0, el calentamiento en un microondas (alta durante 2,5 minutos, bajo durante 5 minutos), enfriamiento a 4 ° C durante -20 minutos, y lavado en agua durante 5 minutos. Peroxidasa endógena fue bloqueada en 3 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Y las diapositivas bloqueadas durante 1 hora (bloque CAS, Zymed Laboratories Inc., CA, # 00 a 8120). Las secciones fueron incubadas en β activina<sub>La-</sub> (E4,

IgG2<sub>b</sub>) O-específica folistatina (2E6) de anticuerpos (IgM) en 10 mg / ml durante la noche a 4 ° C. Después del lavado, los portaobjetos se incubaron en IgG anti-ratón<sub>2b</sub>-HRP (Zymed, # 61 a 0320) o IgM-HRP (Zymed # 61-6820) diluido 1:500, durante 2 horas, y se lavaron dos veces en NaCl tamponada con Tris (TBS) 0,05 % de Tween-20, pH 7,5, a continuación, MilliQ H<sub>2</sub>O. Producto de reacción O. fue desarrollado con el kit de sustrato de tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencidina (Zymed # 00-2014), y secciones contratiñidas en hematoxilina durante 15 segundos. Todos los pasos de lavado estaban en TBS/0.05 % de Tween-20. Los anticuerpos se diluyeron en 1 % de BSA / TBS.

#### Resultados

En los cuatro pacientes (Figura 15, paneles A-D), los niveles de activinas A y folistatina variaron y mostraron picos como en la figura B y se observaron niveles muy altos en uno de los pacientes (panel D). En el último paciente, los niveles están muy significativamente elevados por encima de los observados y alcanzan niveles vistos en pacientes con septicemia (Michel et al., 2003, *European Journal of Endocrinology* 148: 559-564). A partir de estos estudios preliminares, se concluye que los niveles de activina A y de folistatina en suero pueden variar significativamente durante el curso de una lesión por quemaduras y, en algunos pacientes, los niveles alcanzan los hallados en pacientes con septicemia. Estos estudios son consistentes con el concepto de que la respuesta inflamatoria asociada con quemaduras inicia niveles incrementados de activina A, lo que a su vez estimula la folistatina similar a los ejemplos indicados de los cambios en estos niveles en ratones a los que se administra una exposición a LPS.

Los sitios de expresión de activina A y folistatina en muestras de tejido tomadas de las zonas quemadas a diferentes puntos de tiempo después de la lesión demuestran que diversos tipos de células pueden producir estas proteínas.

La expresión de activina A se detecta mediante la localización de la subunidad  $\beta_A$  y en la epidermis de la piel, la activina A se localizó de un modo parcheado en el estrato basal germinativo (SGE), hasta un grado limitado en el estrato espinoso (SSp) y más intensamente en el estrato granuloso (SGR), justo por debajo del estrato lúcido (SL) cuando está presente (Figuras 16 y 17). La folistatina se expresa ligeramente en el estrato germinativo, en mayor medida en el estrato espinoso pero hasta un grado marcadamente disminuido en el estrato granuloso. Cuando hay estrato lúcido en la piel queratinizada engrosada, la folistatina se localizó en las células de esta región (Figuras 16 y 17). Obsérvese que las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E) para ayudar a la identificación celular.

En la dermis, la activina A se encuentra en el endotelio de los capilares y vasos pequeños (V) en macrófagos y monocitos y en leucocitos polimorfonucleares cuando está presente (Figuras 18-20). Los fibroblastos (F) contienen activina A. Hay folistatina en las células endoteliales y en una cantidad baja en los macrófagos (M) y los fibroblastos (Figuras 18-20). En las biopsias de pacientes con mala cicatrización, inflamación y fibrosis caracterizadas por agregaciones de colágeno (C), se produjo una regulación por aumento de la activina A en los fibroblastos, macrófagos y monocitos y los leucocitos (INF) (Figuras 18-20). En algunas áreas existen acumulaciones de macrófagos, monocitos, leucocitos y células en degeneración (D) y cada una muestra una localización significativa de activina A, mientras que la de la folistatina es parcheada o de menor intensidad (Fig 18-20). El incremento de la vascularidad en estas regiones muestra una localización clara e incrementada de la activina A en células endoteliales (V) (véanse las flechas, Fig. 18) (Figuras 18-20).

El incremento de la localización de la A activa en fibroblastos es probable que sea responsable de la fibrosis dérmica que se produce tras quemaduras en la piel, ya que algunos investigadores han hallado una correlación entre la regulación por aumento de la activina A en tejido pulmonar después del tratamiento con bleomicina y la fibrosis pulmonar resultante (Matsuse et al., 1995, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 13 17-24). También se hallaron correlaciones similares entre la regulación por aumento de la activina A y la fibrosis pulmonar en seres humanos (Matsuse et al., 1996, *American Journal of Pathology* 148 707-713) y Ohga *et al.* (Ohga et al., 1996, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228 391-396) mostraron que la activina A estimula la proliferación de fibroblastos pulmonares y su diferenciación en miofibroblastos que producen colágeno.

Dado que la folistatina neutraliza las acciones de la activina A y puede atenuar el desarrollo de fibrosis hepática, se puede usar para prevenir el desarrollo de fibrosis inducida por la reacción inflamatoria causada por quemaduras. Los niveles elevados de activina A y de folistatina observados en algunos pacientes después de quemaduras indica la participación de la activina A en este proceso inflamatorio análogo a los cambios inducidos por el LPS en ratones. El ejemplo anterior, que muestra que la folistatina administrada antes de la exposición a LPS en ratones puede alterar el patrón de citocinas, proporciona pruebas de que el bloqueo de las acciones biológicas de la activina puede alterar la cascada de citocinas. Estos datos indican además que el bloqueo de las acciones biológicas de la activina A inducida por la lesión térmica por la folistatina bloquearía las acciones de la activina A que son consecuencia de una lesión tisular.

#### Bibliografía

Alexander C, Rietschel ET, 2001, Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 7:167 - 202

- Benayoun, L., A. Druilhe, M.C. Dombret et al. 2003. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1360 - 1368.
- 5 Bernard DJ 2004 Both SMAD2 and SMAD3 mediate activin-stimulated expression of the follicle-stimulating hormone beta subunit in mouse gonadotrope cells. *Molecular Endocrinology* 18 606 - 623
- Billestrup N, Gonzalez-Manchon C, Potter E & Vale W. Inhibition of somatotroph growth and growth hormone biosynthesis by activin in vitro. *Molecular Endocrinology* 1990 4 356 - 362.
- 10 Brown CW, Houston-Hawkins DE, Woodruff TK & Matzuk MM 2000 Insertion of *Inhbb* into the *Inhba* locus rescues the *Inhba*-null phenotype and reveals new activin functions. *Nature Genetics* 25 453 - 457
- Bunin BA, et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4708 - 4712
- 15 Corrigan AZ, Bilezikjian LM, Carroll RS, Bald LN, Schmelzer CH, Fendly BM, Mason AJ, Chin WW, Schwall RH & Vale W 1991 Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrinology* 128 1682 - 1684
- Coyle, A.J., S. Tsuyuki, C. Bertrand, S. Huang, M. Aguet, S.S. Alkan, and G.P. Anderson. 1996. Mice lacking the IFN-gamma receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J Immunol* 156:2680 - 2685.
- 20 De Bleser PJ, Niki T, Xu G, Rogiers V & Geerts A 1997 Localization and cellular sources of activins in normal and fibrotic rat liver. *Hepatology* 26 905 - 912
- 25 Demura R, Suzuki T, Tajima S, Mitsushashi S, Odagiri E, Demura H et al. Human plasma free activin and inhibin levels during the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993 76 1080 - 1082.
- Demura R, Suzuki T, Tajima S, Mitsushashi S, Odagiri E, Eto Yet al. Competitive protein binding assay for activin A/EDF using follistatin determination of activin levels in human plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992 185 1148 - 1154.
- 30 de Winter JP, ten Dijke P, de Vries CJ, van Achterberg TA, Sugino H, de Waele P et al. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1996 116 105 - 114.
- 35 DeWitt SH, et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6909 - 6913
- Douillard and Hoffman, Basic Facts about Hybridomas, in *Compendium of Immunology Vol II*, ed. by Schwartz, 1981
- 40 Erämaa M, Hurme M, Stenman UH, Ritvos O (1992), Activin A/erythroid differentiation factor is induced during human monocyte activation., *J Exp Med* 176:1449 - 52
- 45 Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. (1991) *Science* 251(4995):767 - 73
- Gilfillan CP & Robertson DM. Development and validation of a radioimmunoassay for follistatin in human serum. *Clinical Endocrinology* 1994 41 453 - 461.
- 50 Hardy, C.L., L. Kenins, A.C. Drew, J.M. Rolland, and R.E. O'Hehir. 2003. Characterization of a mouse model of allergy to a major occupational latex glove allergen Hev b 5. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1393 - 1399.
- Harrison CA, Gray PC, Fischer WH, Donaldson C, Choe S & Vale W 2004 An activin mutant with disrupted ALK4 binding blocks signaling via type II receptors. *Journal of Biological Chemistry* 279 28036 - 28044
- 55 Hashimoto O, Nakamura T, Shoji H, Shimasaki S, Hayashi Y & Sugino H. A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. Endocytotic degradation of activin and its acceleration by follistatin associated with cell-surface heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry* 1997 272 13835 - 13842.
- 60 Hübner G & Werner S. Serum growth factors and proinflammatory cytokines are potent inducers of activin expression in cultured fibroblasts and keratinocytes. *Experimental Cell Research* 1996 228 106 - 113.
- Hübner G, Brauchle M, Gregor M & Werner S. Activin A: a novel player and inflammatory marker in inflammatory bowel disease? *Laboratory Investigation* 1997 77 311 - 318.
- 65

- Hübner G, Hu Q, Smola H & Werner S. Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair. *Developmental Biology* 1996 173 490 - 498 .
- 5 Jones RL, Salamonsen LA, Critchley HOD, Rogers PAW, Affandi B and Findlay JK, 2000, Inhibin and activin subunits are differentially expressed in endometrial cells and leukocytes during the menstrual cycle, in early pregnancy and in women using progestin-only contraception. *Molecular Human Reproduction* 6:1107 - 1117.
- Keelan JA, Zhou RL & Mitchell MD. Activin A exerts both pro- and anti-inflammatory effects on human term gestational tissues. *Placenta* 2000 21 38 - 43.
- 10 Khoury RH, Wang QF, Crowley WF Jr, Hall JE, Schneyer AL, Toth T et al. Serum follistatin levels in women: evidence against an endocrine function of ovarian follistatin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995 80 1361 - 1368.
- 15 Kitaoka M, Kojima I & Ogata E. Activin-A: a modulator of multiple types of anterior pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1988 157 48 - 54.
- Knight PG, Muttukrishna S, Groome NP (1996), Development and application of a two-site enzyme immunoassay for the determination of 'total' activin-A concentrations in serum and follicular fluid., *J Endocrinol* 148:267 - 79
- 20 Kobayashi T, Niimi S, Hashimoto O, and Hayakawa T, (2000) *Biol. Pharm. Bull.* 23(6):755 - 757
- Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 - 499, 1975; *European Journal of Immunology* 6: 511 - 519, 1976
- 25 Kumar, R.K., C. Herbert, M. Yang et al. 2002. Role of interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway remodelling in a mouse model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy* 32:1104 - 1111.
- Lee, C.G., R.J. Homer, Z. Zhu et al. 2001. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* 194:809 - 821.
- 30 Li, X., and J.W. Wilson. 1997. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 156:229 - 233.
- Loria P, Petraglia F, Concari M, Bertolotti M, Martella P, Luisi S et al. Influence of age and sex on serum concentrations of total dimeric activin A. *European Journal of Endocrinology* 1998 139 487 - 492.
- 35 Maeshima K, Maeshima A, Hayashi Y, Kishi S & Kojima I 2004 Crucial role of activin A in tubulogenesis of endothelial cells induced by vascular endothelial growth factor. *Endocrinology* 145 3739 - 3745
- 40 Manthey CL, Perera PY, Henricson BE, Hamilton TA, Qureshi N, Vogel SN (1994), Endotoxin-induced early gene expression in C3H/HeJ (Lpsd) macrophages., *J Immunol* 153:2653 - 63
- Matsuse T, Fukuchi Y, Eto Y, Matsui H, Hosoi T, Oka T, Ohga E, Nagase T & Orimo H 1995 Expression of immunoreactive and bioactive activin A protein in adult murine lung after bleomycin treatment. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 13 17 - 24.
- 45 Matsuse T, Ikegami A, Ohga E, Hosoi T, Oka T, Kida K, Fukayama M, Inoue S, Nagase T, Ouchi Y et al. 1996 Expression of immunoreactive activin A protein in remodeling lesions associated with interstitial pulmonary fibrosis. *American Journal of Pathology* 148 707 - 713
- 50 Matzuk MM, Kumar TR, Vassalli A, Bickenbach JR, Roop DR, Jaenisch R & Bradley A 1995 Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature* 374 354 - 356
- McFarlane JR, Foulds LM, Pisciotta A, Robertson DM & de Kretser DM. Measurement of activin in biological fluids by radioimmunoassay, utilizing dissociating agents to remove the interference of follistatin. *European Journal of Endocrinology* 1996 134 481 - 489.
- 55 Meunier H, Rivier C, Evans RM & Vale W. Gonadal and extragonadal expression of inhibin  $\alpha$ ,  $\beta$ A and  $\beta$ B subunits in various tissues predicts diverse functions. *PNAS* 1988 85 247 - 251.
- 60 Michel U, Albiston A & Findlay JK. Rat follistatin: gonadal and extragonadal expression and evidence for alternative splicing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1990 173 401 - 407.
- 65 Michel U, Esselmann J & Nieschlag E. Expression of follistatin messenger ribonucleic acid in Sertoli cell-enriched cultures: regulation by epidermal growth factor and protein kinase C-dependent pathway but not by follicle-stimulating hormone and protein kinase A-dependent pathway. *Acta Endocrinologica* 1993 129 525 - 531.

- Michel U, Schneider O, Kirchhof C, Meisel S, Smirnov A, Wiltfang J et al. Production of follistatin in porcine endothelial cells: differential regulation by bacterial compounds and the synthetic glucocorticoid RU 28362. *Endocrinology* 1996 137 4925 - 4934.
- 5 Michel U, Ebert S, Phillips D & Nau R 2003 Serum concentrations of activin and follistatin are elevated and run in parallel in patients with septicemia. *European Journal of Endocrinology* 148 559 - 564
- Mohan A, Asselin J, Sargent IL, Groome NP & Muttukrishna S. Effect of cytokines and growth factors on the secretion of inhibin A, activin A and follistatin by term placental villous trophoblasts in culture. *European Journal of Endocrinology* 2001 145 505 - 511.
- 10 Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K & Sugino H 1990 Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247 836 - 838
- 15 Nakamura T, Asashima M, Eto Y, Takio K, Uchiyama H, Moriya N, Ariizumi T, Yashiro T, Sugino K, Titani K et al. 1992 Isolation and characterization of native activin B. *Journal of Biological Chemistry* 267 16385 - 16389
- O'Connor AE, McFarlane JR, Hayward S, Yohkaichiya T, Groome NP, de Kretser DM (1999), Serum activin A and follistatin concentrations during human pregnancy: a cross-sectional and longitudinal study., *Hum Reprod.* 14:827 - 832
- 20 Orsida, B.E., X. Li, B. Hickey, F. Thien, J.W. Wilson, and E.H. Walters. 1999. Vascularity in asthmatic airway: relation to inhaled steroid dose. *Thorax* 54:289 - 295.
- 25 Petraglia F, Garg S, Florio P, Sadick M, Gallinelli A, Wong W-L, Krummen L, Comitini G, Mather J & Woodruff TK 1993 Activin A and activin B measured in maternal serum, cord blood serum and amniotic fluid during human pregnancy. *Endocrine Journal* 1 323 - 327
- Phillips DJ, de Kretser DM, Pfeffer A, Chie WN & Moore LG. Follistatin has a biphasic response but follicle-stimulating hormone is unchanged during an inflammatory episode in growing lambs. *Journal of endocrinology* 1998 156 77 - 82.
- 30 Phillips and deKretser, 1998, *Frontiers in Neuroendocrinology* 19:287 - 322
- 35 Phillips DJ. New developments in the biology of inhibins, activins and follistatins. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2001 12 94 - 96.
- Phillips, D.J. 2000. Regulation of activin's access to the cell: why is mother nature such a control freak? *Bioessays* 22:689 - 696.
- 40 Poulaki V, Mitsiades N, Kruse FE, Radetzky S, Iliaki E, Kirschhof B & Jousseaume AM 2004 Activin A in the regulation of corneal vascularization and vascular endothelial growth factor expression. *American Journal of Pathology* 164 1293 - 1302
- 45 Robinson GW & Hennighausen L 1997 Inhibins and activins regulate mammary epithelial cell differentiation through mesenchymal-epithelial interactions. *Development* 124 2701 - 2708
- Rosendahl, A., D. Checchin, T.E. Fehniger et al. 2001. Activation of the TGF-beta/activin-Smad2 pathway during allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:60 - 68.
- 50 Russell CE, Hedger MP, Brauman JN, de Kretser DM, Phillips DJ (1999), Activin A regulates growth and acute phase proteins in the human liver cell line, HepG2., *Mol Cell Endocrinol* 148:129 - 36
- Sakai R, Shiozaki M, Tabuchi M & Eto Y. The measurement of activin/EDF in mouse serum: evidence for extragonadal production. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992 188 921 - 926.
- 55 Sakamoto Y, Shintani Y, Harada K, Abe M, Shitsukawa K & Saito S. Determination of free follistatin levels in sera of normal subjects and patients with various diseases. *European Journal of Endocrinology* 1996 135 345 - 351.
- 60 Schneider O, Nau R & Michel U. Comparative analysis of follistatin-, activin beta A- and activin beta B-mRNA steady-state levels in diverse porcine tissues by multiplex S1 nuclease analysis. *European Journal of Endocrinology* 2000 142 537 - 544.
- 65 Shao L, Frigon NL, Jr, Sehy DW, Yu AL, Lofgren J, Schwall R, Yu J (1992), Regulation of production of activin A in human marrow stromal cells and monocytes., *Exp Hematol* 20:1235 - 42

- Shao LE, Frigon NL, Jr, Yu A, Palyash J, Yu J (1998), Contrasting effects of inflammatory cytokines and glucocorticoids on the production of activin A in human marrow stromal cells and their implications., *Cytokine* 101:227 - 35
- 5 Stein and Cohen, 1988 (*Cancer Res* 48:2659 - 68)
- Takabe K, Wang LL, Leal AMO, MacConell LA, Wiater E, Tomiya T, Ohno A, Verma IM & Vale W 2003 Adenovirus-mediated overexpression of follistatin enlarges intact liver of adult rats. *Hepatology* 38 1107 - 1115
- 10 Thomsen G, Woolf T, Whitman M, Sokol S, Vaughan J, Vale W & Melton DA 1990 Activins are expressed early in *Xenopus* embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structures. *Cell* 63 485 - 493
- Tilbrook AJ, de Kretser DM, Dunshea FR, Klein R, Robertson DM, Clarke IJ et al. The testis is not the major source of circulating follistatin in the ram. *Journal of Endocrinology* 1996 149 55 - 63.
- 15 Tsuchida K, Nakatani M, Yamakawa N, Hashimoto O, Hasegawa Y & Sugino H 2004 Activin isoforms signal through type I receptor serine/threonine kinase ALK7. *Molecular and Cellular Endocrinology* 220 59 - 65
- 20 Ulevitch RJ, Tobias PS, 1999, Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 11:19 - 22
- Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W et al. (1986) Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 321 776 - 779.
- 25 Vale et al. (1990) In peptide growth factors and their receptors : Handbook of Experimental Physiology, Vol. 95, Eds. Sporn & Roberts, Springer-Verlag, Berlin pp211 - 248]
- van der Krol et al., 1988 (*Biotechniques* 6:958 - 976)
- 30 Van Baalen B, Odding E, Maas AIR, Ribbers GM, Bergen MP & Stam HJ 2003 Traumatic brain injury: classification of initial severity and determination of functional outcome. *Disability and Rehabilitation* 25 9 - 18
- Van Dijk W & Mackiewicz A 1995 Interleukin-6-type cytokine-induced changes in acute phase protein glycosylation. *Annals of the New York Academy of Science* 762 319 - 330
- 35 Vassalli A, Matzuk MM, Gardner HAR, Lee K-F & Jaenisch R 1994 Activin/inhibin  $\beta$ B subunit gene disruption leads to defects in eyelid development and female reproduction. *Genes and Development* 8 414 - 427
- 40 Vihko KK, Blauer M, Kujansuu E, Vilksa S, Albäck T, Tuimala R, Tuohimaa P & Punnonen R 1998 Activin B: detection by an immunoenzymometric assay in human serum during ovarian stimulation and late pregnancy. *Human Reproduction* 13 841 - 846.
- Vihko KK, Bläuer M, Puistola U & Tuohimaa P 2003 Activin B in patients with granulosa cell tumors: serum levels in comparison to inhibin. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 80 570 - 574
- 45 Wakatsuki M, Shintani Y, Abe M, Liu ZH, Shitsukawa K & Saito S. Immunoradiometric assay for follistatin: serum immunoreactive follistatin levels in normal adults and pregnant women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996 81 630 - 634.
- 50 Wilson, J.W., and X. Li. 1997. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Exp Allergy* 27:363 - 371.
- Woodruff TK, Sluss P, Wang E, Janssen I & Mersol-Barg MS 1997 Activin A and follistatin are dynamically regulated during human pregnancy. *Journal of Endocrinology* 152 167 - 174.
- 55 Xu J, McKeehan K, Matsuzaki K & McKeehan WL 1995 Inhibin antagonizes inhibition of liver cell growth by activin by a dominant-negative mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 270 6308 - 6313
- 60 Yu J, Shao LE, Frigon NL Jr, Lofgren J & Schwall R. Induced expression of the new cytokine, activin A, in human monocytes: inhibition by glucocorticoids and retinoic acid. *Immunology* 1996 88 368 - 374.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MONASH UNIVERSITY

5 <120> Método terapéutico

<130> 12508890/TDO

10 <150> 2003905461  
<151> 10-06-2003

<150> 2004902056  
<151> 16-04-2004

15 <150> 2004904834  
<151> 24-08-2004

<160> 8

20 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> cebador

25 <400> 1  
tactggcatc ttcaccacca 20

30 <210> 2  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> cebador

35 <400> 2  
ggctaacaga accaggacca 20

40 <210> 3  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> cebador

45 <400> 3  
gacacgcata gccagactca 20

<210> 4  
<211> 20  
<212> ADN

50 <213> cebador

<400> 4  
cttatgtatt cggccatcc 20

55 <210> 5  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> cebador

60 <400> 5  
gtgagcttcc cattcagctc 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> cebador

65

# ES 2 468 516 T3

	<400> 6	
	cttcttccca tctccatcca	20
5	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> cebador	
10	<400> 7	
	actgcccctc tccaagaaca	20
	<210> 8	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> cebador	
	<400> 8	
	cctagtgtgg gctaccagga	20



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Folistatina para uso en un método de regulación negativa de una respuesta inflamatoria en un mamífero, en donde la respuesta inflamatoria se produce en el contexto de trasplante de pulmón, síndrome de dificultad respiratoria aguda grave o asma.
- 10 2. Folistatina para uso en un método de tratamiento de una afección **caracterizado por** una respuesta inflamatoria aberrante, no deseada o, de otro modo, inapropiada en un mamífero, en donde la respuesta inflamatoria se produce en el contexto de trasplante de pulmón, síndrome de dificultad respiratoria aguda grave o asma.
- 15 3. Folistatina para uso en un método de regulación negativa de una respuesta inflamatoria en un mamífero mediante la regulación negativa de la actividad funcional de la activina A y / o de la activina B en dicho mamífero, en donde la respuesta inflamatoria se produce en el contexto inflamación aberrante, no deseada o, de otra manera, inadecuada, aguda de las vías respiratorias.
- 20 4. Folistatina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la respuesta inflamatoria es una respuesta a una cascada proinflamatoria, en donde dicha cascada de citocinas proinflamatorias **se caracteriza por** la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 y / o IL-6 y en donde la respuesta inflamatoria se regula por disminución a través de la regulación negativa de la actividad funcional de la activina A y / o de la activina B en dicho mamífero hasta un nivel funcionalmente ineficaz para inhibir o retardar la cascada proinflamatoria.
- 25 5. La folistatina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la folistatina es la isoforma 288 de folistatina o la isoforma 315 de folistatina.
- 30 6. La folistatina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el la respuesta inflamatoria es aguda.
7. La folistatina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el mamífero es un ser humano.

Figura 1A

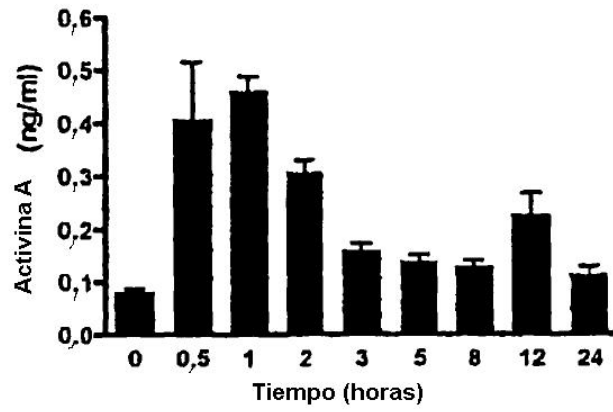


Figura 1B

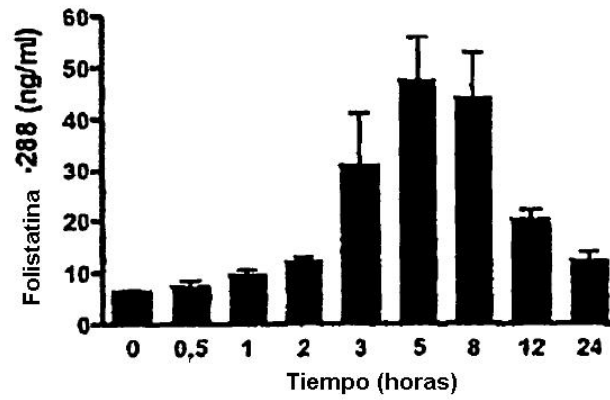


Figura 1C

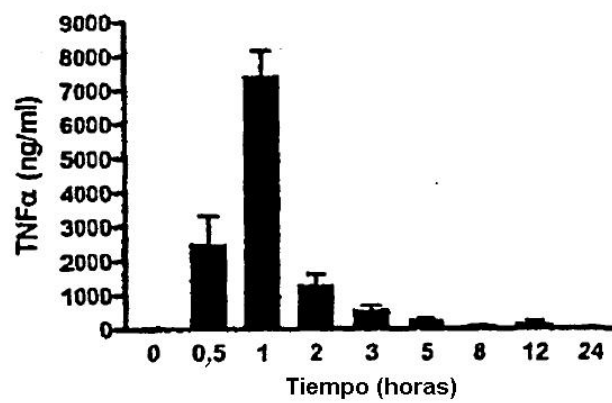


Figura 1D

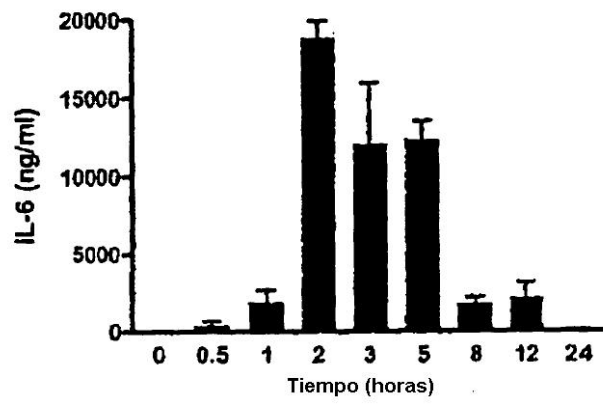


Figura 1E

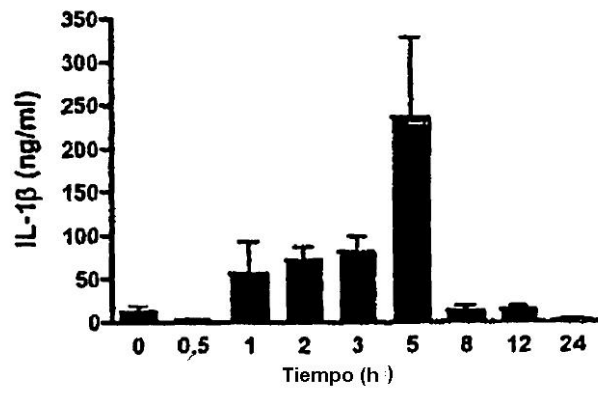


Figura 2A

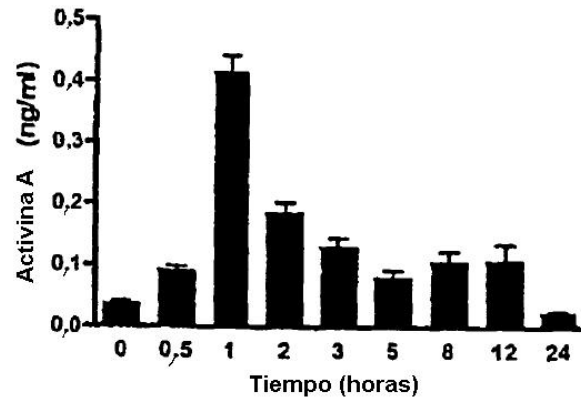


Figura 2B

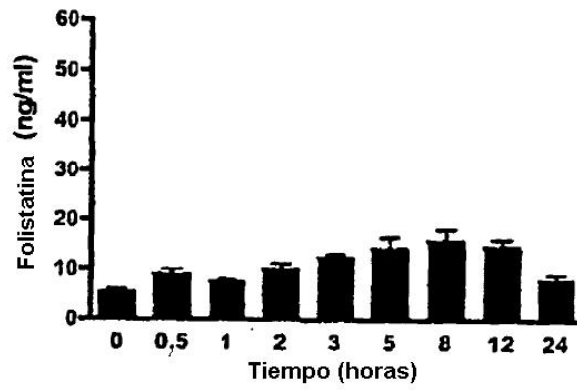


Figura 2C

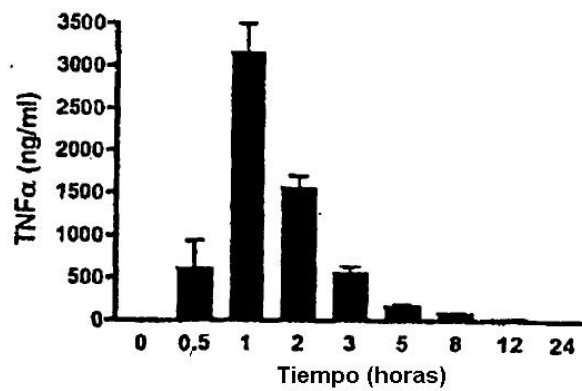


Figura 2D

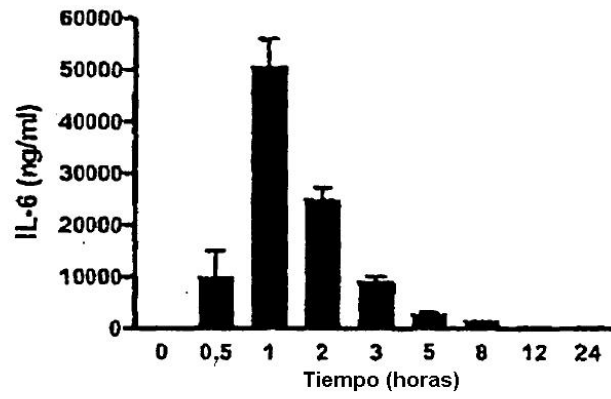


Figura 2E

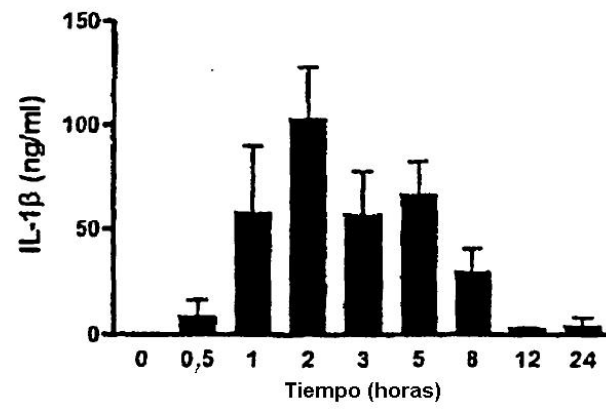


Figura 3

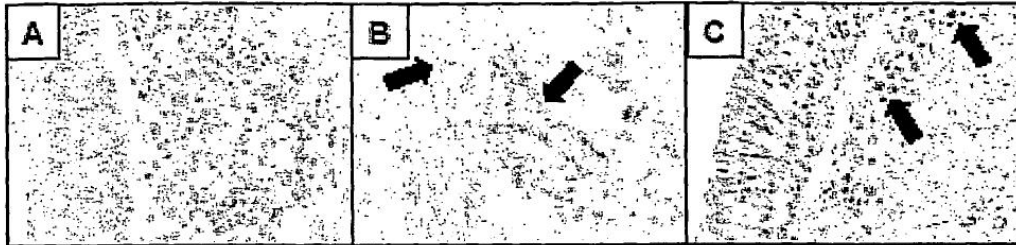
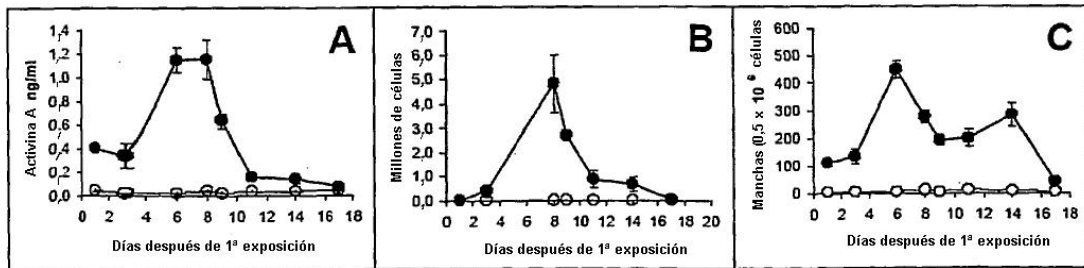


Figura 4

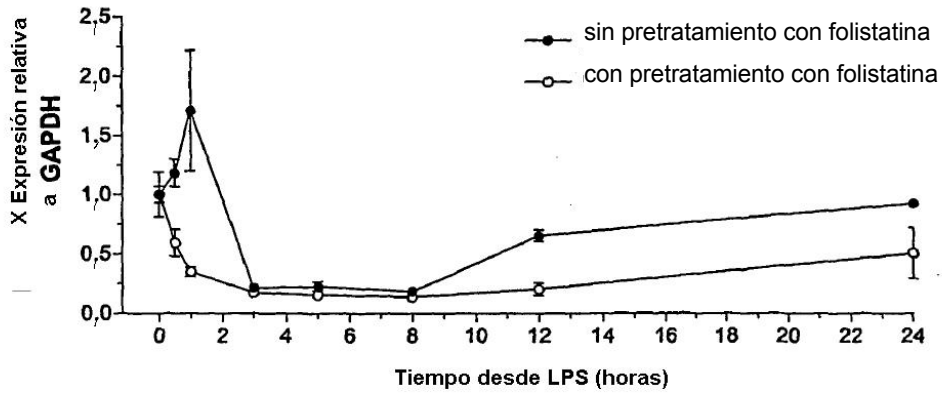


**Figura 5**



**Figura 6**

**Expresión de ARNm de activina  $\beta$ A en ratones tratados con LPS**



**Expresión de ARNm de activina  $\beta$ B en ratones tratados con LPS**

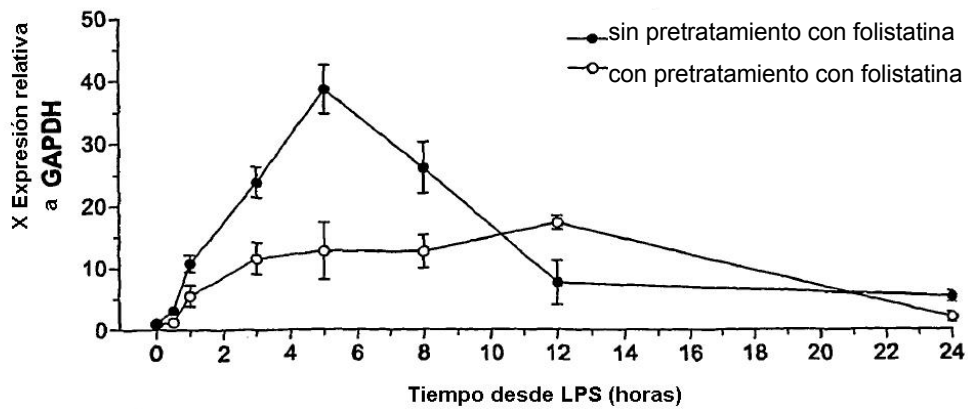
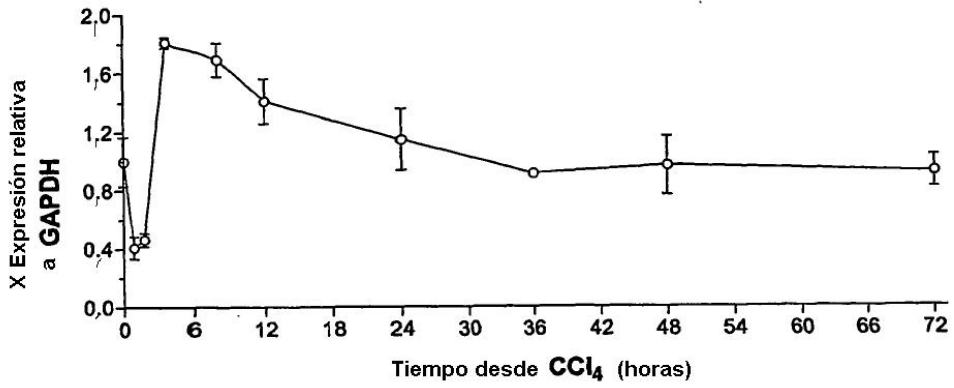


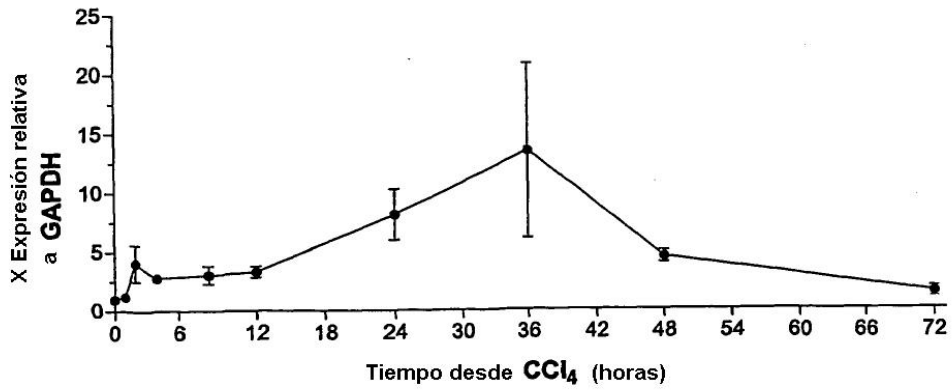


Figura 7

Expresión de ARNm de activina  $\beta$ A en ratones tratados con  $\text{CCl}_4$



Expresión de ARNm de activina  $\beta$ B en ratones tratados con  $\text{CCl}_4$



**Figura 8**

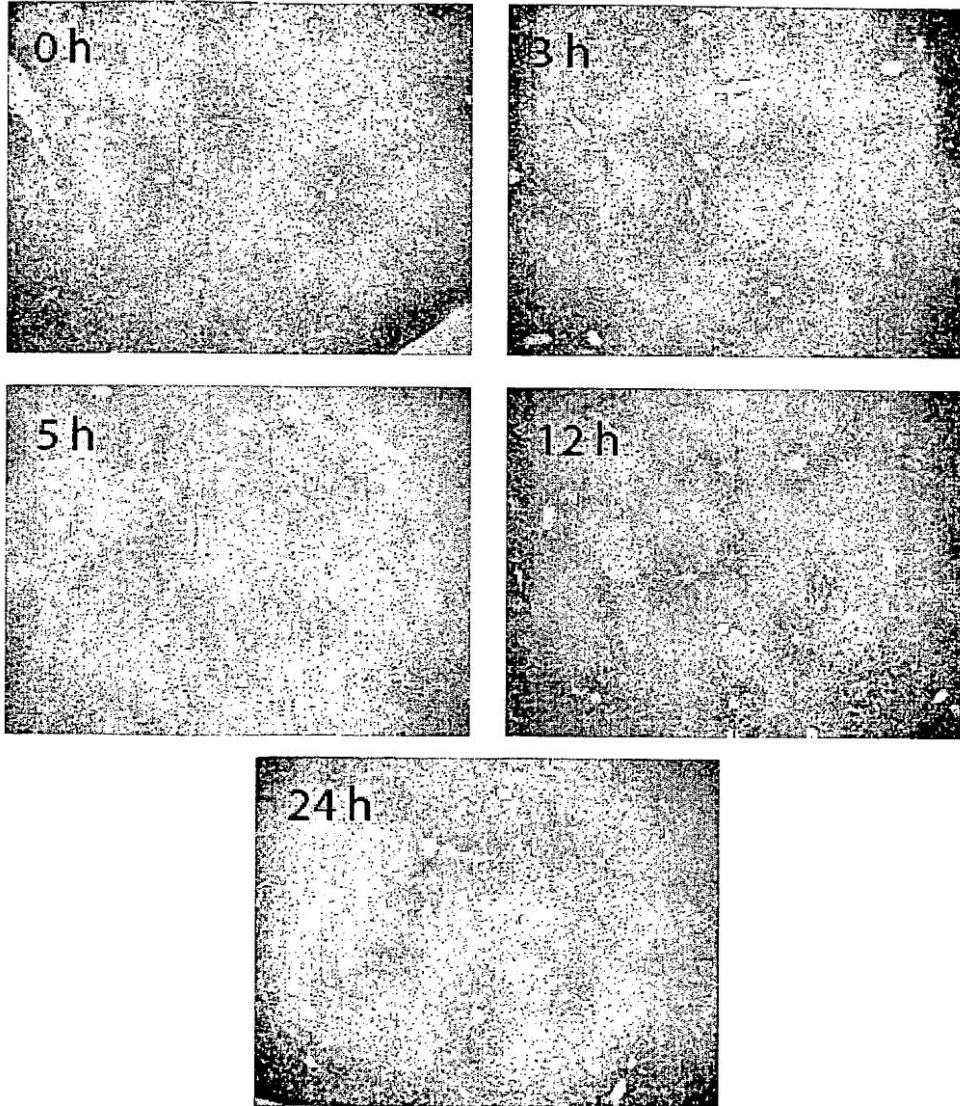


Figura 9

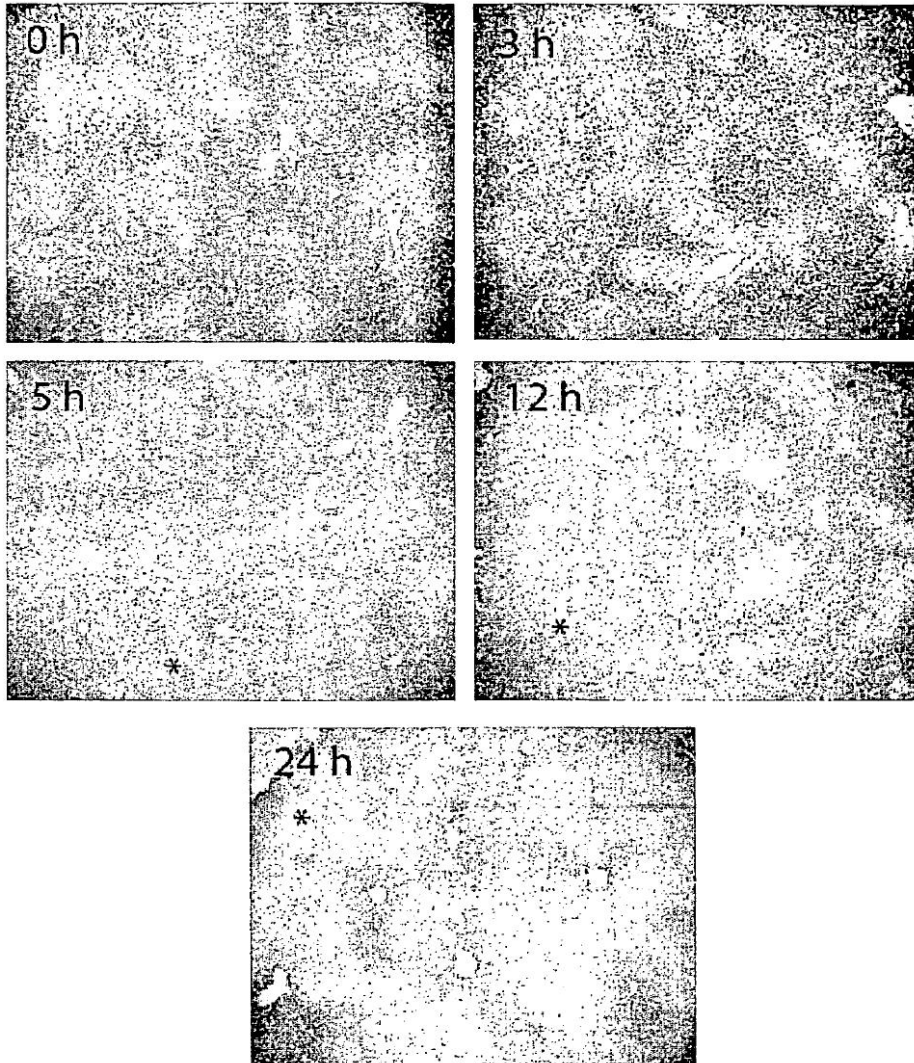


Figura 10

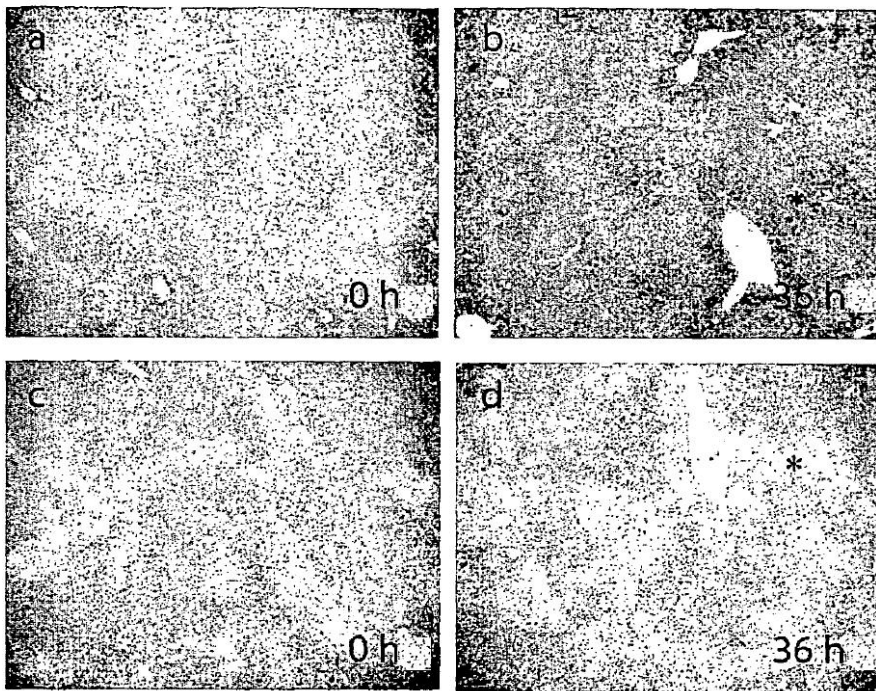
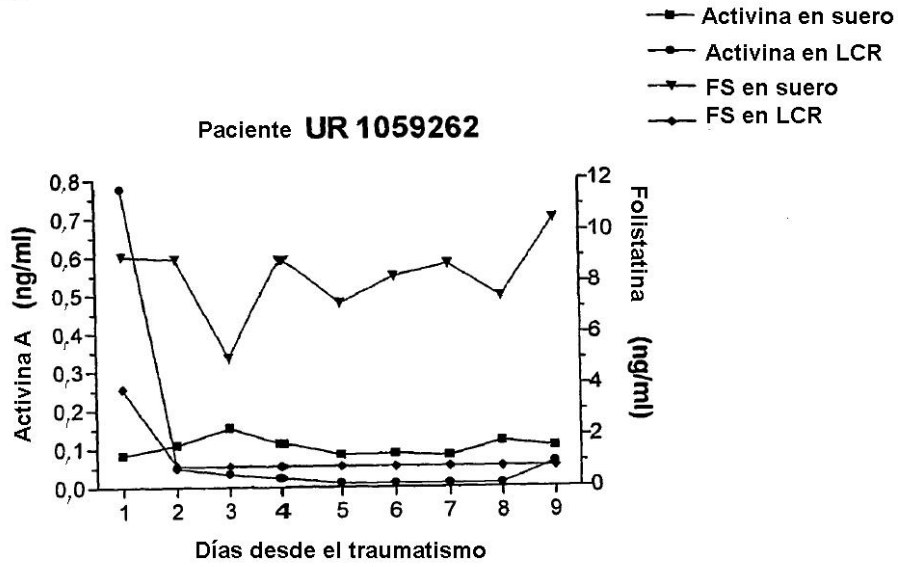


Figura 11

(A)



(B)

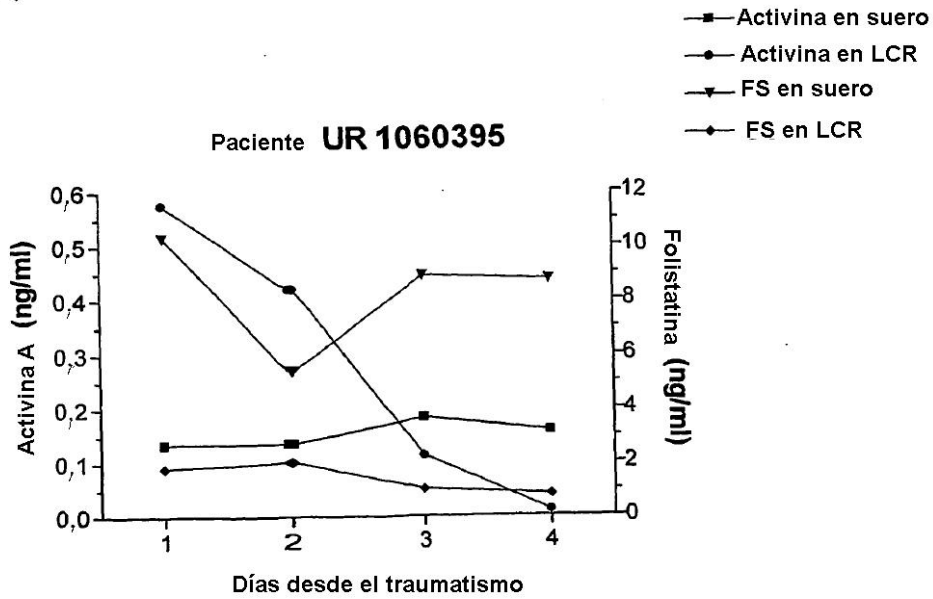
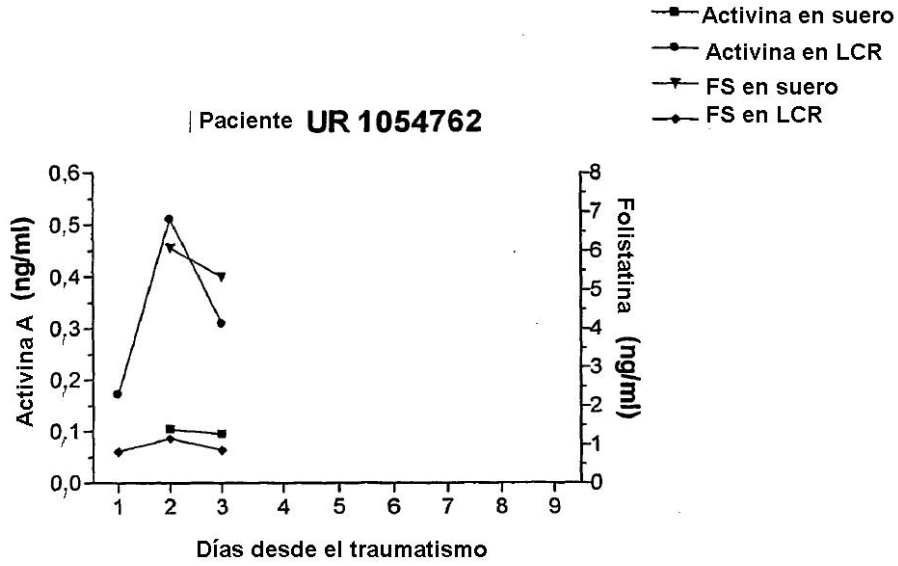


Figura 11 (cont'd)

(C)



(D)

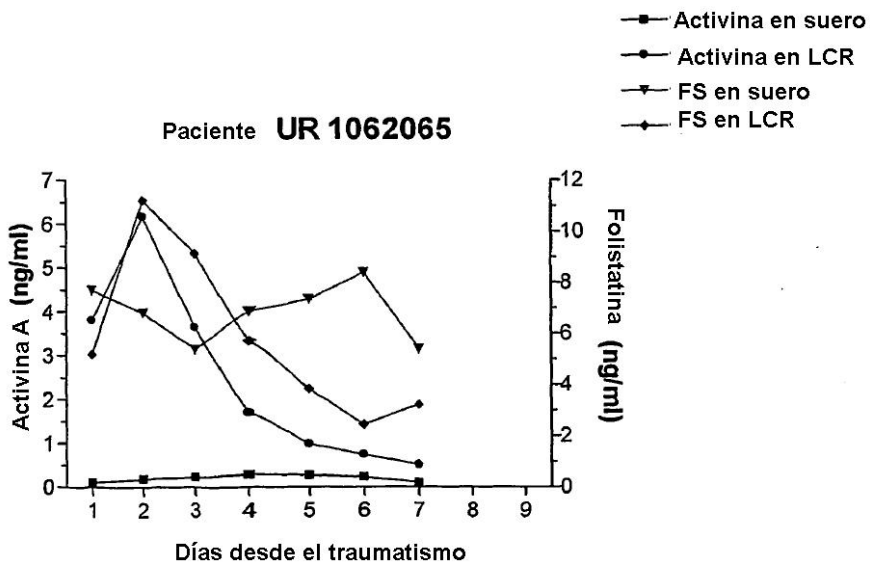


Figura 11 (cont )

(E)

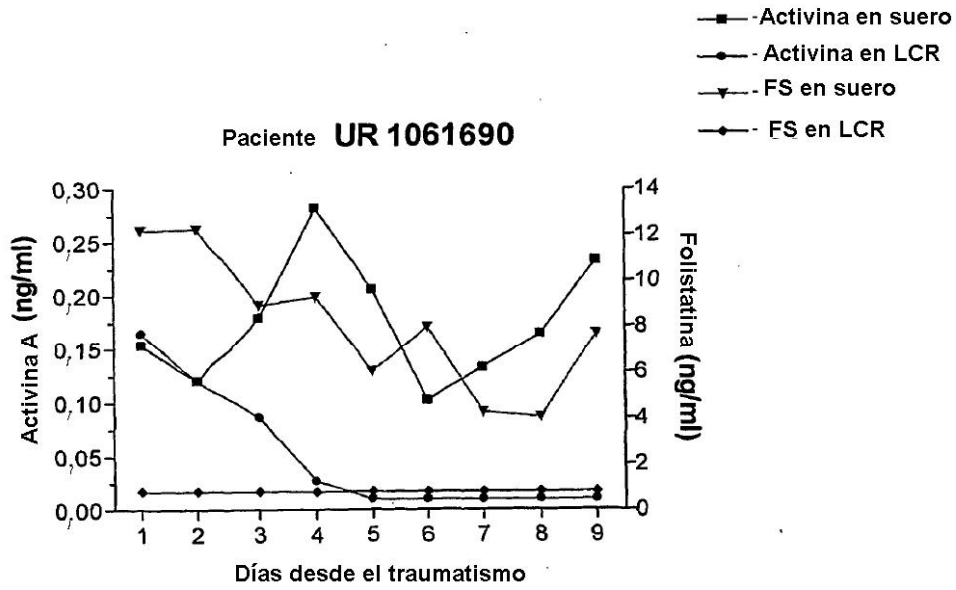
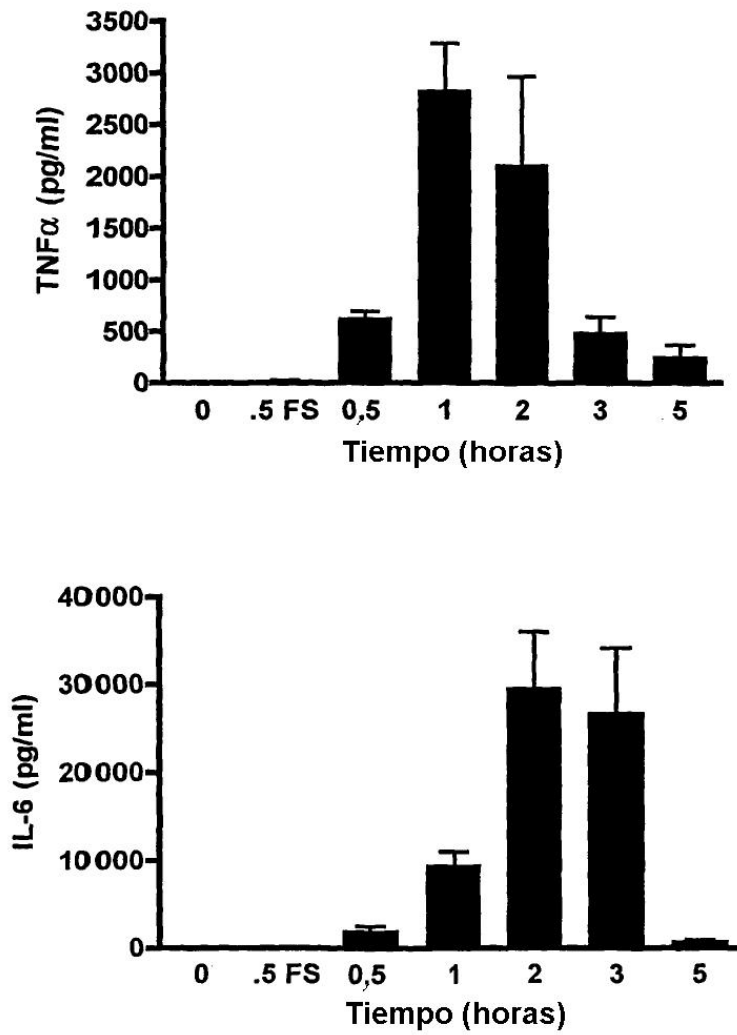


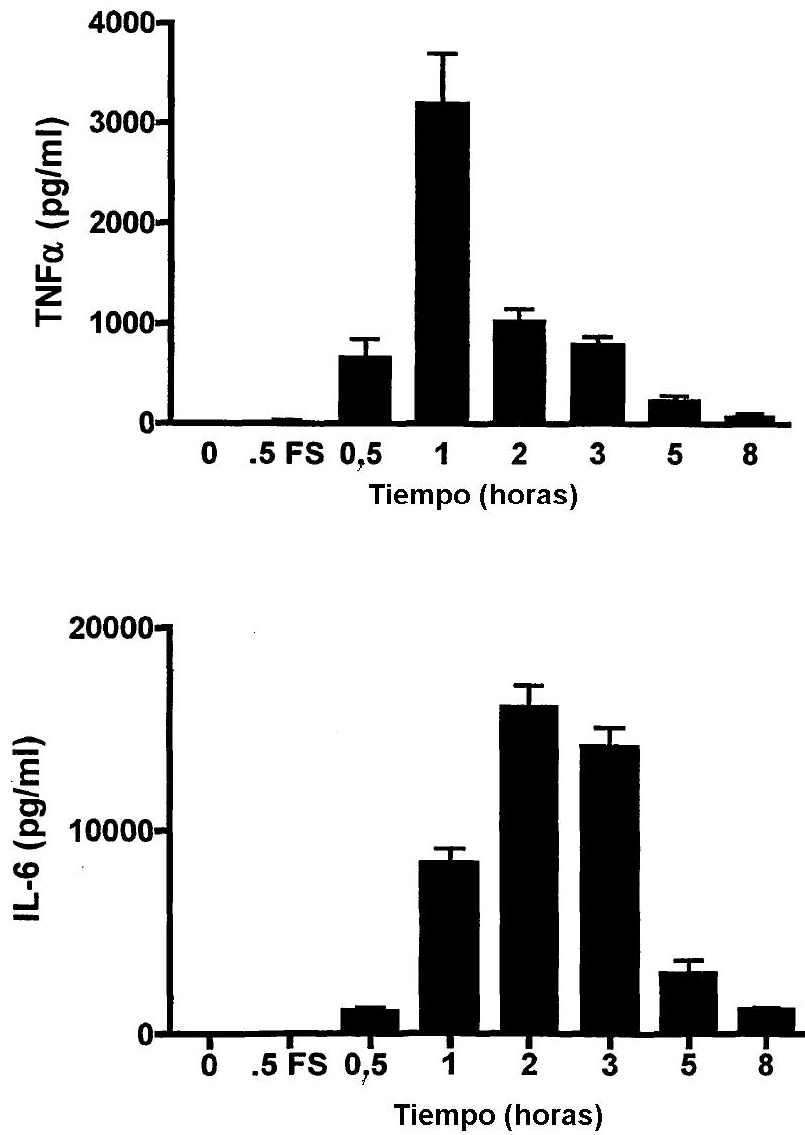
Figura 12



.5FS representa el nivel de TNFα o IL-6 en ratones 30 minutos después de la administración de folistatina sola (sin LPS)



Figura 13



.5FS representa el nivel de TNFα o IL-6 en ratones 30 minutos después de la administración de folistatina sola (sin LPS)

Figura 14

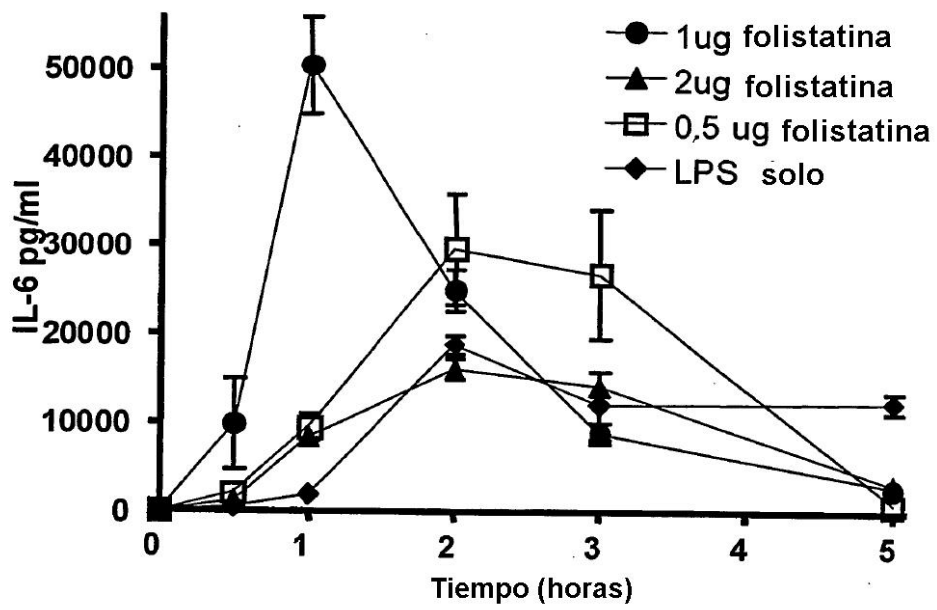


Figura 15(A)

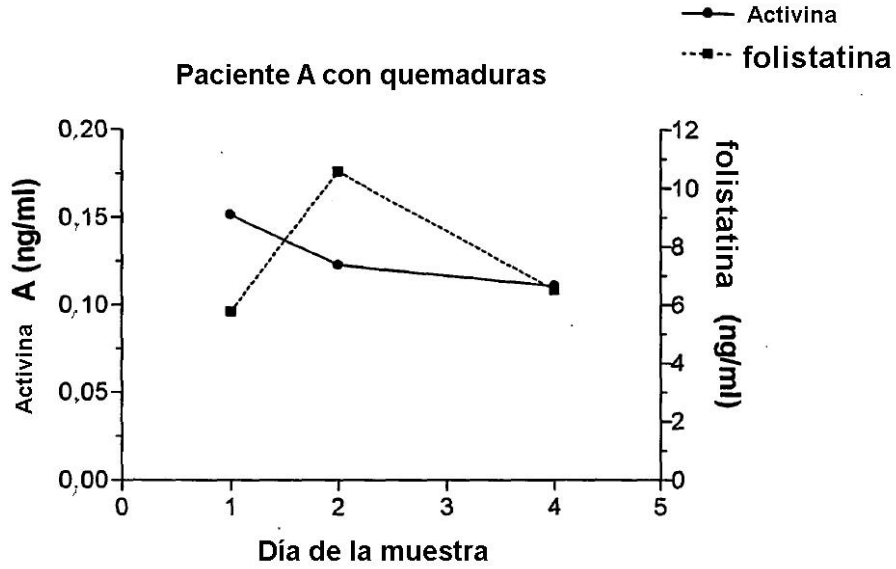


Figura 15(B)

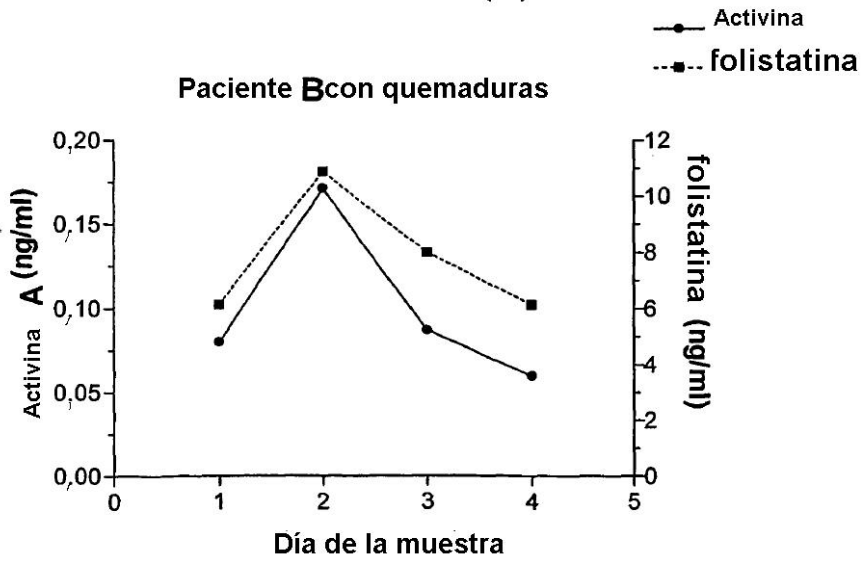


Figura 15(C)

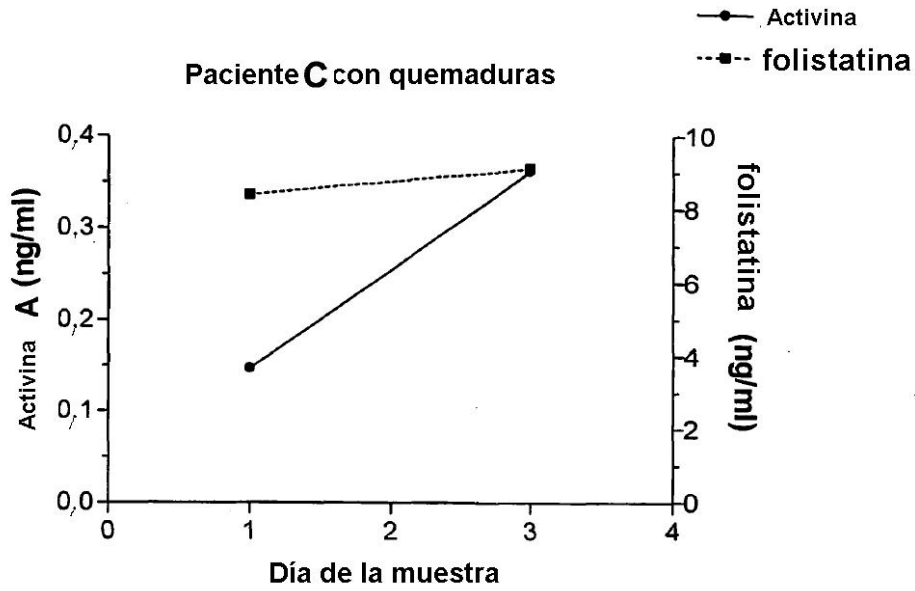


Figura 15(D)

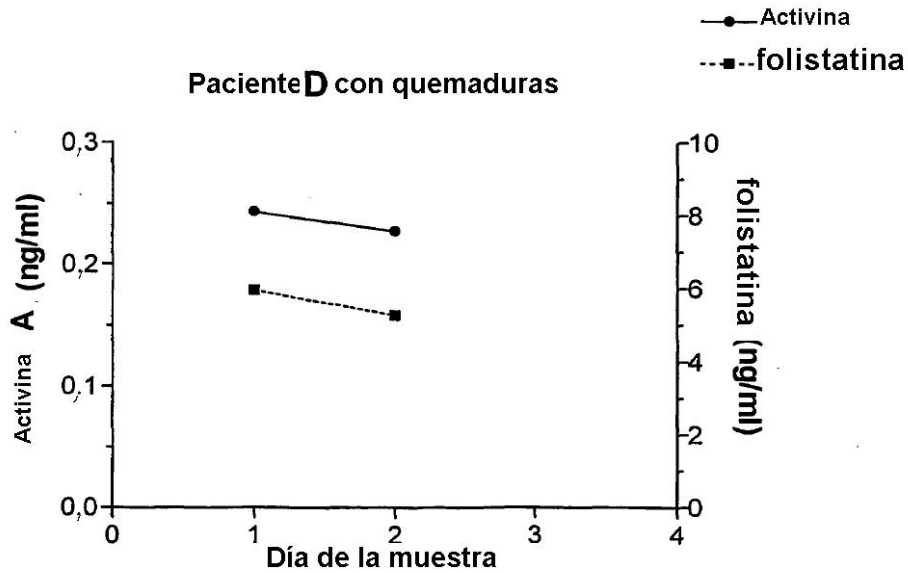
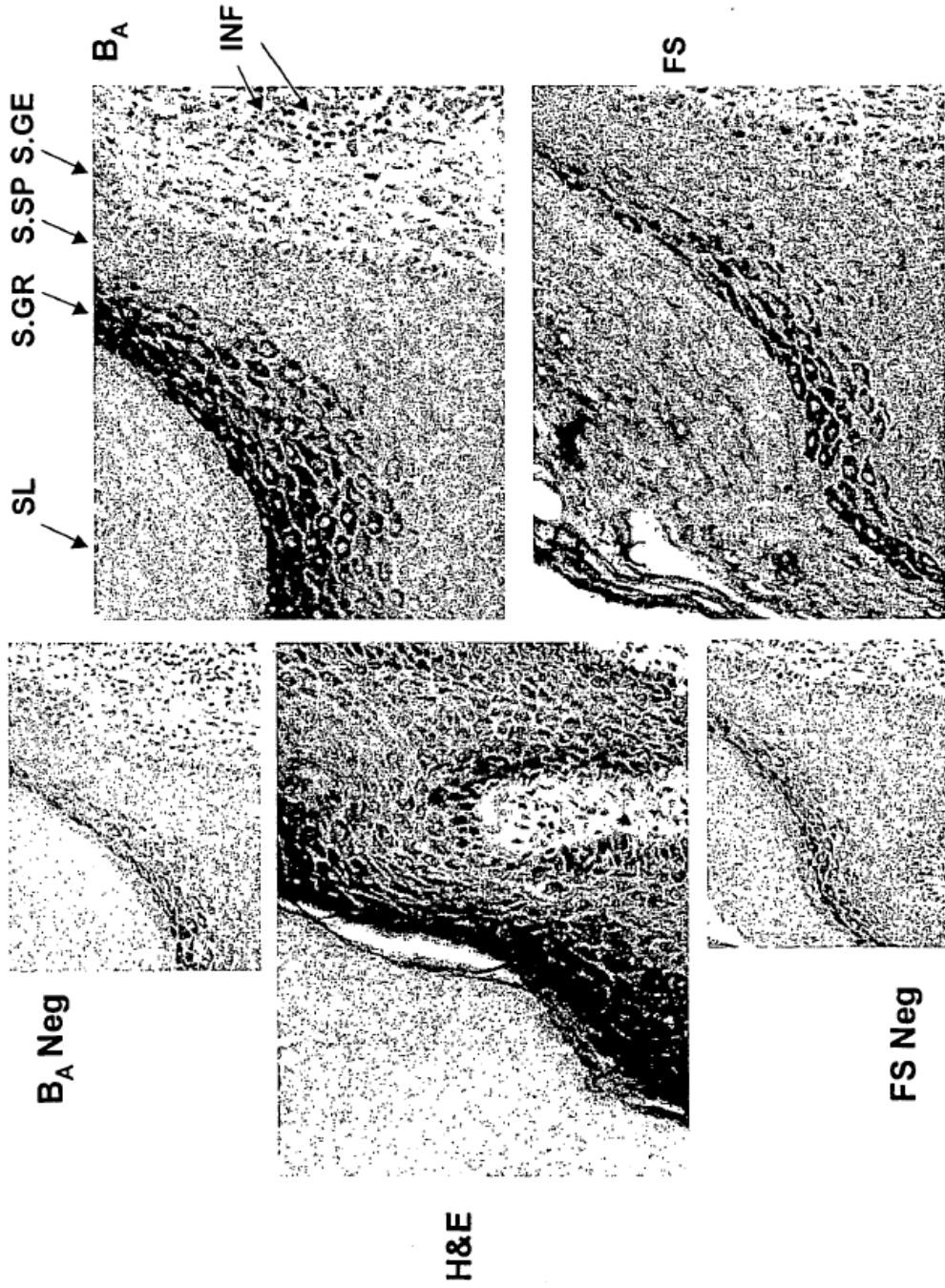


Figura 16



**Figura 17**

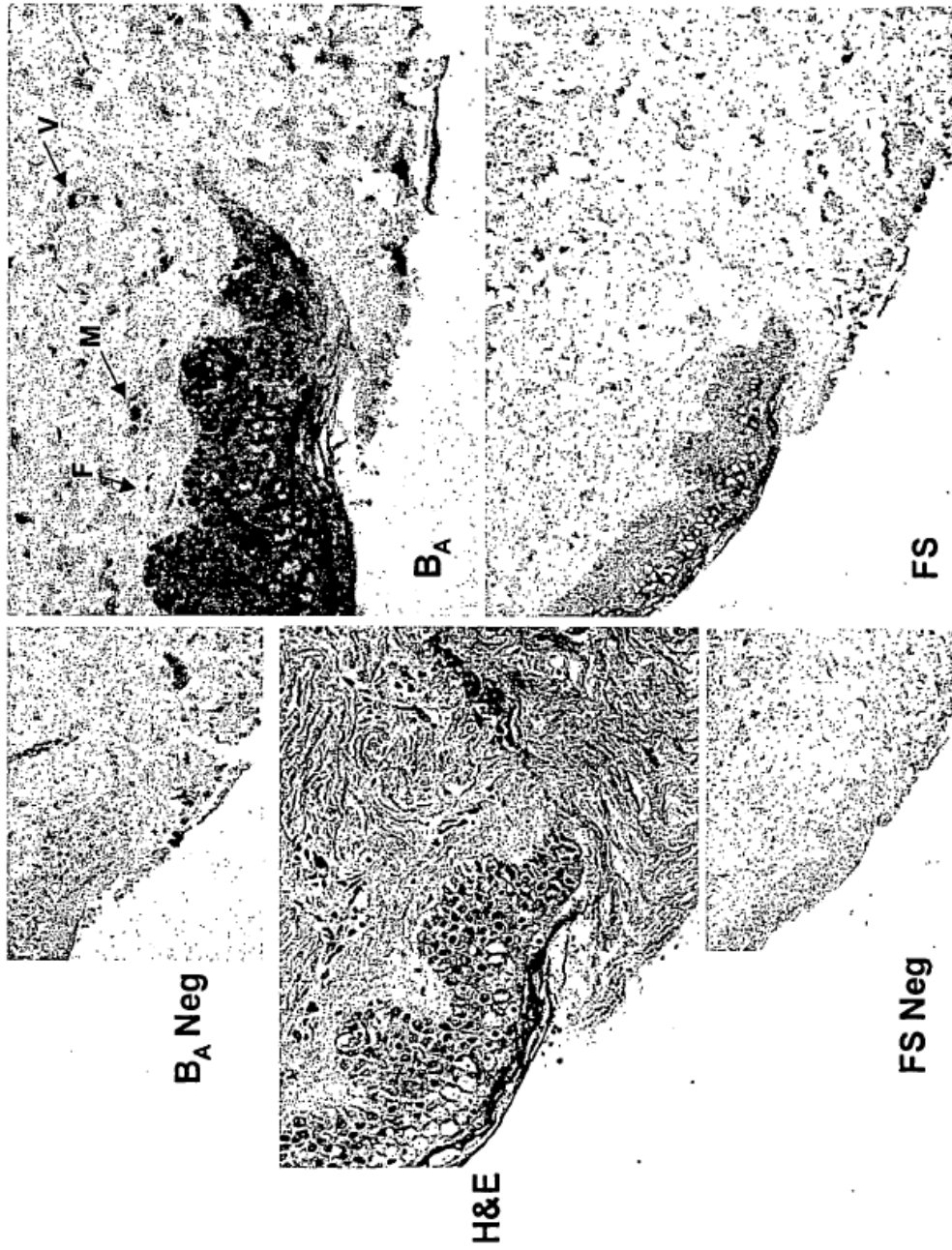


Figura 18

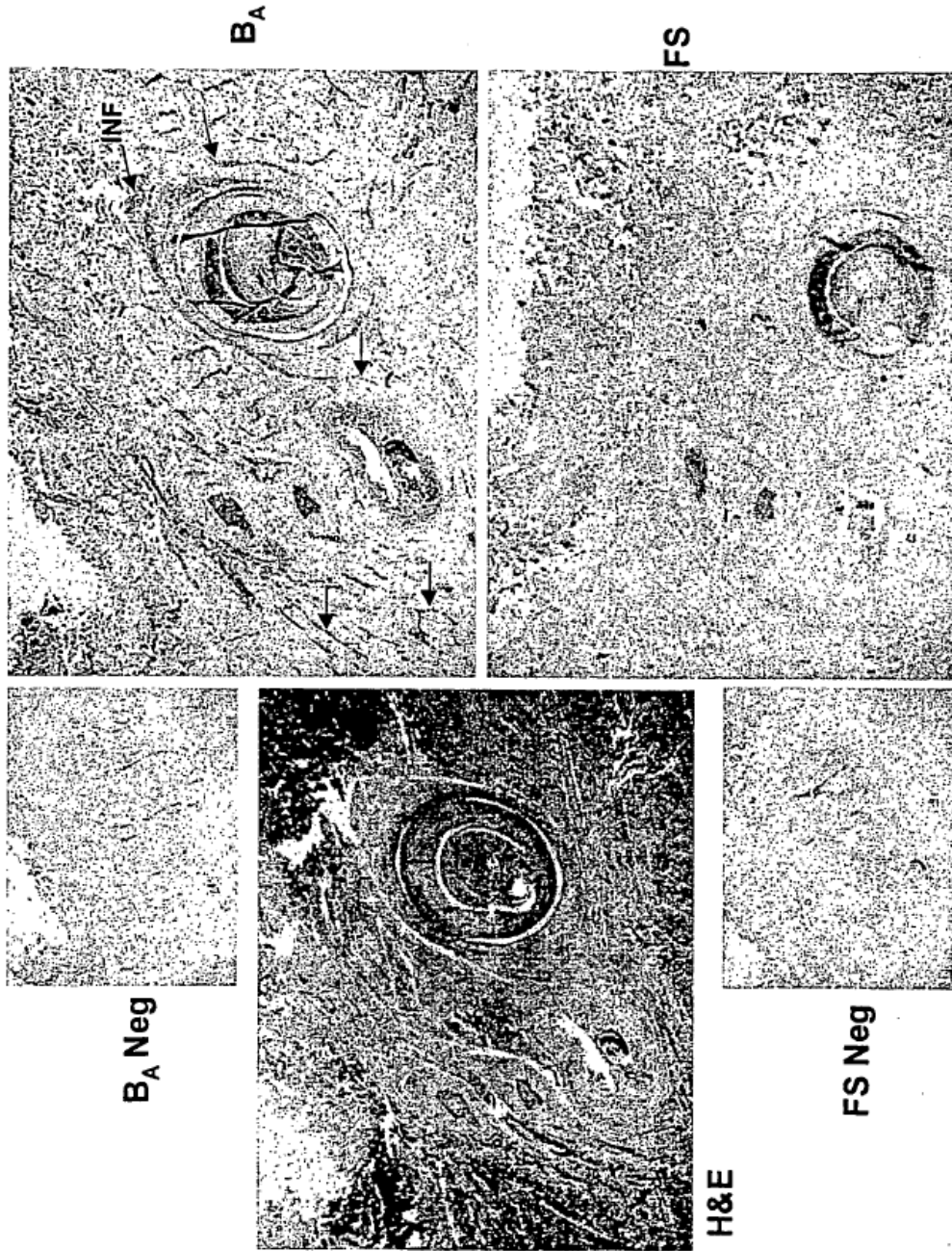


Figura 19

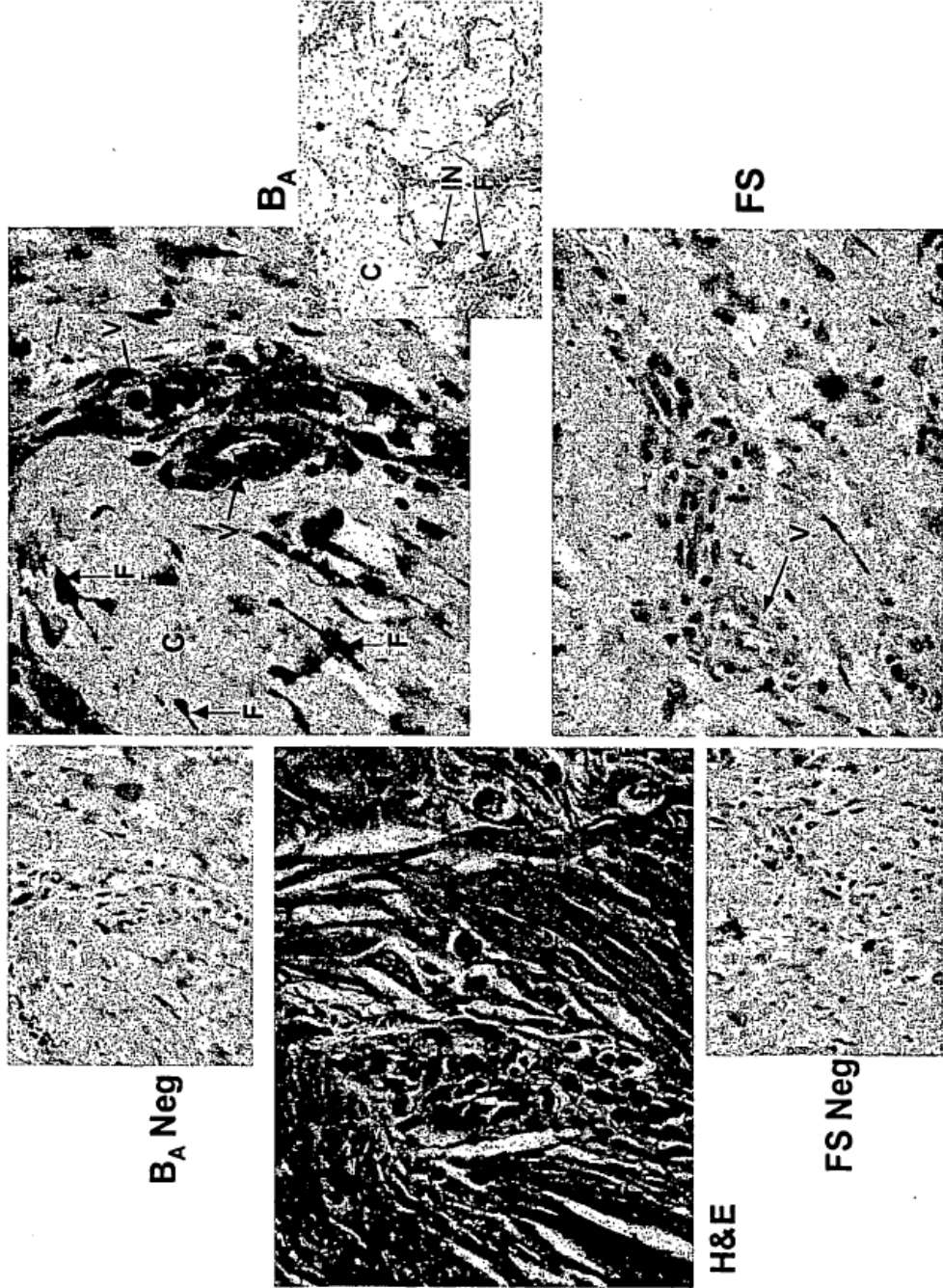




Figura 20

