

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 725**

51 Int. Cl.:

C12N 9/50 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2005 E 05812977 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 1809742**

54 Título: **Métodos para tratar estados asociados con la acumulación excesiva de matriz celular**

30 Prioridad:

27.09.2004 US 952361

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

20.10.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
615 ARAPEEN DRIVE, SUITE 310
SALT LAKE CITY, UT 84108, US**

72 Inventor/es:

**NOBLE, NANCY A. y
BORDER, WAYNE A.**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 548 725 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para tratar estados asociados con la acumulación excesiva de matriz celular

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 Esta invención se refiere a una combinación de agentes que inhiben el TGF β en el tratamiento de un estado asociado con una acumulación excesiva de matriz extracelular en tejidos u órganos o en una herida.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 En enfermedades tales como la fibrosis del riñón o pulmón existe una deposición y acumulación excesiva de matriz extracelular (ECM). Aunque el factor transformante del crecimiento beta (TGF β) de citoquina regula la deposición de matriz extracelular para la reparación de tejidos, una sobreproducción de TGF β es claramente la base de la fibrosis tisular provocada por una deposición excesiva de matriz extracelular que provoca la enfermedad (Border y Ruoslahti, J. Clin. Invest. 90:1-7 (1992)). La acción fibrinogénica del TGF β resulta de la estimulación simultánea de la síntesis de proteínas de matriz (Border y col., Kidney Int 37:689-695 (1990), la inhibición de la degradación y recambio de matriz y el incremento de las interacciones célula-matriz a través de la modulación de los receptores de la integrina que facilitan la formación de ECM. Ya se ha demostrado
- 15 una sobreproducción de TGF β en casos de glomerulonefritis (Okuda y col., J. Clin. Invest. 86:453-462 (1990)), nefropatía diabética y lesión glomerular en hipertensión, así como en afecciones fibróticas relacionadas de pulmón, hígado, corazón, pared arterial, piel, cerebro, articulaciones y médula ósea (Border y Noble, N. Eng. J. Med. 331:1286-1292 (1994)). Además del riñón, se ha demostrado que el bloqueo de la acción del TGF β con un agente tal como un anticuerpo o el proteoglicano decorina es terapéutico en caso de
- 20 fibrosis y cicatrización de piel, pulmón, sistema nervioso central y pared arterial (Border y Noble, Kidney Int. 51:1388-1396 (1997)).

- También se ha demostrado una supresión de la producción de ECM y una prevención de la acumulación excesiva de matriz mesangial en glomérulos de ratas glomerulonefriticas mediante la administración intravenosa de anticuerpos neutralizantes específicos para el TGF β (Border y col., Nature 346:371-374
- 25 (1990)) o la administración de decorina purificada, un proteoglicano (Border y col., Nature 360:361-364 (1992)) y mediante la introducción de decorina codificadora de ácido nucleico, un agente inhibidor del TGF β , en un modelo de rata de glomerulonefritis mesangial aguda (Isaka y col., Nature Med. 2:418-423 (1996)). Además se ha demostrado que la inhibición de la actividad del TGF β , utilizando por ejemplo anticuerpos anti-TGF β , interrumpe la sobreproducción de TGF β (Sharma y col., Diabetes 45:522-530 (1996)).

- 30 La cicatrización cutánea después de una lesión cutánea resulta de una acumulación excesiva de tejido fibroso formado por colágeno, fibronectina y proteoglicanos en una herida. Dado que la matriz extracelular fibrosa carece de elasticidad, el tejido cicatrizado puede afectar a la función tisular esencial y provocar un aspecto estético no deseable. Se cree que el TGF β induce la deposición de matriz fibrosa en la herida (Shah y col., Lancet 339:213-214 (1992)).

- 35 Una explicación de la sobreexpresión persistente del TGF β en la enfermedad renal fibrótica progresiva es que episodios reiterados o múltiples de lesión tisular, tal como ocurre en caso de enfermedades crónicas como hipertensión, diabetes o enfermedad por inmunocomplejos, conducen a una sobreproducción continua del TGF β y matriz extracelular que resulta en una fibrosis tisular (véase Border y Noble, N. Eng. J. Med. 331:1286-1292 (1994)). Otra explicación posible de la sobreexpresión persistente del TGF β es la presencia de una interconexión biológicamente compleja entre el TGF β y el sistema de renina-Angiotensina (RAS) en el
- 40 riñón como parte de un sistema de emergencia que responde a la amenaza de lesión tisular tal como se describe adicionalmente aquí.

- La renina es una aspartil proteinasa sintetizada por células yuxtglomerulares del riñón y células mesangiales en humanos y ratas (Chansel y col., Am. J. Physiol. 252:F32-F38 (1987) y Dzau y Kreisberg, J. Cardiovasc. Pharmacol. 8(Suppl 10):S6-S10(1986)). La renina tiene un papel clave en la regulación de la presión sanguínea y el balance de la salinidad. Su fuente principal en humanos es el riñón, donde se produce inicialmente como preprorenina. Después del procesamiento de péptidos señal y la glicosilación se produce una secreción de prorenina y su forma enzimáticamente activa, renina madura. La enzima activa dispara una cascada proteolítica mediante escisión de angiotensinógeno para generar Angiotensina I, que se convierte a su vez en la hormona vasoactiva Angiotensina II mediante la enzima convertidora de Angiotensina ("ACE").
- 50

- La secuencia del gen de la renina humana es conocido (GenBank entrada M26901). La renina humana recombinante se ha sintetizado y expresado en diversos sistemas de expresión (Sielecki y col., Science 243:1346-1351 (1988), Mathews y col., Protein Expression and Purification 7:81-91 (1996)). También se conocen inhibidores del sitio enzimático de la renina (Rahuel y col., J. Struct. Biol. 107:227-236 (1991); Badasso y col., J. Mol. Biol. 223:447-453 (1992); y Dhanaraj y col., Nature 357:466-472 (1992)) incluyendo un
- 55

inhibidor de la renina oralmente activo en primates, *Ro* 42-5892 (Fischli y col., *Hypertension* 18:22-31(1991)). Además, se han identificado proteínas de unión a renina y a un receptor de renina de superficie celular en células mesangiales humanas (Campbell y Valentijn, *J. Hypertens.* 12:879-890 (1994), Nguyen y col., *Kidney Internat.* 50:1897-1903 (1996) y Sealey y col., *Amer. J. Hyper.* 9:491-502 (1996)).

- 5 El sistema renina-angiotensina (RAS) es una red endocrina sistémica prototípica cuyas acciones en el riñón y las glándulas suprarrenales regulan la presión sanguínea, el volumen intravascular y el equilibrio electrolítico. En cambio, el TGF β se considera una citoquina prototípica, una molécula de señalización de péptidos cuyas múltiples acciones en las células están mediadas de forma local o paracrina. Sin embargo, datos recientes indican que existe un RAS intacto en muchos tejidos cuyas acciones son totalmente paracrinas y el TGF β
- 10 tiene efectos sistémicos (endocrinos) de amplia gama. Además, el RAS y el TGF β actúan en diversos puntos regulando mutuamente sus acciones.

En una respuesta sistémica a una lesión tal como una herida, el RAS genera rápidamente All, que actúa por vasoconstricción para mantener la presión sanguínea y después estimula la secreción de aldosterona, lo que conduce a un aumento del volumen intravascular. En la herida, las plaquetas en degranulación liberan rápidamente TGF β , que provoca una serie de efectos, incluyendo: 1) autoinducción de la producción de TGF β por células locales para amplificar los efectos biológicos; 2) quimioatracción de monocitos/macrófagos que desbridan y esterilizan la herida y fibroblastos que comienzan la síntesis de ECM; 3) provocación de una deposición de nueva ECM estimulando al mismo tiempo la síntesis de nueva ECM, inhibiendo las proteasas que degradan la matriz y modulando la cantidad de receptores de integrina para facilitar la adhesión celular a la matriz recién formada; 4) supresión de los efectos proinflamatorios de la interleuquina-1 y el factor de necrosis tumoral; 5) regulación de la acción de factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento fibroblástico, de modo que la proliferación celular y la angiogénesis se coordinan con deposición de matriz; y 6) finalización del proceso cuando la reparación está completa y la herida está cerrada (Border y Noble, *Scientific Amer. Sci. & Med.* 2:68-77 (1995)).

- 25 Las interacciones entre el RAS y el TGF β se producen tanto a nivel sistémico como a nivel molecular. Se ha comprobado que la acción del TGF β para provocar la deposición de ECM en una herida en cicatrización es la misma acción que hace del TGF β una potente citoquina fibrogénica (Border y Noble, *New Engl. J. Med.* 331:1286-1292 (1994); y Border y Ruoslahti, *J. Clin. Invest.* 90:107 (1992)). De hecho, el fallo en la conclusión de la producción de TGF β es lo que distingue una reparación tisular normal de una enfermedad fibrótica. El RAS y el TGF β coregulan mutuamente sus expresiones. Por consiguiente, los dos sistemas pueden permanecer activos durante un largo tiempo después de haber finalizado una respuesta de emergencia, y esto puede conducir a una fibrosis progresiva. El riñón es particularmente susceptible a la sobreexpresión de TGF β . La interrelación del RAS y el TGF β puede explicar la susceptibilidad del riñón a la sobreexpresión de TGF β y por qué tanto la supresión farmacológica del RAS o la inhibición del TGF β son terapéuticas en caso de enfermedades fibróticas del riñón (Noble y Border, *Sem. Nephrol.*, *supra* y Border y Noble, *Kidney Int.* 51:1388-1396 (1997)).

Ya es sabido que la activación del RAS y la generación de la Angiotensina II (All) representan un papel en la patogénesis de la hipertensión y la fibrosis renal y cardíaca. Se ha comprobado que el TGF β es una potente citoquina fibrogénica, que actúa para, simultáneamente, estimular la síntesis de ECM, inhibir la acción de proteasas que degradan la ECM y aumentar la expresión de integrinas de superficie celular que interactúan con componentes de matriz. Debido a estos efectos, el TGF β provoca rápidamente la deposición de ECM en exceso. La infusión de All estimula fuertemente la producción y activación de TGF β en el riñón (Kagami y col., *J. Clin. Invest.* 93:2431-2437 (1994)). La Angiotensina II también aumenta la producción de TGF β e incrementa la activación cuando se añade a células cultivadas vasculares de músculo liso (Gibbons y col., *J. Clin. Invest.* 90:456-461 (1992)) y este incremento es independiente de la presión (Kagami y col., *supra*). La All también aumenta los receptores de TGF β , incluso en presencia de TGF β añadido de forma exógena, que normalmente reduce sus propios receptores, lo que conduce a un aumento de la señalización de TGF β y un incremento de la producción de fibronectina (Kanai y col., *J. Am. Soc. Nephrol.* 8:518A (1997)). El bloqueo de la All reduce la sobreexpresión del TGF β en el riñón y el corazón, y se cree que el TGF β media en la fibrosis renal y cardíaca asociada con la activación del RAS (Noble y Border, *Sem. Nephrol.* 17(5):455-466 (1997)), Peters y col., *Kidney International* 54 (1998)). El bloqueo de la All utilizando inhibidores de la ACE ralentiza la progresión de la enfermedad fibrótica renal (véase, por ejemplo, Anderson y col., *J. Clin. Invest.* 76:612-619 (1985) y Noble y Border, *Sem. Nephrol.* 17(5):455-466 (1997)). Lo que no está claro es si el bloqueo de la angiotensina reduce la fibrosis únicamente mediante el control de la hipertensión glomerular y en consecuencia la lesión glomerular, o si están actuando tanto mecanismos independientes de la presión como mecanismos dependientes de la presión. Aunque se ha comprobado que los inhibidores de la ACE y los antagonistas de receptor de All ralentizan el progreso de enfermedades fibróticas, no detienen la enfermedad y los niveles de TGF β se mantienen un tanto elevados (Peters y col., *supra*).

- 60 Por consiguiente, el RAS y el TGF β pueden ser considerados como potentes moléculas efectoras que interactúan preservando la homeostasis sistémica y tisular. La respuesta a una emergencia tal como una

lesión tisular es la activación del RAS y del TGF β . La activación continua puede resultar en una hipertensión crónica y una fibrosis tisular progresiva, que conduce a un fallo del órgano. Debido a la interacción entre el RAS y el TGF β y los efectos de esta interacción en la homeostasis tisular, el bloqueo del RAS puede no ser del todo óptimo para prevenir o tratar enfermedades fibróticas progresivas tales como la nefropatía diabética.

- 5 Algunos componentes del sistema renina-angiotensina estimulan adicionalmente la producción de TGF β y del inhibidor del activador de plasminógeno, lo que conduce a una rápida acumulación de ECM. El efecto protector de la inhibición del sistema de renina-angiotensina en enfermedades renales experimentales y humanas está en correlación con la supresión de la producción de TGF β (Noble y Border, *Sem. Nephrol.*, *supra*; y Peters y col., *supra*).
- 10 Se ha demostrado que la molécula de renina escinde enzimáticamente el angiotensinógeno en Angiotensina I. Después la enzima convertidora de Angiotensina ("ACE") convierte la Angiotensina I en Angiotensina II, que actúa como un metabolito activo e induce la producción de TGF β . La Angiotensina II es un importante modulador de la presión sanguínea sistémica. Se ha pensado que si se disminuye la hipertensión mediante el bloqueo de los efectos vasoconstrictores de la AII, se reduce la enfermedad fibrótica.
- 15 En el endotelio glomerular se ha demostrado que la activación del RAS y el TGF β representan un papel en la patogénesis de la glomerulonefritis y la lesión en hipertensión. También se ha demostrado que la reducción del volumen (agua) y la restricción de potasio estimulan la producción tanto de renina como de TGF β en el aparato yuxtglomerular (JGA) del riñón (Horikoshi y col., *J. Clin. Invest.* 88:2117-2122 (1992) y Ray y col., *Kidney Int.* 44:1006-1013 (1993)). Además se ha demostrado que el bloqueo de la angiotensina aumenta la producción de renina. También se ha demostrado que el TGF β estimula la liberación de renina de rebanadas corticales de riñón y células JG cultivadas (Antonipillai y col., *Am. J. Physiol.* 265:F537-F541 (1993); Ray y col., *Contrib. Nephrol.* 118:238-248 (1996) y Veniant y col., *J. Clin. Invest.* 98:1996-19970 (1996)), lo que sugiere que la renina y el TGF β se coregulan. Otras interacciones entre el RAS y el TGF β consisten en que la AII induce la producción de TGF β en células cultivadas e *in vivo* (Kagami y col., *supra*) y en que la AII regula la expresión de receptores de TGF β (Kanai y col., 1977, *supra*). Por tanto, es probable que los efectos fibrogénicos que han sido atribuidos a la AII realmente estén mediados por el TGF β .

- Otra interacción entre el RAS y el TGF β está relacionada con la producción de aldosterona. La sobreproducción de aldosterona se ha vinculado con la hipertensión y la glomeruloesclerosis. La AII estimula la producción y liberación de aldosterona desde la glándula suprarrenal. En cambio, el TGF β suprime la producción de aldosterona y bloquea la capacidad de la AII para estimular la aldosterona, reduciendo la cantidad de receptores de AII expresados en la glándula suprarrenal (Gupta y col., *Endocrinol.* 131:631-636 (1992)), y bloquea los efectos de la aldosterona en la reabsorción de sodio en células cultivadas de los conductos colectores del riñón (Husted y col., *Am. J. Physiol. Renal, Fluid Electrolyte Physiol.* 267:F767-F775 (1994)). La aldosterona puede tener efectos fibrogénicos independientes de la AII y puede aumentar la expresión de TGF β . El mecanismo de los efectos patológicos de la aldosterona es desconocido, pero éstos se pueden deber a la estimulación de la producción de TGF β en el riñón (Greene y col., *J. Clin. Invest.* 98:1063-1068 (1996)).

- La prorenina o la renina pueden tener efectos independientes de la AII que aumentan la enfermedad fibrótica. Se ha comprobado que ratas que sobreexpresan prorenina son normotensas pero desarrollan glomeruloesclerosis grave (Veniant y col., *J. Clin. Invest.* 98:1996-1970 (1996)).

- La renina recombinante humana añadida a células mesangiales humanas induce un marcado incremento de la producción de inhibidores del activador de plasminógeno (por ejemplo PAI-1 y PAI-2) que bloquean la generación de plasmina, una enzima fibrinolítica importante en la disolución de coágulos después de sufrir una herida generados a partir de plasminógeno por dos enzimas denominadas activadores de plasminógeno, activador de plasminógeno de uroquinasa (u-PA) y tisular (t-PA). Los PAI-1 y 2 regulan a su vez el U-PA y el t-PA. La plasmina parece ser un mediador clave de la degradación de matriz extracelular, desempeñando al menos tres funciones importantes para la degradación de la matriz extracelular. La plasmina degrada directamente componentes de proteoglicano de matriz extracelular, activa proteolíticamente metaloproteinasas (MMP) que, a su vez, degradan colágenos y otras proteínas de matriz, e inactiva enzimáticamente inhibidores tisulares de las MMP (TIMP), liberando las MMP de la inhibición por TIMP y permitiendo que éstas digieran proteolíticamente proteínas de matriz (Baricos y col., *Kidney Int' l.* 47:1039-1047 (1995); Baricos y col., *J. Amer. Soc. Nephrol.* 10:790-795 (1999)). La generación neta de plasmina activa a partir del plasminógeno precursor inactivo resulta de un equilibrio de los activadores de plasminógeno y PAI-1 y 2 y otros factores. El PAI-1 se une a vitronectina (Lawrence y col., *J. Biol. Chem.* 272:7676-7680 (1997)). Se han desarrollado moléculas PAI-1 mutantes que tienen propiedades mejoradas para la unión de PAI-1 con moléculas de vitronectina, pero que no inhiben la actividad de t-PA ni la actividad de u-PA, lo que conduce a un aumento de la cantidad de la forma activa de la plasmina (véase el documento WO 97/39028, Lawrence y col.). El PAI-1 aumenta en respuesta a la adición de TGF β (Tomooka y col., *Kidney Int.* 42:1462-1469 (1992)).

Se ha sugerido que el TGF β aumenta la liberación de renina de gránulos de almacenamiento en el aparato yuxtglomerular del riñón (Antonipillai y col., *Am. J. Physiol.* 265:F537-F541 (1993) y Ray y col., *Contrib. Nephrol.* 118:238-248 (1996)).

- 5 Así, las interacciones de la producción de RAS y TGF β forman un sistema complejo que afecta a la acumulación de ECM fibrótica y a la incidencia de la enfermedad fibrótica. Varios componentes del RAS, como la aldosterona, la prorenina y la renina, pueden estar relacionados con la producción de TGF β y la acumulación de ECM fibrótica. Todo régimen terapéutico eficaz debe tener en cuenta estas relaciones complejas para optimizar la inhibición de TGF β con el fin de prevenir y/o reducir la acumulación de ECM. Ya se ha propuesto el uso de combinaciones de agentes para reducir y prevenir la acumulación excesiva de
- 10 matriz extracelular (Noble y col., WO 00/40227). Además se ha descubierto que un anticuerpo anti-TGF β , cuando se añade al inhibidor de la ACE lisinopril, detiene la nefropatía diabética en un modelo de rata (Benigni y col., *J. Am. Soc. Nephrol.* 14:L1816-1824 (2003)). También se ha empleado un anticuerpo anti-TGF β junto con Enalapril en el tratamiento de la nefropatía diabética en fase tardía (Noble y Border, WO 06/037029).
- 15 Las múltiples vías que resultan en la sobreexpresión de TGF β y la fibrosis propuestas a partir de estudios *in vitro* muestran en la Figura 1 (véase Kagami y col., *J. Clin. Invest.* 93:2431-2437 (1994); Gibbons y col., *J. Clin. Invest.* 90:456-461 (1992); Abboud, *Kidney Int.* 41:581-583 (1992); Ruiz-Ortega y col., *J. Am. Soc. Nephrol.* 5:683 (1994) resumen; Kim y col., *J. Biol. Chem.* 267:13702-13707 (1992); Ohno y col., *J. Clin. Invest.* 95:1363-1369 (1995); Riser y col., *J. Clin. Invest.* 90:1932-1943 (1992); Riser y col., *J. Am. Soc. Nephrol.* 4:663 (1993); Ziyadeh y col., *J. Clin. Invest.* 93:536-542 (1994); Rocco y col., *Kidney Int.* 41:107-114 (1992); Flaumenhaft y col., *Advan. Pharmacol.* 24:51-76 (1993); Lopez-Armanda y col., *J. Am. Soc. Nephrol.* 5:812 (1994) resumen; Sahai y col., *J. Am. Soc. Nephrol.* 6:910 (1995); Remuzzi y col., *Kidney Int.* 1:2-15 (1997); y Remuzzi y col., *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:1321-1332 (1998)). Este diagrama muestra que se cree que un gran número de factores implicados en la lesión renal aumenta la producción de TGF β .
- 25 En enfermedades fibróticas, la sobreproducción de TGF β resulta en una acumulación excesiva de matriz extracelular, que conduce a fibrosis tisular y finalmente a fallo orgánico. La acumulación de matriz mesangial es una indicación histológica de enfermedades glomerulares progresivas que conducen a glomeruloesclerosis y enfermedad renal en etapa terminal (Klahr y col., *N. Engl. J. Med.* 318:1657-1666 (1988); Kashgarian y Sterzel, *Kidney Int.* 41:524-529 (1992)). Un modelo aceptado de la glomerulonefritis humana consiste en ratas a las que se les inyecta suero antitímocito, demostrando este modelo que una sobreproducción de TGF β glomerular puede ser causa de desarrollo de glomeruloesclerosis (Okuda y col., *J. Clin. Invest.* 86:453-462 (1990); Border y col., *Nature (Lond.)* 346:371-374 (1990); Kagami y col., *Lab. Invest.* 69:68-76 (1993); e Isaka y col., *J. Clin. Invest.* 92:2597-2602 (1993)). Utilizando células mesangiales de rata cultivadas, en las que los efectos de la Angiotensina II en la presión glomerular no son un factor, se ha demostrado que la Angiotensina
- 30 II induce la producción y secreción de TGF β por células mesangiales, y también se ha demostrado que éste a su vez estimula la producción y deposición de matriz extracelular (Kagami y col., *J. Clin. Invest.* 93:2431-2437 (1994)). Los aumentos de los niveles de PAI-1 resultan en una degradación reducida de la matriz extracelular (Baricos y col., *Kidney Int.* 47:1039-1047 (1995)). Los incrementos del TGF β resultan en un aumento de los niveles de PAI-1 (Tomooka y col., *Kidney Int.* 42:1462-1469 (1992)). Se ha demostrado que la disminución de la sobreexpresión del TGF β en un modelo de glomerulonefritis en rata mediante inyección *in vivo* de anticuerpos neutralizantes para TGF β reduce la sobreexpresión del TGF β (Border y col., *Nature* 346:371-374 (1990)), y reduce la deposición de PAI-1 en la matriz patológica (Tomooka y col., *Kidney Int.* 42:1462-1469 (1992)). Por consiguiente, disminuciones de los niveles de TGF β deberían conducir a una disminución de los niveles de PAI-1 y un aumento de la degradación de la matriz extracelular para mejorar la deficiencia del
- 35 órgano y la enfermedad fibrótica. Sin embargo, existen pacientes con enfermedad fibrótica que está muy avanzada en lo que respecta a la formación de la matriz extracelular (ECM). Esto se debe a que el funcionamiento anómalo del órgano no es detectable hasta que la acumulación de ECM está muy avanzada. Por ejemplo, en el riñón, los análisis de diagnóstico estándar no proporcionan una lectura anómala hasta que el órgano ha perdido aproximadamente un cincuenta por ciento de su función.
- 40 El tratamiento de los estados asociados con una acumulación excesiva de ECM también se ha centrado en la disminución de estímulos de la enfermedad para reducir la presión sanguínea o, en el caso de la nefropatía diabética, para reducir los niveles de glucosa en plasma. Por ejemplo, las terapias actuales para el tratamiento de la enfermedad fibrótica renal se limitan al bloqueo de la AII utilizando inhibidores de la ACE, como Enalapril, o antagonistas del receptor de AII, como Losartan. Además se anima a los pacientes para que sigan dietas bajas en proteínas, ya que este régimen tiene cierto valor terapéutico (Rosenberg y col., *J. Clin. Invest.* 85:1144-1149 (1992)). En el mejor de los casos, estas terapias solo prolongan la función del
- 45 órgano en 1-2 años. Esto se puede deber a las múltiples vías que resultan en una sobreexpresión o un aumento de la actividad del TGF β . Además, es probable que las estrategias terapéuticas actuales para reducir la sobreproducción de TGF β puedan conducir a la intensificación de otras vías, resultando en una sobreproducción continua del TGF β . Por ejemplo, cuando se bloquea la acción de la AII, la renina se incrementa, lo que a su vez aumenta la producción de TGF β (véase la solicitud de patente US en tramitación
- 50
- 55
- 60

junto con la presente, n° de serie US 09/005,255). Más recientemente se han propuesto tratamientos dirigidos a la detención de la sobreproducción de TGFβ (Border y Noble, *Kidney Internatl.* 54 (1998); y Peters y col., *Kidney Internatl.* 54 (1998)).

5 Por consiguiente, los métodos terapéuticos más prometedores necesitarán aumentar la degradación de la ECM para restaurar la función del órgano y disminuir la sobreproducción y/o la actividad del TGFβ. Una mayor degradación de la ECM acumulada en exceso puede ser utilizada para optimizar la reducción global en los niveles de ECM acumulada con el fin de restaurar la función de tejidos y órganos. Ya se conocen proteasas que pueden degradar la ECM. Por ejemplo, la serina proteasa plasmina degrada proteínas de ECM y activa pro-metaloproteinasas además de degradar la fibrina (Baricos y col., *supra*). Un objetivo de la
10 intervención terapéutica para aumentar la degradación de la ECM con el fin de tratar la fibrosis podría consistir en aumentar la plasmina en la zona de deposición excesiva de ECM.

15 Existe una necesidad de mejores terapias para normalizar la producción de TGFβ que tengan en cuenta las múltiples vías que estimulan la producción de TGFβ, para prevenir o reducir la acumulación excesiva de la ECM con el fin de restaurar la función de tejidos y órganos en los que se ha acumulado ECM en exceso y/o reducir la formación de una cicatriz en una herida.

SUMARIO DE LA INVENCION

20 Así, la presente invención proporciona una combinación de agentes, un anticuerpo anti-TGFβ en combinación con Enalapril, que inhibe el TGFβ para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con una acumulación excesiva de matriz extracelular en tejidos u órganos, estando destinada la combinación de agentes a reducir la acumulación excesiva de matriz extracelular (ECM) asociada con estados fibróticos mediante la inhibición de TGFβ, utilizando una combinación de agentes que inhiben el TGFβ, o utilizando una combinación de agentes para inhibir el TGFβ y agentes que provocan un incremento de la degradación de ECM acumulada en exceso, seleccionándose dicha enfermedad de entre el grupo consistente en síndrome de dificultad respiratoria del adulto o aguda (ARDS), enfermedades fibróticas del hígado, fibrosis cardíaca postinfarto, enfermedades fibroquísticas tales como fibroesclerosis, cánceres fibróticos tales como cánceres de mama, útero, páncreas o colon, fibroides, fibroma, fibroadenomas, fibrosarcomas, estado postinfarto de miocardio, hipertrofia ventricular izquierda, cirrosis hepática, enfermedad venooclusiva, estado después de una lesión de la médula espinal, estado después de cirugía retiniana y de glaucoma, postangioplastia, restenosis, fibrosis renal intersticial, fallo de injerto arteriovenoso, cicatrizaciones excesivas tales como cicatrices queloides y cicatrices resultantes de lesiones, quemaduras o cirugía.

30 La invención prevé el uso de la combinación de un anticuerpo anti-TGFβ y Enalapril, que inhibe directa o indirectamente el TGFβ incluyendo inhibidores directos de la actividad del TGFβ. Los agentes inhibidores del TGFβ incluyen anticuerpos, proteoglicanos como decorina y ligandos para receptores del TGFβ, y/o inhibidores de TGFβ indirectos incluyendo aldosterona, inhibidores de aldosterona, inhibidores de Angiotensina II, inhibidores de renina, inhibidores de la ACE y antagonistas del receptor de la AII, que actúan disminuyendo la producción de TGFβ.

40 La invención también prevé el uso de agentes adicionales que resultan en un aumento de la degradación de matriz acumulada en exceso, incluyendo proteasas tales como serina proteasas, incluyendo plasmina, metaloproteasas, o combinaciones de proteasas, y agentes tales como tPA, y mutantes como PAI-1 que aumentan la producción y/o la actividad de proteasas tales como plasmina.

45 Los agentes para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1 se pueden administrar como compuestos inhibidores en formulaciones farmacéuticas o como ácidos nucleicos que codifican los inhibidores suministrados a células huésped adecuadas. El ácido nucleico se puede introducir directamente en una célula *in vivo*, por ejemplo en tejido muscular, o se puede introducir primero en una célula *ex vivo* para obtener una célula que expresa el o los agentes inhibidores, y trasplantar o injertar después la célula en un sujeto para inhibir o reducir la acumulación en exceso de matriz extracelular.

También se describen composiciones para reducir la acumulación excesiva de ECM que contienen la combinación de agentes para inhibir el TGFβ.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

50 Figura 1: diagrama que representa diversas vías que resultan en un aumento de la producción de TGFβ.
Figura 2: gráfico de barras que muestra el incremento de la producción de TGFβ en células mesangiales humanas cultivadas en respuesta a la renina, tal como se describe en el Ejemplo I, *infra*.

- Figura 3: gráfico de barras que muestra el efecto de agentes bloqueantes sobre la producción de TGFβ en células mesangiales humanas en respuesta a la renina, tal como se describe en el Ejemplo II, *infra*.
- 5 Figuras 4A y B: gráficos de barras que muestran el aumento dependiente de la dosis en la producción de TGFβ (Figura 4A) y Fn (Figura 4b) con aumentos en HrRenina, tal como se describe en el Ejemplo IV, *infra*.
- Figuras 5A y B: gráficos de barras que muestran el curso temporal de la producción de TGFβ (Figura 5A) y Fn (Figura 5B), tal como se describe en el Ejemplo IV, *infra*.
- 10 Figuras 6A-C: gráficos de barras que muestran el aumento inducido por renina en ARNm de TGFβ, PAI-1 y Fn con el tiempo, tal como se describe en el Ejemplo IV, *infra*.
- Figura 7: gráfico de barras que muestra el resultado de inhibidores que bloquean la acción de la renina para aumentar la Angiotensina II en el aumento inducido por renina en la producción de TGFβ en células mesangiales humanas adultas, tal como se describe en el Ejemplo IV, *infra*.
- 15 Figuras 8A y B: fotografías que muestran los efectos del tratamiento con tPA en la acumulación de ECM en glomérulos, tal como se describe en el Ejemplo V, *infra*.
- Figuras 9A-D: gráficos de barras que muestran el efecto del tratamiento con tPA en el número de constituyentes de la ECM (9A: FN EDA+; 9B: laminina; 9C: colágeno I y 9D: colágeno IV) determinado por tinción, tal como se describe en el Ejemplo V, *infra*.
- 20 Figura 10: gráfico de barras que muestra los efectos del tPA en la expresión de ARNm glomerular en el día 6, tal como se describe en el Ejemplo V, *infra*.
- Figuras 11A y B: gráficos de barras que muestran los efectos del tratamiento con tPA en la actividad de plasmina glomerular, tal como se describe en el Ejemplo V, *infra*.
- 25 Figura 12: gráfico de barras que demuestra que la inyección de mutantes de PAI-2 produce un aumento de la generación de plasmina de glomérulos nefríticos, tal como se describe en el Ejemplo VII, *infra*.
- Figura 13: gráfico de barras que demuestra la reducción de la acumulación de colágeno de tipo I después de la administración de mutante de PAI-1, tal como se describe en el Ejemplo VII, *infra*.
- 30 Figura 14: muestra el efecto de dosis crecientes de 1D11, Enalapril y combinaciones de 1D11 y Enalapril en el desarrollo de glomeruloesclerosis (A, ratas normales; B, ratas enfermas de control; C, dosis de 1D11 0,01 mg/kg; D, dosis de 1D11 0,1 mg/kg; E, dosis de 1D11 0,5 mg/kg; F, dosis de 1D11 5,0 mg/kg; G, y Enalapril; H, Enal + 0,5 mg/kg de 1D11; e I, Enal + 5 mg/kg de 1D11, tal como se describe en el Ejemplo IX, *infra*.
- 35 Figura 15: muestra el efecto de dosis crecientes de 1D11, Enalapril y combinaciones de 1D11 y Enalapril en la puntuación de matriz (A), y tinción inmunohistoquímica para fibronectina EDA+ (B), y colágeno I (C), tal como se describe en el Ejemplo IX, *infra*.
- Figura 16: micrografías de inmunofluorescencia de fibronectina EDA+, A, glomérulos normales, B, ratas no tratadas, con tratamiento de 1D11 en C, 0,01 mg/kg, D, 0,1 mg/kg, E, 0,5 mg/kg, F, 5 mg/kg, y G, y Enalapril, y combinaciones de H, Enal + 0,5 mg/kg 1D11, y I Enal + 5 mg/kg, tal como se describe en el Ejemplo IX, *infra*.
- 40 Figura 17: micrografías de inmunofluorescencia de colágeno de tipo I en glomérulos normales (A), ratas enfermas de control no tratadas (B), y con tratamientos con 1D11 en dosis de C, 0,01 mg/kg, D, 0,1 mg/kg, E, 0,5 mg/kg, F, 5 mg/kg y G, y Enalapril, y H, combinación de Enal + 0,5 mg/kg de 1D11, e I, combinación de Enal + 5 mg/kg de 1D11, tal como se describe en el Ejemplo IX, *infra*.
- 45 Figura 18: muestra los efectos de dosis crecientes de 1D11, Enalapril y combinaciones de 1D11 y Enalapril en la producción glomerular de fibronectina (A), PAI-1(B), y TGFβ (C), tal como se describe en el Ejemplo IX, *infra*.
- 50 Figura 19: *Northernblot* representativo que muestra la expresión de ARNm glomerular de TGFβ, PAI-1 colágeno I y fibronectina seis días después de la inducción de glomerulonefritis, tal como se describe en el Ejemplo IX, *infra*.
- Figura 20: muestra los efectos de dosis crecientes de 1D11, Enalapril y combinaciones de 1D11 y Enalapril en los niveles de ARNm glomerular de fibronectina (A), PAI-1 (B), colágeno I (C) y TGFβ (D), tal como se describe en el Ejemplo IX, *infra*.
- 55 Figura 21: muestra los efectos de dosis crecientes de 1D11, Enalapril y combinaciones de 1D11 y Enalapril en la tinción inmunofluorescente para el marcador de monocito/macrófago ED1, tal como se describe en el Ejemplo IX, *infra*.
- Figura 22: muestra los efectos de dosis crecientes de 1D11, Enalapril y combinaciones de 1D11 y Enalapril en la proteína p-smad2 glomerular, determinados mediante *Western blot*, tal como se describe en el Ejemplo IX, *infra*.
- 60 Figura 23: es la Tabla 2, que muestra una determinación en ratas del intervalo de dosis eficaz de anticuerpo 1D11 en glomerulonefritis anti-Thy 1, tal como se describe en el Ejemplo VIII, *infra*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento de que es posible garantizar que una combinación de estrategias previene o trata estados asociados con la acumulación excesiva de matriz extracelular en tejidos u órganos, incluyendo enfermedades fibróticas y cicatrización, resultante de la sobreproducción y/o la actividad de TGF β . Tal como se ha indicado más arriba, la sobreproducción de TGF β puede ser el resultado de múltiples vías y requiere la inhibición de más de una vía para lograr cualquier reducción clínicamente significativa de la acumulación excesiva de matriz extracelular y una mejoría de la enfermedad. Por ejemplo, tal como se da a conocer en la solicitud de patente U.S. en tramitación junto con la presente, n° de serie U.S. 09/005,255, la renina estimula la producción de TGF β en células capaces de producir TGF β de forma independiente de la Angiotensina II y la presión sanguínea.

Una terapia óptima de trastornos asociados con una acumulación excesiva de ECM, que provoca un deterioro del órgano y finalmente un fallo del mismo, debe tener en cuenta las múltiples vías de producción de TGF β para combatir eficazmente la sobreproducción de TGF β . Sin esta estrategia multifactorial, la inhibición de una vía de la producción de TGF β puede ser insuficiente para bloquear la acumulación excesiva de matriz extracelular e incluso puede resultar en un aumento de los niveles de producción de TGF β por estimulación de una de sus vías alternativas de producción.

Aunque ahora se sabe que múltiples estímulos conducen a la sobreexpresión de TGF β y la acumulación excesiva de ECM resultante, actualmente se están explorando estrategias terapéuticas que inhiben directamente el TGF β , como el uso de anticuerpos anti-TGF β o antagonistas del receptor de TGF β . Sin embargo, dado que el TGF β tiene muchos efectos beneficiosos, tales como efectos inmunosupresores e inmunomoduladores, así como la inhibición del crecimiento celular epitelial, que retrasa la carcinogénesis (Markowitz, Science 268:1336-1338 (1995)), y la supresión de la aterogénesis (Grainger y col., Nature Med.1:74-79 (1995)), estas terapias pueden tener efectos secundarios inaceptables si se administran en dosis lo suficientemente altas para detener con eficacia los estados fibróticos. Esto se ha demostrado en los ratones *null (knockout)* de TGF β , que murieron de inflamación incontenible aproximadamente a las 6 semanas de edad (Letterio y col., Science 264:1936-1938 (1994); Kulkarni y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 90:770-774 (1993) y Shull y col., Nature 359:693-699 (1992)), lo que indica que el TGF β tiene un importante papel beneficioso en la función inmunitaria. Para reducir adecuadamente una acumulación excesiva de ECM asociada con el TGF β sin provocar efectos secundarios nocivos, pueden ser necesarios múltiples agentes que directamente inhiben el TGF β y/o que inhiben los estímulos específicos de la enfermedad que provocan la sobreexpresión y/o actividad del TGF β , por ejemplo un alto nivel de glucosa debido a diabetes. Por consiguiente, un objetivo de los métodos de la presente invención es llevar a cabo la normalización de la producción de TGF sin efectos secundarios nocivos y prevenir o reducir la acumulación excesiva de ECM y el consiguiente estado fibrótico.

Además puede ser necesario degradar la ECM acumulada para restaurar la función de los tejidos u órganos comprometidos por la presencia de una acumulación excesiva de ECM. La prevención o degradación de una acumulación excesiva de ECM también puede evitar o reducir la formación de una cicatriz en el lugar de la herida.

El uso de acuerdo con la invención incluye el uso la combinación de agentes de acuerdo con las reivindicaciones para reducir la sobreproducción y/o actividad del TGF β y/o para bloquear vías alternativas de la producción de TGF β para reducir la acumulación excesiva de ECM. El uso de acuerdo con la invención incluye además el uso de la combinación de agentes para reducir la sobreproducción y/o la actividad de TGF β en combinación con agentes para aumentar la degradación de la ECM acumulada en exceso. La combinación de agentes es útil para reducir la acumulación excesiva de matriz extracelular con el fin de mejorar el estado fibrótico y para restaurar o mantener la función normal del tejido u órgano y el aspecto de la piel.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "acumulación excesiva de matriz extracelular" significa la deposición de componentes de matriz extracelular, incluyendo colágeno, laminina, fibronectina y proteoglicanos, en tejidos hasta tal punto que se produce un deterioro del tejido u órgano y finalmente a un fallo del órgano como resultado de una enfermedad fibrótica. Además, el concepto "acumulación excesiva de matriz extracelular" significa la deposición de componentes de matriz extracelular en el proceso denominado comúnmente como "cicatrización" o "formación de cicatriz", por ejemplo en una herida. El concepto "reducir la acumulación excesiva de matriz extracelular" significa evitar la acumulación excesiva de matriz extracelular, por ejemplo en tejidos, órganos o en una herida, evitar la continuación de la deposición de matriz extracelular y/o disminuir la cantidad de matriz acumulada en exceso ya presente para mantener o restaurar la función o el aspecto del tejido u órgano.

Diversas enfermedades se caracterizan por una acumulación excesiva de matriz extracelular (colágeno, fibronectina y otros componentes de matriz). Estos estados incluyen, por ejemplo, de forma no exclusiva,

glomerulonefritis, síndrome de dificultad respiratoria del adulto o aguda (ARDS), patologías asociadas con la diabetes, como enfermedad diabética renal, enfermedades fibróticas del hígado, pulmón y fibrosis cardíaca postinfarto. También incluyen enfermedades fibroquísticas tales como fibroesclerosis y cánceres fibróticos tales como cánceres de mama, útero, páncreas o colon, y fibroides, fibroma, fibroadenomas y fibrosarcomas.

- 5 También existe una serie de estados médicos asociados a una acumulación excesiva de matriz extracelular que implica una cantidad elevada de colágeno, fibronectina y otros componentes de matriz. Estos estados incluyen, por ejemplo, de forma no exclusiva, estado de postinfarto de miocardio, hipertrofia ventricular izquierda, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, enfermedad venooclusiva, estado después de una lesión de la médula espinal, estado después de cirugía retiniana y de glaucoma, postangioplastia, restenosis y fibrosis renal intersticial, fallo de injerto arteriovenoso, cicatrización excesiva tal como cicatrices queloides y cicatrices resultantes de lesiones, quemaduras o cirugía.

15 Tal como se ha descrito, *supra*, ya es sabido que el TGFβ está indicado en la causalidad de estados fibróticos. Durante la reparación tisular normal, la producción de TGFβ se incrementa para estimular el proceso de reparación. Una vez completa la reparación, la producción de TGFβ disminuye. Si no se reduce después de una reparación del tejido normal, la sobreproducción de TGFβ incrementada puede conducir al desarrollo de una acumulación excesiva de matriz extracelular y estados fibróticos. Por consiguiente, una lesión tisular reiterada o un defecto en la regulación del TGFβ que conduce a una producción prolongada de TGF resultan en una acumulación excesiva de matriz extracelular.

20 Tal como se utiliza aquí, el concepto "inhibición de TGFβ" incluye la inhibición de la actividad de TGFβ, por ejemplo la provocación de una deposición excesiva de ECM, y la inhibición de la producción de TGFβ que resulta en una sobreproducción y una acumulación excesiva de ECM, independientemente del mecanismo de la actividad o sobreproducción de TGFβ. Esta inhibición puede estar causada directamente, por ejemplo mediante la unión con TGFβ o sus receptores, por ejemplo por anticuerpos anti-TGFβ o antagonistas del receptor de TGFβ, o puede estar causada indirectamente, por ejemplo mediante la inhibición de una vía que conduce a una producción de TGFβ, como la vía de renina. La inhibición provoca una reducción de la actividad del TGFβ que produce ECM independientemente del mecanismo exacto de inhibición.

25 Tal como se utiliza aquí, un "agente inhibidor del TGFβ" es un agente que inhibe directa o indirectamente la unión de TGFβ a sus receptores, como un agente inhibidor específico para el TGFβ o un agente que bloquea una vía alternativa de producción de TGFβ. Este agente provoca una reducción de la actividad del TGFβ que produce ECM independientemente de su mecanismo de acción. El agente puede ser un ácido nucleico que codifica el agente inhibidor del TGFβ, tal como ADNc, ADN genómico, o ARN o ADN que codifican la actividad inhibidora del TGFβ, como ARN o ADN antisentido de TGFβ.

30 Tal como se utiliza aquí, el concepto "agente inhibidor específico para el TGFβ" significa un agente que incluye actividad de inhibición del TGFβ, incluyendo agentes que se unen directamente al TGFβ, como anticuerpos anti-TGFβ, o que son un ligando para el TGFβ que impide que éste se una a sus receptores. Un agente que inhibe específicamente el TGFβ también incluye un ácido nucleico que codifica un agente inhibidor específico para el TGFβ, como un ADNc, ADN genómico o un ARN o ADN que codifica la actividad inhibidora específica para el TGFβ, como un ARN o ADN antisentido de TGFβ.

35 Son conocidos agentes que se unen directamente al TGFβ, incluyendo anticuerpos anti-TGFβ, como anticuerpos anti-TGFβ1 (Genzyme, Cambridge, MA) y anticuerpos que se unen tanto al TGFβ1 como al TGFβ2 (Dasch y col., Patente US nº 5.571.714), proteoglicanos como decorina, biglicano y fibromodulina, y los ácidos nucleicos que codifican estos agentes.

40 Los anticuerpos a utilizar en la presente invención para inhibir el TGFβ, la renina u otras moléculas se pueden preparar de acuerdo con métodos bien establecidos en la técnica, por ejemplo mediante inmunización de animales huésped adecuados con el antígeno seleccionado, por ejemplo TGFβ. En cuanto a las descripciones de técnicas para obtener anticuerpos monoclonales, véase, por ejemplo, la técnica de hibridoma de Kohler y Milstein (Nature 256:495-497 (1975)), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor y col., Immunol. Today 4:72 (1983); Cole y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. EEUU, 80:2026-2030 (1983)) y la técnica de hibridoma de EBV (Cole y col., Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77096 (1985)). Estos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma productor del anticuerpo monoclonal se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*. Los animales huésped adecuados incluyen, de forma no exclusiva, conejos, ratones, ratas y cabras. También se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica al animal huésped, dependiendo de las especies huésped, incluyendo, de forma no exclusiva, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas como polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de *Megathura crenulata* (lapa californiana), dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles como BCG (bacilo de Calmette-

Guerin) y *Cornibacterium parvum*. Los anticuerpos aquí utilizados incluyen anticuerpos no humanos, quiméricos (diferentes especies), humanizados (véase Borrebaeck, *Antibody Engineering: A Practical Guide*, W.H. Freeman and Co., New York, 1991), humanos y de cadena sencilla, así como fragmentos de anticuerpos incluyendo, de forma no exclusiva, fragmentos F(ab')₂ que pueden ser producidos por digestión de pepsina de moléculas de anticuerpo y fragmentos Fab que pueden ser generados por reducción de los puentes de disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab (Science 246:1275-1281 (1989)) para permitir una identificación rápida y sencilla de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

Un inhibidor de TGFβ indirecto inhibiría la síntesis o secreción de TGFβ o secuestrarían éste de sus células diana. Estos inhibidores incluyen, de forma no exclusiva, inhibidores de enzima convertidora de Angiotensina ("ACE"), antagonistas del receptor de la AII tales como LosartanTM y CozarTM (Merck), e inhibidores de la aldosterona tales como SpironolactoneTM (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, Producto n° S 3378), que en otro caso conducirían a un aumento de la producción de TGFβ.

El alcance de los inhibidores de TGFβ de la invención también comprende ácidos nucleicos que incluyen oligonucleótidos antisentido que bloquean la expresión de genes específicos dentro de células uniéndose a un ARN mensajero complementario (ARNm) y evitando su traducción (véase revisión por Wagner, *Nature* 372:332-335 (1994); y Crooke y Lebleu, *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton (1993)). La inhibición de genes se puede medir determinando la degradación del ARN diana. El ADN y el ARN antisentido se puede preparar por métodos conocidos en la técnica de síntesis de ARN, incluyendo síntesis químicas tales como síntesis química de fosoramidita en fase sólida o transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN antisentido. Las secuencias de ADN se pueden incorporar en vectores con promotores de ARN polimerasa, tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Alternativamente también es posible introducir constructos de ADNc antisentido que sintetizan ARN antisentido de forma constitutiva o inductiva en líneas celulares. La potencia de los oligonucleótidos antisentido para inhibir el TGFβ se puede incrementar utilizando diversos métodos, incluyendo 1) adición de polilisina (Leonetti y col., *Bioconj. Biochem.* 1:149-153 (1990)); 2) encapsulación en liposomas diana de anticuerpos (Leonetti y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 87:2448-2451 (1990) y Zelphati y col., *Antisense Research and Development* 3:323-338 (1993)); 3) nanopartículas (Rajaonarivony y col., *J. Pharmaceutical Sciences* 82:912-917 (1993) y Haensler y Szoka, *Bioconj. Chem.* 4:372-379 (1993)); 4) uso de liposomas de ácido catiónico (Feigner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 84:7413-7417 (1987); Capaccioli y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197:818-825 (1993); Boutorine y Kostina, *Biochimie* 75:35-41 (1993); Zhu y col., *Science* 261:209-211 (1993); Bennett y colaboradores, *Molec. Pharmac.* 41:1023-1033 (1992) y Wagner, *Science* 280:1510-1513 (1993)); y 5) liposomas derivados de virus Sendai (Compagnon y col., *Exper. Cell Res.* 200:333-338 (1992) y Morishita y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 90:8474-8478 (1993)), para suministrar los oligonucleótidos dentro de células. Algunas técnicas recientes para aumentar el suministro incluyen la conjugación de los oligonucleótidos antisentido con un péptido fusogénico (Bongartz y col., *Nucleic Acids Res.* 22(22):4681-4688 (1994)).

Otros agentes inhibidores del TGFβ adecuados adicionales se pueden obtener fácilmente utilizando métodos conocidos en la técnica para seleccionar moléculas de agente candidato para la unión con TGFβ, como ensayos para detectar la capacidad de un agente candidato para bloquear la unión de TGFβ humano radiomarcado con células, tales como células mesangiales humanas. Alternativamente se pueden analizar compuestos candidatos en cuanto a la capacidad para inhibir la producción de TGFβ por células mesangiales utilizando un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), por ejemplo empleando el *kit* de análisis ELISA de TGFβ de R & D Systems (Minneapolis, MN) (n° de cat. DB 100) (en cuanto a los métodos, véase, por ejemplo, Uotila y col., *J. Immunol. Methods* 42:11 (1981)).

También es posible desarrollar agentes inhibidores específicos de TGFβ por métodos conocidos de diseño de fármacos, por ejemplo utilizando análisis estructura de la molécula de TGFβ mediante el empleo de métodos establecidos en la técnica, por ejemplo utilizando cristalografía por rayos X para analizar la estructura del complejo formado por TGFβ y uno de sus inhibidores conocidos (véase, por ejemplo, Sielecki y col., *supra*; Rahuel y col., *supra*, Badasso y col., *supra* y Dhanaraj y col., *supra*), y/o modificando antagonistas de TGFβ conocidos, es decir, "compuestos principales", para obtener inhibidores más potentes y compuestos para diferentes modos de administración (es decir, administración oral frente a administración intravenosa) (véase, por ejemplo, Wexler y col., *Amer. J. Hyper.* 5:209S-220S (1992)-development of AII receptor antagonists from LosartanTM). Para estos procedimientos se pueden generar grandes cantidades de TGFβ utilizando tecnología recombinante o éstas se pueden adquirir comercialmente (R & D Systems).

Además de los agentes inhibidores del TGFβ, también están previstos agentes que conducen a la degradación de ECM para su uso en la presente invención. Estos agentes incluyen serina proteasas como plasmina y metaloproteinasas, y combinaciones de proteasa tales como Wobenzym (Mucos Pharma, Geretsried, Alemania). Además, los presentes inventores han descubierto que es posible utilizar agentes tales como tPA para aumentar la cantidad de proteasas activas *in vivo* con el fin de incrementar la

degradación de ECM acumulada en órganos y tejidos. Se ha demostrado que el activador de plasmina tisular (tPA, Activase, Genentech, S. San Francisco, CA) disuelve coágulos asociados con infarto de miocardio y apoplejía. Los presentes inventores tienen la teoría de que el tPA podría ser útil en el incremento de la plasmina para reducir la ECM acumulada. Aquí se muestra el uso de tPA recombinante (tPA_r) para aumentar la generación de plasmina *in vivo* con el fin de degradar ECM (Ejemplo V, *infra*).

Además, utilizando un diseño de fármaco racional se puede descubrir o desarrollar la producción y/o actividad de nuevas proteasas o agonistas de proteasas y éstas se pueden utilizar para degradar la ECM de acuerdo con los métodos de la presente invención.

Los presentes inventores también han descubierto que algunos mutantes de PAI, como los mutantes PAI-1 descritos en el documento WO 97/39028 por Lawrence y col., incorporado aquí en su totalidad, pueden utilizarse para aumentar la cantidad de plasmina activa con el fin de mejorar la degradación de ECM acumulada en órganos y tejidos. Estos mutantes PAI-1 no inhiben los activadores de plasminógeno, pero conservan una significativa afinidad de unión con vitronectina. Es posible obtener mutantes PAI-1 adicionales para su uso en los métodos de la invención y analizarlos en cuanto a su capacidad de unión con vitronectina y su incapacidad para inhibir activadores de plasminógeno (Lawrence y col., J. Biol. Chem. 272:7676-7680 (1997)). La unión de PAI-1 con vitronectina se puede determinar bien funcionalmente (Lawrence y col., J. Biol. Chem. 265:20293-20301 (1990)), bien en un ELISA específico para vitronectina (Lawrence y col., J. Biol. Chem. 269:15223-15228 (1994)). La capacidad de los PAI-1 para inhibir activadores de plasminógeno se puede evaluar utilizando ensayos cromogénicos, tal como describen Sherman y col., J. Biol. Chem. 270:9301-9306 (1995)).

En el uso de acuerdo con la invención, los agentes de la combinación de agentes inhibidores del TGF β se administran simultánea o secuencialmente. Los agentes inhibidores se localizarán en lugares de sobreproducción de TGF β , por ejemplo órganos como los riñones. Los agentes inhibidores se pueden marcar utilizando métodos de radiomarcado conocidos para detectar su localización en un sujeto después de la administración. Los agentes también se pueden conjugar con moléculas de fijación de diana tales como anticuerpos para componentes de la ECM con el fin de mejorar la localización de los agentes después de la administración en los lugares de sobreproducción de TGF β y/o acumulación excesiva de ECM en un sujeto.

En otra realización de la invención, los agentes inhibidores del TGF β se administran simultánea o secuencialmente con al menos un agente que degrada la ECM acumulada, por ejemplo una serina proteasa, como plasmina. Alternativamente se administra un agente que induce la producción de proteasa, como tPA, para aumentar la producción de proteasa en el o los lugares de acumulación de ECM. El tPA se une a fibrina (Rondeau y col., Clinical Nephrol. 33:55-60 (1990)) y por consiguiente se localizará en áreas fibróticas en las que se desea un incremento de la producción de proteasa.

En una realización de la invención, la combinación de agentes inhibidores de TGF β de acuerdo con la invención se administra a un sujeto que presenta una acumulación excesiva de ECM existente en tejidos u órganos, o un alto riesgo de dicha acumulación, para reducir la acumulación excesiva de ECM. Por ejemplo, individuos con riesgo de desarrollar estados fibróticos, como una persona que padezca o presente un alto riesgo de padecer diabetes, hipertensión, enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo lupus) y enfermedades inflamatorias, pueden ser examinados utilizando procedimientos médicos conocidos, incluyendo biopsias tisulares de riñón, pulmón o hígado, para determinar si se ha acumulado ECM en dichos órganos. Si el agente es específico para TGF β , se une al TGF β circulante o el TGF β tisular. Si el agente inhibe el TGF β indirectamente, por ejemplo un antirrenina, reduce la cantidad de TGF β producido. Como resultado de la administración de agentes que inhiben directa o indirectamente el TGF β , la ECM acumulada en el momento del diagnóstico o el tratamiento y la acumulación posterior de ECM se reducen.

En otra realización de la invención, la combinación de agentes inhibidores del TGF β se administra a un sujeto que presenta una acumulación excesiva de ECM existente en tejidos u órganos junto con al menos un agente para degradar la ECM acumulada. La degradación de ECM se lleva a cabo utilizando una proteasa, o un agente que intensifica la producción o la actividad de agentes degradantes de la ECM tales como proteasas. Como resultado de la administración de estos agentes, la matriz acumulada en exceso en el momento del diagnóstico o el tratamiento y la acumulación posterior de ECM se reducen.

Además del uso de moléculas tales como anticuerpos y compuestos purificados tales como decorina, al sujeto se le administra un ácido nucleico codificador de los agentes inhibidores del TGF β y ácido nucleico codificador del agente para degradar directa o indirectamente la ECM acumulada, con el fin de permitir que los agentes sean expresados y segregados para inhibir la TGF β y degradar la ECM acumulada. El ácido nucleico se puede introducir en células en el sujeto, por ejemplo utilizando un vehículo de suministro adecuado, como un vector de expresión o una unidad de encapsulación como un liposoma, o se puede introducir directamente a través de la piel, por ejemplo en una vacuna de ADN.

Alternativamente, los ácidos nucleicos codificadores de los agentes se introducen en una célula *ex vivo* y las células que expresan los ácidos nucleicos se introducen en un sujeto, por ejemplo por procedimientos de implantación, para suministrar los agentes *in vivo*. Múltiples agentes se pueden introducir en un vehículo de suministro o en vehículos separados.

5 Métodos de Terapia Génica

En la técnica ya se conocen métodos para obtener ácidos nucleicos codificadores de agentes inhibidores del TGF β y agentes degradantes de la ECM. A continuación se ofrece una descripción general de métodos de uso de ácidos nucleicos en la terapia génica para reducir la acumulación excesiva de ECM.

- 10 En una realización de la invención está prevista una terapia génica mediante el uso de ácidos nucleicos codificadores de los agentes inhibidores del TGF β y/o del agente degradante de la ECM, introducidos en células de un sujeto para reprimir la sobreproducción de TGF β y degradar la ECM acumulada. En los métodos de la invención está prevista la transferencia genética en células de estos ácidos nucleicos.

Ácidos Nucleicos

- 15 Las secuencias de ácidos nucleicos codificadoras de los agentes inhibidores del TGF β y/o los agentes degradantes de la ECM se pueden obtener en grandes cantidades utilizando procedimientos bien establecidos de clonación molecular y replicación del vector o plásmido transportando las secuencias en una célula huésped adecuada. Las secuencias de ADN codificadoras de un agente específico se pueden reunir a partir de fragmentos de ADNc y enlaces de oligonucleótidos, o a partir de una serie de oligonucleótidos para proporcionar un gen de agente inhibidor sintético y/o un gen degradante de la ECM que puede expresarse.
- 20 Preferentemente, estas secuencias se proporcionan en un marco de lectura abierto ininterrumpido por secuencias internas no traducidas o intrones, que normalmente están presentes en genes eucariotas. También se puede utilizar ADN genómico que contenga las secuencias pertinentes. Algunas secuencias de ADN no traducido pueden estar presentes de 5' a 3' a partir del marco de lectura abierto, no interfiriendo dichas secuencias en la manipulación o expresión de las regiones codificadoras. Es posible emplear
- 25 secuencias genéticas completas o secuencias parciales codificadoras de los agentes deseados.

- Las secuencias de ácidos nucleicos codificadoras de los agentes también se pueden producir parcial o totalmente mediante síntesis química, por ejemplo mediante el método de fosforamidita descrito por Beaucage y Carruthers, Tetra Letts. 22:1859-1862 (1981) o el método de triéster (Matteucci y col., J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981), y estos métodos se pueden llevar a cabo en sintetizadores de oligonucleótidos automáticos comerciales. Un fragmento de doble cadena se puede obtener a partir del producto de cadena simple de síntesis química bien sintetizando la cadena complementaria e hibridando las cadenas bajo condiciones apropiadas, bien sintetizando la cadena complementaria utilizando ADN polimerasa con una secuencia de cebado apropiada.
- 30

Transferencia Genética

- 35 Los pasos clave para la transferencia genética son 1) seleccionar el modo de suministro, por ejemplo un vector apropiado para suministrar los genes inhibidores al sujeto; 2) administrar el ácido nucleico al sujeto; y 3) lograr la expresión apropiada del gen transferido para unas duraciones satisfactorias. En la técnica se conocen métodos de transferencia genética. Los métodos abajo descritos son meramente ilustrativos y son métodos típicos de uso en la práctica de la invención. Sin embargo, también se pueden emplear otros procedimientos, como es sabido en la técnica. La mayor parte de los métodos para construir vehículos de suministro como vectores y similares son muy utilizados en la técnica, y la mayor parte de los profesionales están familiarizados con los materiales de recursos estándar que describen condiciones, reactivos y procedimientos específicos. Los siguientes párrafos sirven como directriz.
- 40

- 45 Las técnicas de manipulación de ácido nucleico son bien conocidas (véase, por ejemplo, Annual Rev. of Biochem. 61:131-156 (1992)). Los reactivos útiles para la aplicación de estas técnicas, como enzimas de restricción y similares, son muy conocidos en la técnica y se pueden adquirir comercialmente de diversos vendedores.

- El ácido nucleico natural o sintético que codifica los inhibidores para expresión en un sujeto se pueden incorporar en vectores que pueden ser introducidos y replicados en el sujeto. En general, el ácido nucleico que codifica las moléculas inhibidoras y/o las moléculas degradantes de la ECM seleccionadas se inserta utilizando técnicas recombinantes estándar en un vector que contiene secuencias de control de transcripción y traducción apropiadas, incluyendo secuencias de iniciación vinculadas operativamente con la secuencia genética para conducir a la expresión de los genes recombinantes en las células huésped receptoras. El concepto "vinculadas operativamente" significa que los componentes están en relación física y funcional, lo que les permite funcionar del modo previsto. Por ejemplo, un promotor está vinculado operativamente con una secuencia codificadora si el promotor efectúa su transcripción o expresión.
- 50
- 55

- Las secuencias codificadoras de genes inhibidores y/o degradantes seleccionados incluirán al menos una parte de la secuencia codificadora suficiente para proporcionar la actividad inhibidora de TGF β o degradante de ECM en la molécula expresada. Por ejemplo, en el caso de un inhibidor de la renina se puede utilizar una parte de la secuencia codificadora que posibilita que el inhibidor se una a la renina. En la técnica se conocen métodos para determinar estas partes o dominios, incluyendo dominios de unión de moléculas (véase, por ejemplo, Linsley y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 87:5031-5035 (1990)). Es posible que sea necesario bloquear tanto el sitio enzimático de renina como el dominio de unión de célula de renina para prevenir eficazmente el estímulo de sobreproducción de TGF β por renina. En este caso se pueden preparar moléculas antisentido de renina utilizando métodos estándar para llevar a cabo el bloqueo completo.
- 5
- 10 Las secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas se insertan en un solo vector o en vectores independientes. Puede insertarse más de un gen codificador de un agente seleccionado, o una parte de los mismos que incluye la actividad deseada, en un solo vector o en vectores independientes para su introducción en las células huésped. Alternativamente, estas secuencias se pueden administrar como secuencias de ácido nucleico desnudo o como parte de un complejo con otras moléculas, por ejemplo liposomas.
- 15
- En la técnica son bien conocidos diversos vectores de expresión y métodos de transferencia genética útiles para lograr la expresión de moléculas seleccionadas en células receptoras, que pueden ser construidos utilizando técnicas de ligación y restricción estándar (véase, por ejemplo Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Maniatis y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York (1982), Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (W.H. Freeman and Co., New York, NY 1990) y Wu, Methods in Enzymol. (Academic Press, New York, NY 1993)). La elección del vector o el método depende de diversos factores, como la molécula particular a expresar.
- 20
- Los vectores adecuados pueden ser vectores plasmídicos o virales (Kaufman, en Gene Expression Technology, Goeddel (Ed.) (1991)) incluyendo baculovirus, adenovirus, poxvirus (Moss, Current Opin. Biotech. 3:518-522 (1993)), vectores de retrotransposón (Cook y col., Bio/Technology 9:748-751 (1991) y Chakraborty y col., FASEB J. 7:971-977 (1993)), virus adenoasociados (AAV) (Yei y col., Gene Therapy 1:192-200 (1994) y Smith y col., Nat. Genet. 5:397-402 (1993)), vectores de virus herpes y retrovirus (Price y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 84:156-160 (1987); Naviaux y Verma, Current Opinion in Biotechnol. 3:540-547 (1992); Hodgson y Chakraborty, Curr. Opin. Thera. Patients 3:223-235 (1993)) como el vector incompetente de replicación basada en MMLV pMV-7 (Kirschmeier y col., DNA 7:219-225 (1988)), así como cromosomas artificiales humanos y de levadura (HAC y YAC) (Huxley, Gene Therapy 1:7-12 (1994) y Huxley y col., BiolTechnology 12:586-590 (1994)). Los vectores de expresión plasmídicos comprenden plásmidos incluyendo pBR322, pUC o BluescriptTM (Stratagene, San Diego, CA).
- 25
- 30
- 35 Los vectores que contienen el ácido nucleico que codifica los agentes seleccionados son preferentemente vectores de expresión recombinantes en los que se pueden producir altos niveles de expresión genética y que contienen secuencias reguladoras apropiadas para la transcripción y traducción de la secuencia de ácidos nucleicos insertada. Las secuencias reguladoras se refieren a las secuencias normalmente asociadas (por ejemplo dentro de 50 kb) de la región codificadora de un locus que afecta a la expresión del gen (incluyendo transcripción, traducción, corte y empalme, estabilidad o similares, del ARN mensajero). Una región reguladora de transcripción incluye todos los elementos necesarios para la transcripción, incluyendo la secuencia promotora, la secuencia potenciadora y sitios de unión de factor de transcripción. Las secuencias reguladoras también incluyen, entre otras cosas, sitios de corte y empalme y sitios de poliadenilación. Entre secuencias de codificación recombinantes se puede disponer una secuencia de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) para permitir la expresión de más de una secuencia codificadora con un solo promotor.
- 40
- 45
- Las regiones de control de transcripción incluyen: la región promotora temprana SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV) (región promotora IE94 de CMV humano (Boshart y colaboradores, Cell 41:521-530 (1985)); el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus de sarcoma de Rous u otros retrovirus; el promotor de herpes timidina quinasa; las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína; regiones del gen de IL-2 humano (Fujita y col., Cell 46:401-407 (1986)); regiones del gen de IFN humano (Ciccarone y col., J. Immunol. 144:725-730 (1990); regiones del gen de IFN humano (Shoemaker y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 87:9650-9654 (1990); regiones del gen de IL-4 humano (Arai y col., J. Immunol. 142:274-282 (1989)); regiones del gen de linfotoxina humana (Nedwin y co., Nucl. Acids. Res. 13:6361-6373 (1985)); regiones del gen de CSF granulocito-macrófago humano (GM-CSF) (Miyatake y col., EMBOJ. 4:2561-2568 (1985)) y otros. Si se utilizan vectores virales, en el vector se pueden disponer secuencias codificadoras recombinantes para que su expresión sea regulada por secuencias reguladoras tales como promotores que residen naturalmente en el vector viral.
- 50
- 55
- Los elementos de operación para lograr la expresión pueden incluir secuencias líder, codones de terminación y otras secuencias necesarias o preferentes para la transcripción y traducción apropiada de las secuencias de ácido nucleico insertadas. También se pueden incluir señales de secreción del inhibidor nativo o de otros
- 60

- polipéptidos segregados, que permiten que la molécula entre a través de las membranas y alcance una conformación funcional. Los expertos en la técnica entenderán que el tipo de corrección y la combinación de elementos de control de expresión dependen de las células huésped receptoras elegidas para expresar las moléculas *ex vivo*. El vector de expresión debería contener los elementos adicionales necesarios para la
- 5 transferencia y la replicación subsiguiente del vector de expresión que contiene las secuencias de ácidos nucleicos insertadas en las células huésped. Ejemplos de estos elementos incluyen, de forma no exclusiva, orígenes de replicación y marcadores seleccionables. Adicionalmente se pueden utilizar elementos tales como secuencias potenciadoras, por ejemplo secuencias potenciadoras de CMV, para aumentar el nivel de expresión genética terapéutica (Armstrong. Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 70:2702 (1973)).
- 10 El vector puede incluir al menos un marcador positivo que permite la selección de células que portan los ácidos nucleicos insertados. La molécula seleccionable puede consistir en un gen que, después de su introducción en la célula huésped, expresa un fenotipo dominante que permite la selección positiva de células que portan el gen *ex vivo*. En la técnica se conocen genes de este tipo, que incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a fármacos tales como la higromicina-B fosfotransferasa (hph), que confiere resistencia al
- 15 antibiótico G418; el gen de aminoglucósido fosfotransferasa (*neo* o *aph*) de Tn5, que codifica la resistencia al antibiótico G418; el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR); el gen de adenosina desaminasa (ADA) y el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR).
- Los vectores virales recombinantes se introducen en células huésped utilizando técnicas estándar. Se han desarrollado técnicas de infección que utilizan partículas virales infecciosas recombinantes para suministrar
- 20 genes a células. Los vectores virales utilizados de este modo incluyen vectores derivados del virus del simio 40 (SV40; Karlsson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 82:158 (1985)); adenovirus (Karlsson y col., EMBO J. 5:2377 (1986)); virus Vaccinia (Moss y col., Vaccine 6:161-3 (1988)); y retrovirus (Coffin, en Weiss y col.(Eds.), RNA Tumor Viruses, 2ª Ed., Vol. 2, Cold Spring Laboratory, NY, pp. 17-71 (1985)).
- También es posible producir vectores virales no replicantes en líneas celulares de empaquetamiento que
- 25 producen partículas víricas, que son infecciosas pero defectuosas en cuanto a la replicación, lo que los convierte en vectores útiles para la introducción de ácidos nucleicos en una célula que carece de información genética complementaria que posibilita la encapsidación (Mann y col., Cell 33:153 (1983); Miller y Buttimore, Mol. Cell. Biol. 6:2895 (PA317, ATCC CRL9078). Son preferentes las líneas celulares de empaquetamiento que contienen genes de empaquetamiento anfotróficos capaces de transducir células de origen humano y de
- 30 otras especies.
- Los vectores que contienen los genes insertados o las secuencias codificadoras se introducen en las células huésped utilizando métodos de transfección estándar, incluyendo electroporación, preparaciones liposomales, geles de Ca-PH-DNA, DEAE-dextrano, "cañones" de partículas de ácido nucleico y otros métodos adecuados.
- 35 Además de diversos vectores incluyendo vectores virales, también es posible utilizar otros sistemas de suministro, incluyendo, de forma no exclusiva, microinyección (DePamphilis y col., BioTechnique 6:662-680 (1988)); transfección mediada por liposomas (Felgner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 84:7413-7417 (1987); Felgner y Holm, Focus 11:21-25 (1989) y Felgner y col., Proc. West. Pharmacol. Soc. 32:115-121 (1989)); uso de transferencia de ADN desnudo o mediado por partículas y otros métodos conocidos en la
- 40 técnica. Recientemente se han utilizado liposomas catiónicos para potenciar la transfección (Felgner y col., Nature 349:351 (1991); Zhu y colaboradores, Science 261:209 (1993)).
- Células huésped adecuadas para la transferencia genética son células de vertebrados tales como fibroblastos, queratinocitos, células musculares, células mesangiales (véase, Kitamura y col., Kidney Int. 48:1747-1757 (1995)), y cualquier otra célula huésped adecuada, incluyendo las denominadas células
- 45 huésped universales, es decir, células obtenidas de un donante diferente al sujeto receptor, pero modificadas genéticamente para inhibir el rechazo por el sujeto. Las células autólogas son preferibles, pero el alcance de la invención abarca células heterólogas.
- La expresión de los genes inhibidores del TGF β después de la introducción en las células huésped se confirma utilizando métodos estándar. Por ejemplo, la expresión de agentes inhibidores específicos del TGF β
- 50 se puede determinar analizando la capacidad del sobrenadante de células transfectadas para inhibir la unión del TGF β radiomarcado con células mesangiales humanas utilizando clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) o ELISA. La expresión a partir de células huésped de un agente que inhibe el TGF β indirectamente, como Losartan, se puede confirmar detectando una disminución en la producción de fibronectinas por células mesangiales expuestas al sobrenadante de células transfectadas, en relación a un
- 55 control. La expresión de genes codificadores de agentes degradantes de ECM se puede determinar utilizando, por ejemplo, un sistema *in vitro* mediante el empleo de células mesangiales cultivadas sobre un sustrato de ECM tal como MatrigelTM (Collaborative Research, Inc., Bedford, MA), que contiene los principales componentes de la matriz mesangial, incluyendo laminina, colágeno de tipo IV, entactina y heparán sulfato proteoglicano, tal como describen Baricos y col., Kidney Internatl. 47:1039-1047 (1995)). El sustrato de ECM

se radiomarca y la degradación de la ECMN por el producto de un gen expresado a partir de células huésped transfectadas se determina midiendo la emisión de radiactividad de la ECM en un medio libre de suero. Estos sistemas de ensayo también se pueden emplear para seleccionar agentes candidatos inhibidores del TGF β y degradantes de la ECM.

5 Administración de Agentes Inhibidores del TGF β y Agentes Degradantes de la ECM Acumulada

La combinación de agentes de acuerdo con la invención para inhibir el TGF β y agentes para degradar la ECM acumulada se suspende en vehículos farmacéuticos fisiológicamente compatibles, como solución salina fisiológica, solución salina tampón fosfato, o similares, con el fin de formar composiciones farmacéuticas acuosas fisiológicamente aceptables para administrarlas a un sujeto. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio y solución Ringer lactato. También se pueden añadir otras sustancias en la medida necesaria, como agentes antimicrobianos.

La combinación de agentes inhibidores del TGF β y agentes degradantes de la ECM se puede administrar juntos o por separado, simultánea o secuencialmente, para llevar a cabo los métodos de la invención.

Los modos de administración de la combinación de agentes inhibidores del TGF β y agentes degradantes de la ECM son los conocidos en la técnica de los agentes terapéuticos e incluyen las vías parenterales, por ejemplo intravenosa (por ejemplo para inhibidores de anticuerpos o proteasas), intraperitoneal, intramuscular, intradérmica y epidérmica, incluyendo subcutánea e intradérmica, la vía oral (por ejemplo renina de moléculas pequeñas y antagonistas del TGF β), o la aplicación en superficies de mucosas, por ejemplo mediante administración intranasal utilizando inhalación de suspensiones de aerosol, o mediante implante en músculos u otros tejidos del sujeto (por ejemplo, para transferencia genética de ácido nucleico que expresa renina y/o inhibidores del TGF β). También están previstos supositorios y preparaciones tópicas.

La combinación de agentes inhibidores del TGF β y agentes degradantes de la ECM se introduce en una cantidad suficiente para reducir la acumulación en exceso de matriz extracelular en tejidos y órganos susceptibles, incluyendo, de forma no exclusiva, tejido pulmonar y renal. Antes o después de la administración, en caso necesario se pueden utilizar agentes inmunosupresores prevenir o inhibir la respuesta inmunológica del sujeto a los vehículos que portan los inhibidores. Alternativamente, los vehículos que portan los agentes inhibidores del TGF β y degradantes de la ECM se pueden encapsular.

El modo de administración y el régimen de dosificación más eficaces para la combinación de agentes inhibidores del TGF β y agentes degradantes de la ECM a utilizar de acuerdo con la presente invención depende de la magnitud de la sobreproducción de TGF β , la gravedad de la acumulación de matriz extracelular y el deterioro resultante de la función del tejido o el órgano, la salud del sujeto, el historial médico previo, la edad, el peso, la altura, el sexo y la respuesta al tratamiento, y la opinión del médico que aplica el tratamiento. Por consiguiente, la cantidad de la combinación de agentes inhibidores del TGF β y agentes degradantes de la ECM a administrar, así como la cantidad y el ritmo de las administraciones subsiguientes, son determinadas por un profesional médico que dirige la terapia sobre la base de la respuesta del sujeto individual. Inicialmente, estos parámetros son determinados fácilmente por profesionales experimentados utilizando análisis apropiados en modelos animales para seguridad y eficacia, y en sujetos humanos durante ensayos clínicos de formulaciones terapéuticas candidatas. Ya se conocen modelos animales adecuados de estados fibróticos humanos (véase, por ejemplo, Border y Noble, *New Eng. J. Med.* 331:1286-1292 (1994), aquí incluido).

Después de la administración, la eficacia de la terapia mediante el empleo de la combinación de agentes de acuerdo con la invención se evalúa por diversos métodos, incluyendo biopsia de riñón, pulmón o hígado u otros tejidos para detectar la cantidad de matriz extracelular acumulada. La ausencia de una acumulación excesiva significativa de ECM, o una disminución de la cantidad o expansión de la ECM en el tejido u órgano indicará la respuesta terapéutica deseada en el sujeto. Preferiblemente, para detectar una respuesta terapéutica se utiliza un procedimiento no invasivo. Por ejemplo, los cambios en la actividad del TGF β se pueden medir en muestras de plasma tomadas antes y después del tratamiento con un inhibidor (véase Eltayeb y col., *J. Am. Soc. Nephrol.* 8:110A (1997)), y el tejido de biopsia se puede utilizar para aislar individualmente glomerulos afectados, que después se utilizan para aislamiento de ARN. Después se determinan transcripciones de ARNm para TGF β , y componentes de matriz extracelular (por ejemplo colágeno) utilizando reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) (Petén y col., *J. Exp. Med.* 176:1571-1576 (1992)).

Ventajas de la Invención

La invención proporciona un mejor tratamiento y prevención de estados fibróticos asociados con una sobreproducción de TGF β y una acumulación excesiva de ECM en tejidos y/u órganos que conducen a un deterioro de la función, o una cicatrización, mediante una reducción directa de la sobreproducción de TGF β y

la resultante de múltiples vías biológicas para inhibir eficazmente el componente inducido por TGF β de la deposición de matriz extracelular, y mediante una mayor degradación de la ECM utilizando agentes degradantes.

- 5 Los efectos terapéuticos de la invención son el resultado de una reducción de la acumulación excesiva de matriz extracelular en tejidos y/u órganos inducida por TGF β y, cuando se combina con agentes degradantes de la ECM, de un aumento de la degradación de la ECM con el tiempo.

Los siguientes ejemplos se presentan para demostrar el uso de acuerdo con la presente invención y para ayudar al experto en la materia a utilizarla. Los ejemplos no están concebidos en modo alguno para limitar de otra forma el alcance de la descripción de la protección otorgada por la Patente de Invención otorgada a ésta.

10 **Ejemplo I**
Demostración de que la renina aumenta el TGF β en células mesangiales humanas

- Células mesangiales humanas fetales normales (Clonetics Corp., Clonetics, Walkersville, MD) pasadas de 5 a 8 veces se dispusieron en placas de 12 pocillos (3.000 células/cm²) en 2 ml de medio (Mesangial Basal Medium (Clonetics Corp.) conteniendo un 5% de FCS, 10 μ g/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin) y se dejó que se desarrollaran hasta confluencia durante 48 horas a 37°C, 5% de CO₂. Los cultivos se lavaron tres veces utilizando una solución salina tampón fosfato estéril a temperatura ambiente y después 2 ml/pocillo de medio MBM libre de suero para inducir la quiescencia. Después de 48 horas, el medio libre de suero se retiró y se añadieron 2 ml/pocillo de medio fresco libre de suero. Luego se añadió a cada pocillo renina recombinante humana (Hoffman-La Roche Ltd., Basilea, Suiza) en concentraciones de 10⁻⁶ a 10⁻¹² M. Como controles se utilizaron un ensayo en blanco y 5 ng/ml de TGF β (R & D Systems, Minneapolis, MN). Las células y los sobrenadantes se recogieron por centrifugación después de 24 horas de cultivo y se congelaron a -70°C hasta el análisis. La producción y liberación total de TGF β en el sobrenadante de cultivo se midió utilizando un *kit* ELISA (R & D Systems). La inducción de PAI-1 y fibronectina en el sobrenadante también se midieron utilizando anticuerpos anti-PAI-1 y anti-fibronectina en un ELISA para obtener una confirmación adicional de la inhibición del TGF β . El ARNm de TGF β , fibronectina y PAI-1 se miden utilizando RT-PCR semicuantitativo. (1) Determinación de la Dependencia de la Dosis de la Inducción de TGF β por Renina

Como se muestra en la Figura 2, la renina aumenta la producción de TGF β por células mesangiales humanas cultivadas de un modo dependiente de la dosis.

30 **Ejemplo II**
Demostración del efecto de inhibición de la renina en la producción de TGF β por células mesangiales humanas

- En pocillos individuales se dispusieron por triplicado inhibidor de renina Ro42-5892 (Hoffman-LaRoche, Basilea, Suiza), LosartanTM (Merck Pharmaceuticals, West Point, PA), EnalaprilTM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Prod. n° E6888), o anticuerpo neutralizante de TGF β 1 (R & D Systems) en las cantidades abajo indicadas para bloquear la cascada de renina en diferentes lugares después de estimulación mediante renina:

- 10⁻⁵ M inhibidor de renina R042-5892 (Hoffman-LaRoche).
 30 ng/ml anticuerpo anti-TGF β 1 (R & D Systems, #AB 101 NA).
 30 ng/ml IgG de pollo (control para anticuerpo anti-TGF β 1 antibody, R & D Systems, # AB 101 C).
 10⁻⁵ M EnalaprilTM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).
 40 10⁻⁵ M LosartanTM (Merck Pharmaceuticals, West Point, PA).

Estos inhibidores se añadieron en el tiempo cero con 10⁻⁷M de renina recombinante humana (Hoffman-LaRoche).

- Como muestra la Figura 3, el uso de inhibidores que bloquean la acción de la renina para aumentar la Angiotensina II, es decir bloqueando la producción de Angiotensina I a partir de angiotensinógeno (Ro 42-5892), bloqueando la conversión de Angiotensina I en Angiotensina II (EnalaprilTM) y bloqueando la unión de Angiotensina II con su receptor de tipo I (LosartanTM), no reduce el aumento de la producción de TGF β inducido por renina. Estos resultados demuestran por primera vez una vía alternativa a través de la cual la renina estimula la producción de TGF β .

Ejemplo III**Demostración de la inhibición de TGFβ mediante el bloqueo de renina in vivo en presencia de un fármaco antifibrótico**

5 En este ejemplo, un fármaco conocido para enfermedad fibrótica, Enalapril™, que inhibe la producción de Angiotensina II, se combina con un inhibidor de renina, oligonucleótido de renina antisentido, para lograr un efecto terapéutico potenciado contra la enfermedad fibrótica en un modelo animal.

10 A unas ratas se les administra Enalapril™ en el agua para beber antes de una inyección de suero antitimocito, por ejemplo tres (3) días antes de la inyección. En el día 3 se inyecta a las ratas vía intravenosa anticuerpo antitimocito, por ejemplo OX-7, para producir enfermedad fibrótica (Bagchus y col., Lab. Invest. 55:680-687 (1986)). Una hora después de la administración de OX-7 se administran oligonucleótidos antisentido de renina introduciendo los oligonucleótidos en un vehículo adecuado, como liposomas HVJ, e inyectando las formulaciones en la arteria renal izquierda de ratas Sprague Dawley tal como ha sido descrito para genes de renina por Arai y col., Biochem. And Biophys. Res. Comm. 206(2):525-532 (1995), aquí incluido. También se inyecta en la arteria renal izquierda de otras ratas un control consistente en oligonucleótidos codificadores terminadores (por ejemplo derivados de la secuencia genética de renina antisentido). La renina antisentido se localiza en el aparato yuxtglomerular del glomérulo, donde se produce la renina, bloqueando la producción de renina.

20 Los animales son sacrificados el día 7 y se toman muestras de tejido renal para analizar los niveles de TGFβ en los glomérulos. Los glomérulos de cada rata se criban individualmente y se ponen en cultivo en un medio adecuado durante tres días. Al final del cultivo, el sobrenadante de cultivo se recoge por centrifugación y se determina la producción de TGFβ, fibronectina y PAI-1 como marcadores de la gravedad de la enfermedad renal fibrótica. También se reúnen otros glomérulos, que se utilizan para aislar ARN. El ARN se utiliza mediante métodos estándar para cuantificar la expresión de ARNm de interés, incluyendo TGFβ, fibronectina y colágenos.

25 También se examinan histológicamente glomérulos para comprobar cambios fenotípicos, por ejemplo cambios resultantes de la deposición para ECM. Los cambios fenotípicos están asociados con alteraciones patológicas de glomérulos indicativas de enfermedad fibrótica. Estos cambios incluyen la expansión de matriz extracelular en el área mesangial del riñón en modelos animales y la presencia de células mesangiales activadas que han adquirido las características de fibroblastos, por ejemplo expresando actina de músculo liso α y colágeno intersticial, lo que indica una lesión glomerular progresiva (Johnson y col., J. Am. Soc. Nephrol. 2:S190-S197 (1992)). Para la microscopía óptica, el tejido se fija en formaldehído, después se deshidrata en etanol graduado y se integra en parafina. Luego se cortan secciones de 3 μm de espesor y se tiñen con el reactivo de Schiff periódico. La sección renal fijada en paraformaldehído de las ratas también se incuba con anticuerpo monoclonal de renina antihumana (Kaiichi Radioisotope Labs, Ltd., Tokio, Japón), anticuerpo monoclonal antiactina de músculo liso α de ratón (Immunotech S. A. (Marsella, Francia) y anticuerpos anticolágeno de conejo (Chemicon, Temicula, CA, prod. nº AB755). Las secciones se procesan adicionalmente utilizando el Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA).

Los resultados de unión de anticuerpo indican la magnitud de la lesión glomerular y los efectos de la inhibición de la renina en dicha lesión.

40 **Ejemplo IV****Demostración adicional de que la renina aumenta la producción de TGFβ en células mesangiales humanas**

45 A partir de tejidos de nefrectomía humanos se desarrollaron cultivos primarios de células mesangiales humanas de adulto utilizando métodos estándar. Las células se sometieron a 4-7 pasadas y después de dispusieron en placas de 12 pocillos (3.000 células/cm²) en 2 ml de medio (Mesangial Basal Medium (Clonetics Corp.) que contiene un 5% de FCS, 10 μg/ml de penicilina y 100 μg/ml de estreptomycin) y se dejaron crecer hasta un 70% de confluencia durante 48 horas a 37°C, 5% de CO₂. Los cultivos se lavaron tres veces utilizando solución salina tampón de fosfato estéril a temperatura ambiente y después 2 ml/pocillo de medio MBM libre de suero para inducir la quiescencia. Después de 48 horas, el medio libre de suero se retiró y se añadieron 2 ml/pocillo de medio fresco libre de suero durante 24 horas. Luego se añadió a cada pocillo renina recombinante humana (HrRenin, Hoffman-La Roche Ltd., Basilea, Suiza) en concentraciones de 10⁻⁶ a 10⁻¹² durante 24 horas. Como control se utilizó un ensayo en blanco (sin HrRenina). Las células y sobrenadantes se recogieron por centrifugación después de 24 horas de cultivo y se congelaron a -70°C hasta su análisis.

55 La producción y liberación total de TGFβ en el sobrenadante de cultivo se midió utilizando un *kit* ELISA (R & D Systems). La inducción de la proteína de matriz fibronectina (Fn) en el sobrenadante se midió utilizando anticuerpos antifibronectina en un ELISA para confirmar adicionalmente la inducción de TGFβ. La inducción

de ARNm de TGF β , fibronectina y PAI-1 se midió con el tiempo utilizando RT-PCR semicuantitativa en un sistema múltiple en el que múltiples ADNc se amplifican simultáneamente de acuerdo con Dostal y col., Anal. Biochem. 223:239-250 (1994), aquí incluido. Las determinaciones se realizaron por triplicado en cultivos de células mesangiales.

5 (1) Determinación de la Dependencia de la Dosis de la Inducción de TGF β por Renina

Como muestra la Figura 4, se observaron aumentos dependientes de la dosis estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en la producción de TGF β (Figura 4A) y Fn (Figura 4B), alcanzando valores máximos de aumento por un factor 2 y un factor 1,4 con 10^{-6} M HrRenina, respectivamente. Los experimentos con el tiempo utilizando 10^{-7} M HrRenina revelaron aumentos significativos de la producción de TGF β y Fn a las 24 y las 48 horas ($p < 0,03$) (Figuras 5A y B). Como muestran las Figuras 6A-C, los aumentos inducidos por renina de los ARNm de TGF β , PAI-1 y Fn alcanzaron sus valores máximos a las 4 horas con aumentos en factores de 1,5 a 2.

(2) Demostración de que el aumento de la producción de TGF β por la renina no está mediado por actividad enzimática de renina o por angiotensina II

15 En pocillos individuales se dispusieron por triplicado inhibidor de renina Ro42-5892 (Hoffman-LaRoche, Basilea, Suiza), LosartanTM (Merck Pharmaceuticals, West Point, PA), EnalaprilTM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Prod. n° E6888), o anticuerpo neutralizante de TGF β 1 (R & D Systems) en las cantidades abajo indicadas para bloquear la cascada de renina en diferentes lugares después de estimulación mediante renina:

20 10^{-5} M inhibidor de renina R042-5892 (Hoffman-LaRoche).
 10^{-5} M EnalaprilTM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).
 10^{-5} M LosartanTM (Merck Pharmaceuticals, West Point, PA).

Los controles incluían anticuerpo neutralizante de TGF β (ATG) e IgG de control (TgG).

Estos inhibidores se añadieron en el tiempo cero con 10^{-7} M de renina recombinante humana (Hoffman-LaRoche).

25 Como muestra la Figura 7, el uso de inhibidores que bloquean la acción de la renina para aumentar la Angiotensina II, es decir, bloqueando la producción de Angiotensina I a partir de angiotensinógeno (Ro 42-5892), bloqueando la conversión de Angiotensina I en Angiotensina II (EnalaprilTM) y bloqueando la unión de Angiotensina II con su receptor de tipo I (LosartanTM), no reduce el aumento de la producción de TGF β inducido por renina.

30 Estos resultados proporcionan una evidencia adicional de que la renina aumenta la producción del TGF β por células mesangiales humanas a través de un mecanismo que es independiente de la acción enzimática de la renina para convertir Angiotensina en Angiotensina I, e independiente de la generación de Angiotensina II. Estos resultados pueden tener implicaciones profundas para la progresión de la enfermedad renal fibrótica, en particular en estados de alto contenido de renina en plasma tal como se observa con bloqueo terapéutico de Angiotensina II. Por consiguiente, los agentes terapéuticos tales como EnalaprilTM o LosartanTM utilizados para el bloqueo de la Angiotensina pueden no ser óptimos como agentes de tratamiento, ya que conducen a altos niveles de renina, lo que impide una reducción terapéutica del TGF β . Además, no es de esperar que antagonistas desarrollados para bloquear el sitio sobre la renina que actúa en la vía de la Angiotensina II bloqueen la acción de la renina que es independiente de esta vía. Por tanto, una terapia efectiva para las enfermedades fibróticas debe tener en cuenta estas múltiples vías de aumento del TGF β .

Ejemplo V

Demostración de la capacidad del tPA para aumentar la degradación de plasmina de ECM acumulada *in vivo*

45 En este ejemplo se demostró que el activador de plasminógeno de tipo tisular recombinante (tPA) promueve la generación de la proteasa plasmina en glomérulos nefríticos y degrada proteínas de ECM patológicas, conduciendo a una reducción terapéutica de la acumulación de matriz.

50 A seis ratas Sprague-Dawley se les inyectó solución salina tampón de fosfato (PBS, como control) y a 18 ratas se les inyectaron 300 μ g de anticuerpo OX7 monoclonal de ratón producido en el laboratorio utilizando células de hibridoma adquiridas comercialmente (American Type Culture Collection (Rockville, MD, EEUU; Peters y col., Kidney Internatl. 54:1570-1580 (1998)) el día 1 para inducir una nefritis anti-Thy-1. La inyección intravenosa de anticuerpo anti rata-timocito provoca la unión con un epítipo en células mesangiales glomerulares de rata llamado Thy 1.1. La subsiguiente lisis de células mesangiales mediada por complemento inicia una cascada de lesión tisular, seguida por un proceso de reparación que implica la inducción de producción dirigida de TGF β y la deposición de componentes de ECM. Además, el sistema de

plasmina proteasa se altera de tal modo que el PA disminuye y el PAI-1 aumenta notablemente. Estas alteraciones favorecen la disminución de la generación de plasmina, lo que reduce el recambio de la matriz y aumenta la acumulación de la misma. La plasmina es la clave del recambio de la matriz celular mesangial (Baricos y col., *Kidney Int.* 47:1037-1047 (1995)).

- 5 Tres días después de la inyección inicial se inyectó vía intravenosa tPA (Genentech, Inc., San Francisco, CA) en una formulación diseñada para inyección intravenosa en roedores (GenBank EO8757) o PBS. Las inyecciones se repitieron dos veces al día desde el día 3 hasta el día 5. El tPA se inyectó vía intravenosa en una dosis de 1 mg/kg de peso corporal (n'6). Los controles recibieron solución salina (n'6). El día 6 se evaluaron tinciones glomerulares para proteínas de matriz ECM (colágeno de tipo I y III, fibronectina EDA+ y tenascina) y los niveles de ARNm glomerular de TGFβ1, fibronectina y PAI-1. Se investigó la localización del tPA en glomérulos nefríticos y el efecto del tPA en plasmina glomerular. Las ratas fueron sacrificadas el día 6 y se les extirparon tejidos renales, que se fijaron en formalina y se congelaron para análisis histológicos.

Tabla 1

Grupos de seis ratas	Tratamiento
Grupo 1 - controles normales	300 µg de PBS el día 1, después 300 µg de PBS 2X
Grupo 2 - enfermedad de control	300 µg de OX7 el día 1, después 300 µg de PBS 2X
Grupo 3 - Enfermedad + dosis 1	300 µg de OX7 el día 1, después 0,25 mg/día de tPA 2X/día en los días 3, 4 y 5

- 15 Las secciones de tejido renal se tiñeron para matriz extracelular utilizando ácido peryódico de Schiff (PAS) mediante procedimientos estándar y se tiñeron para proteínas de matriz relevantes específicas tales como colágeno I, colágeno IV, fibronectina EDA y tenascina utilizando procedimientos de tinción inmunohistoquímica estándar. Las proteínas de matriz se puntuaron mediante análisis de imágenes de 30 glomérulos por rata.
- 20 Las Figuras 8A (control) y B (tPA) muestran una disminución general de la matriz acumulada como resultado del tratamiento con tPA. En comparación con el grupo de enfermedad de control no tratado (Figura 9A-D), el porcentaje del área glomerular con tinción positiva era considerablemente menor en el grupo tratado con tPA el día 6 en cuanto a fibronectina EDA+(FN) (19 ± 2 frente a 14 ± 1 , $p < 0,01$), laminina (35 ± 2 frente a 25 ± 2 , $p < 0,001$), colágeno de tipo I (33 ± 1 frente a 21 ± 3 , $p < 0,001$) y colágeno de tipo IV (27 ± 2 frente a 23 ± 1 , $p < 0,01$). Los niveles glomerulares de ARNm de TGFβ, FN y PAI-1 estaban inalterados (Figura 10), el tPA se localizó junto con fibrina a lo largo de los bucles capilares glomerulares y en el mesangio.

- 30 A unas ratas nefríticas se les inyectó tPA 10, 20 y 30 minutos antes de sacrificarlas. Al sacrificarlas se aislaron glomérulos, que se dispusieron en cultivo con un sustrato cromogénico para tPA. La generación de plasmina por glomérulos nefríticos, como muestra la Figura 11, era considerablemente mayor en los glomérulos nefríticos tratados con tPA que en los glomérulos nefríticos de ratas de enfermedad de control.

Este ejemplo demuestra que el tPA inyectado se une a fibrina en glomérulos nefríticos, donde aumenta la generación de plasmina y promueve la degradación de la ECM patológica. Por consiguiente, el tPA puede ser utilizado en los métodos de la invención como agente degradante de la ECM.

Ejemplo VI

- 35 **Efecto de la administración de agentes inhibidores del TGFβ y agentes que promueven la degradación de la ECM**

En este ejemplo, al menos un agente que inhibe el TGFβ, anticuerpo anti-TGFβ o decorina, se administra en combinación con un agente degradante de la ECM, como tPA para reducir el exceso de acumulación de ECM y degradar la ECM acumulada en un modelo animal de glomerulonefritis.

- 40 Unas ratas Sprague-Dawley se tratan tal como se describe más arriba en los ejemplos para inducir nefritis. Unos grupos de seis (6) ratas cada uno incluyen controles de enfermedad no tratados, ratas tratadas con tPA solo como en el Ejemplo V, arriba descrito, ratas tratadas con Enalapril™ solo (200 mg/día) en el agua para beber y ratas tratadas con tPA intravenoso y con Enalapril™ en el agua para beber. El día 6, las ratas son sacrificadas y se les extirpan secciones de riñón, que se fijan en formalina y se congelan para análisis histológicos.
- 45 Los glomérulos se aíslan y se utilizan para análisis *in vitro* de la producción de TGFβ, fibronectina y PAI-1 utilizando ensayos ELISA de sobrenadantes de cultivo y para aislar ARN para análisis Northern de niveles de mensaje de TGFβ, fibronectina y PAI-1. Las muestras de tejido se tiñen para proteínas de ECM y niveles de ARNm glomerular de TGFβ1, fibronectina y PAI-1.

- 50 Es de esperar que los resultados de los tratamientos con anticuerpo anti-TGFβ y con tPA presenten considerablemente menos tinción positiva tanto en tejido teñido con PAS como en glomérulos teñidos para

componentes de matriz específicos, tal como muestra el Ejemplo V, en comparación con grupos tratados solo con agente o el grupo de enfermedad de control.

Ejemplo VII

5 Demostración de los efectos de la administración de un mutante PAI-1 en la degradación de matriz extracelular

10 El mutante de PAI-1 humano utilizado en este experimento (véase el documento WO 97/39028) se construyó en base al PAI-1 natural (Ginsburg y col., J. Clin. Invest. 78:1673-1680 (1986)), y se desactivó mediante la introducción de dos residuos Arg en las posiciones 333 y 335 de la proteína madura, que también se denominan residuos P14 y P12 del bucle central reactivo (Lawrence, Adv. Exp. Med. Biol. 425:99-108 (1997)). Después de la interacción con una proteinasa, estas sustituciones retardan en gran medida la inserción del bucle central reactivo en β -lámina A e impiden que el mutante adopte la conformación latente. Dado que la inserción de bucle resulta en una pérdida de afinidad por la vitronectina (Lawrence y col., 1997, *supra*), el mutante de PAI-1 conserva una actividad de vitronectina significativa y al mismo tiempo no puede inhibir todos los activadores de plasminógeno.

15 Se trataron ratas Sprague-Dawley macho de cuatro a seis semanas de edad (Sasco, Inc., Omaha, NE) tal como se describe en los ejemplos anteriores para inducir nefritis anti-thy-1 mediante inyección intravenosa del anticuerpo antitimocito monoclonal OX-7 en dosis de 350 mg/200 g de peso corporal. Unos grupos de seis (6) ratas incluían un grupo de control normal (al que se le inyectó solución salina), un grupo de enfermedad de control no tratado (al que se le inyectó PBS) y un grupo tratado con 1 mg/kg de PAI-1 inyectado una vez al día comenzando 24 horas después de la inducción de nefritis ATS y finalizando el día 5. Otros dos grupos de ratas se trataron con 1) 100 mg/litro de Enalapril (en el agua para beber) con una dosis de carga de Enalapril administrada mediante alimentación forzada 24 horas después de la inducción de la enfermedad seguida de 100 mg/litro de Enalapril en el agua para beber, y 2) un 6% de dieta baja en proteínas (Teklad, Madison, WI, número de dieta TD86551) iniciada 24 horas después de la inducción de la enfermedad.

25 Las ratas fueron sacrificadas el día 6 y se les extirparon tejidos renales, que se fijaron en formalina y se congelaron para análisis histológicos. Los riñones fueron sometidos a perfusión *in situ* con solución salina tamponada (PBS) fría, pH 7,4, y después se extirparon. Luego se retiraron trozos de corteza y se sometieron a congelación rápida en 2-metilbutano que había sido enfriado en nitrógeno líquido o se fijaron en un 10% de formalina neutralizada para examen inmunohistológico. Las cápsulas se retiraron y el tejido cortical se diseccionó y se picó con una cuchilla antes de aislar los glomérulos mediante cribado graduado estándar. Las secciones de tejido renal se tiñeron para matriz extracelular utilizando ácido peryódico de Schiff (PAS) mediante procedimientos estándar y se tiñeron para proteínas de matriz relevantes específicas tales como colágeno I, colágeno IV, fibronectina EDA y tenascina utilizando procedimientos de tinción inmunohistoquímica estándar. Las proteínas de matriz fueron puntuadas por un observador de modo ciego. Se evaluaron 20 glomérulos por rata. También se utilizaron glomérulos aislados para determinar los niveles de ARNm glomerular de TGF β 1, fibronectina y PAI-1 el día 6.

40 Los reactivos para medir la actividad de plasmina, incluyendo plasminógeno, u-PA de bajo peso molecular y H-D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilida (S-2251) se obtuvieron de KabiVitrum (Franklin, OH). La actividad de PAI-1 se analizó midiendo la hidrólisis de sustrato sintético mediante plasmina formada en presencia de plasminógeno (Marshall y col., J. Biol. Chem. 265:9198-8204 (1990)). Los ensayos se llevaron a cabo en placas de microtitulación de cloruro de polivinilo. El volumen total de 125 μ l estaba formado por lo siguiente: muestra, H-D-Val-Leu-Lys-P-nitroanilida (0,01 μ M) y plasminógeno (0,03 μ M) en 0,5% Triton X-100, Tris 0,1 M, pH 8,0. La cantidad de p-nitroanilina liberada se midió a 410 nm con un lector de microplacas Thermomax (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Con cada ensayo se generó una curva estándar utilizando u-PA humano de bajo peso molecular. Cada muestra se ensayó además sin plasminógeno para establecer en qué medida la actividad enzimática depende del plasminógeno. La actividad de plasmina en sobrenadante de cultivo o en lisado celular se expresó como IU/1000 glomérulos.

50 La Figura 12 muestra un aumento en la generación de plasmina de glomérulos en cultivo como resultado de la inyección del mutante de PAI-1. En comparación con el grupo de enfermedad de control no tratado, la actividad de plasmina glomerular era considerablemente mayor en grupo tratado con PAI-1, estando aproximadamente a medio camino entre la actividad de los grupos de enfermedad de control y los glomérulos normales. En particular, el aumento significativo de la actividad de plasmina glomerular en glomérulos nefríticos se observó con el mutante de PAI-1 24 horas después de la inyección final.

55 Además, el tratamiento con el mutante de PAI-1 resultó en una reducción de la acumulación de colágeno de tipo I en relación con los grupos de enfermedad de control (Figura 13), mientras que los niveles glomerulares de TGF β 1, FN, PAI-1, ARNm y ARNm de colágeno I no variaron significativamente. La disminución de la acumulación de colágeno de tipo I junto con el hecho de que el ARNm de colágeno I no disminuye significativamente sugiere una potenciación de la degradación de matriz extracelular más que una disminución de la producción de colágeno I.

- Estos resultados sugieren que el aumento de la actividad de plasmina glomerular con un mutante de PAI-1 se puede titular para evitar grandes aumentos de la generación de plasmina que pueden conducir a hemorragias. Por consiguiente, la dosis del mutante de PAI-1 se puede variar, por ejemplo doblando la dosis, para aumentar la actividad de plasmina glomerular a niveles normales, pero no excesivos, con el fin de disminuir la acumulación nociva de matriz extracelular. Además, el tiempo de tratamiento se puede prolongar, por ejemplo a 10 días, para obtener la degradación deseada.

Ejemplo VIII

Efectos Antifibróticos Potenciados Obtenidos Combinando Inhibición del TGF- β y Bloqueo de la Angiotensina II

- 10 Para investigar el potencial antifibrótico de diferentes dosis del anticuerpo monoclonal anti-TGF- β 1, β 2 y 133 de ratón, 1D11, para reducir la enfermedad se utilizó un modelo de ratón de glomerulonefritis aguda inducida mediante inyección de anticuerpo anti-Thy1. Después se comparó la dosis con eficacia máxima del 1D11 con la dosis de eficacia máxima previamente determinada del ACEI, Enalapril. Finalmente se determinó si la combinación del anticuerpo y Enalapril en las dosis máximamente terapéuticas podían disminuir adicionalmente la enfermedad.

Materiales

El anticuerpo anti-TGF- β , 1D11, que neutraliza isoformas TGF- β 1, β 2 y β 3, fue suministrado por Cambridge Antibody Technology (Granta Park CB1 6GH, Cambridgeshire, Reino Unido) y Genzyme Corporation (Cambridge, MA, EEUU).

- 20 A no ser que se indique otra cosa, los materiales, productos químicos o medios de cultivo se compraron en Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EEUU).

Animales

- 25 Estos experimentos se llevaron a cabo en ratas Sprague Dawley macho (200-250 g) obtenidas de la colonia Sasco de Charles River Laboratories (Wilmington, MA, EEUU). El alojamiento y cuidado de los animales fueron conforme a la NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Publicación NIH n° 85-23, 1985. Los animales fueron alimentados con una dieta de proteína normal (22% de proteína, Teklad n° 86 550, Teklad Premier Laboratory Diets, Madison, WI, EEUU). La glomerulonefritis se indujo mediante inyección en la vena causal de 2,25 mg/kg del anticuerpo anti-Thy 1.1 monoclonal OX-7 (NCCC, Biovest International Inc, Minneapolis, MN, EEUU). El OX-7 se une a un epitopo similar a Thy-1 sobre la superficie de células mesangiales, provocando una lisis celular dependiente de complemento seguida por una reparación tisular fibrótica (Bagchus y col., Lab Invest. 55:680-687 (1986)). A los animales de control se les inyectaron volúmenes similares de solución salina tampón de fosfato (PBS).

Métodos

- 35 Se llevó a cabo un experimento para determinar el intervalo de dosis eficaz de anticuerpo 1D11 en la glomerulonefritis anti-Thy 1. Se administraron dosis de 0,05 - 5 mg/kg de 1D11 a 10 grupos de 4 ratas. en base a los resultados se llevó a cabo un experimento mayor.

- 40 Se asignaron grupos de 8 ratas y se trataron tal como se perfila en la Tabla 2. Las dosis de Enalapril por encima de 100 mg/ml en agua para beber presentan la eficacia máxima en este modelo (Peters y col., Kidney Int. 54:1570-1580 (1998)). Aquí se utilizó una dosis de 200 mg/ml. El tratamiento con Enalapril comenzó 24 horas después de la inducción de la enfermedad. En ese momento, sobre la base de un consumo de agua de 40 ml al día, un 60% de la dosis diaria se administró por alimentación forzada tal como se describe más arriba (Peters y col., *supra*). Los resultados indicaban que la respuesta de dosis estaba en el intervalo de 0,01 - 5 mg/kg; las dosis de 0,5 y 5,0 mg/kg de 1D11 produjeron una reducción máxima de la acumulación de ECM, de modo que estas dosis se utilizaron en combinación con Enalapril, en grupos 8 y 9.

- 45 Seis días después de la inducción de la glomerulonefritis, los animales fueron anestesiados con isoflurano. Después de una incisión abdominal en línea media se extrajeron 5-10 ml de sangre de la aorta abdominal inferior y a continuación los riñones fueron sometidos a perfusión con 30 ml de PBS helado. Para los exámenes histológicos un tejido cortical se sometió a congelación rápida y se fijó en 10% formalina tamponada neutra. Después se aislaron glomérulos de ratas individuales mediante una técnica de cribado graduado (cribas metálicas de malla 150, 125 y 75 μ m) tal como se ha descrito anteriormente (Okuda y col., J.Clin.Invest. 86:453-462 (1990)), y se resuspendieron a razón de 5000 glomérulos/ml/pocillo en RPMI complementado con 0,1 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina y tampón HEPES 25 mM. Después de 48 horas de incubación a 37°C/5% CO₂, el sobrenadante se recogió y se conservó a -70°C hasta el análisis de la producción glomerular de fibronectina (FN), inhibidor de activador de plasminógeno de tipo 1 (PAI-1) y TGF- β 1.

Medida de la Fibronectina, PAI-1 y TGF- β 1

La síntesis de fibronectina y PAI-1 se midió con ensayos ELISA modificados de acuerdo con métodos publicados (Rennard y col., Anal Biochem 104:205-214 (1980)). La producción de TGF- β 1 de glomérulos cultivados se midió después de activación con ácido utilizando un *kit* ELISA comercialmente disponible (DuoSet®, R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se analizaron tres muestras de cada rata.

Microscopía Óptica

Todos los exámenes microscópicos se llevaron a cabo de modo ciego. Unas secciones de 3 μ m de tejido insertado en parafina se tiñeron con ácido peryódico de Schiff (PAS) y se evaluó la expansión de matriz glomerular tal como se ha descrito más arriba (Okuda y col., *supra*). En resumen, en 30 glomérulos de cada rata se evaluó el porcentaje de matriz mesangial que ocupaba cada glomérulo con el siguiente resultado: 0' 0%, 1' 25%, 2' 50%, 3' 75% y 4' 100%.

Tinción Inmunofluorescente

Un anticuerpo de colágeno I antihumano de cabra se obtuvo en Southern Biotechnology Associates Inc. (Birmingham, AL, EEUU). Una IgG anticabra de conejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se utilizó como anticuerpo secundario (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, EEUU). Una fibronectina EDA⁺ anticelular de ratón monoclonal se obtuvo de Harlan Sera-Lab LTD (Loughborough, LE12 9TE, Inglaterra). Una IgG(H+L) antirratón F(ab')₂ FITC-rata se utilizó como anticuerpo secundario (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, EEUU). Un anticuerpo de monocito/macrófago antirrata de ratón conjugado con FITC (ED1) se obtuvo de Serotec (Oxford, Reino Unido).

El tejido renal se sometió a congelación rápida en 2-metilbutano que había sido previamente enfriando a -80°C. Utilizando un criostato (Leica CM 1800, E LICHT Company, Denver, CO, EEUU) se obtuvieron secciones de cuatro micrómetros. Los tejidos se secaron al aire y se fijaron en alcohol, se lavaron con PBS, pH 7,4, se incubaron con los anticuerpos primarios, se lavaron con PBS, se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con FITC apropiados, se lavaron de nuevo y se montaron con cubreobjetos utilizando Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates Inc, Birmingham, AL, EEUU).

La intensidad de la tinción glomerular de colágeno I y fibronectina se evaluó de acuerdo con una escala del 0 al 4, que ya ha sido descrita previamente de forma detallada (Yamamoto y col., Kidney Int. 49:461-469 (1996)). Se contó el número de células por glomérulo con tinción positiva en cuanto al marcador de monocito/macrófago ED1. Se evaluaron treinta glomérulos por muestra. Se calcularon los valores medios con valores de error estándar.

Preparación de ARN e Hibridación *Northern*

En primer lugar se extrajo ARN total mediante un método de isotiocianato de guanidinio utilizando reactivo Trizol® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN de 8 ratas de cada grupo se reunió para su posterior examen. Para el análisis *Northern*, el ARN se desnaturalizó y fraccionó por electroforesis a través de un gel de agarosa al 1,0% (30 μ g/pista) y se transfirió a una membrana de nylon (BrightStar™-Plus, Ambion Inc., Austin, TX, EEUU). Los ácidos nucleicos se inmovilizaron por radiación UV (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU). Las membranas se prehibridaron con tampón ULTRAhyb™ (Ambion Inc.) y se hibridaron con sondas de ADN marcadas con ³²P-dATP mediante cebado con oligonucleótido aleatorio (Strip-EZ DNA™, Ambion Inc.). Las membranas se lavaron en 2 X SSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente durante 10 minutos y 0,1 X SSC, 0,1% SDS a 42°C durante 15 minutos 2 veces. Las sondas de ADN utilizadas fueron: 1) 18S de ratón (ATCC, Manassas, VA, EEUU), 2) ADNc α ₁ procolágeno de rata (suministrado por el Dr. D. Rowe (Genovese y col., Biochem. 23:6210-6216 (1984)), 3) ADNc de fibronectina-EDA (suministrado por el Dr. R.O. Hynes) (Schwarzbauer y col., Cell 35:421-431 (1983)), 4) ADNc de PAI-1 (suministrado por el Dr. T. D. Gelehrter) (Zeheb y col., Gene 73:459-468 (1988)), y 5) ADNc de TGF- β 1 (suministrado por el Dr. H. Moses), (Derynck y col., J. Biol. Chem. 261:4377-4379 (1986)). Con cada sonda se realizaron tres transferencias. Las señales autorradiográficas obtenidas con la sonda de ADNc de 18S sirvieron como controles para una carga igual del gel. Las autorradiografías se exploraron en un densitómetro de formación de imágenes BIO-RAD GS-700 (BIO-RAD Laboratories Inc, Hercules, CA, EEUU). Los cambios en los niveles de ARNm se determinaron corrigiendo en primer lugar la intensidad densitométrica de 18S de cada muestra. En comparación, esta relación se estableció como unidad para las muestras de control normales y otras pistas del mismo gel se expresaron como aumentos en relación con este valor.

Western Blot

Los glomérulos de ratas individuales se aislaron y resuspendieron a razón de 2 x 10⁴ glomérulos/ml en tampón RIPA (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 1% Nonidet P-40, 0,5% desoxicolato, 0,1% SDS y 1

5 tableta/5 ml de Mix inhibidor de proteasa [Completo, mini; Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, EEUU], 50 ml/5 ml cóctel inhibidor de fosfatasa II [Sigma]). Los glomérulos se homogenizaron dos veces sobre hielo por sonicación. A cada 15 segundos de sonicación les seguían 15 segundos de enfriamiento. Después de dos centrifugaciones a 10.000xg durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se conservó a -70°C hasta su análisis. Cuarenta µl de cada sobrenadante se separaron mediante electroforesis por gel de Tris-glicina al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (Millipore, Bedford, MA, EEUU). La unión no específica se bloqueó mediante un 10% de leche en polvo no grasa en solución salina tampón de fosfato (TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente seguida de una incubación a 4°C durante la noche con anticuerpo primario (Anti-Phospho-Smad2, Upstate, Lake placid, NY, EEUU, dilución 1:500 en 5% BSA en TBS/0,1% Tween-20 con 0,02% NaN₃; o Anti-β-actina, Sigma, dilución 1:10.000). La membrana se lavó tres veces durante 10 minutos en TBS/0,1% Tween-20. El segundo anticuerpo, peroxidasa de rábano silvestre anticonejo de cabra o peroxidasa de rábano silvestre antirratón de cabra (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, EEUU), se incubó en una dilución 1:2.000 durante una hora más a temperatura ambiente seguido de tres lavados tal como se describe más arriba. Los anticuerpos unidos se detectaron revelando la membrana en reactivos de detección por transferencia *Western ECL*TM (Amersham Pharmacia Biotech) durante 1 minuto. La cuantificación de las bandas en autorradiogramas se llevó a cabo un densitómetro de formación de imágenes BIO-RAD GS-700. Los cambios en los niveles de p-Smad2 se determinaron corrigiendo la intensidad densitométrica de β-actina de cada muestra.

Análisis Estadístico y Cálculo de la Reducción Porcentual de la Gravedad de la Enfermedad

20 Los datos se expresan como la media ± error típico de la media. Los análisis estadísticos de las diferencias entre los grupos se llevaron a cabo mediante ANOVA y análisis subsiguiente de Student-Newman-Keuls o Dunnett para comparación múltiple o, en el caso de la puntuación con PAS, colágeno I y tinción de inmunofluorescencia de fibronectina, las diferencias entre los grupos se examinaron utilizando análisis de rangos mediante Kruskal-Wallis con análisis posterior de Dunn. Los valores medios o medianos se consideraron significativamente diferentes cuando P < 0,05.

El aumento inducido por enfermedad en una variable se definió como el valor medio del grupo de enfermedad de control menos el valor medio del grupo de control normal. La reducción porcentual de la gravedad de la enfermedad en un grupo tratado se calculó de la siguiente manera:

$$30 \left[\frac{\text{Media del grupo de enfermedad de control} - \text{Media del grupo control tratado}}{\text{Media del grupo de enfermedad de control} - \text{Media del grupo control normal}} \right] \times 100$$

Resultados

35 En estos experimentos se plantearon tres preguntas. En primer lugar, ¿el 1D11 es eficaz en este modelo de nefritis y es posible determinar la dosis con eficacia máxima del 1D11? En segundo lugar, ¿Cómo es la comparación de esta dosis con los efectos observados con dosis máximas de Enalapril? Y en tercer lugar, se puede observar la aditividad del Enalapril y el 1D11 si se administran los dos en las dosis con eficacia máxima?

Efecto del 1D11

40 La inducción de la enfermedad mediante la administración de OX-7 produjo una rápida acumulación de matriz extracelular en glomérulos medida mediante tinción con PAS. La Figura 14 muestra glomérulos representativos de este estudio. El aumento de la matriz extracelular inducido por la enfermedad se puede ver comparando las Figuras 14A (control normal) y 14B (enfermedad de control). Las dosis crecientes de 1D11 (0,05 mg/kg - 5,0 mg/kg), mostradas en las Figuras 14D - 14F, revelan una clara disminución del material positivo en relación con PAS con dosis crecientes de 1D11. Para cuantificar este efecto histológico del 1D11 en la acumulación de matriz extracelular se puntuaron 30 glomérulos por animal y se halló la media de las puntuaciones de cada animal y después de cada grupo. Este análisis, presentado gráficamente en la Figura 15A, indica que el 1D11 produce una reducción dependiente de la dosis de la tinción con PAS. En ratas tratadas con 0,5 mg/kg de 1D11 se observó una reducción moderada pero significativa (p < 0,05) de aproximadamente un 56% en comparación con animales con enfermedad de control.

50 Para determinar la contribución de proteínas de matriz específicas al material positivo en relación con el PAS se llevó a cabo una tinción inmunofluorescente para proteínas glomerulares específicas. Las Figuras 16 y 17 muestran glomérulos representativos teñidos para fibronectina EDA⁺ y colágeno de tipo I. De nuevo se observó un aumento espectacular de la tinción para proteínas de matriz en los animales con enfermedad de control (Figuras 16B y 17B) (aumento hasta un factor 13 en el caso del colágeno y un factor 3,6 en el caso de la fibronectina) en comparación con animales de control normal (Figuras 16A y 17A). El tratamiento con 1D11

5 produjo disminuciones dependientes de la dosis de la acumulación de fibronectina EDA⁺ y colágeno I en glomérulos, que se ven claramente al comparar glomérulos de enfermedad de control (Figuras 16B y 17B) con las dosis crecientes de 1D11 mostradas en las Figuras 16C-F y 17C-F. Como en el caso de las puntuaciones con PAS, se halló la media de todas las puntuaciones de tinción, que se presenta gráficamente en las Figuras 15B y 15C. Las dosis de 0,5 mg/kg y 5 mg/kg de 1D11 redujeron la deposición tanto de fibronectina EDA⁺ como de colágeno I entre un 32% y un 36%. Sin embargo, estos cambios no eran significativos.

10 La síntesis glomerular de proteínas de interés se determinó mediante ELISA en sobrenadantes de cultivo de glomérulos aislados cultivados durante 48 horas. De nuevo, tal como muestra la Figura 18, el tratamiento con 1D11 provocó una reducción relacionada con la dosis de estos marcadores de enfermedad. Con una dosis de 1D11 de 5 mg/kg, los niveles de FN, PAI-1 y TGF-β1 se redujeron en un 54%, un 115% y un 67%, respectivamente (P < 0,05).

15 Las Figuras 19 y 20 muestran expresión de ARNm glomerular de fibronectina EDA⁺, colágeno I, PAI-1 y TGF-β1. En la Figura 19 se muestran transferencias para un gel. La Figura 20 muestra gráficamente la media±error típico de los valores de densitometría obtenidos de exploraciones de estos geles. El tratamiento con 1D11 redujo la expresión genética de ARNm de fibronectina EDA⁺ y PAI-1, colágeno I y TGF-β1 de forma dependiente de la dosis. Sin embargo, los efectos máximos para la inhibición de la expresión de EDA⁺, colágeno I y TGF-β1 se lograron con una dosis de 0,5 mg/kg, siendo menos eficaz una dosis de 5 mg/kg. El 20 1D11 produjo una reducción máxima de la expresión de fibronectina EDA⁺ en un 63%, PAI-1 en un 58%, colágeno I en un 96% y TGF-β1 en un 48% (Figuras 20A-D, respectivamente).

El tratamiento con 1D11 también redujo la proteinuria de forma dependiente de la dosis. Una dosis de 1D11 de 5 mg/kg produjo una reducción máxima de la proteinuria con una media de proteínas urinarias de 17,7 ± 2,3 mg/24 h, en comparación con el grupo con enfermedad de control (35,1 ± 8,5 mg/24 h). Sin embargo, para esta lectura, el anticuerpo de control IgG1 de ratón 13C4 (5 mg/kg) también redujo la proteinuria a 10,2 ± 0,9 mg/24 h. Por lo tanto, es difícil interpretar el efecto del 1D11 en esta variable. El anticuerpo de control, 13C4, no tuvo ningún efecto significativo en ninguna otra medida de la enfermedad (en comparación con el grupo con la enfermedad de control).

Comparación del Efecto del 1D11 y Enalapril

30 A partir de los datos arriba presentados, está claro que 0,5 o 5,0 mg/kg de 1D11 muestran efectos terapéuticos máximos en este modelo. Además, por nuestro estudio previo de dosis-respuesta con Enalapril (Peters y col., *Kidney Int.* 54:1570-1580 (1998)), sabemos que el Enalapril, en dosis mayores de 100 mg/litro en agua para beber, produce la respuesta terapéutica máxima obtenible con este modelo. Por consiguiente se utilizaron 200 mg/litro de Enalapril solo o en combinación con 0,5 o 5 mg/kg de 1D11 para determinar el efecto de la combinación de estos dos tratamientos.

35 La dosis de 0,5 mg/kg de 1D11 redujo la puntuación de la matriz en un 56%, mientras que el Enalapril individualmente la redujo en un 59% (Figuras 14G y 15A). Esta similitud en la reducción de la enfermedad se observó en la mayor parte de las medidas de la enfermedad. El Enalapril o el 1D11 con eficacia máxima (0,5 mg/kg o 5 mg/kg) redujeron la inmunotinción de fibronectina en un 36% y un 36% (Figuras 16E y 16G, Figura 2B), la inmunotinción de colágeno I en un 33% y un 34% (Figuras 17E y 17G, Figura 15C) y la producción de 40 fibronectina en un 53% y un 54%, respectivamente (Figura 18A).

En cambio, el efecto terapéutico del 1D11 en la producción de PAI-1 por glomérulos cultivados (Figura 18B) y en el ARNm de PAI-1 (Figura 19 y Figura 20B) parece ser algo mayor que el observado en el caso del Enalapril, aunque las pruebas estadísticas no alcanzaron una significancia para realizar comparaciones entre estos grupos. Del mismo modo, los análisis de ARNm sugieren que el 1D11 era mucho más eficaz para 45 reducir el ARNm de colágeno I que el Enalapril (P < 0,05, Figura 19 y 20C).

Combinación de 1D11 y Enalapril

A partir de estos datos, es evidente que la combinación de las dosis con eficacia máxima de Enalapril y 1D11 confiere ventajas terapéuticas adicionales en comparación con cualquiera de los dos fármacos administrados de forma individual. La combinación de Enalapril con 1D11 redujo la acumulación de matriz glomerular, 50 medida mediante tinción con PAS, de aproximadamente un 59% en el caso del Enalapril solo o el 1D11 solo a un 80% en el caso de Enalapril más 5,0 mg/kg de 1D11 (p < 0,001 en comparación con animales con enfermedad de control) (Figuras 14E-I y 15A). La potenciación del efecto terapéutico del tratamiento con los dos agentes combinados también se observó en el caso de la inmunotinción de fibronectina (Figuras 16 y 15B) y el colágeno I (Figuras 17 y 15C), y en la producción glomerular de fibronectina y PAI-1 (Figuras 18A y 18B). La adición de 1D11 (0,5 mg/kg) a Enalapril redujo adicionalmente la producción de fibronectina en un 55 25% hasta una inhibición total del 77%. En lo que respecta a la proteinuria, la monoterapia redujo los

5 aumentos de proteína urinaria inducidos por enfermedad en un 78%, un 74% y un 62% en el caso del Enalapril, 0,5 1D11 y 5 1D11, respectivamente. El tratamiento combinado redujo la proteinuria adicionalmente a un 98% y un 99% en el caso de 0,5 y 5,0 mg/kg de 1D11, respectivamente, valores que no difieren de los valores normales. El tratamiento combinado no tuvo ningún efecto adicional en la producción de PAI-1. Sin embargo, esta variable se redujo a niveles menores que los del grupo de control normal, con 1D11 solo (Figura 18B). En cambio, como muestra la Figura 18C, la reducción de la producción de TGF- β 1 por glomérulos cultivados relacionada con el tratamiento fue similar en todos los grupos de tratamiento, lo que indica que esta lectura no tiene ningún efecto aditivo de combinación.

10 Los resultados obtenidos en relación con los niveles de ARNm glomerular para fibronectina, colágeno, TGF- β 1 y PAI-1 produjeron una imagen más diversa que la de otras variables, en concreto una imagen que no corresponde por completo a los resultados de la producción de proteínas por glomérulos cultivados (Figuras 19 y 20). Los niveles de ARNm de fibronectina se redujeron de modo similar al utilizar Enalapril o 1D11 solos, y la inhibición máxima de ARNm de fibronectina se logró con 0,5 mg/kg de 1D11, siendo una dosis de 5 mg/kg menos eficaz. Sin embargo, la combinación de Enalapril con 5 mg/kg de 1D11 parecía revertir esta reducción aparente en la eficacia del 1D11 restaurando la inhibición de la producción de ARNm de fibronectina (Figura 20A). Un aspecto interesante consiste en que, mientras que el efecto terapéutico del Enalapril o el 1D11 de forma individual condujo a reducciones muy similares en el ARNm de PAI-1, la combinación de estos dos fármacos parecía haber revertido el efecto para el mensaje de PAI-1 (Figura 20B). En comparación con los niveles de proteína medidos en el sobrenadante, los datos sugieren que el aumento del ARNm de PAI-1 no se traducía en una producción y secreción de proteína de PAI-1 en sobrenadante de cultivo. El ARNm de colágeno I se redujo a niveles de control mediante tratamiento con 1D11 solo tanto en dosis de 0,5 como en dosis de 5 mg/kg. Por consiguiente, no resulta sorprendente que la combinación de 1D11 y Enalapril no tuviera ningún efecto adicional (Figura 20C). Por último, la imagen de los niveles de ARNm de TGF- β 1 también es algo variada (Figura 20D). Mientras que el Enalapril o 0,5 mg/kg de 1D11 redujeron el ARNm de TGF- β 1 en un 29% y un 48%, respectivamente, una alta dosis de anticuerpos o combinaciones de éstos revirtió por completo este efecto llevando los niveles esencialmente a los del grupo con enfermedad de control (Figura 20D). Como en el caso del ARNm de PAI-1, este resultado se vio solo en el caso del ARNm de TGF- β 1 y no en el caso del TGF- β 1 segregado por glomérulos en sobrenadante de cultivo. Por tanto, la importancia de estos datos de ARNm no respalda por completo los cambios proteínicos observados. La razón de ello es desconocida.

Mecanismos de la Aditividad de Enalapril y 1D11

35 Se cree que la infiltración de macrófagos en glomérulos dañados contribuye a la enfermedad en nefritis anti-Thy1 (Westerhuis, Am. J. Path. 156:303-310 (2000)). La Figura 21 muestra los resultados de tinción para células ED1+ de la línea de los monocitos/macrófagos. Con las tres dosis bajas de anticuerpo se observa una clara respuesta a la dosis, reduciéndose la cantidad de células ED1+ de forma significativa ($P < 0,05$) en un 71% en el caso de la dosis de 0,5 mg/kg de 1D11. Sin embargo, con la dosis más alta de 1D11, 5 mg/kg, éste tuvo menos eficacia, de modo que la reducción solo fue del 23% (Figura 21). El Enalapril solo también redujo de modo significativo ($p < 0,05$) las células ED1+ en un 62%. De forma interesante, como en el caso del ARNm de fibronectina, la combinación de los dos fármacos parecía evitar el rebote observado con la dosis alta de 1D11 y la reducción de las células ED1+ se mantuvo en un 70% y un 69% en los dos grupos de combinación (Figura 21).

45 Para estudiar la transducción de señales de TGF- β 1 se analizó la activación de Smad2 utilizando un Smad2 fosforilado que detecta específicamente anticuerpos (Figura 22). Los glomérulos enfermos aumentaron drásticamente el p-Smad2 intracelular en comparación con el control normal. El 1D11 redujo la activación de Smad2 de forma dependiente de la dosis, alcanzándose una reducción máxima de un 75% con la dosis más alta. El Enalapril también redujo la activación de Smad2 en un 36%. La adición de Enalapril a 1D11 condujo a una reducción adicional. Una dosis de 5 mg/kg de 1D11 más Enalapril prácticamente normalizó los niveles de p-Smad2.

Discusión

50 Los datos presentados en este ejemplo muestran que las dosis crecientes de anticuerpo 1D11 neutralizador del TGF- β 1, β 2 y β 3 conducen a un incremento de la eficacia terapéutica. En este modelo de fibrosis renal aguda se observa una reducción de la enfermedad fibrótica dependiente de la dosis hasta el efecto máximo con 0,5 mg/kg de 1D11, tras lo cual la eficacia parece estacionarse. Dado que algunas de las medidas empleadas para evaluar la eficacia estaban realmente bloqueadas con menor eficacia en el grupo que recibió 5,0 mg/kg de 1D11, es probable que la verdadera dosis con efecto terapéutico máximo oscile entre 0,5 y 5,0 mg/kg. Los datos sugieren que la reducción máxima posible de la enfermedad con 1D11 es cercana al 50% y que la reducción de la enfermedad por el 1D11 administrado de forma individual es comparable a la del Enalapril administrado de forma individual.

Hemos demostrado que una combinación de inhibición del TGF- β 1 con bloqueo de Angiotensina II resulta en una potenciación de la reducción de la enfermedad. Por consiguiente, la combinación de bloqueo de la Ang II e inhibición del TGF- β 1 podría representar un importante paso adelante en los esfuerzos por detener enfermedades en humanos. Mientras que previamente hemos mostrado la aditividad en nefritis anti-Thy1 con complementación de L-arginina y dieta baja en proteínas y también con bloqueo de angiotensina y dieta baja en proteínas (Peters y col., *Kidney Int.* 57:992-1001,2000; Peters y col., *Kidney Intl* 57:1493-1501 2000), tanto el grado de la aditividad como la viabilidad de la combinación de bloqueo de la Ang e inhibición del TGF- β 1 son claramente superiores a los de las combinaciones previamente utilizadas.

Una serie de estudios en el modelo anti-Thy1 ha demostrado que una monoterapia con Enalapril, Losartan, 1% L-arginina en agua para beber o 6% dieta baja en proteínas redujo en todos los casos los marcadores de enfermedad fibrótica aproximadamente un 50% (Peters y col., *Kidney* 54:1570-1580, 1998, Peters y col., *Kidney Int.* 57:992-1001, 2000). El descubrimiento del incremento de la reducción de fibrosis mediante el uso de una combinación de inhibidores del TGF- β 1, β 2 y β 3 con bloqueo de la Ang es particularmente importante, ya que, de las muchas moléculas implicadas en la fibrosis, no se ha encontrado ninguna que intervenga tan sistemática o plenamente como la sobreexpresión del TGF- β . En este contexto, incluso con el potente anticuerpo neutralizador anti-TGF- β 1, 1D11, solo observamos una reducción máxima de un 50% en la gravedad de la enfermedad. El hecho de que ningún tratamiento individual pueda prevenir la enfermedad fibrótica sugiere, como proponemos nosotros, que bien existen diferentes vías que median en la enfermedad, bien la propia terapia estimula la acción de mecanismos de reserva. De forma interesante, la gravedad de la fibrosis en el modelo de rata de obstrucción ureteral unilateral también disminuyó aproximadamente un 50% en animales, estando alterados los dos genes de angiotensina (Fern y col., *J. Clin. Invest.* 103:39-46 (1999)).

Se ha de señalar que diversos estudios han mostrado la aditividad de dosis subóptimas de diversos tratamientos, incluyendo ACEi y AT1RA (Peters y col., *Kidney Intl* 57:1493-1501 (2000), Benigni y col., *Kidney Int.* 54:353-359 (1998), Remuzzi y col., *J Am Soc Nephrol* 10:1542-1549 (1999), Amann y col., *J Am Soc Nephrol* 12:2572-2584 (2001), Benigni y col., *J Am Soc Nephrol* 14:1816-1824 (2003)). Si bien algunas combinaciones de dosis subóptimas de dos fármacos pueden resultar clínicamente útiles para reducir efectos secundarios de altas dosis de un fármaco, la aditividad real, o sinergismo, solo se puede demostrar cuando se dan dosis de eficacia máxima de al menos uno de los dos fármacos. Esta es la primera demostración de la aditividad real de inhibición de ACE y anticuerpos de TGF- β . La capacidad del 1D11 y el Enalapril para mostrar aditividad cuando se administran en las dosis con eficacia terapéutica máxima sugiere que estos fármacos actúan, al menos en parte, a través de vías diferentes. Esto contrasta con los resultados obtenidos con la combinación de Enalapril y Losartan, en la que no se observó ninguna aditividad (Peters y col., *Kidney Int* 54:1570-1580 (1998)), lo que sugiere que estos fármacos actúan a través de una vía común.

Un descubrimiento interesante en el estudio aquí presentado es que la respuesta a la dosis del 1D11 se modula mediante la adición de Enalapril. La reversión del efecto terapéutico del 1D11 en la puntuación de matriz (Figura 15A), ARNm de fibronectina (Figura 20A), ARNm de colágeno I (Figura 20C) y ARNm de TGF- β 1 (Figura 20D) se observó con la dosis máxima de 1D11 (5,0 mg/kg). Aunque esta reversión era frecuentemente marginal en todos los casos excepto en la fibronectina, los resultados sugieren que una inhibición más completa del TGF-B puede ser menos efectiva para tratar la enfermedad. Esto se ve con mayor claridad en la Figura 8, en la que la dosis máxima de 1D11, 5 mg/kg, es menos eficaz para reducir la afluencia de células ED1+ que una dosis más baja de este agente. De forma interesante, recientemente se ha informado de un efecto similar en células de monocitos/macrófagos con la dosis de 5,0 mg/kg de 1D11 en el modelo de nefropatía de puromicina (Ma L.J.- y col. *J Am Soc Nephrol* 12:2001:819A). En el presente estudio, el efecto terapéutico también se redujo con esta dosis de 1D11. Tanto la Ang II como el TGF- β desempeñan funciones importantes en el reclutamiento de macrófagos activados para el lugar de la lesión. Se cree que estos macrófagos activados liberan factores quimiotácticos y profibróticos. Sin embargo, el TGF- β tiene efectos dobles en macrófagos: atrae fuertemente los macrófagos y al mismo tiempo inhibe la función de macrófagos activados reduciendo la producción y liberación de otros factores quimiotácticos e inflamatorios (Letterio y col., *Annu Rev Immunol* 16:137-161 (1998), Pawluczyk y col., *Kidney Int.* 60:533-542 (2001), Suto y col., *J Immunol* 159:2476-2483 (1997)). Es posible que el aumento de las dosis de 1D11 disminuya inicialmente la infiltración de macrófagos, pero a medida que se neutraliza más TGF- β , el escape de la inhibición de TGF- β puede conducir a una liberación de agentes que reclutan más macrófagos. Aunque la reducción del efecto con las dosis más altas de 1D11 y el posible papel de los macrófagos en esta observación requiere más estudio, resulta muy interesante que la combinación de altas dosis de 1D11 con Enalapril parece revertir esta tendencia al rebote en todas las variables, excepto en el caso del ARNm de TGF- β . Esto corrobora la idea de que la combinación de bloqueo de Ang II con anticuerpos de TGF- β no solo proporcionará mayores ventajas terapéuticas que las terapias actualmente disponibles, sino que cualquier consecuencia negativa potencial se puede mejorar mediante esta combinación de fármacos.

Es notable que el tratamiento con anticuerpo de TGF- β no provocó ningún efecto secundario perceptible durante los 6 días del experimento. Otros estudios a largo plazo con anticuerpo TGF- β , incluyendo cuatro publicaciones en relación con el anticuerpo monoclonal de ratón 1D11 aquí utilizado (Ziyadeh y col. *Proc natl*

Acad Sci EEUU 97:8015-8020 (2000), Miyajima y col., Kidney Int 58:2301-2313 (2000)), Dahly y col. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 283:R757-767, (2002), Benigni y col., J Am Soc Nephrol 14:1816-1824 (2003), Islam y col., Kidney Int. 59:498-506 (2001), Ling y col. J Am Soc Nephrol 14:377-388 (2003)), no informaron de ningún problema de seguridad con esta terapia.

- 5 En resumen, el estudio aquí presentado demuestra una clara respuesta terapéutica dependiente de la dosis en relación con el anticuerpo 1D11, que neutraliza el TGF- β 1, β 2 y β 3. El efecto terapéutico máximo de la monoterapia es cercano a un 50% de reducción de la enfermedad, consistiendo la terapia bien en el bloqueo de la Ang II, bien en la inhibición del TGF- β . Por último, y lo más importante, los datos muestran una reducción adicional de la gravedad de la enfermedad cuando las dosis con una eficacia máxima de Enalapril se combinan con anticuerpo de TGF- β .
- 10

Por tanto, las realizaciones particulares de la presente invención arriba descrita han de ser consideradas en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas. El alcance de la invención es tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas, más que estar limitado por los ejemplos incluidos en la anterior descripción.

15

REIVINDICACIONES

1. Combinación de agentes que inhibe el TGF β para su uso en el tratamiento de un estado fibrótico asociado con una acumulación excesiva de matriz extracelular en tejidos u órganos, estando prevista la combinación de agentes para reducir la acumulación excesiva de matriz extracelular asociada con la sobreproducción y/o la actividad del TGF β en un tejido y/u órgano, o en un lugar de lesión cutánea, utilizándose la combinación de agentes que inhiben el TGF β en una cantidad suficiente para inhibir la sobreproducción y/o la actividad del TGF β , resultando el uso de dicha combinación de agentes en una mayor reducción de la acumulación de matriz extracelular que cuando cada agente se utiliza por separado, reduciéndose la acumulación de matriz extracelular en un tejido y/u órgano o una lesión a partir del nivel existente en el momento de la administración de los agentes, consistiendo un agente de la combinación en un anticuerpo anti-TGF β y otro agente en EnalaprilTM, y seleccionándose dicho estado entre un grupo consistente en síndrome de dificultad respiratoria del adulto o aguda (ARDS), enfermedades fibróticas del hígado, fibrosis cardíaca postinfarto, enfermedades fibroquísticas tales como fibroesclerosis, cánceres fibróticos tales como cánceres de mama, útero, páncreas o colon, fibroides, fibroma, fibroadenomas, fibrosarcomas, estado de postinfarto de miocardio, hipertrofia ventricular izquierda, cirrosis hepática, enfermedad venooclusiva, estado después de una lesión de la médula espinal, estado después de cirugía retiniana y de glaucoma, postangioplastia, restenosis, fibrosis renal intersticial, fallo de injerto arteriovenoso, cicatrizaciones excesivas tales como cicatrices queloides, y cicatrices resultantes de lesiones, quemaduras o cirugía.
2. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho anticuerpo anti-TGF β es 1D11.
3. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho anticuerpo anti-TGF β es un anticuerpo monoclonal.
4. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 3, caracterizada porque dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de IgG.
5. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho anticuerpo anti-TGF β se selecciona entre el grupo consistente en un anticuerpo no humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo de cadena sencilla y un fragmento de anticuerpo.
6. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 5, caracterizada porque dicho anticuerpo anti-TGF β es un anticuerpo quimérico.
7. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 5, caracterizada porque dicho anticuerpo anti-TGF β es un anticuerpo humanizado.
8. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 5, caracterizada porque dicho anticuerpo anti-TGF β es un anticuerpo humano.
9. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 5, caracterizada porque dicho anticuerpo anti-TGF β es un anticuerpo de cadena sencilla.
10. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 5, caracterizada porque dicho anticuerpo anti-TGF β es un fragmento de anticuerpo.
11. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque otro agente de la combinación es un agente que potencia la degradación de la matriz extracelular acumulada en exceso.
12. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho tejido u órgano se selecciona entre el grupo consistente en riñones, pulmones, hígado, corazón, arterias, piel y sistema nervioso central.
13. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho estado asociado con la acumulación excesiva de matriz extracelular es la cicatrización.

- 5
14. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque los agentes se utilizan simultáneamente.
 15. Combinación de agentes para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque los agentes se utilizan secuencialmente.

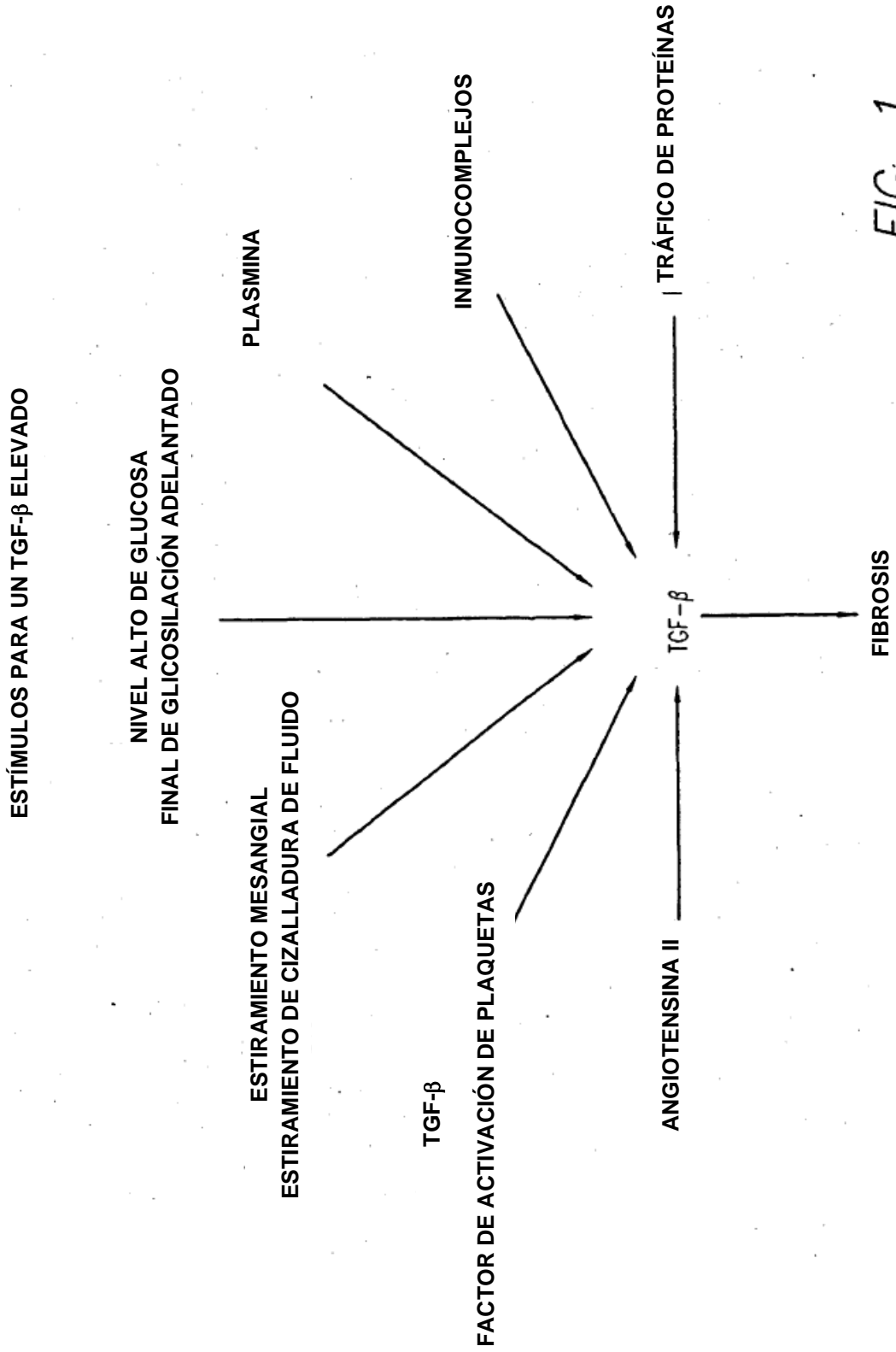


FIG: 1

LA RENINA AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE TGF- β POR CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS CULTIVADAS DE FORMA DEPENDIENTE DE LA DOSIS

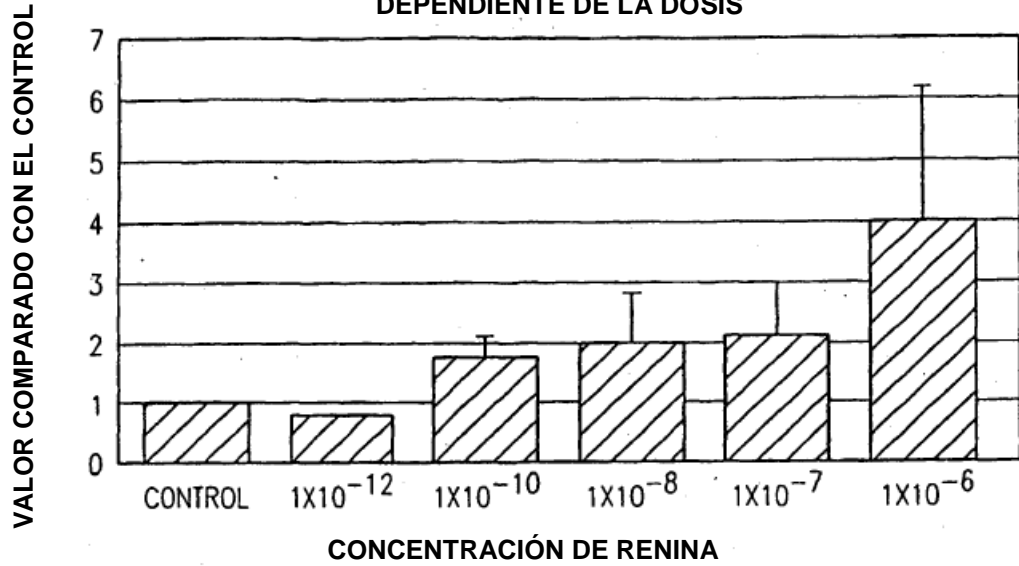


FIG. 2

EFFECTO DE AGENTES DE BLOQUEO EN LA PRODUCCIÓN DE TGF- β POR CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS EN CULTIVO EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN MEDIANTE RENINA 10^{-7} M

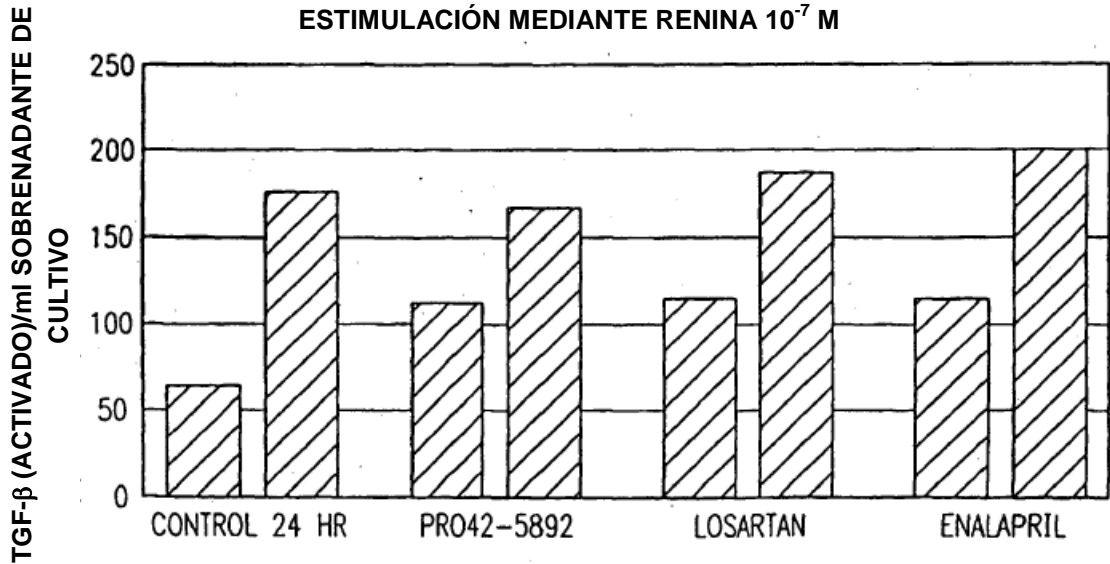


FIG. 3

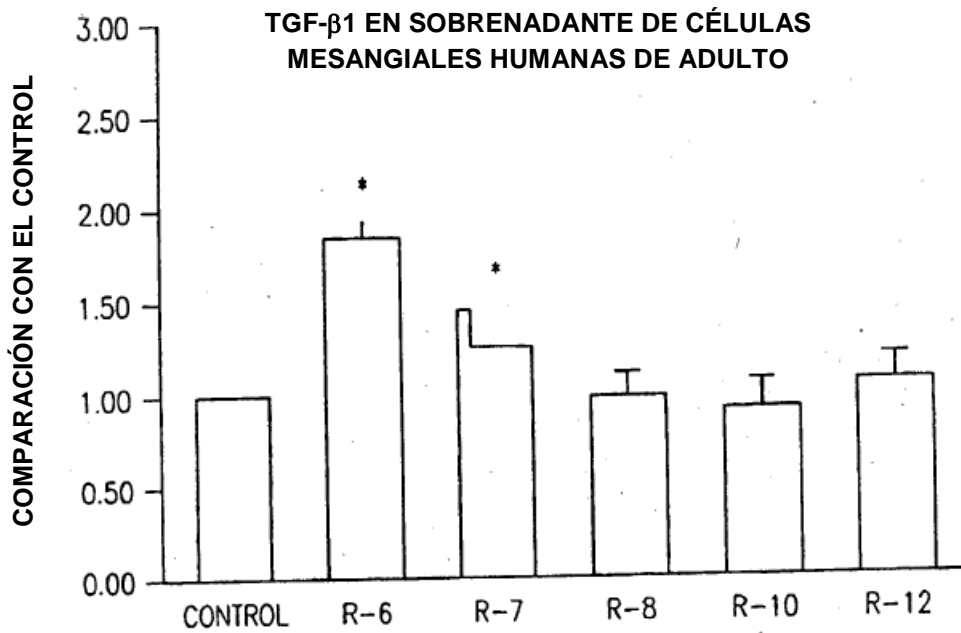


FIG. 4A

* = $p < 0.05$

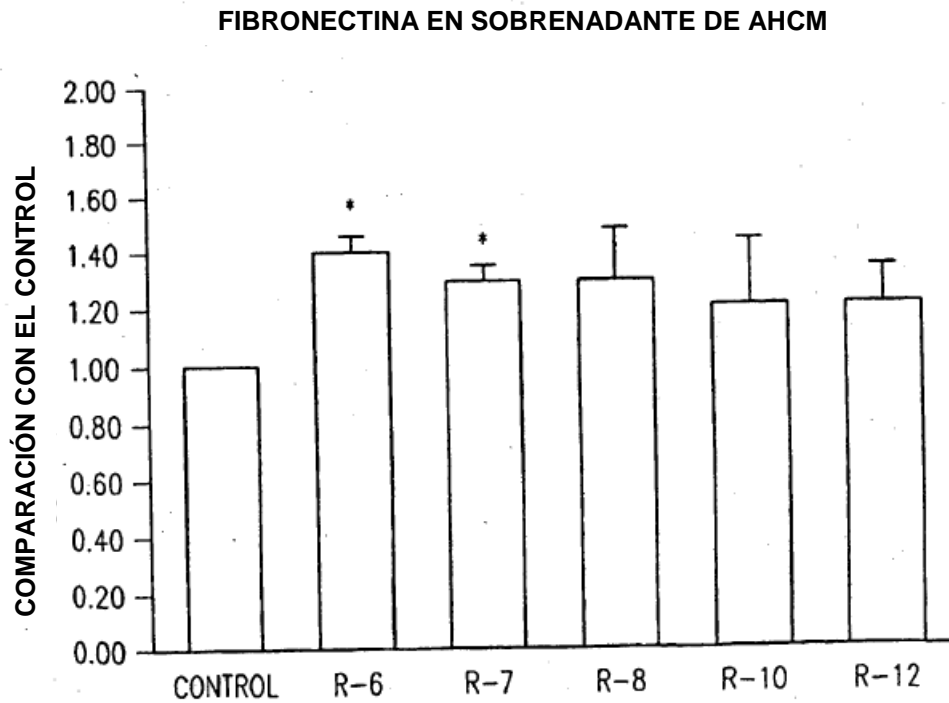


FIG. 4B

EVOLUCIÓN TEMPORAL DEL TGF- β 1 EN SOBRENADANTE DE CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS DE ADULTO

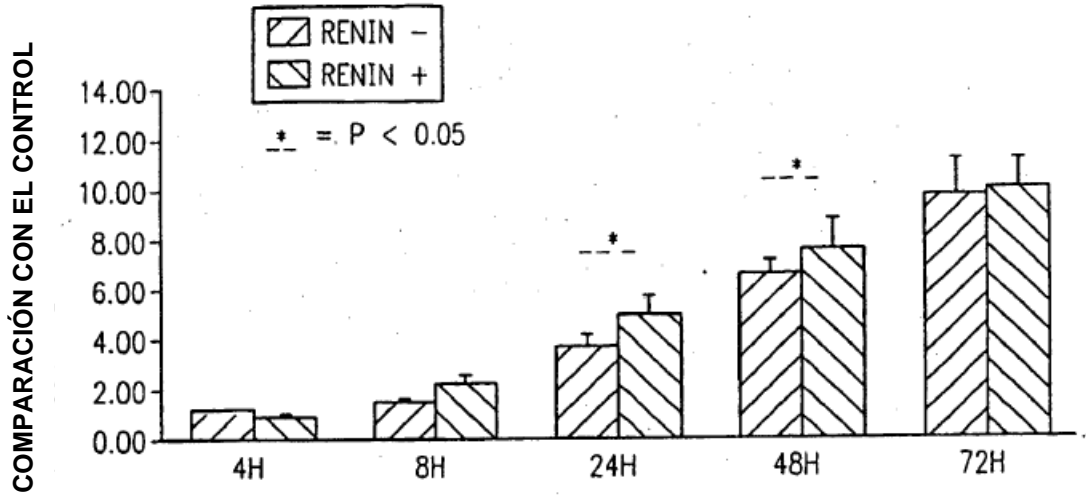


FIG. 5A

EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA FIBRONECTINA

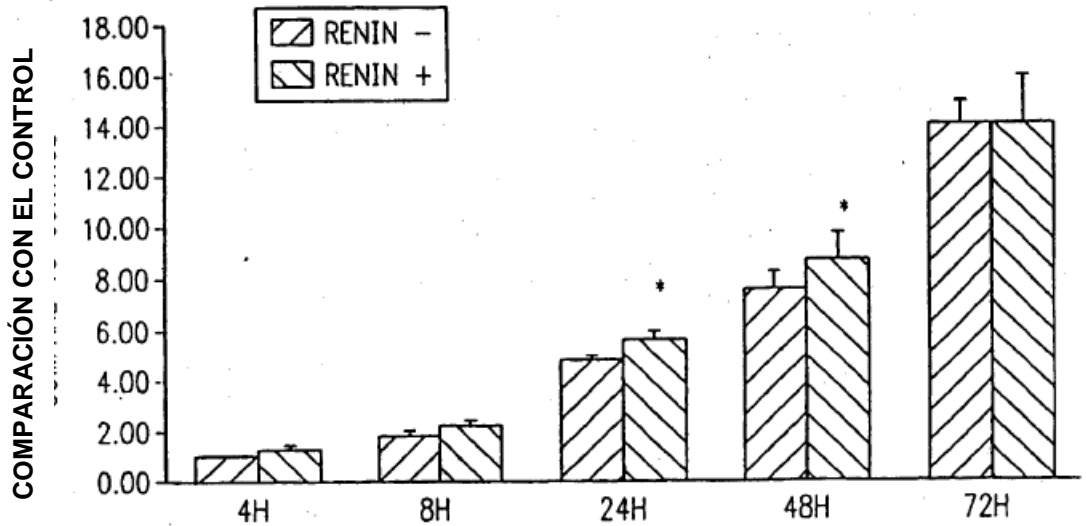
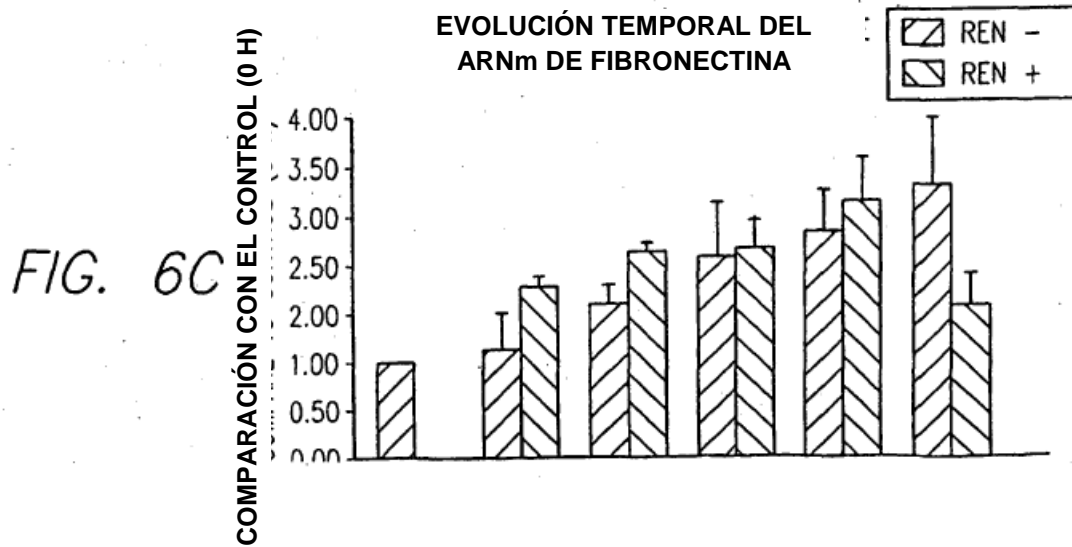
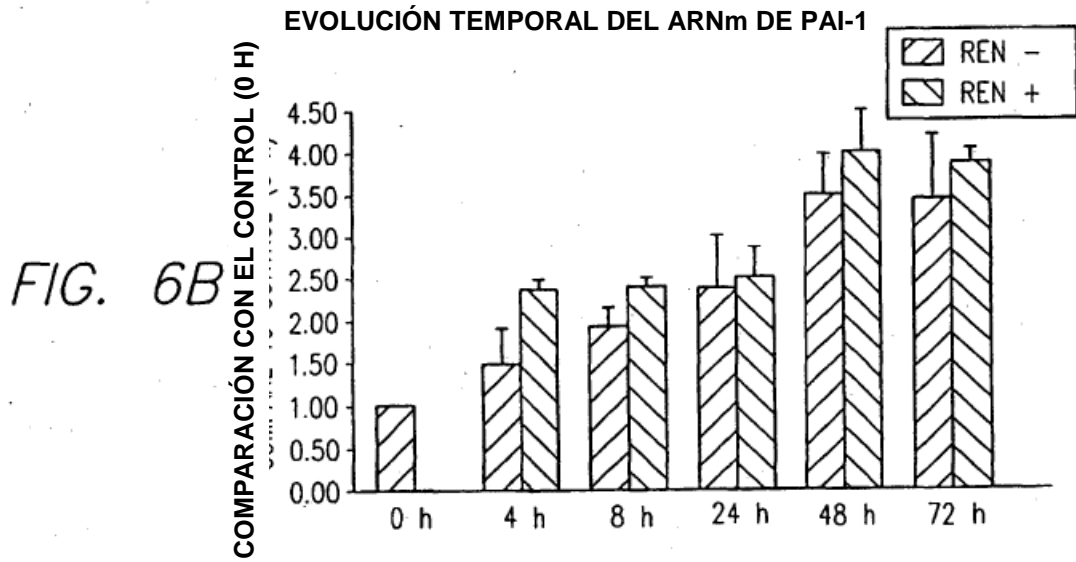
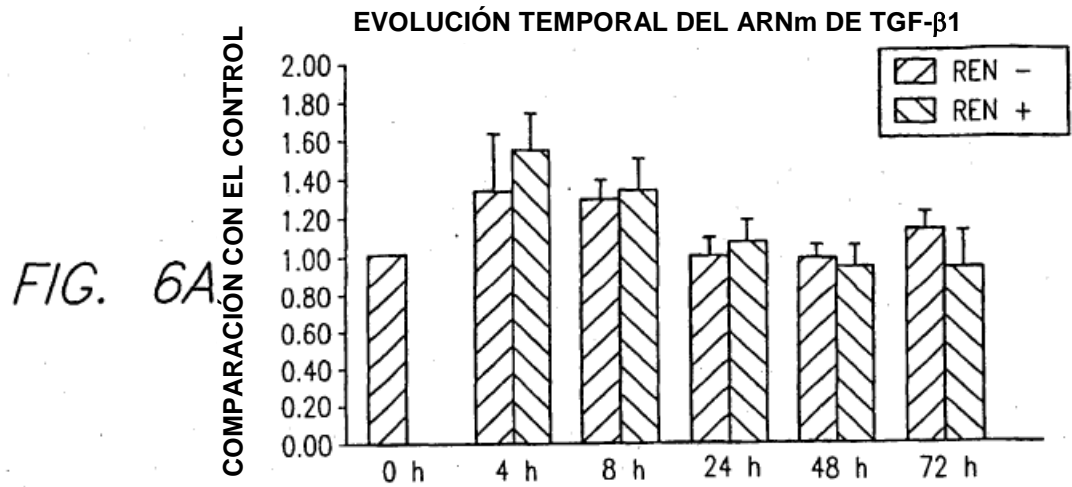


FIG. 5B



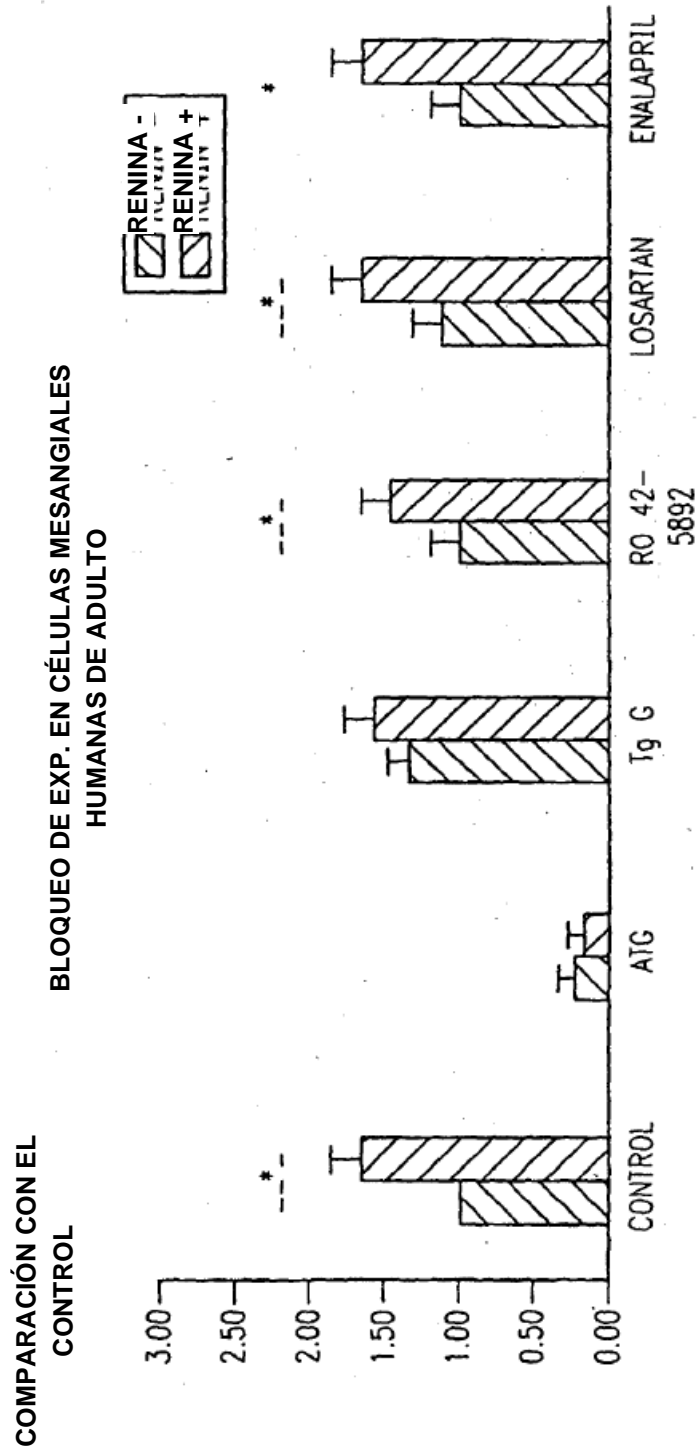


FIG. 7

EFFECTO DEL tPA EN NEFRITIS ANTI-THY-1 EL DÍA 6

OX-7 ENFERMEDAD DE CONTROL

TRATADO CON tPA (DÍA 3 - DÍA 5)

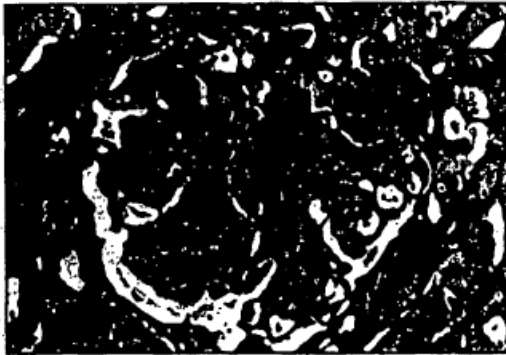


FIG. 8

**ÍNDICE DE TINCIÓN
(PORCENTAJE DE ÁREA DE TINCIÓN
POSITIVA / ÁREA GLOMERULAR)**

NORMAL
 OX-7 + SOL. SALINA
 * OX-7 + TPA

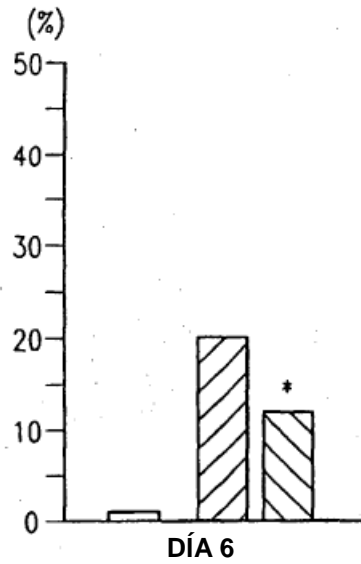


FIG. 9A

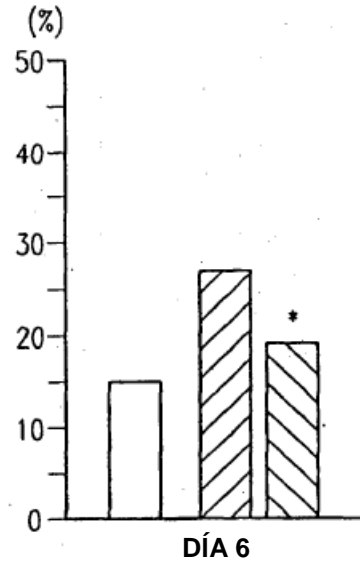


FIG. 9B

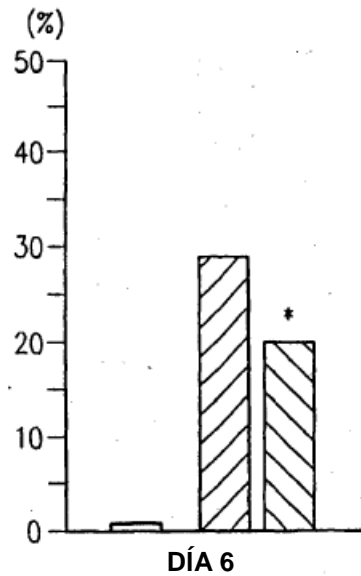


FIG. 9C

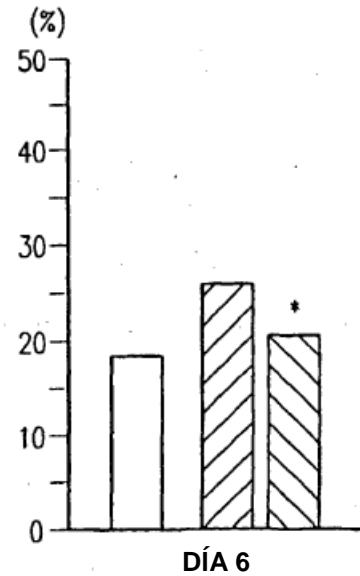


FIG. 9D

EFFECTO DEL tPA EN EXPRESIONES DE ARNm GLOMERULAR EL DÍA 6

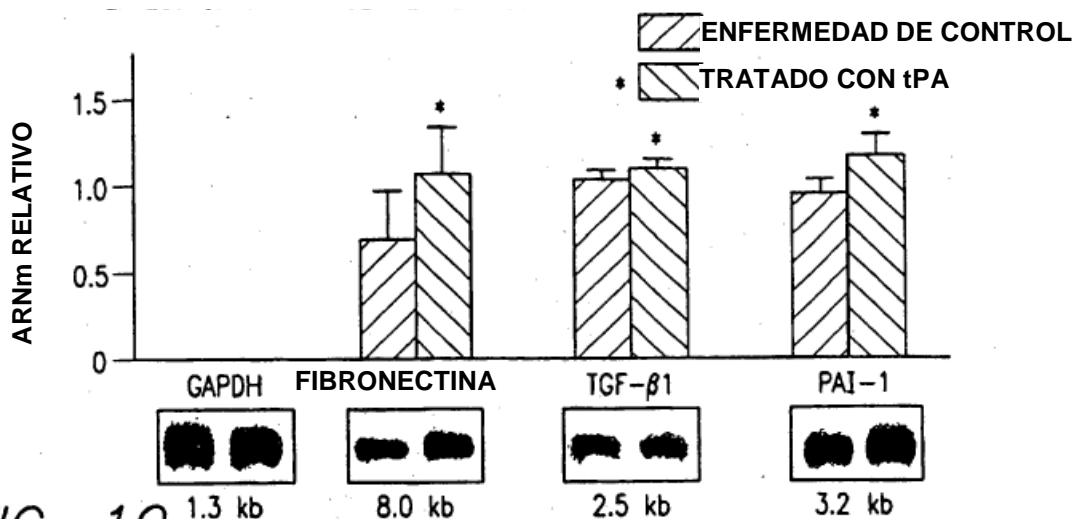
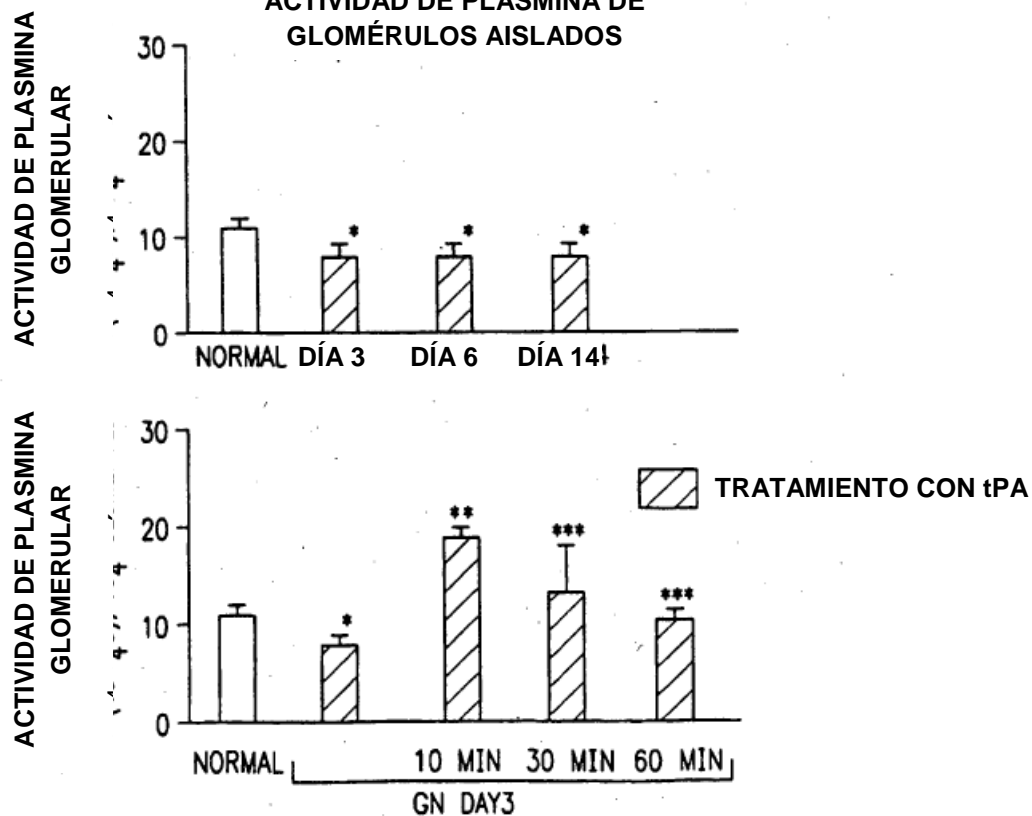


FIG. 10

ACTIVIDAD DE PLASMINA DE GLOMÉRULOS AISLADOS



*P<0.01 VS. NORMAL
 **P<0.01 VSENFERMEDAD DE CONTROL
 ***P<0.05 VSENFERMEDAD DE CONTROL

FIG. 11

EL TRATAMIENTO CON MUTANTE DE PAI-1
AUMENTA LA GENERACIÓN DE PLASMINA
GLOMERULAR

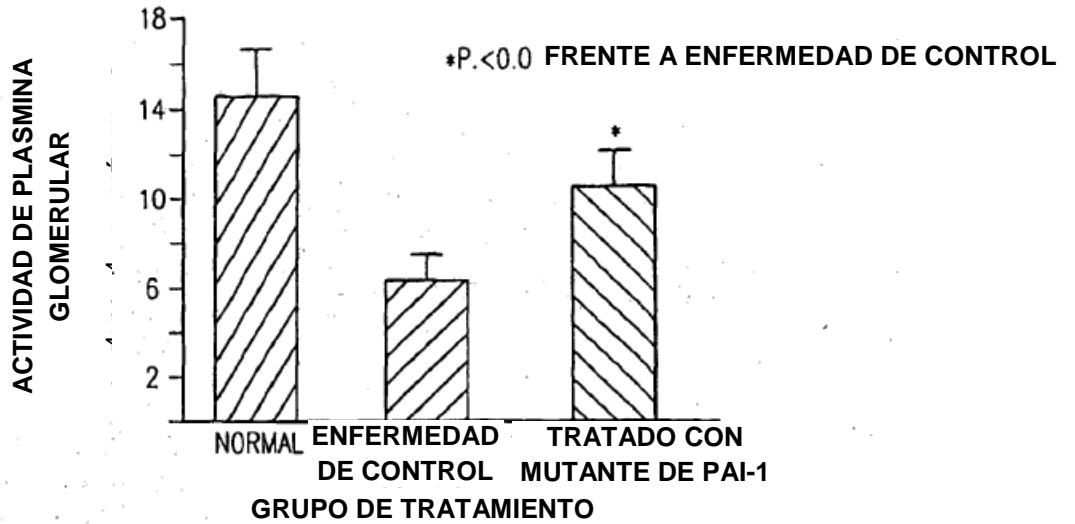


FIG. 12

EL TRATAMIENTO CON MUTANTE DE PAI-1
CONDUCE A UNA DISMINUCIÓN DE LA
ACUMULACIÓN DE COLÁGENO DE TIPO 1

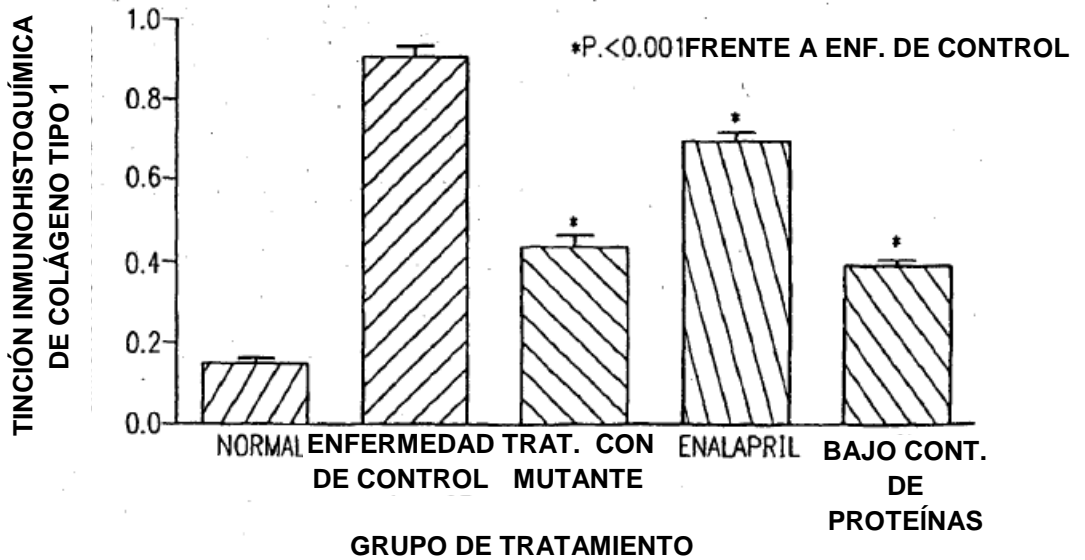


FIG 13

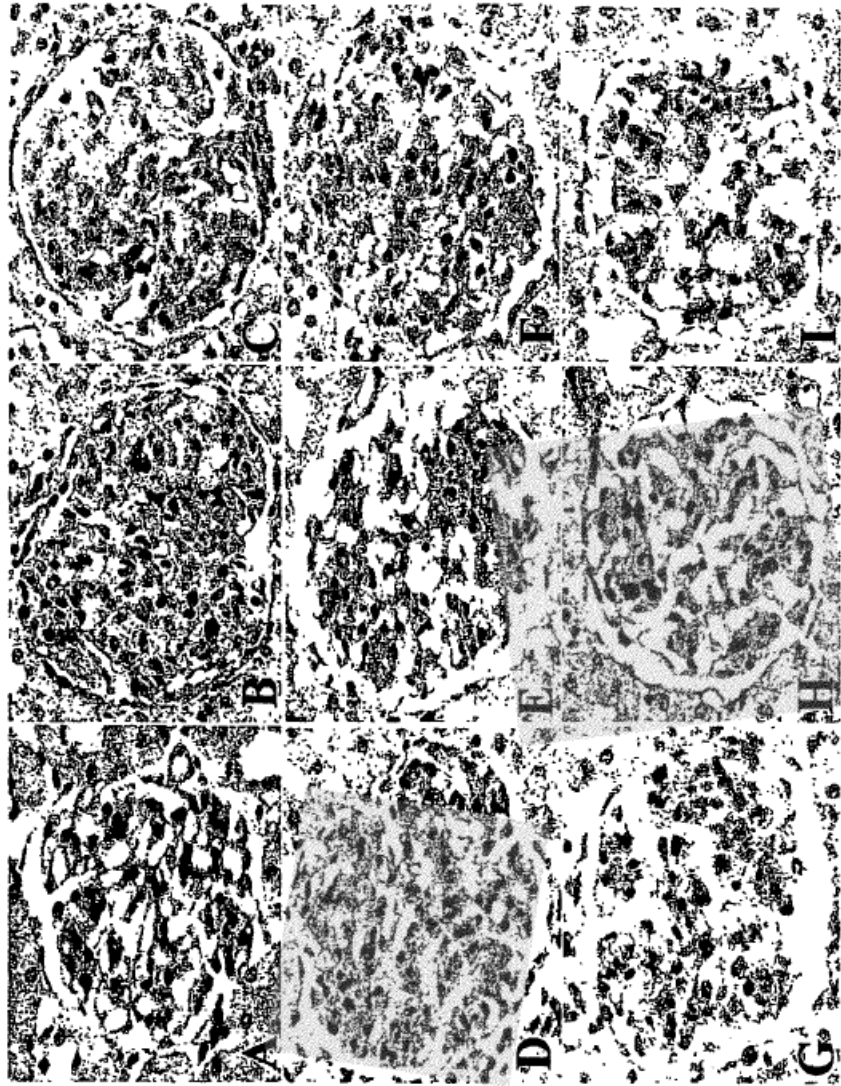


FIG. 14

FIG. 15A
Puntuación PAS

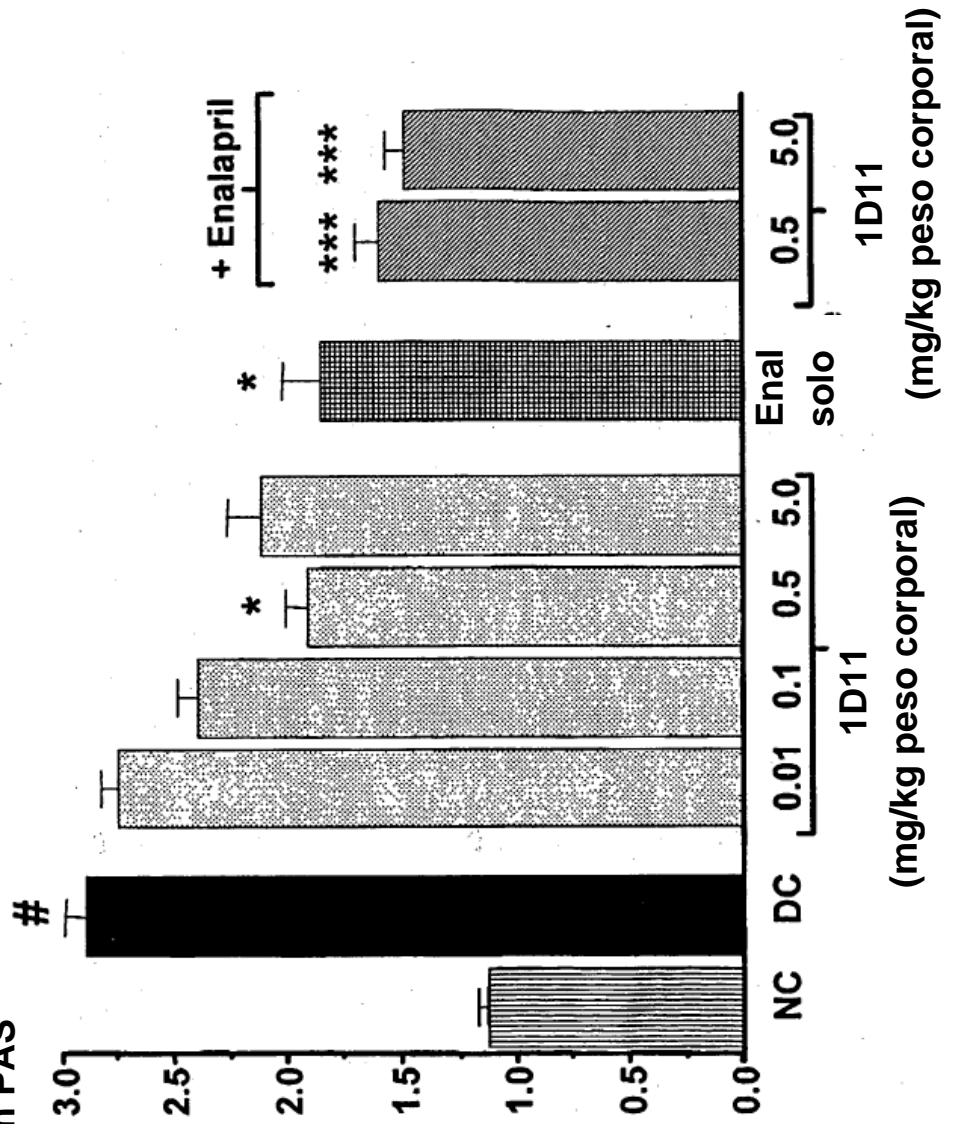
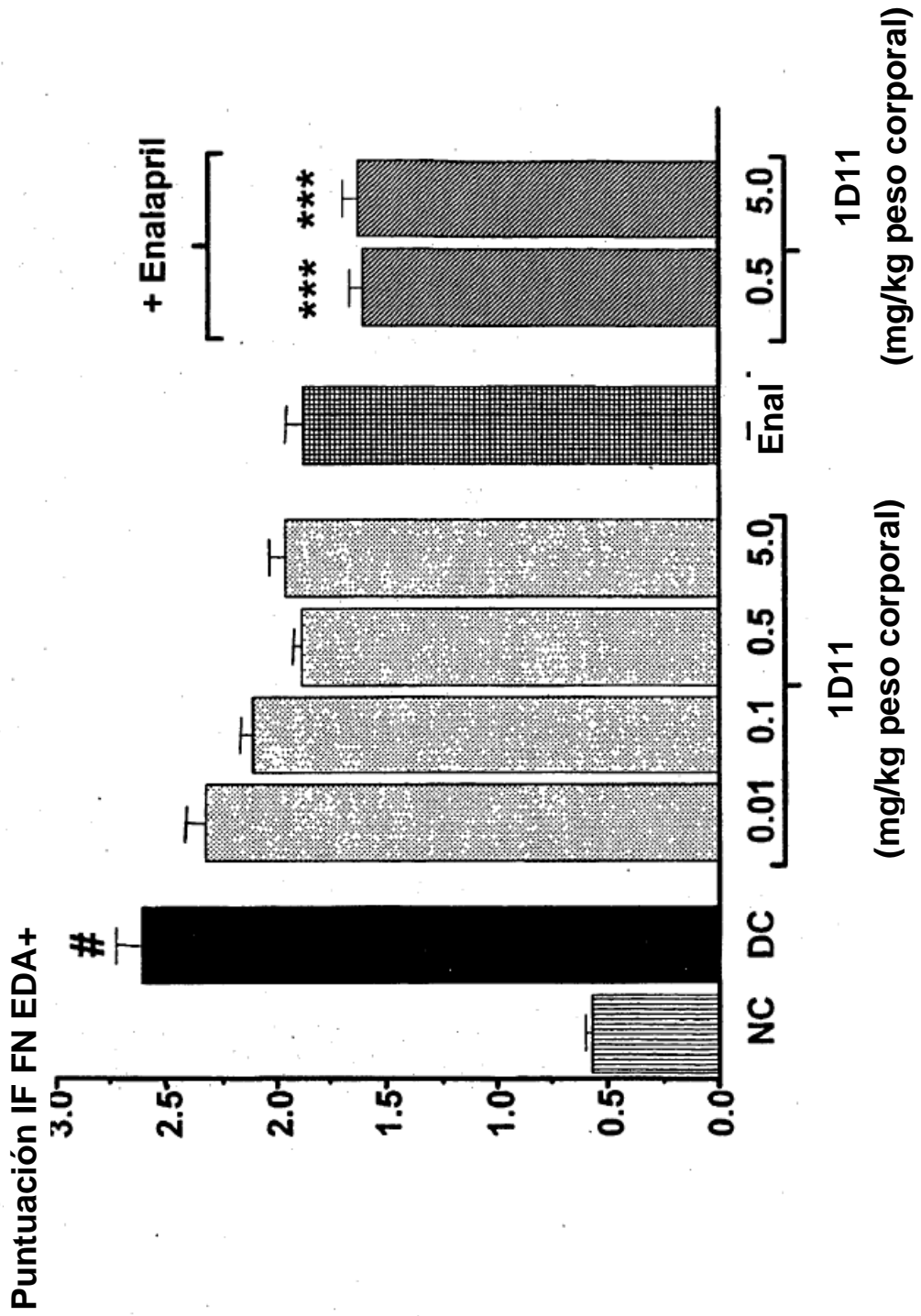
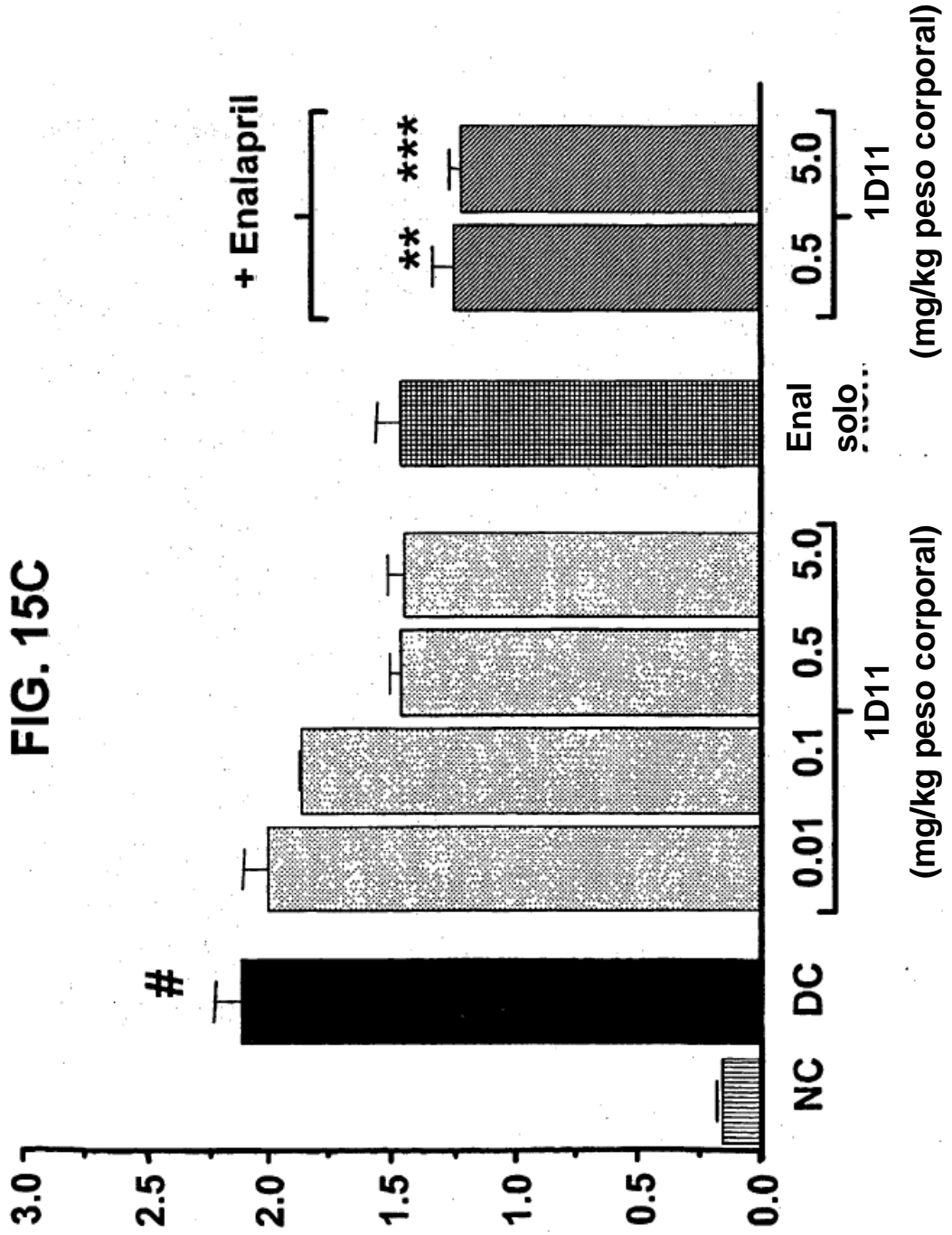


FIG. 15B



Puntuación IF
Colágeno 1



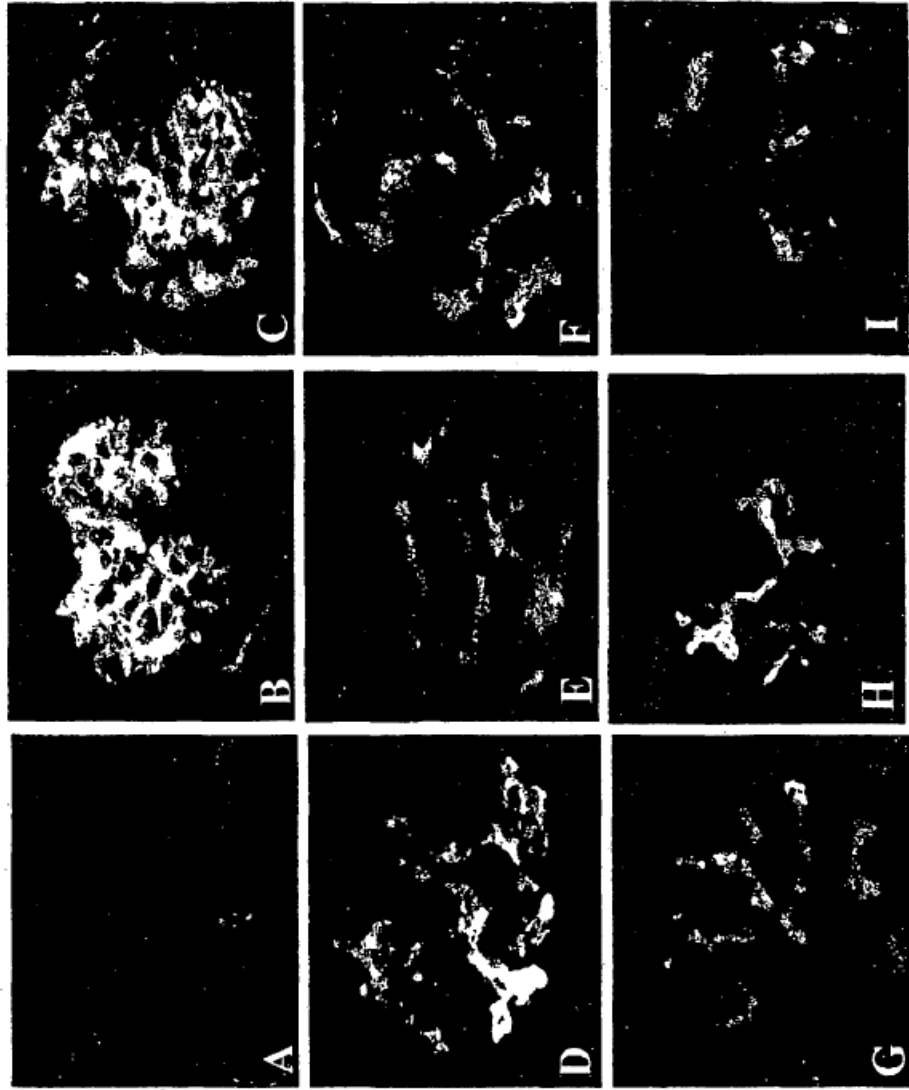


FIG. 16

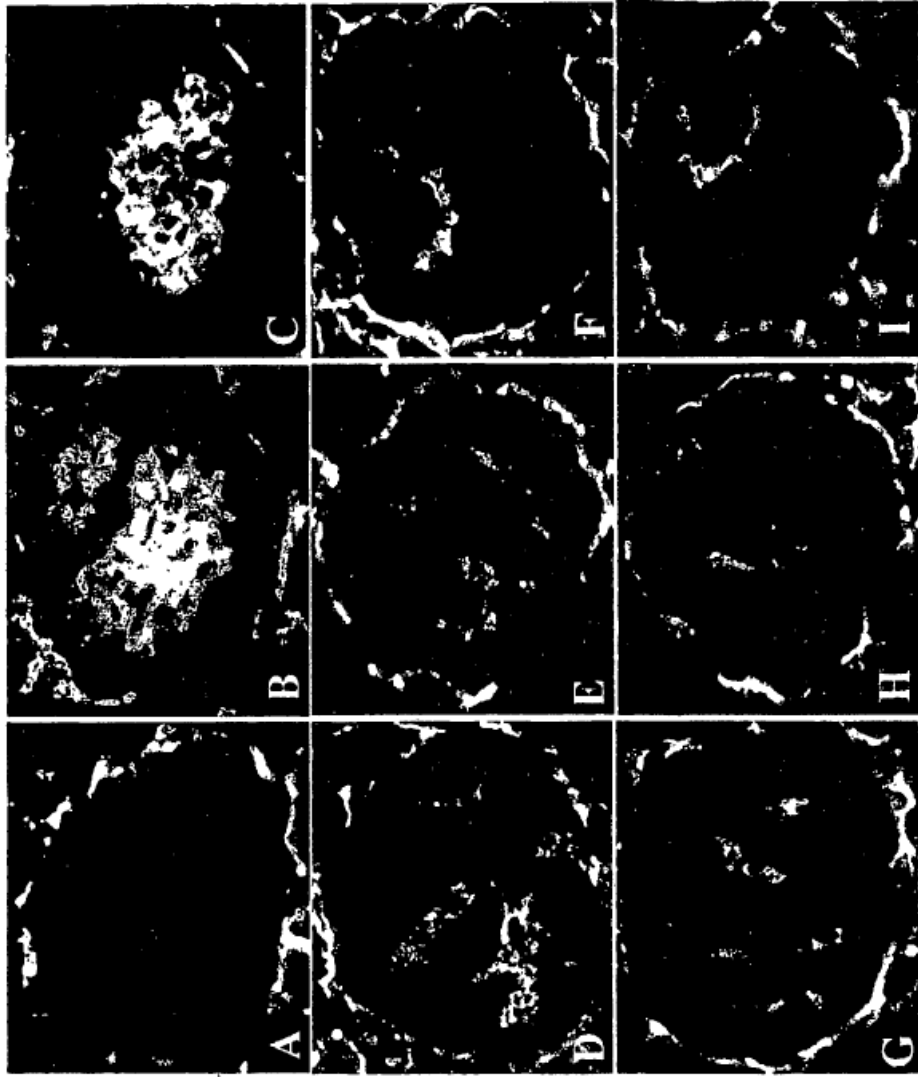
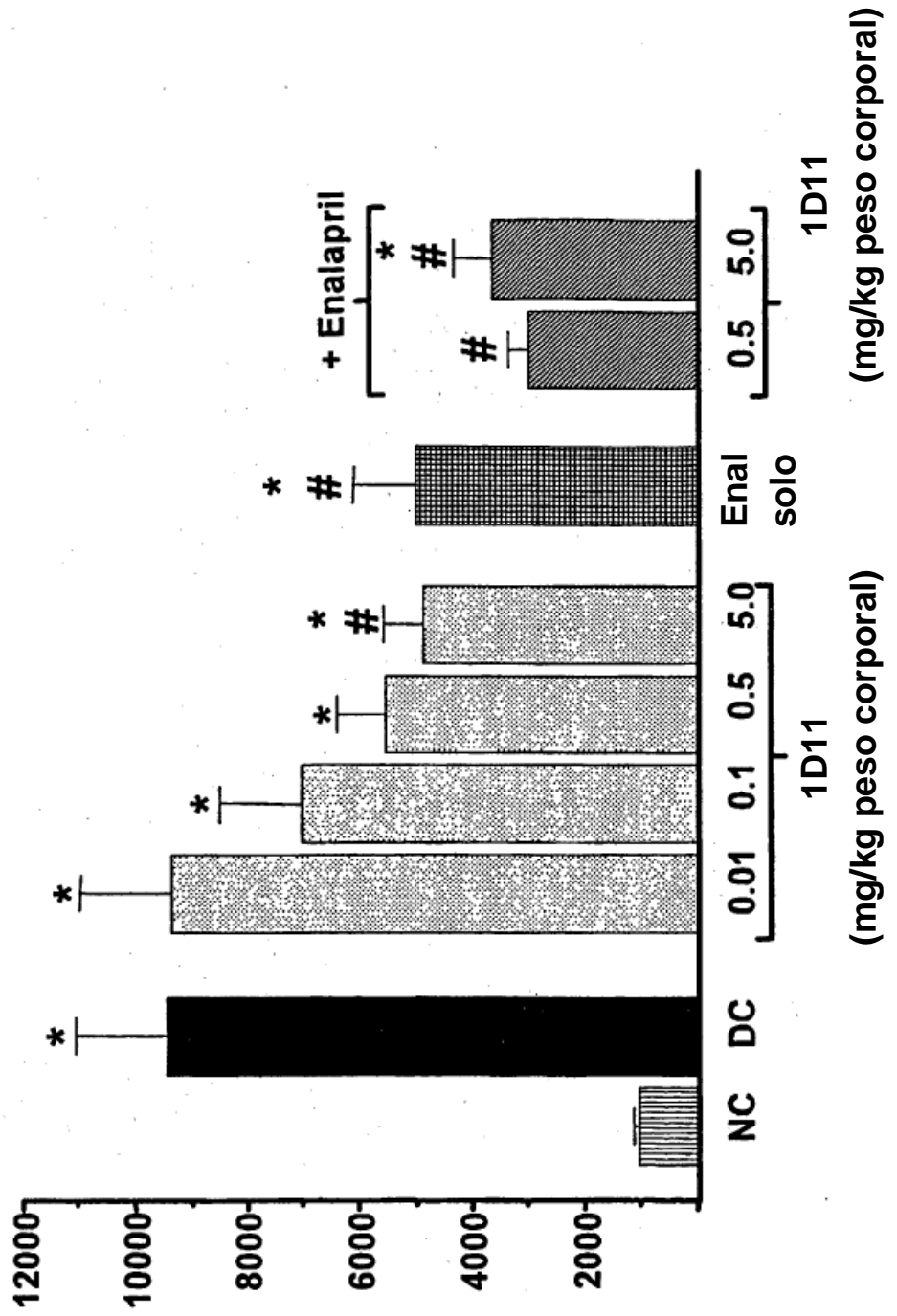
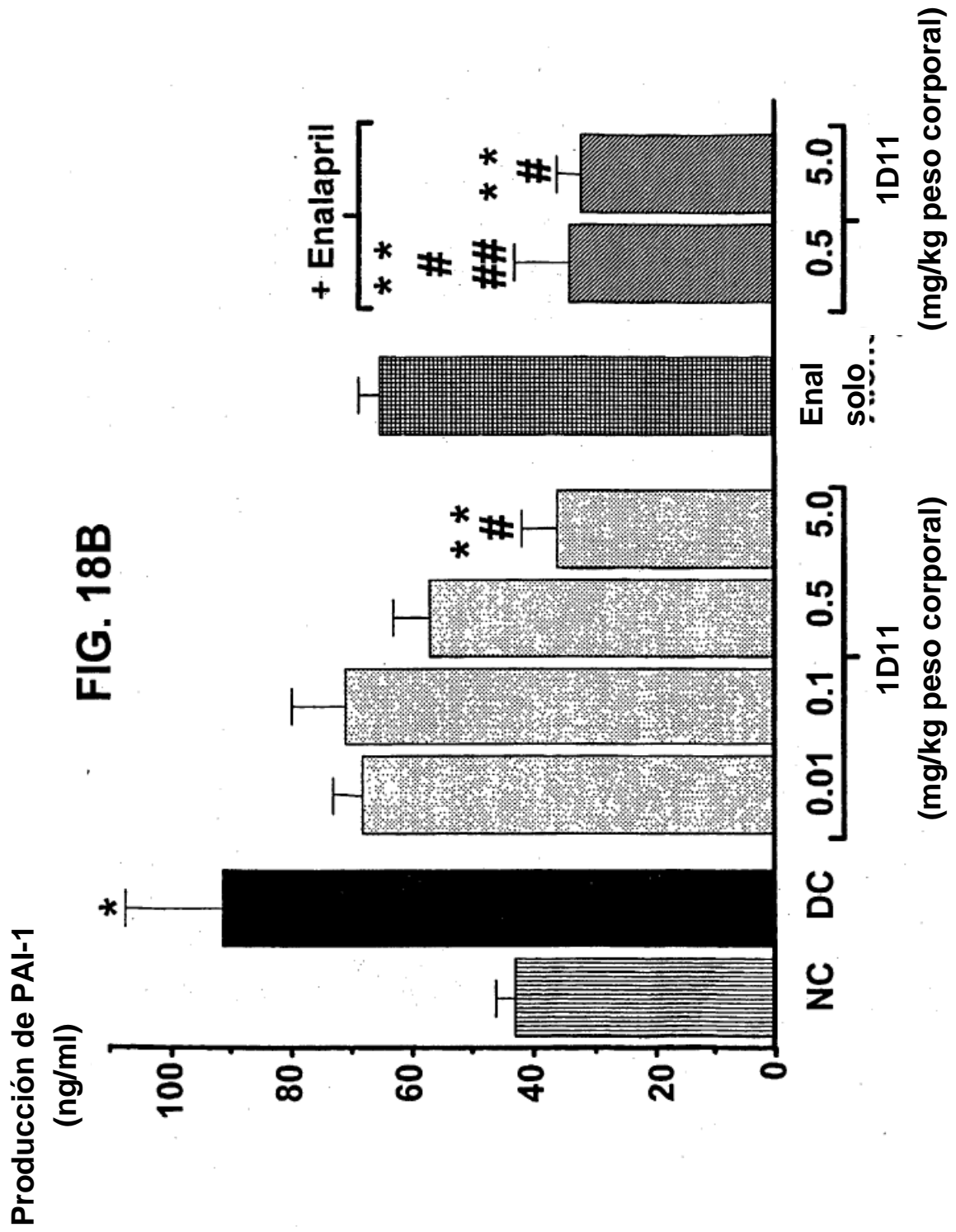


FIG. 17

FIG. 18A

Producción de FN
(ng/ml)





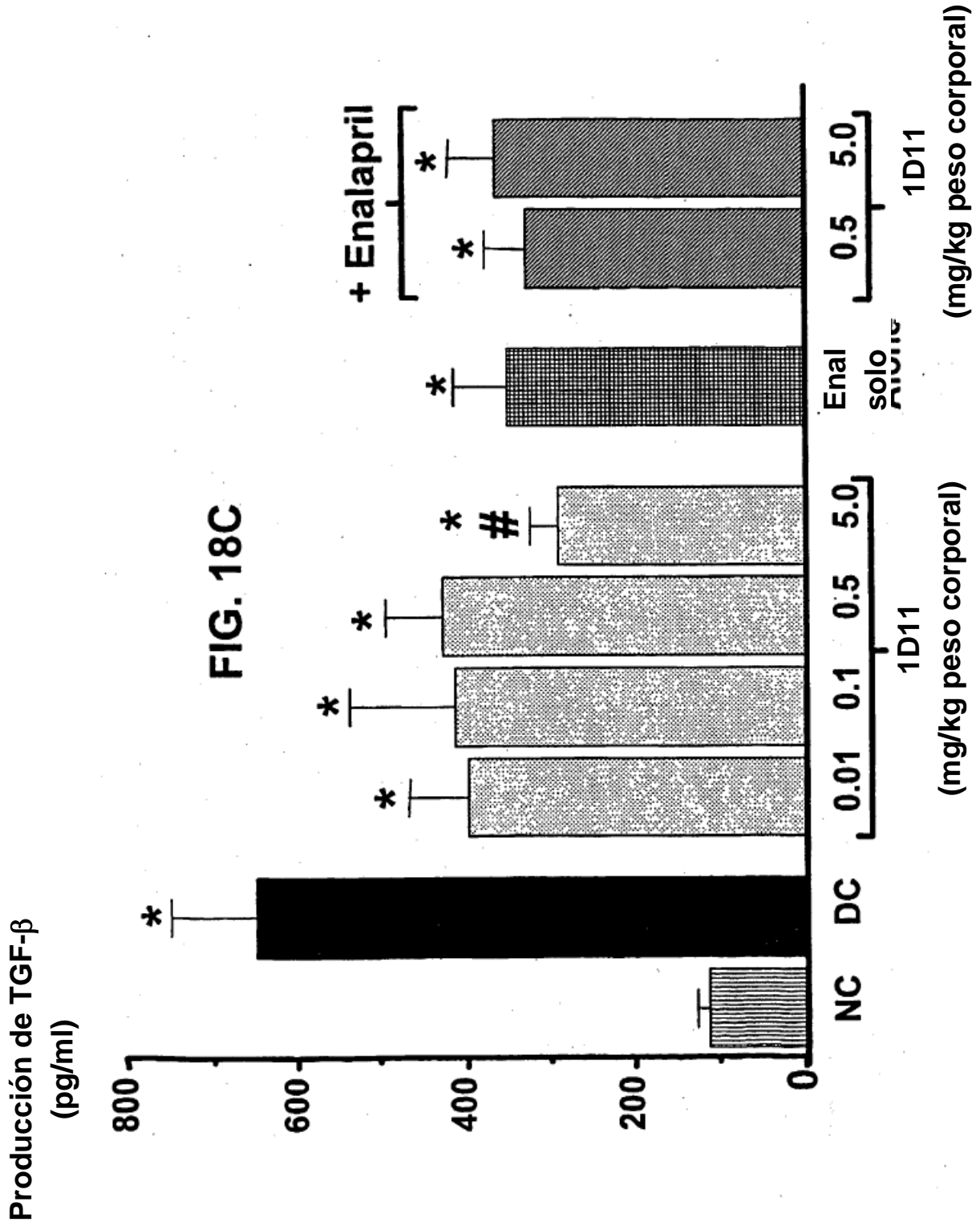
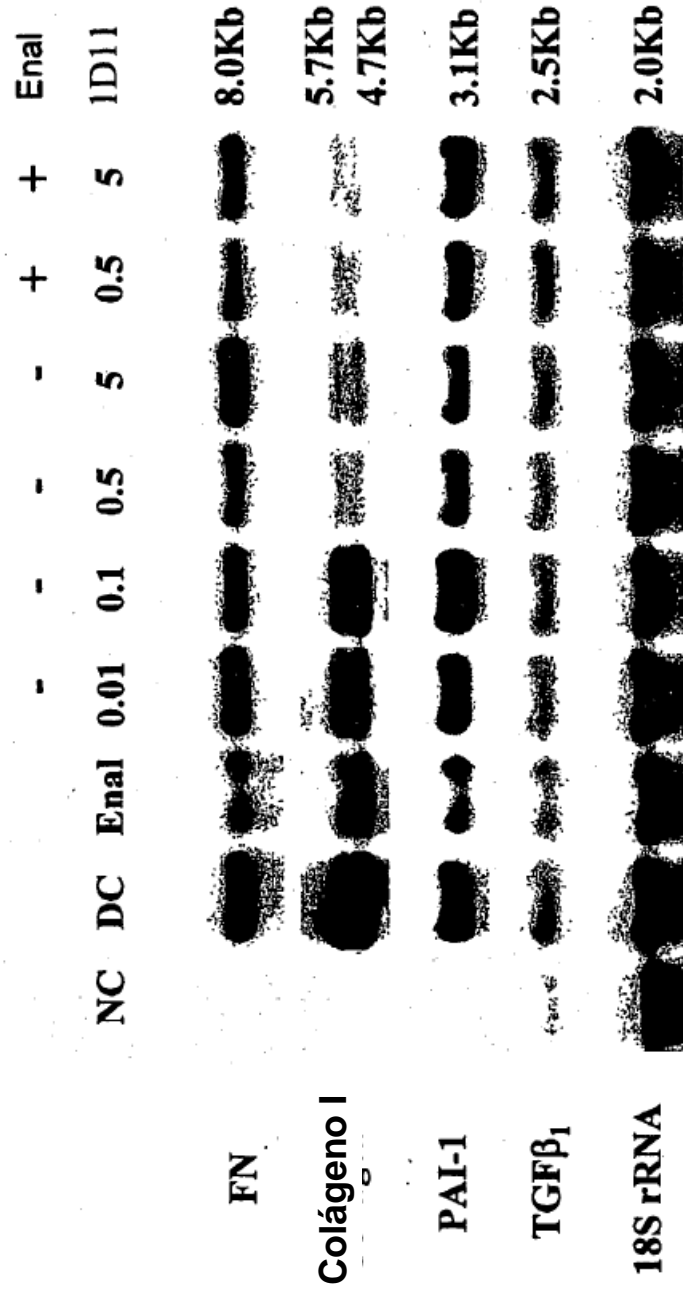
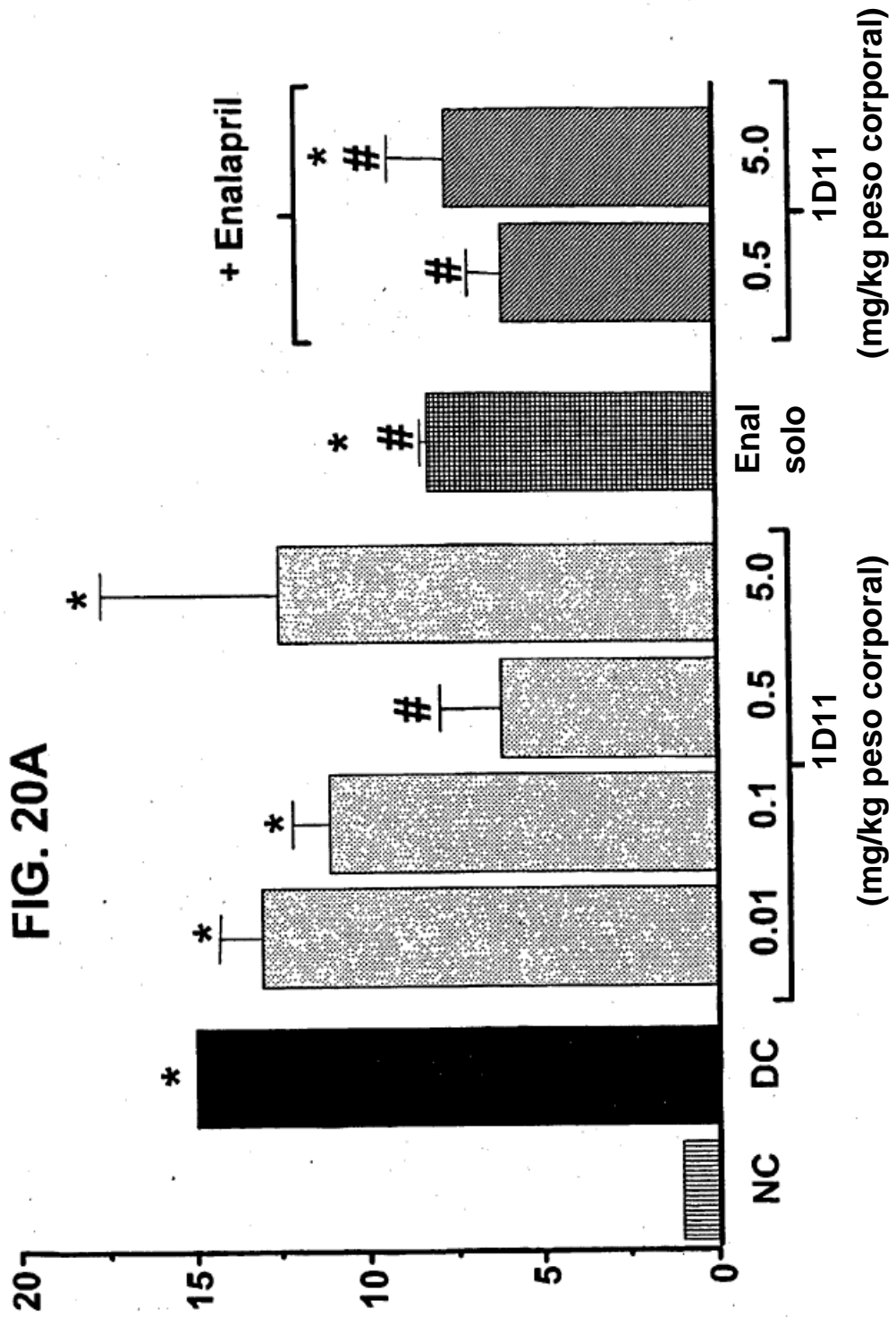


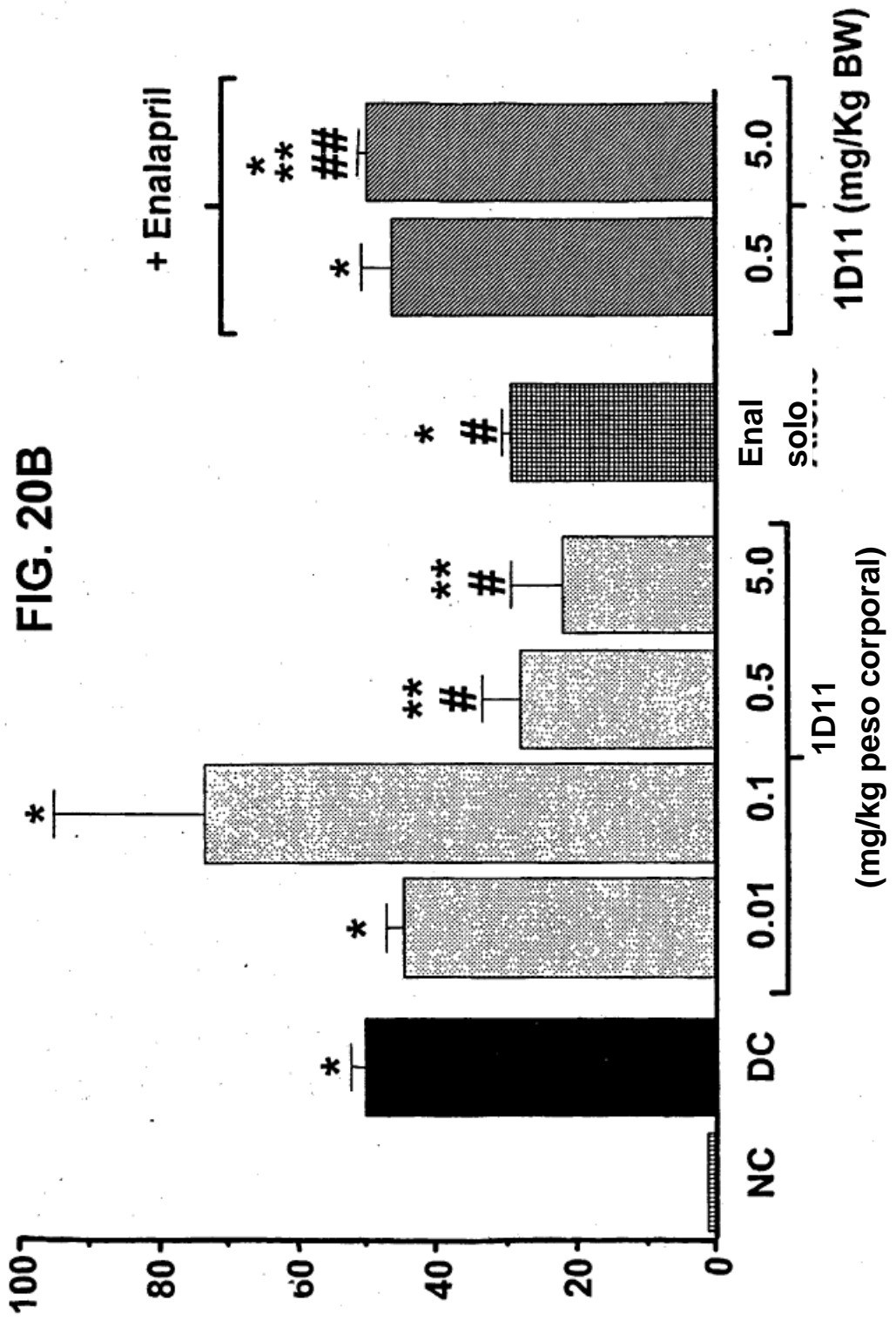
FIG. 19



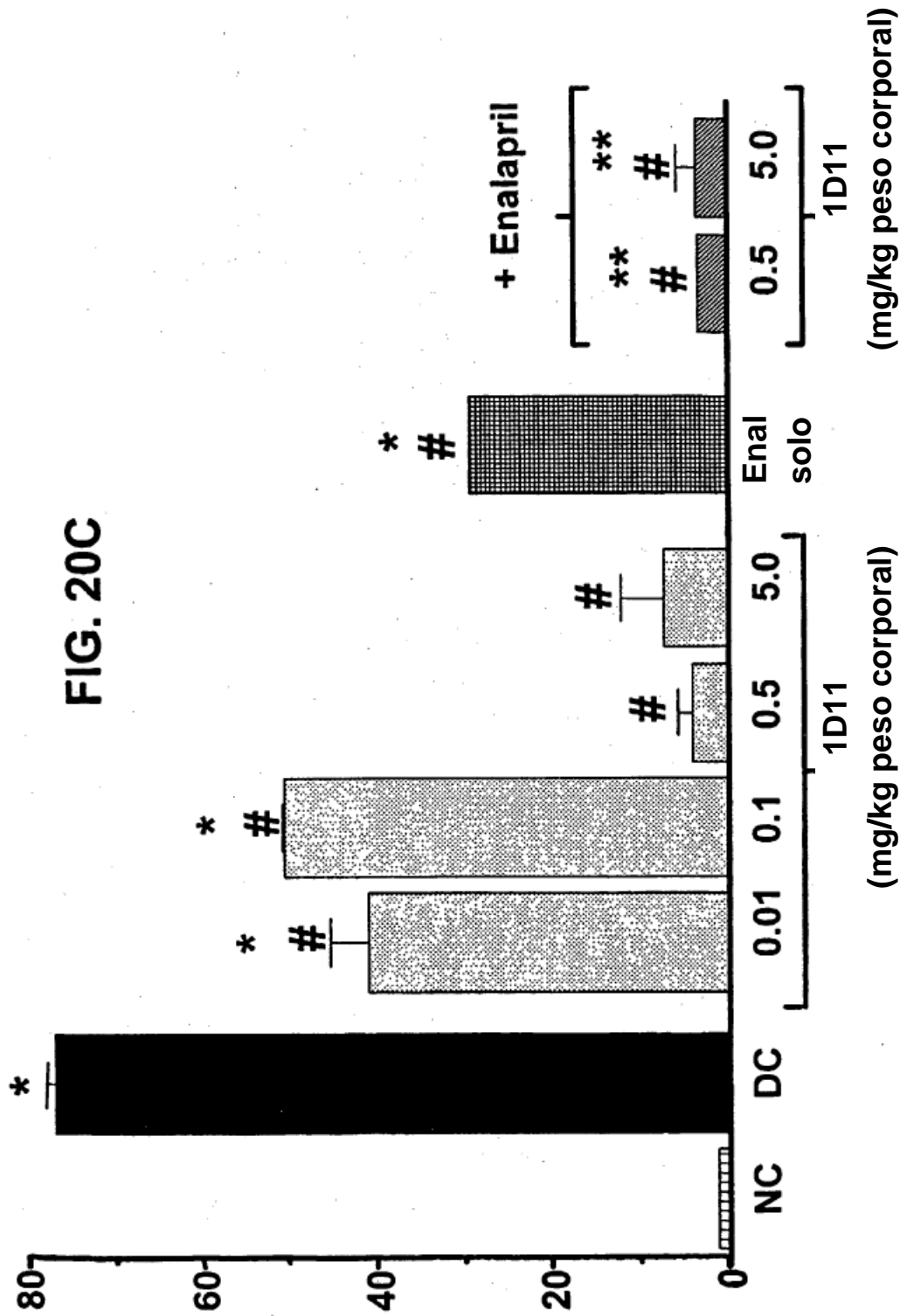
ARNm de FN
EDA+



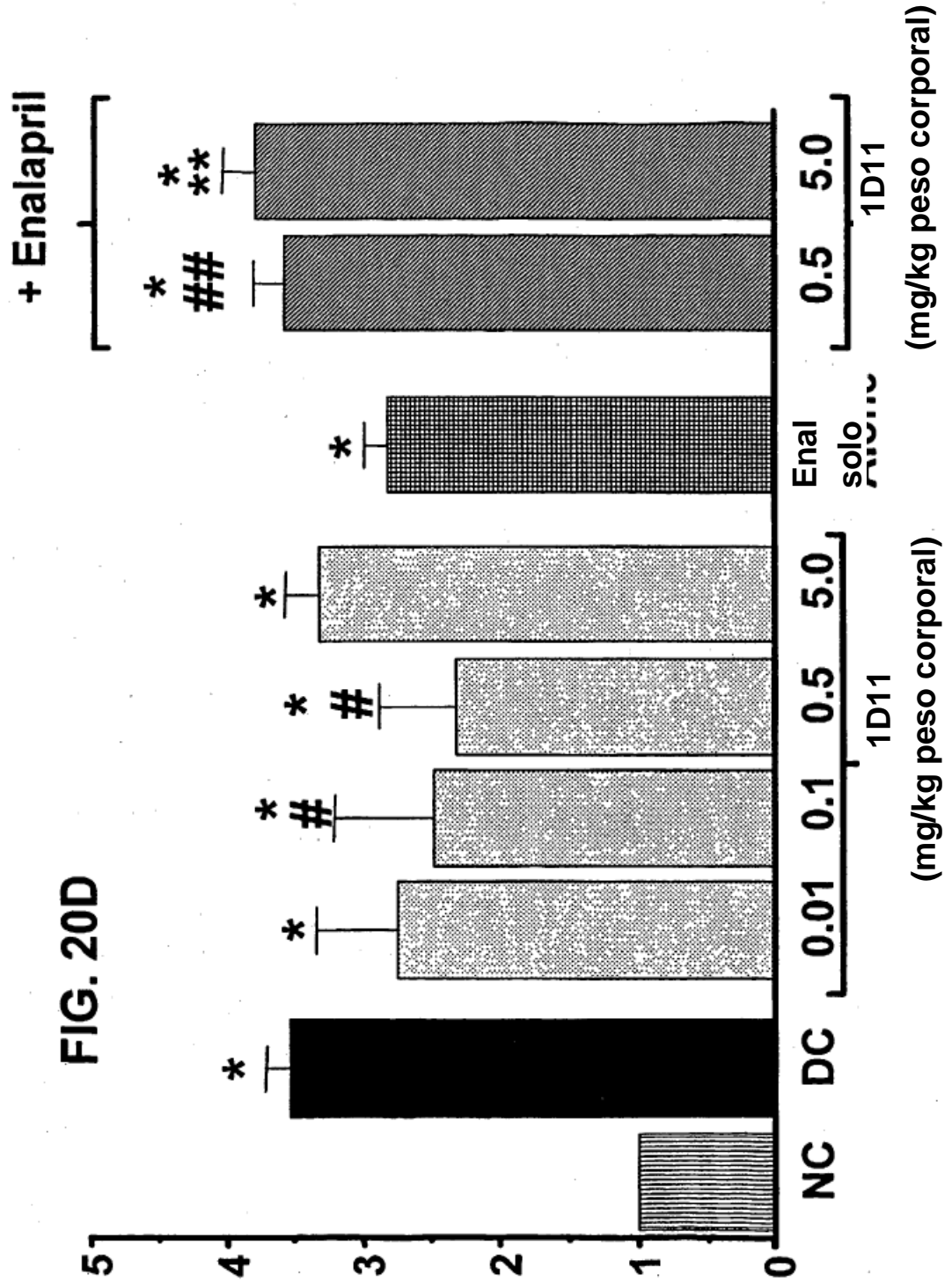
ARNm de PAI-1



ARNm de
Colágeno 1



ARNm de TGF-β



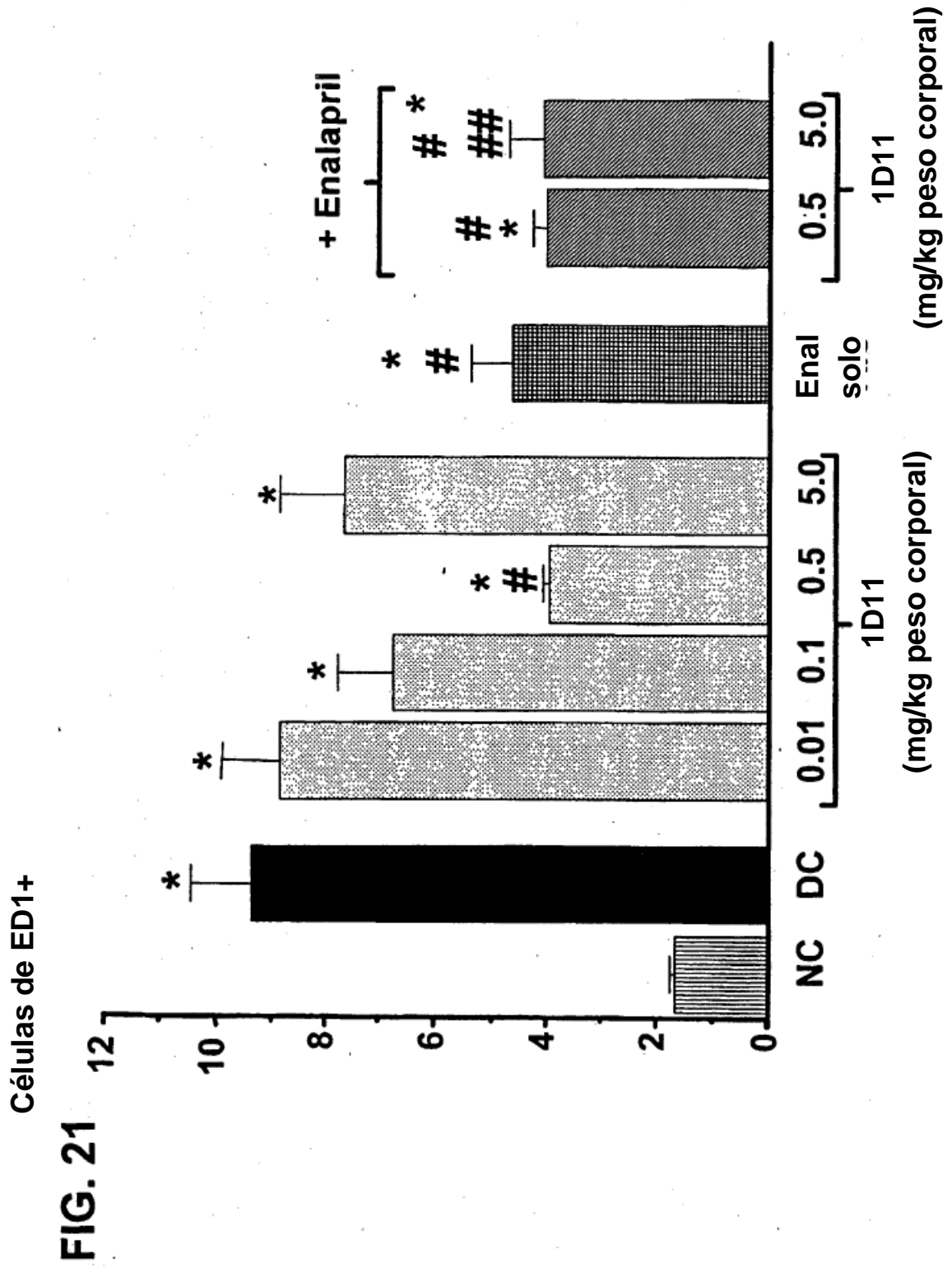


FIG. 22

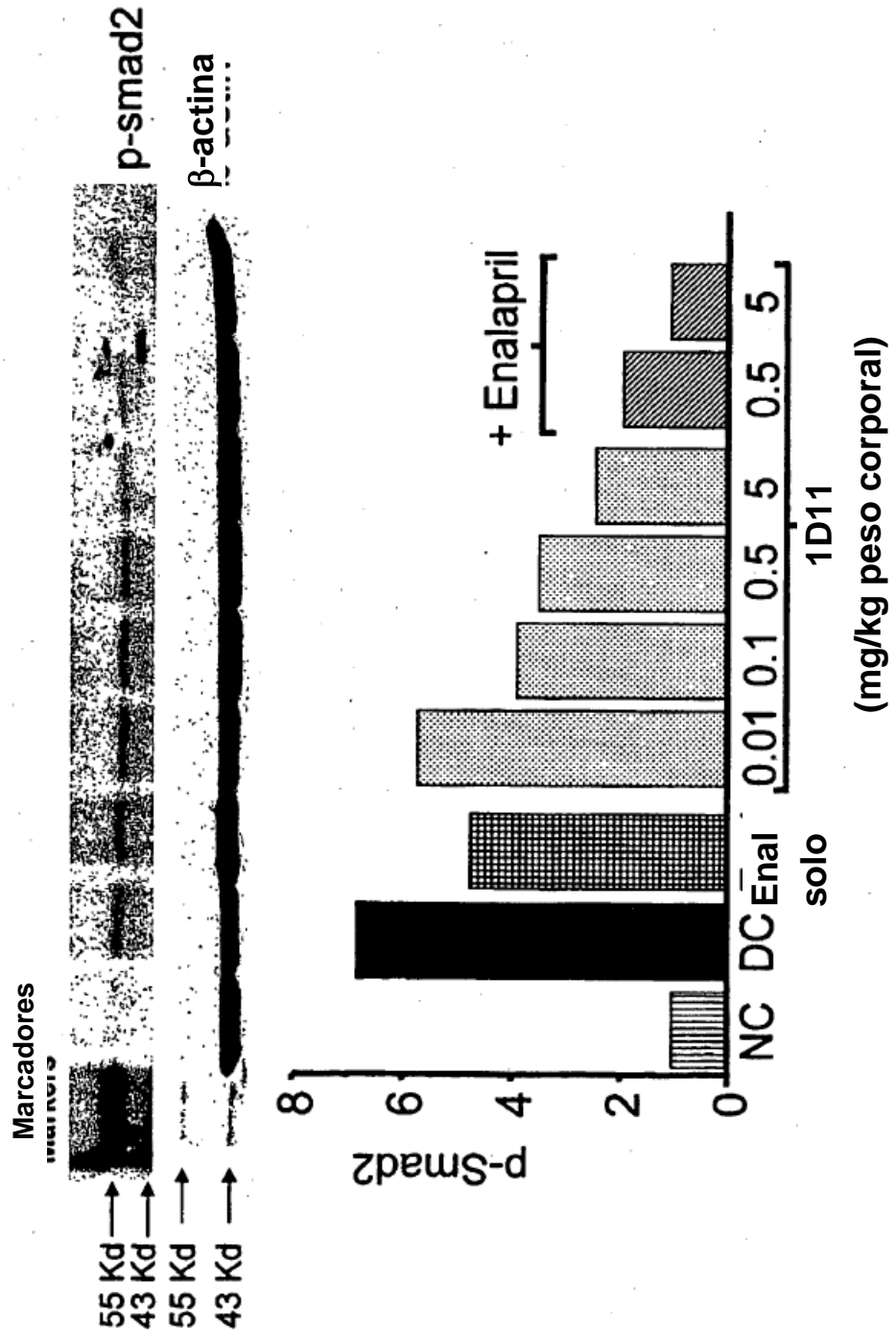


FIG. 23

TABLA 2

GRUPO	TRATAMIENTO Y (DÍAS DE TRATAMIENTO)	DESIGNACIÓN
1	PBSIV (0)	Control normal (CN)
2	OX7 IV (0), PBS IP (1, 3 y 5)	Enfermedad de control (EC)
3	OX7 IV (0), 1D11, 0,01 mg/kg IP (1, 3 y 5)	Ab 0,01
4	OX7 IV (0), 1D11, 0,1 mg/kg IP (1, 3 y 5)	Ab 0,1
5	OX7 IV (0), 1D11, 0,5 mg/kg IP (1, 3 y 5)	Ab 0,5
6	OX7 IV (0), 1D11, 5 mg/kg IP (1, 3 y 5)	Ab 5,0
7	OX7 IV (0), Enalapril 200 mg/ml en el agua para beber (1-6)	Enal
8	OX7 IV (0), Enalapril 200 mg/ml en el agua para beber (1-6), 1D11, 0,5 mg/kg IP (1, 3 y 5)	Enal + Ab 0,5
9	OX7 IV (0), Enalapril 200 mg/ml en el agua para beber, 1D11, 5 mg/kg IP (1, 3 y 5)	Enal + Ab 5,0
10	OX7 IV (0), 13C4 (anticuerpo de control), 5 mg/kg IP (1, 3 y 5)	Ab de control