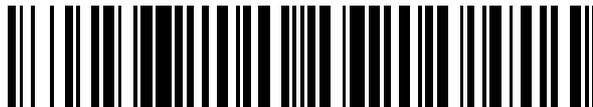


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 422**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2008 E 08833608 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2209802**

54 Título: **Antagonistas de resistina y su uso**

30 Prioridad:

24.09.2007 US 974607 P

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

12.02.2016

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**CARTON, JILL;
FARRELL, FRANCIS;
MURRAY, LYNNE;
ORT, TATIANA y
TEPLYAKOV, ALEXEY**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 559 422 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).

Antagonistas de resistina y su uso**Descripción****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a antagonistas de resistina tales como anticuerpos y a su uso en el tratamiento de enfermedades con patologías fibróticas y a antígenos útiles para generar anticuerpos anti-resistina.

10 Antecedentes de la invención

La enfermedad pulmonar intersticial (ILD) es un término colectivo para más de 100 enfermedades diferentes con características clínicas, radiológicas y fisiológicas similares. Las causas subyacentes pueden ser debidas a enfermedad sistémica o exposición ocupacional. Sin embargo, algunas ILD tienen etiología subyacente desconocida. Estas enfermedades pulmonares fibróticas son difíciles de tratar, requiriéndose biopsias para el diagnóstico.

La enfermedad pulmonar fibrótica más común es la UIP (neumonía intersticial usual) con una incidencia de entre 3-29 por 100.000 (Coultais et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150:967-72 (1994)). La UIP se desarrolla insidiosamente durante algunos meses a varios años y frecuentemente los cambios radiológicos aparecen antes que los síntomas clínicos. Los hallazgos histológicos característicos de UIP incluyen la presencia de fibrosis pulmonar heterogénea en parches que, a medida que avanza la enfermedad, puede producir colapso alveolar, bronquiectasia y patrón de abeja. La neumonía intersticial no específica (NSIP) presenta síntomas clínicos similares a la UIP. Sin embargo, aunque ciertos hallazgos histológicos son similares, este grupo de pacientes tiende a tener menos fibrosis (MacDonald et al., Radiology 221:600-5 (2001)). Además, los pacientes con NSIP son más sensibles a corticosteroides y en un estudio los pacientes con NSIP tuvieron pronóstico considerablemente mejorado (Daniil et al., Am. J. Respir. Crit. Care. 160:899-905 (1999)).

Ha habido informes en la bibliografía de que hay diferencias en los fibroblastos obtenidos de enfermedad pulmonar fibrótica en comparación con células obtenidas de enfermedad pulmonar no relacionada con la fibrosis, tal como muestras aisladas de los márgenes normales de resecciones de tumor pulmonar. Las secciones de tejido de pacientes con UIP expresan elevados niveles de CXCL8 (también conocidas como interleucina 8 o IL8), una quimiocina angiogénica y niveles reducidos de una quimiocina angiostática CXCL10 (proteína inducible por IFN de 10 kDa, IP10), sugiriendo así un desequilibrio en la angiogénesis neta en los pulmones de pacientes con UIP (Keane et al., J. Immunol. 159:1437-43 (1997)). Además, los fibroblastos de estos pacientes también expresaron CXCL8 elevado, sugiriendo que el fibroblasto es la principal célula efectora que causa el desequilibrio angiogénico (Keane et al., arriba). Más recientemente se ha mostrado que los fibroblastos de pacientes con UIP expresan y secretan elevados niveles de CCL7 (proteína 3 quimiotáctica de monocitos, MCP3) (Choi et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 170:508-15 (2004)). Los estudios que comparan la expresión génica inducida por TGFβ1 en fibroblastos de tejido no fibrótico, UIP y fibrosis pulmonar inducida por esclerodermia también han demostrado distintos fenotipos y respuestas de fibroblastos dependiendo del entorno del que se han aislado las células (Renzoni et al., Respir. Res. 5:24 (2004)).

La resistina es un factor secretado que pertenece a la familia de las proteínas FIZZ (encontradas en la zona inflamatoria, también conocidas como RELM) que contiene un dominio rico en Cys del extremo conservado (Steppan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:502-506 (2001)). Se describió originalmente en ratones como un polipéptido derivado de adipocitos que proporcionó el enlace entre la obesidad y la resistencia a la insulina (Steppan et al., Nature 409:307-312 (2001)). La resistina humana, por otra parte, es un factor derivado de macrófagos/monocitos reconocido como un potente factor proinflamatorio. La resistina humana induce la liberación de citocinas de diversas células de origen inmune, regula por incremento la expresión de moléculas de adhesión y promueve la angiogénesis en células endoteliales (Burnett et al., Atherosclerosis 182:241-8 (2005); Mu et al., Cardiovasc. Res. 70:146-57 (2006); Verma et al., Circulation 108:736-40 (2003); Bokarewa et al., J. Immunol. 174:5789-95 (2005)). El efecto de la resistina está probablemente mediado por la vía de NF-kb (Bokarewa et al., arriba).

Actualmente se han identificado cuatro miembros de la familia de FIZZ en roedores y dos en seres humanos. Entre ellos, FIZZ1 (RELMα) participa en el desarrollo de fibrosis pulmonar en ratones. Se descubrió FIZZ1 en líquido de lavado en un modelo pulmonar alérgico murino (Holcomb et al., EMBO J. 19:4046-55 (2000)). Además, se encontró la regulación por incremento de los genes FIZZ1 en pulmón de ratones fibróticos inducidos por bleomicina (Liu et al., Am. J. Pathol. 164:1315-26 (2004)). La inyección intravenosa de FIZZ1 en ratones mostró un marcado aumento de los macrófagos CD68 positivos en los pulmones (Yamaji-Kegan et al., J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. August 4, 2006 e-print). Estudios *in vitro* mostraron que FIZZ1 tiene propiedades mitogénicas y puede mediar en la fibrosis mediante la estimulación de la proliferación de células de músculo liso y la inducción de la deposición de actina y colágeno en fibroblastos de pulmón (Teng et al., Circ. Res. 92:1065-7 (2003)). La instilación intratraqueal de FIZZ1 produjo un aumento significativo de la producción de VEGF, sugiriendo la función de FIZZ1 en la angiogénesis pulmonar (Tong et al., Respir. Res. 7:37 (2006)). No se ha identificado un ortólogo de FIZZ1 en el genoma humano. De forma interesante, la resistina humana (FIZZ3) muestra una mayor similitud en el patrón de expresión con FIZZ1 murina, sugiriendo entonces la resistina murina una posible similitud funcional. Sin embargo, la relación entre la

resistina humana y la fibrosis pulmonar sigue estando ampliamente sin explorar.

No se ha identificado un receptor de resistina, que limita el entendimiento de la biología de la resistina. Recientemente, se ha resuelto la estructura tridimensional de la resistina de ratón (Patel et al., Science 304:1154-8 (2004). La resistina de ratón forma oligómeros trímeros no covalentes que pueden agregarse en estructuras hexámeras enlazadas por disulfuro. No hay información estructural sobre la resistina humana.

Así, en vista de lo anterior, existe la necesidad de información estructural sobre la resistina humana y de terapéuticos, tales como antagonistas de resistina, para tratar fibrosis pulmonar y sus síntomas asociados.

El documento WO 03/085093 describe anticuerpos y moléculas relacionadas que se unen inmunoespecíficamente a péptidos GMAD antigénicos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra niveles de resistina en biopsias de pulmón de pacientes con UIP, NSIP y no fibróticos.

Las Fig. 2A, B y C muestran los efectos de la resistina sobre la inducción de la expresión génica de procolágeno I y α -actina de músculo liso (α SMA) en fibroblastos derivados de pulmón fibrótico y pulmón no fibrótico y después de tratar fibroblastos de pulmón primarios aislados de biopsia de pulmón fibrótico con resistina recombinante.

Las Fig. 3A y B muestran el efecto de la resistina sobre la expresión génica de factores de crecimiento pro-fibróticos y receptores del factor de crecimiento en fibroblastos de pulmón primarios.

Las Fig. 4A y B muestran la inducción del nivel de expresión de varios genes relacionados con la matriz extracelular (4A) y el gen IL-6 (4B) en fibroblastos de pulmón.

Las Fig. 5A, B y C muestran el aumento en la liberación de citocinas pro-inflamatorias IL-6 (5A), IL-8 (5B) y MCP-1 (5C) después de que fibroblastos primarios de pulmón humano se trataran con resistina recombinante.

La Fig. 6 muestra la secreción de resistina de monocitos primarios humanos. Monocitos no adherentes o adherentes no se trataron o se estimularon con moduladores pro-fibróticos, * indica valor de $p < 0,05$.

Las Fig. 7A y B muestran la co-localización de resistina con células similares a macrófagos en secciones de tejido de UIP.

La Fig. 8 muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de resistina humana y de ratón.

La Fig. 9 muestra la unión de anticuerpos policlonales C2815 y C2816 a resistina humana de longitud completa.

Las Fig. 10A y B muestran el efecto de anticuerpos policlonales C2815 y C2816 sobre la liberación de MCP-1 mediada por resistina humana de células mononucleares de sangre primaria (CMSP) humanas aisladas.

Las Fig. 11A y B muestran el efecto de los anticuerpos policlonales C2815 y C2816 sobre la liberación de MCP-1 mediada por resistina de ratón de CMSP humanas aisladas.

Sumario de la invención

La invención se refiere a un antagonista de resistina tal como un anticuerpo aislado reactivo con resistina que neutraliza al menos una de sus actividades biológicas.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo aislado reactivo con un epítipo localizado en los residuos 78 a 93 (SEC ID N°: 4) de resistina humana.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del antagonista de resistina de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es la composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de modificación de la actividad biológica de resistina en un mamífero que comprende administrar la composición farmacéutica al mamífero. Otro aspecto de la invención es la composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de tratamiento, o alivio, de los síntomas de las enfermedades con actividad de fibroblastos aberrante que incluyen enfermedades pulmonares intersticiales, cicatriz hipertrófica, cicatriz queloide, esclerodermia, fibrosis hepática, fibrosis renal y fibrosis cardíaca que comprende administrar la composición farmacéutica a un paciente en necesidad de la misma.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la función de resistina, una citocina, como novedosa diana terapéutica para antagonistas de resistina para tratar enfermedades asociadas a patologías fibróticas tales como ILD, esclerodermia, cicatriz hipertrófica, además de enfermedades asociadas a una significativa remodelación en el pulmón tales como asma y trastorno pulmonar obstructivo crónico (EPOC).

En la presente divulgación se ha mostrado que la proteína resistina se detecta en pulmones fibróticos. La inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales anti-resistina indica que la resistina se expresa en células de

monocito/macrófago que participan en procesos fibróticos y de remodelación. La secreción de resistina se induce por moduladores pro-fibróticos, sugiriendo que elevados niveles locales de resistina podrían estar presentes en pulmón fibrótico. La resistina afecta directamente los fibroblastos de pulmón primarios, induciendo genes asociados a la acumulación de matriz extracelular (ECM) y diferenciación de miofibroblastos, dos procesos que contribuyen a la patogénesis de la fibrosis pulmonar. La resistina también induce la expresión de factores de crecimiento pro-fibróticos y sus receptores en fibroblastos de pulmón. Además, la resistina estimula la respuesta inflamatoria en fibroblastos de pulmón, aumentando la liberación de citocinas pro-inflamatorias. La resistina afecta las células fibróticas más que los fibroblastos no fibróticos, sugiriendo que la señalización de resistina está regulada por incremento en fibroblastos enfermos. Finalmente, en la presente divulgación se muestra que la expresión y secreción de resistina se inducen por moduladores pro-fibróticos. Tomados conjuntamente, estos datos sugieren que la resistina es capaz de agravar la fibrosis, contribuyendo a la activación de fibroblastos e inflamación pulmonar. Por consiguiente, la inhibición de resistina será beneficiosa para el tratamiento de enfermedades asociadas a la función aberrante de fibroblastos.

Además, la presente divulgación describe un modelo de la estructura tridimensional de resistina humana que se basó en la estructura cristalina de la proteína de ratón. Este modelo se usa para predecir un posible sitio de unión al receptor basado en la similitud estructural con la superfamilia C1q/TNF. Se han producido dos anticuerpos policlonales contra péptidos que abarcan el sitio de unión al receptor predicho y la actividad neutralizante de anticuerpos se confirmó en el ensayo funcional *in vitro*. Los datos sugieren que los epítopes identificados son importantes para la función de la resistina y pueden usarse para la generación de agentes terapéuticos que neutralizan resistina.

En una realización de la divulgación, los péptidos de epítipo están conjugados con una proteína transportadora o fusionada con un andamiaje de proteína mayor para su uso como antígeno para la inmunización y/o para la inmunopurificación de presentación en fagos para la generación de anticuerpo anti-resistina neutralizante. Los epítipes funcionales desvelados pueden usarse para cribar un panel de anticuerpos para identificar aquellos con actividad neutralizante.

Polipéptidos y composiciones de anticuerpo

La presente invención proporciona un antagonista contra resistina. En una realización, el antagonista de resistina es un anticuerpo que tiene las propiedades de unión a resistina y que neutraliza al menos una actividad biológica de resistina.

El término “antagonista” se usa en el sentido más amplio e incluye una molécula que es capaz de contrarrestar, reducir o inhibir, directamente o indirectamente, parcialmente o completamente, una o más actividades biológicas de la resistina.

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio e incluye inmunoglobulina o moléculas de anticuerpo que incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales que incluyen anticuerpos monoclonales murinos, humanos, humanizados y quiméricos y fragmentos de anticuerpos.

En general, los anticuerpos son proteínas o polipéptidos que presentan especificidad de unión a un antígeno específico. Los anticuerpos intactos son glicoproteínas heterotetraméricas, compuestas de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas idénticas. Normalmente, cada cadena ligera está enlazada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes de disulfuro entre las cadenas regularmente separados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Cadenas ligeras del anticuerpo de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, concretamente kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales, concretamente IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. IgA e IgG se subclasifican adicionalmente como los isotipos IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

El término “fragmentos de anticuerpos” significa una porción de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, y moléculas de anticuerpo monocatenario.

“CDR” se definen como las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de un anticuerpo que son las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Hay tres CDR de la cadena pesada y tres de la cadena ligera o regiones CDR en la porción variable de una inmunoglobulina. Así, “CDR” como se usa en el presente documento se

refiere a las tres CDR de la cadena pesada, o las tres CDR de la cadena ligera, o tanto a todas las CDR de la cadena pesada como la ligera, si es apropiado.

Las CDR proporcionan la mayoría de los residuos de contacto para la unión del anticuerpo al antígeno o epítipo. Las CDR de interés en la presente invención se derivan de secuencias de cadenas pesadas y ligeras variables de anticuerpo donante, e incluyen análogos de las CDR que existen de forma natural, análogos que también comparten o retienen la misma especificidad de unión al antígeno y/o capacidad neutralizante como anticuerpo donante del que se derivaron.

El término "anticuerpo monoclonal" (mAb) como se usa en el presente documento significa un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando normalmente dirigidos contra un único determinante antigénico. El modificador "monoclonal" indica el carácter sustancialmente homogéneo del anticuerpo y no requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, pueden prepararse mAb murinos por el método de hibridoma de Kohler et al., *Nature* 256:495-497 (1975). Los mAb quiméricos que contienen una región variable de la cadena ligera y de la cadena pesada derivada de un anticuerpo donante (normalmente murino) en asociación con regiones constantes de la cadena ligera y pesada derivada de un anticuerpo aceptor (normalmente otra especie de mamífero tal como humana) pueden prepararse por el método desvelado en la patente de EE.UU. Nº 4.816.567. Los mAb humanizados que tienen CDR derivadas de una inmunoglobulina humana no donante (normalmente murina) y las restantes partes derivadas de inmunoglobulina de la molécula que se derivan de una o más inmunoglobulinas humanas, que opcionalmente tienen residuos de soporte de la región estructural alterados para preservar la afinidad de unión, pueden obtenerse por las técnicas desveladas en Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:10029-10032 (1989) y Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991). Secuencias de la región estructural humana a modo de ejemplo útiles para la humanización se desvelan en, por ejemplo, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php; www.kabatdatabase.com/top.html; <ftp://ncbi.nih.gov/repository/kabat>; www.sciquest.com; www.abcam.com; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com; pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html; www.appliedbiosystems.com; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody; www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com; www.cancerresearchuk.org; www.biotech.ufl.edu; www.isac-net.org; baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu; www.mrc-cpe.cam.ac.uk; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; <http://www.bioinf.org.uk/abs>; antibody.bath.ac.uk; www.unizh.ch; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.html; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.jerini.de; imgt.cines.fr; y Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Dept. Health (1987).

Pueden prepararse mAb completamente humanos que carecen de cualquier secuencia no humana a partir de ratones transgénicos para inmunoglobulina humana por técnicas citadas en, por ejemplo, Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-851 (1996) y Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997). Los mAb humanos también pueden prepararse y optimizarse a partir de bibliotecas de presentación en fagos por técnicas citadas en, por ejemplo, Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296:57-86 (2000) y Krebs et al., *J. Immunol. Meth.* 254:67-84 (2001).

La presente invención se refiere a antagonistas de resistina capaces de unirse a resistina humana y modular la señalización mediada por NF- κ B. La presente invención también se refiere a antagonistas de resistina capaces de unirse a resistina humana y modular las actividades mediadas por resistina que incluyen, pero no se limitan a, activación aberrante de fibroblastos, inducción de la expresión génica pro-fibrótica, estimulación de respuestas inflamatorias. Tales antagonistas incluyen anticuerpos anti-resistina que tienen las propiedades de unión a resistina y modulación de la señalización de resistina. Un aspecto de la invención es un anticuerpo reactivo con resistina humana que inhibe la liberación mediada por resistina de otras citocinas inflamatorias que incluyen, pero no se limitan a, MCP-1, IL-8 y IL-6. Estos anticuerpos son útiles como reactivos de investigación, reactivos de diagnóstico y agentes terapéuticos. En particular, los anticuerpos de la invención son útiles como agentes terapéuticos para tratar fibrosis o aliviar síntomas de fibrosis.

Anticuerpos a modo de ejemplo pueden ser anticuerpos de los isotipos IgG, IgD, IgA o IgM. Adicionalmente, tales anticuerpos pueden modificarse postraduccionalmente por procesos tales como glicosilación, isomerización, aglicosilación o modificación covalente que no existen de forma natural, tales como la adición de restos de polietilenglicol (pegilación) y lipidación. Tales modificaciones pueden producirse *in vivo* o *in vitro*. Moléculas completamente humanas, humanizadas y maduras por afinidad de anticuerpo o fragmentos de anticuerpos están dentro del alcance de la invención ya que son mimeticuerpos, proteínas de fusión y proteínas quiméricas.

Los anticuerpos de la invención pueden unirse al epítipo de resistina humana ${}_{78}\text{CGSWDVR AETTCHCQC}_{93}$ (SEC ID Nº: 4). Este epítipo de resistina puede aislarse y modificarse para su uso como un antígeno para producir y cribar anticuerpos monoclonales contra resistina humana. Por ejemplo, la secuencia de epítipo puede modificarse para

eliminar los residuos de cisteína para prevenir el enlace disulfuro. Estos residuos pueden sustituirse con serina.

Los anticuerpos de la invención pueden unirse a resistina humana con una K_d inferior a o igual a aproximadamente 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} o 10^{-12} M. La afinidad de un anticuerpo dado contra resistina humana puede determinarse experimentalmente usando cualquier método adecuado. Tales métodos pueden utilizar instrumentación Biacore o KinExA, ELISA o ensayos de unión competitiva conocidos para aquellos expertos en la materia. Moléculas de anticuerpo que se unen a resistina humana con una afinidad deseada pueden seleccionarse de bibliotecas de variantes o fragmentos por técnicas que incluyen maduración por afinidad de anticuerpos y otras técnicas reconocidas en la materia adecuadas.

Otro aspecto de la presente invención es composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo para resistina y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable conocido en la técnica. El vehículo o diluyente puede ser una disolución, suspensión, emulsión, coloide o polvo.

Un anticuerpo para resistina de la invención se formula como una composición farmacéutica en una cantidad terapéuticamente eficaz. El término "cantidad eficaz" generalmente se refiere a las cantidades de anticuerpo necesarias para terapia eficaz, es decir, el alivio parcial o completo del síntoma o trastorno para el que se busca el tratamiento. Incluida dentro de la definición de terapia eficaz están tratamientos profilácticos previstos para reducir la probabilidad de aparición de los síntomas o trastornos anteriormente descritos.

Ácidos nucleicos, vectores y líneas celulares

Otro aspecto de la presente divulgación es moléculas de ácidos nucleicos aisladas que comprenden, complementarias a o que tienen identidad significativa con un polinucleótido que codifica una cadena pesada o ligera de anticuerpo que tiene secuencias de aminoácidos CDR. Otros polinucleótidos que, dada la degeneración del código genético o la preferencias de codones en un sistema de expresión dado, codifican CDR de la región variable de la cadena pesada o ligera también están dentro del alcance de la divulgación.

Normalmente, los ácidos nucleicos de la presente divulgación se usan en vectores de expresión para la preparación de los polipéptidos de anticuerpo de resistina de la invención. Los vectores dentro del alcance de la divulgación proporcionan elementos necesarios para la expresión eucariota, que incluye los vectores conducidos por el promotor viral, tales como los vectores conducidos por el promotor del CMV, por ejemplo, pcDNA3.1, pCEP4 y sus derivados, vectores de expresión de baculovirus, vectores de expresión de Drosophila y vectores de expresión que son conducidos por promotores del gen de mamífero, tales como los promotores del gen Ig humana. Otros ejemplos incluyen vectores de expresión procariotas, tales como vectores conducidos por el promotor T7, por ejemplo, pET41, vectores conducidos por el promotor de lactosa y vectores conducidos por el promotor del gen arabinosa.

La presente divulgación también se refiere a líneas celulares que expresan anticuerpos para resistina. Las células huésped pueden ser células procariotas o eucariotas. Células eucariotas a modo de ejemplo son células de mamífero, tales como, pero no se limitan a, COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, HepG2, 653, SP2/0, NS0, 293, HeLa, mieloma, células de linfoma, o cualquier derivado de las mismas. Lo más preferentemente, las células huésped son células HEK293, NS0, SP2/0 o CHO. Las líneas celulares pueden generarse por procedimientos de transfección estable o transitoria que son muy conocidos en la técnica.

La presente divulgación proporciona además métodos para expresar un anticuerpo para resistina que comprende cultivar las líneas celulares en condiciones en las que el anticuerpo para resistina se expresa en cantidades detectables o recuperables. La presente divulgación también proporciona métodos para generar anticuerpo para resistina que comprenden traducir los ácidos nucleicos del anticuerpo para resistina que codifican en condiciones *in vitro* o *in situ*, de forma que el anticuerpo para resistina se exprese en cantidades detectables o recuperables. La presente divulgación también engloba un anticuerpo para resistina producido por los métodos anteriores.

Un anticuerpo para resistina puede recuperarse y purificarse por métodos muy conocidos que incluyen, pero no se limitan a, purificación en proteína A, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxilapatita y cromatografía en lectina. También puede emplearse cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la purificación.

Métodos terapéuticos para tratar o aliviar síntomas de fibrosis

Los anticuerpos para resistina son útiles como, entre otros, reactivos de investigación y agentes terapéuticos. En un aspecto, la presente invención se refiere a un método de modificación de las actividades biológicas de resistina que comprende proporcionar anticuerpo para resistina de la presente invención a un mamífero en necesidad del mismo. Ejemplos de tales actividades biológicas de resistina incluyen activación aberrante de fibroblastos, estimulación de la diferenciación de mioblastos, inducción de genes pro-fibróticos, liberación de citocinas pro-inflamatorias, inducción de la acumulación de colágeno I, además de otras actividades conocidas para aquellos expertos en la materia. Específicamente, el anticuerpo para resistina puede disminuir o inhibir las cascadas de señalización celular

mediadas por resistina, tales como, pero no se limitan a, la vía NF-kb.

La presente invención proporciona además métodos de alivio de los síntomas de o tratamiento de fibrosis que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de anticuerpo para resistina a un paciente en necesidad del mismo también. Como se ha descrito anteriormente, tal composición comprende una cantidad eficaz de anticuerpo para resistina y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La cantidad eficaz para una terapia dada, si es curativa o preventiva, generalmente dependerá de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana y otros medicamentos administrados. Así, las dosis de tratamiento necesitarán ajustarse para optimizar la seguridad y eficacia. Además, el anticuerpo para resistina puede administrarse individualmente o en combinación con al menos un compuesto, proteína o composición adicional útiles para tratar fibrosis.

El modo de administración puede ser cualquier vía adecuada para administrar la cantidad farmacéuticamente eficaz de anticuerpo para resistina de la presente invención a un huésped. Por ejemplo, el anticuerpo para resistina puede administrarse mediante administración parenteral, tal como administración subcutánea, intratraqueal, intramuscular, intradérmica, intravenosa o intranasal, o cualquier otro medio conocido en la técnica.

La presente invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son simplemente para ilustrar aspectos de la presente invención y no pretenden ser limitaciones de la presente invención.

Ejemplo 1

La resistina está presente en el pulmón

Se homogeneizaron muestras de biopsia de pulmón de UIP, NSIP y los márgenes normales de tumores de pulmón en PBS que contienen inhibidor de la proteasa completo (Roche). Los niveles de resistina se midieron por ELISA (Linco Research Inc., St. Charles, MO) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la proteína total en cada muestra de biopsia de pulmón usando el ensayo de proteína BCA (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). Entonces se normalizaron los niveles de resistina a la cantidad de proteína en cada muestra de paciente y se muestran en la Fig. 1. La proteína resistina se detectó en homogeneizados derivados de todos los especímenes de biopsia de pulmón. No se observó diferencia significativa entre los grupos no fibróticos y fibróticos.

Ejemplo 2

La resistina estimula la expresión de genes asociados a fibrosis

Se aislaron fibroblastos pulmonares de biopsias de pulmón tomadas de pacientes con UIP (n=4); ahora denominados en el presente documento "fibroblastos fibróticos" o "fibroblastos de UIP". Los fibroblastos también se aislaron de tejido de pulmón tomado durante la resección de tumor pulmonar (n=5) y se confirmó que estas muestras eran no fibróticas por análisis histológico. Estos fibroblastos derivados de tejido no fibrótico se denominan en el presente documento "fibroblastos no fibróticos" (NF).

Se sembraron fibroblastos de pulmón humanos en placas de 24 pocillos (Costar, Corning, NY) a 100.000 células/pocillo y se dejaron adherir durante 8 horas. Las células se lavaron entonces con PBS y se cultivaron durante la noche en medio libre de suero (DMEM con l-glutamina, Pen/Estrep). Las células se estimularon entonces durante 24 h en presencia o ausencia de TGFβ-1 (1 o 10 ng/ml) o resistina (1 o 10 ug/ml). Se compró resistina humana recombinante de Peprotech, Inc (Rocky Hill, NJ). La pureza de la proteína se confirmó usando SDS-PAGE y espectroscopía de masas y se encontró que los niveles de endotoxina eran bajos (0,9 UE/ mg). Los sobrenadantes se eliminaron y se analizaron para proteína resistina usando ELISA comercialmente disponible o Luminex. Posteriormente se aisló ARN usando RNeasy Plus Mini-Kits (QIAGEN, Valencia, CA) según instrucciones del fabricante y se transcribió de forma inversa en ADNc usando reactivos de transcripción inversa TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se determinó la expresión génica profibrótica por PCR en tiempo real usando la mezcla maestra de PCR Taqman® Universal (Applied Biosystems) y los ensayos de expresión génica Taqman® previamente desarrollados (Applied Biosystems) según instrucciones del fabricante. La expresión génica cuantitativa se calculó usando el método comparativo de C_T , en el que los valores de C_T se determinan como el número de ciclos umbrales para el que primero se detectó la expresión génica. Los cambios en veces de la expresión génica para los genes de interés se normalizaron primero al gen de mantenimiento 18S, dando valores de ΔC_T . Los cambios en veces en la expresión génica debido a la estimulación *in vitro* se calcularon por $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{sin estimular})} - \Delta C_{T(\text{estimulada})}$, donde la muestra sin estimular sirvió de calibrador. Para investigar las posibles actividades pro-fibróticas de la resistina, el nivel de expresión de procolágeno I, alfa-actina de músculo liso (α SMA), CTGF, TGFβ1, TGFβR, PDGFR, receptor de hialuronano CD44, fibrilina (fn1), fibronectina (fn1) y IL-6 se evaluó en fibroblastos de pulmón sin tratar y tratados con resistina.

La acumulación de la deposición de colágeno y la presencia de miofibroblastos son dos distintivos clave de la fibrosis. TGFβ1, un modulador pro-fibrótico conocido usado como control positivo en el estudio, indujo una

regulación por incremento de tanto el procolágeno I como α SMA en fibroblastos de pulmón (Fig. 2). Similarmente, el tratamiento de fibroblastos de pulmón con resistina recombinante produjo la inducción de procolágeno I y la expresión de α SMA (Fig. 2). Y, lo que es más importante, este efecto de la resistina es específico para fibroblastos aislados de pacientes fibróticos, ya que la resistina no afectó la expresión génica en fibroblastos no fibróticos. Estos datos sugieren que el receptor/señalización de resistina está regulado por incremento/activado en células fibróticas.

Como se muestra en la Fig. 3A, la resistina indujo una regulación por incremento de genes CTGF y TGF β 1, moduladores pro-fibróticos conocidos. Además, la resistina también indujo una regulación por incremento de la expresión génica del receptor de TGF β y receptor de PDGF (Fig. 3B). Al igual que con los otros genes ya descritos, la resistina solo aumentó la expresión génica en fibroblastos fibróticos.

Alteraciones en los componentes de la matriz extracelular (ECM), además del recambio de matriz aberrante, son distintivos de diversas enfermedades fibróticas o enfermedades asociadas a la remodelación de tejido. Se evaluó el efecto de la resistina sobre varios de los genes ECM que incluyen el receptor de hialuronano CD44, fibrilina (fbn1) y fibronectina (fn1). La resistina potenció la expresión de CD44, fibrilina y fibronectina específicamente en fibroblastos fibróticos (Fig. 4A). La expresión génica inducida por resistina fue más pronunciada a baja concentración (1 μ g/ml). La resistina también indujo un aumento en la expresión de IL-6 en tanto fibroblastos fibróticos como no fibróticos (Fig. 4B).

Ejemplo 3

La resistina promueve un entorno pro-inflamatorio mediante la inducción de la liberación de citocinas

Se analizaron sobrenadantes libres de células de los fibroblastos aislados de las biopsias de pulmón que se estimularon *in vitro* con resistina humana recombinante para niveles de citocina por el kit de citocina humana LINCO (Linco Research). La resistina estimuló la liberación de IL-6 (Fig. 5A), IL-8 (Fig. 5B) y MCP-1 (Fig. 5C) de fibroblastos de pulmón. Otras citocinas analizadas estuvieron por debajo del nivel de detección. Estos datos sugieren que la resistina es capaz de iniciar una respuesta inflamatoria en fibroblastos de pulmón que puede, a su vez, contribuir al desarrollo y la progresión de fibrosis. Los datos sugieren que la resistina es un potente factor pro-inflamatorio que es capaz de estimular la liberación de citocinas de células inmunitarias.

Ejemplo 4

La secreción de resistina está regulada por incremento por mediadores pro-fibróticos

Se compraron monocitos CD14⁺ humanos purificados de células mononucleares de sangre primarias recientemente aisladas de AllCells, LLC (Emeryville, CA). Las células se sembraron en placa de fondo en U de 96 pocillos a una densidad de 75.000 células por pocillo en RPMI que contiene 10 % de suero bovino fetal (FBS). Las células se trataron con 0 o 1 ng/ml de TGF β (R&D Systems, Mineápolis, MN) y PDGF (R&D Systems). Después de 48 h de cultivo, los niveles de resistina en los sobrenadantes se midieron por el kit de ELISA. Para inducir la diferenciación de macrófagos, los monocitos se sembraron en placa en RPMI que contenía 10 % de FBS en placas de fondo plano de 96 pocillos y se dejó que se adhirieran, entonces las células se trataron similarmente a como se ha descrito. Los datos en la Fig. 6 se expresan como media \pm EEM, n=3, * indica valor de p < 0,05.

Como se muestra en la Fig. 6, la resistina se expresa y se secreta de monocitos primarios y monocitos adherentes. El tratamiento de TGF β 1 y PDGF indujo la producción de resistina en tanto monocitos como monocitos adherentes. La resistina no se detectó en fibroblastos de pulmón u otras células inmunitarias que incluyen linfocitos T o B (datos no mostrados). Estos datos indican que los factores de crecimiento que incluyen TGF β 1 y PDGF que están presentes en sitios de remodelación pueden inducir la producción de resistina de monocitos y macrófagos infiltrantes.

Ejemplo 5

La resistina se expresa en células de macrófago en pulmón

Se tiñeron muestras de biopsia de pulmón de cualquiera de los márgenes normales de tumores de pulmón, pacientes con UIP o NSIP (total n=9; n=3 de cada cohorte de pacientes) con un anticuerpo anti-resistina (R&D Systems) a concentración 2 μ g/ml. En especímenes de pulmón, la proteína resistina se detectó en macrófagos, histiocitos (macrófagos limitados a tejido) y mastocitos. La co-tinción de especímenes de pulmón no fibrótico con alto grado de inflamación con anticuerpo CD68 mostró que la resistina se co-localizó con células de macrófago CD68 positivas (Fig. 7A). La expresión de resistina humana en monocitos y células de macrófago se ha informado previamente (Jung et al., *Cardiovasc. Res.*, 69:76-85 (2006); Lehrke et al., *PLoS Med.*, 1:e45 (2004)) además de confirmado por nuestro hallazgo (Fig. 6). Un ejemplo representativo de tinción con anticuerpo anti-resistina de especímenes de pulmón de pacientes con UIP y NSIP se muestra en la Fig. 7B. No se observó una clara diferencia en la tinción con resistina entre especímenes de pulmón no fibróticos y fibróticos.

Ejemplo 6**Modelado de la estructura tridimensional de resistina humana**

5 Se obtuvieron secuencias de aminoácidos de resistina humana (SEC ID N°: 1) y de ratón (SEC ID N°: 2) de Swiss-Prot bajo los códigos de acceso Q9HD89 y Q99P87, respectivamente, y se alinearon. La Fig. 8 muestra el alineamiento de secuencias entre resistina humana y de ratón; la identidad de secuencias total es del 55 %.

10 La estructura cristalina de la resistina de ratón (Patel et al., arriba) está disponible de Protein Data Bank bajo el código de acceso 1RFX. Basándose en esta estructura, se construyó un modelo 3D de resistina humana reemplazando aminoácidos según el alineamiento de secuencias. El programa informático COOT (Emsley, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60:2126-32 (2004)) se usó para este fin. La conformación de la cadena lateral se ajustó para evitar contactos estrechos con otros residuos. Siempre que fuera posible se eligieron los rotámeros más energéticamente favorables. No fueron necesarios cambios en la conformación de cadena principal. El modelo resultante no contuvo residuos en la conformación prohibida, sin choques estéricos, y ningún residuo en un entorno desfavorable, tal como cargas sin compensar en el interior de la molécula, o amplios parches hidrófobos sobre la superficie de la molécula. Dado que la similitud de secuencias con la proteína de ratón es relativamente alta y se cumplen los criterios estereoquímicos, el modelo tridimensional resultante proporciona una buena aproximación de la estructura real.

20 La cadena de polipéptidos de resistina está plegada en una hélice α del extremo N (residuos 22-47), seguido de un dominio globular (residuos 48-108), que tiene una estructura β de un tipo rollo de gelatina. Tres monómeros de proteína forman un trímero en el que las hélices α forman una bobina en espiral y los dominios globulares forman una cabeza compacta con una amplia interfase que cubre aproximadamente el 30 % de la superficie de cada monómero. Un modelo teórico anterior de la resistina está disponible de Protein Data Bank bajo el código de acceso 1LV6. Este modelo anterior no está de acuerdo con los datos de la estructura cristalina ahora disponibles para la resistina de ratón.

Ejemplo 7**Predicción de los sitios de unión del receptor de resistina hipotético**

35 Varias líneas de evidencia sugieren que la superficie lateral de los dominios globulares del trímero es un posible sitio de unión al receptor. Por ejemplo, la resistina es activa en una forma trímera (Patel et al., arriba), por tanto, solo la superficie accesible al disolvente en el trímero se considera como posible sitio de unión al receptor. Además, como parte de la superfamilia estructural C1q/TNF de proteínas, la resistina pueden unirse a su receptor de una forma común a otros miembros de la familia que está en la superficie lateral del dominio globular. La superfamilia C1q/TNF está registrada en la base de datos Pfam bajo el código de acceso CL0100. Incluye varias citocinas, tales como adiponectina, TNF α y β , y CD40L. Miembros de la superfamilia tienen un pliegue helicoidal/en rollo de gelatina característico y una estructura homotrímera de bobina en espiral. Están disponibles estructuras cristalinas para muchos miembros de la superfamilia, además de para sus complejos con los receptores correspondientes. Estas estructuras indican que la unión del receptor se produce en la superficie lateral de los dominios globulares, normalmente en la interfase del dominio, como se observa, por ejemplo, en APO2L+DR5 y TNF β +TNFR55. Nunca se observó que el receptor estuviera unido a la parte superior del dominio globular o al dominio helicoidal.

45 Por tanto, la similitud de secuencias en la familia resistina de proteínas es mucho mayor dentro del dominio globular que en el dominio helicoidal, sugiriendo su importancia funcional. La homología de aminoácidos entre resistina humana y de ratón es ~36 % en el dominio helicoidal frente al ~66 % en el dominio globular. Similarmente, la homología entre resistina humana y bovina o porcina es ~28 % en el dominio helicoidal frente al ~85 % en el dominio globular.

55 Finalmente, la simetría de tres pliegues de la cabeza globular del trímero de resistina implica que el receptor, si se une a la parte superior de la cabeza, debe tener una simetría de tres pliegues interna de su sitio de reconocimiento, que es muy poco probable. Esto elimina prácticamente la posibilidad de unión a la parte superior de la cabeza.

60 Hay solo dos fragmentos de la cadena de polipéptidos de resistina humana que están sobre la superficie lateral del dominio globular y que son accesibles al disolvente en la forma trímera. Éstos incluyen los residuos 50-65 (SEC ID N°: 3) y 78-93 (SEC ID N°: 4). Ambos péptidos contienen dos tipos de residuos, aquellos que son accesibles y por tanto pueden interactuar con el receptor, y aquellos que están enterrados y, por tanto, no pueden participar en la interacción. Los aminoácidos que no están sobre la superficie podrían sustituirse con el fin de lograr mejores propiedades biofísicas de péptido. Las siguientes sustituciones se hicieron en los péptidos para evitar la reticulación de disulfuro no específica: C51S, C63S (péptido 1) y C78S, C89S, C91S, C93S (péptido 2) resultantes en las siguientes secuencias de epítopes de péptidos:

65 Péptido 2815: ESQSVTSRGLATSPR (SEC ID N°: 5)
Péptido 2816: SGSWDVRAETTSQS (SEC ID N°: 6)

Juntos, estos dos péptidos cubren el 64 % de la superficie del dominio globular. Una ventaja del péptido 2815 es que todos los residuos, excepto las dos cisteínas, están expuestos en la resistina, de manera que independientemente del plegamiento del péptido en la forma libre, los posibles residuos de epítopes estarán disponibles para la generación de anticuerpos. El péptido 2816 forma una horquilla β en la proteína. Solo una cara de la horquilla β puede participar en el reconocimiento de receptor. Los residuos clave aquí son R84-A85-E86. Otra ventaja del péptido 2816 es que esta región está el 100 % conservada en mamíferos superiores y el 75 % conservada con respecto a resistina murina. Dada la alta similitud de secuencias en este fragmento, es posible producir un anticuerpo que reaccionará de forma cruzada con proteína resistina de múltiples especies.

Ejemplo 8

Confirmación de la importancia funcional de epítopes identificados

Generación de anticuerpos policlonales: Los péptidos de epítipo 2815 y 2816 se sintetizaron químicamente en un sintetizador de péptidos ABI433A usando RINK Resin SS (Advanced ChemTech, SA5030, Lote nº 17046). El péptido se escindió de la resina, se precipitó, se filtró, se lavó y se secó. Los péptidos se enviaron a Invitrogen Corporation (Carlsburg, CA) donde se fusionaron con la proteína KLH para la inmunización. Se inmunizaron dos conejos por péptido usando los procedimientos convencionales (Cat. número M0300). Los ensayos de ELISA sobre el péptido indicaron los títulos de anticuerpos y los conejos se sangraron terminalmente después del procedimiento de inmunización de cuatro semanas. El anticuerpo se purificó por afinidad usando el péptido conjugado con albúmina de suero. El anticuerpo policlonal producido contra los péptidos 2815 y 2816 se denomina C2815 y C2816, respectivamente.

Unión a resistina humana de longitud completa: La capacidad de los anticuerpos policlonales C2815 y C2816 para unirse a resistina humana de longitud completa se probó usando un formato de ELISA de sándwich estándar. Se recubrió una placa con 2 $\mu\text{g/ml}$ de C2815 o C2816 en tampón carbonato-bicarbonato 0,2 M, pH 8,5, durante la noche a 4 °C. Para eliminar la unión no específica, las placas se bloquearon con 280 μl de 0,5 % de albúmina de suero bovino en PBS durante 2 horas a 37 °C. Se añadió la resistina humana a diferentes concentraciones a la placa y se incubó durante la noche a 4 °C. Para la detección se añadió el anticuerpo anti-resistina marcado con biotina BAM1359 (R&D Systems, Mineápolis, MN) con europio, seguido de disolución de potenciación. La señal de fluorescencia se leyó sobre el lector de placas Victor y se representaron los datos en GraphPad Prism.

Los resultados en la Fig. 9 muestran la unión de anticuerpos policlonales C2815 y C2816 a resistina humana de longitud completa con una K_d de 3,9 y 0,8 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Actividad neutralizante: La actividad neutralizante de C2816 y C2815 se evaluó en un ensayo de liberación de citocinas. Brevemente, se incubaron 2 $\mu\text{g/ml}$ de resistina humana o de ratón con concentraciones crecientes de cada anticuerpo a temperatura ambiente durante veinte minutos. La mezcla resistina-anticuerpo se añadió a células mononucleares de sangre primarias (CMSP) humanas aisladas y se incubaron durante veinticuatro horas. Se recogieron sobrenadantes libres de células y se detectaron niveles de MCP-1 por un kit de ELISA comercialmente disponible (R&D Systems, Mineápolis, MN).

Los resultados en las Figs. 10A y B muestran el efecto de los anticuerpos policlonales C2815 y C2816 sobre la liberación de MCP-1 mediada por resistina humana de CMSP humanas aisladas. Los resultados indican que los anticuerpos fueron capaz de inhibir independientemente de la dosis la actividad de resistina humana en el ensayo de liberación de MCP-1 confirmando que los epítopes identificados son importantes para la actividad de resistina. C2816 (C150 65 $\mu\text{g/ml}$) demostró actividad neutralizante superior en comparación con C2815. Sin embargo, eso podría explicarse parcialmente por la mayor afinidad de C2816 con la proteína resistina humana de longitud completa (Fig. 9).

Las Fig. 11A y B muestran el efecto de los anticuerpos policlonales C2815 y C2816 sobre la liberación de MCP-1 mediada por resistina de ratón de células mononucleares de sangre primarias humanas aisladas. Los resultados indican que los anticuerpos fueron capaces de inhibir dependientemente de la dosis la actividad de resistina de ratón en el ensayo de liberación de MCP-1. Los datos sugieren que C2815 y C2816 reaccionan de forma cruzada con resistina de ratón de acuerdo con el alto nivel de conservación de secuencias en los epítopes seleccionados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CENTOCOR, INC.

<120> ANTAGONISTAS DE RESISTINA Y SU USO

<130> CEN5194PCT

<140> PCT/US2008/076934

<141> 19-09-2008

ES 2 559 422 T3

<150> 60/974.607
 <151> 24-09-2007

<160> 6

5

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 108

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

15

```

Met Lys Ala Leu Cys Leu Leu Leu Leu Pro Val Leu Gly Leu Leu Val
 1          5          10
Ser Ser Lys Thr Leu Cys Ser Met Glu Glu Ala Ile Asn Glu Arg Ile
          20          25          30
Gln Glu Val Ala Gly Ser Leu Ile Phe Arg Ala Ile Ser Ser Ile Gly
          35          40          45
Leu Glu Cys Gln Ser Val Thr Ser Arg Gly Asp Leu Ala Thr Cys Pro
 50          55          60
Arg Gly Phe Ala Val Thr Gly Cys Thr Cys Gly Ser Ala Cys Gly Ser
 65          70          75          80
Trp Asp Val Arg Ala Glu Thr Thr Cys His Cys Gln Cys Ala Gly Met
          85          90          95
Asp Trp Thr Gly Ala Arg Cys Cys Arg Val Gln Pro
          100          105
  
```

20

25

30

<210> 2

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

35

<400> 2

```

Met Lys Asn Leu Ser Phe Pro Leu Leu Phe Leu Phe Phe Leu Val Pro
 1          5          10          15
Glu Leu Leu Gly Ser Ser Met Pro Leu Cys Pro Ile Asp Glu Ala Ile
          20          25          30
Asp Lys Lys Ile Lys Gln Asp Phe Asn Ser Leu Phe Pro Asn Ala Ile
          35          40          45
Lys Asn Ile Gly Leu Asn Cys Trp Thr Val Ser Ser Arg Gly Lys Leu
 50          55          60
Ala Ser Cys Pro Glu Gly Thr Ala Val Leu Ser Cys Ser Cys Gly Ser
 65          70          75          80
Ala Cys Gly Ser Trp Asp Ile Arg Glu Glu Lys Val Cys His Cys Gln
          85          90          95
Cys Ala Arg Ile Asp Trp Thr Ala Ala Arg Cys Cys Lys Leu Gln Val
          100          105          110
Ala Ser
  
```

55

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

60

<400> 3

```

Glu Cys Gln Ser Val Thr Ser Arg Gly Asp Leu Ala Thr Cys Pro Arg
 1          5          10          15
  
```

65

<210> 4

ES 2 559 422 T3

<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

5

Cys Gly Ser Trp Asp Val Arg Ala Glu Thr Thr Cys His Cys Gln Cys
1 5 10 15

10

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 5

Glu Ser Gln Ser Val Thr Ser Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ser Pro Arg
1 5 10 15

20

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25

<400> 6

Ser Gly Ser Trp Asp Val Arg Ala Glu Thr Thr Ser His Ser Gln Ser
1 5 10 15

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo aislado reactivo con un epítotope localizado en los residuos 78 a 93 definidos por SEC ID N°: 4 de resistina humana.

5

2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del antagonista de resistina según la reivindicación 1 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2 para su uso en un método de modificación de la actividad biológica de resistina en un mamífero que comprende administrar la composición farmacéutica al mamífero.

15

4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3 para su uso en un método de tratamiento, o alivio, de los síntomas de las enfermedades con actividad de fibroblastos aberrante que incluyen enfermedades pulmonares intersticiales, cicatriz hipertrófica, cicatriz queloide, esclerodermia, fibrosis hepática, fibrosis renal y fibrosis cardíaca que comprende administrar la composición farmacéutica a un paciente en necesidad de la misma.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

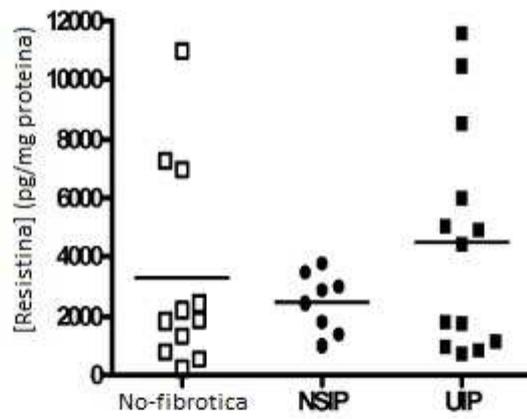


Fig. 2A

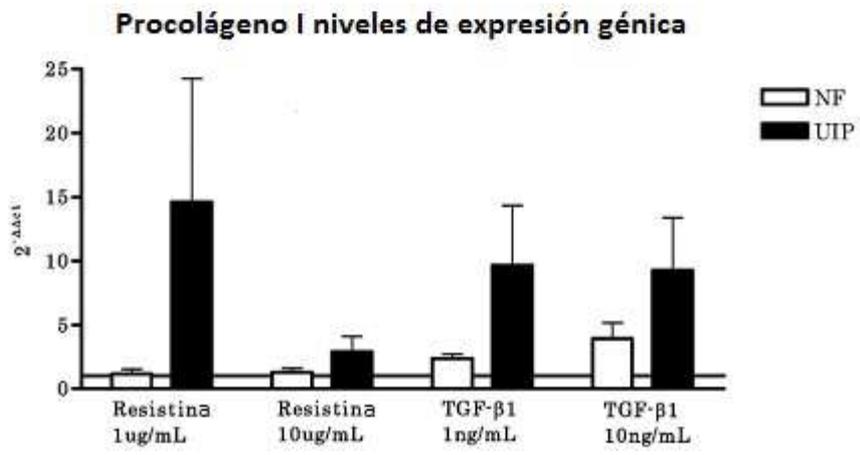


Fig. 2B

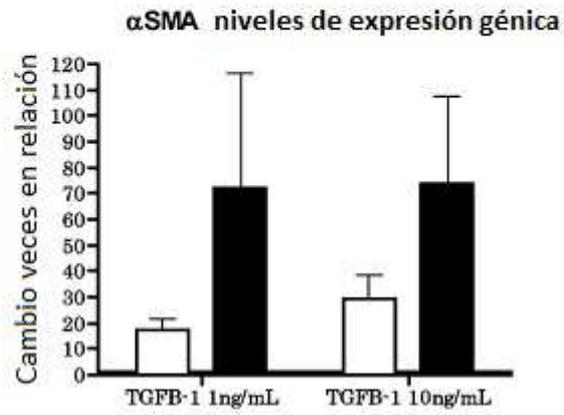


Fig. 2C

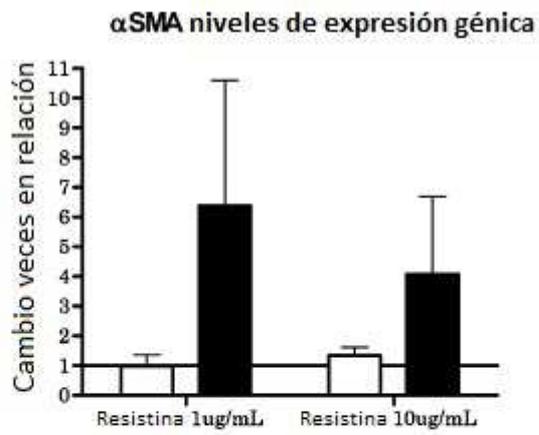


Fig. 3A

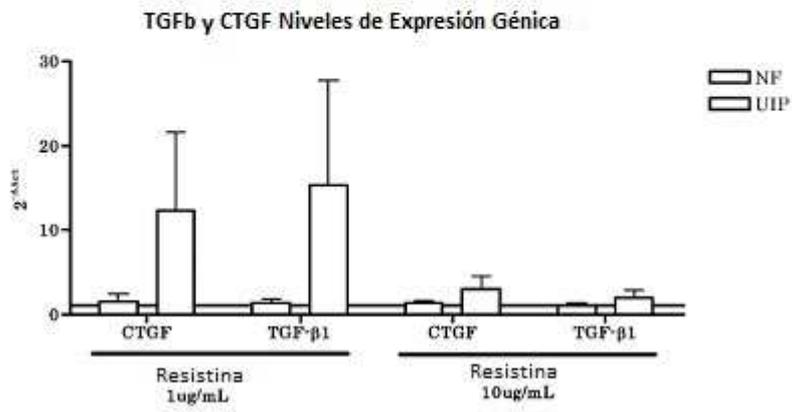


Fig. 3B

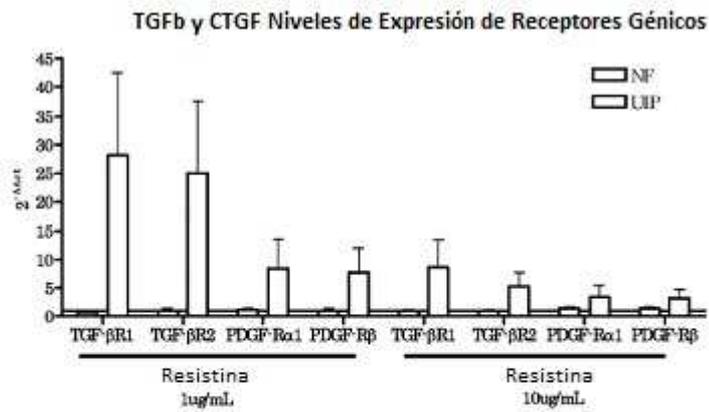


Fig. 4A

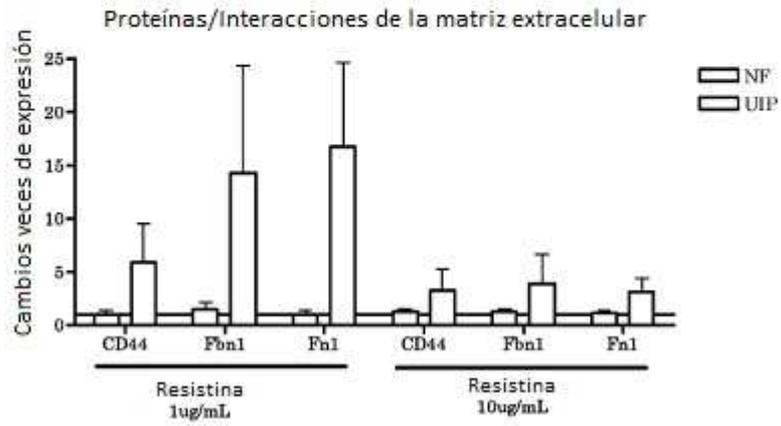


Fig. 4B

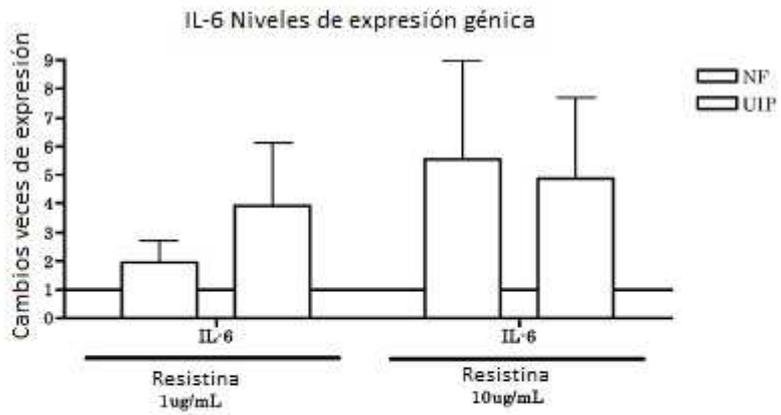


Fig. 5A

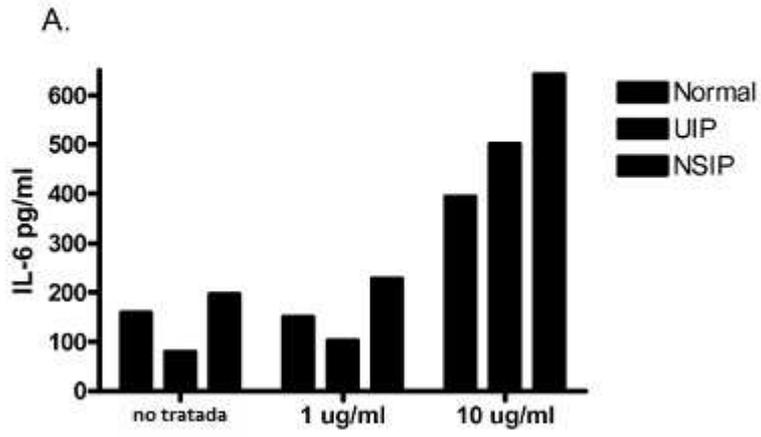


Fig. 5B

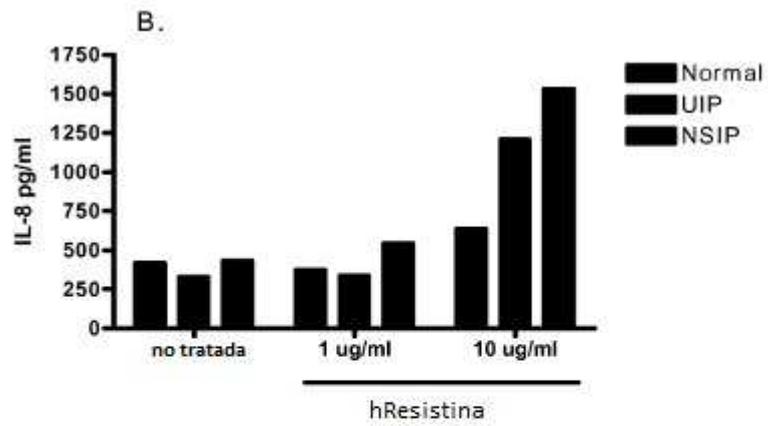


Fig. 5C

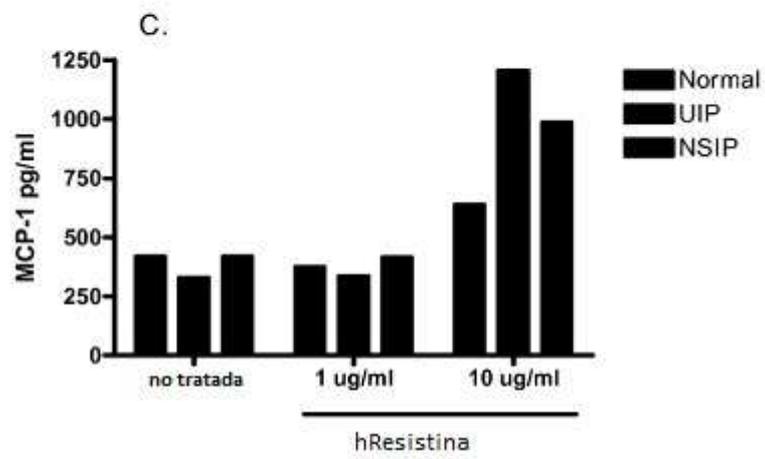


Fig. 6

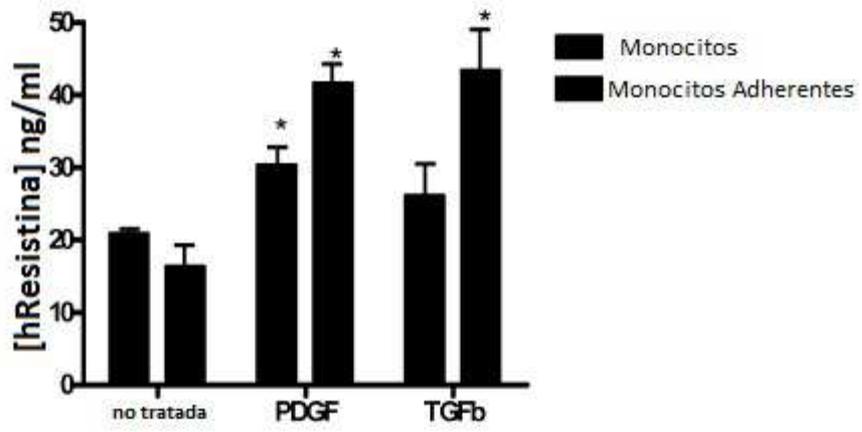
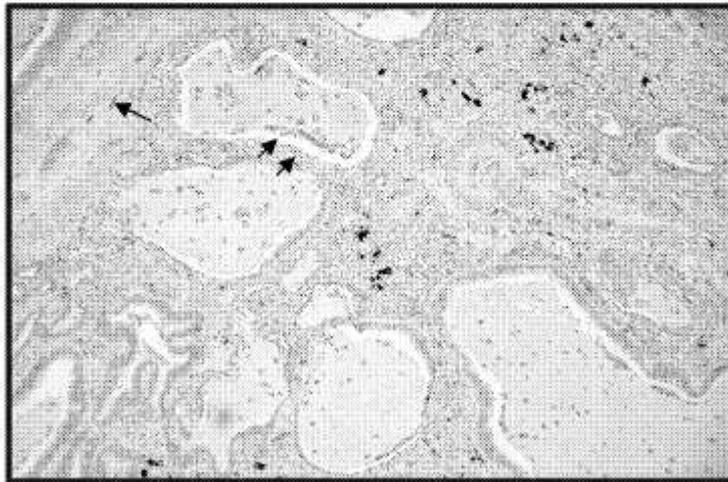


Fig. 7A



Fig. 7B

UIP Pulmón - anti-Resistina, 10x



NSIP Pulmón - anti-Resistina, 10x

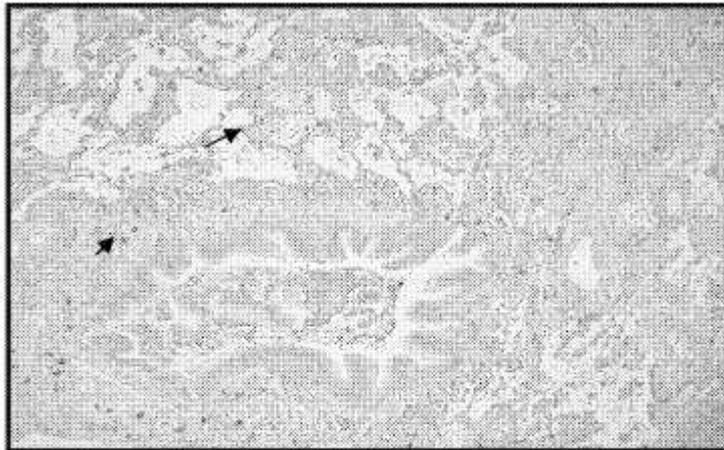


Fig. 8

		10		20		30		40	
humano		MKALCLLLLPVLGLLVSSKTLCSMERAINERIQEVAGSLIFRAISSIGL							
raton		MKNLSFPLLFLFFLVPELLGSSMPLCPIDEAIDKKIKQDFNSLFPNAIKNIGL							
	50	60		70		80		90	100
humano	ECQSVTSRGLATCPRGFAVTGCTCGSACGSNDVRAETTCHCQCAGMDWTGARCCRVQP								
raton	NCWTVSSRGLASCPEGTAVLSCSGSACGSNDIREEKVCHCQCARIDWTAARCKLQVAS								

Fig. 9

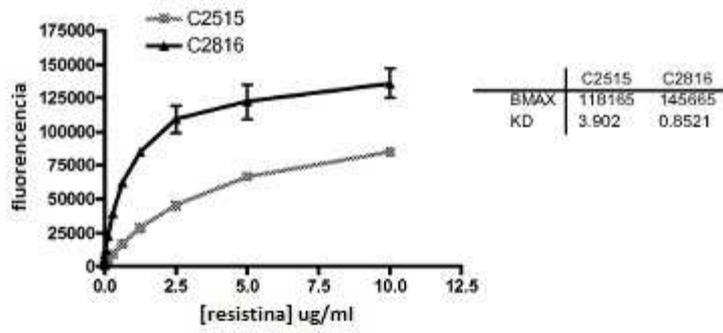


Fig. 10A

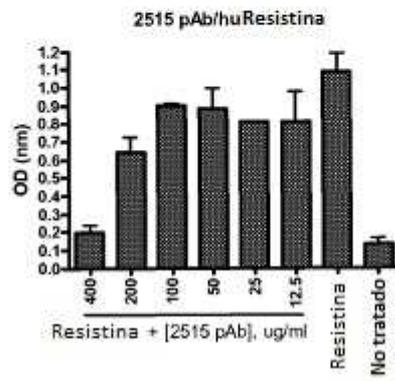


Fig. 10B

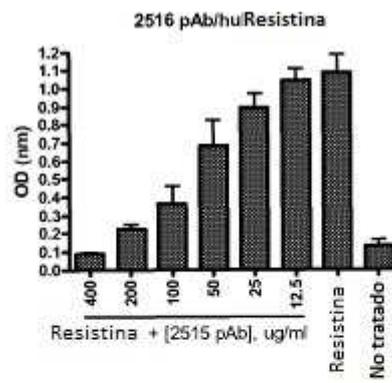


Fig. 11A

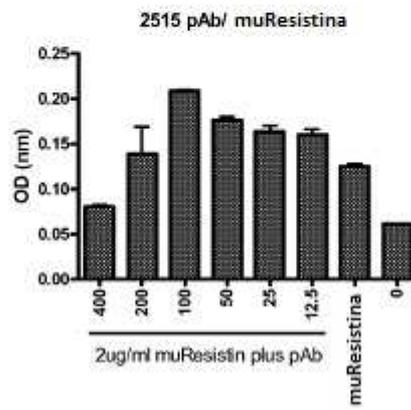


Fig. 11B

