

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 130**

51 Int. Cl.:

|                     |                             |           |
|---------------------|-----------------------------|-----------|
| <b>A61P 11/00</b>   | (2006.01) <b>A61K 39/00</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 1/16</b>    | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 39/395</b>  | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 38/17</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 48/00</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 31/4174</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61P 43/00</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>C07K 16/18</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>C07K 16/22</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 38/22</b>   | (2006.01)                   |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2002 E 10183890 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2327422**

54 Título: **Antagonistas de activina para el diagnóstico y la terapia de enfermedades asociadas a fibrosis**

30 Prioridad:

**13.07.2001 AU PR638101**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.07.2016**

73 Titular/es:

**PARANTA BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)  
40 City Road  
Southbank VIC 3006, AU**

72 Inventor/es:

**PHILLIPS, DAVID;  
DE KRETZER, DAVID;  
SIEVERT, WILLIAM;  
PATELLA, SHANE;  
SMOLICH, JOSEPH;  
MCGAW, DAVID y  
FENNESSY, PAUL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 576 130 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

Antagonistas de activina para el diagnóstico y la terapia de enfermedades asociadas a fibrosis

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al tratamiento de la fibrosis pulmonar en un vertebrado por medio de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de activina, folistatina.

10 **Técnica anterior**

Varias enfermedades graves de los mamíferos, incluyendo los seres humanos, se asocian a fibrosis. Dichas enfermedades incluyen, cirrosis del hígado, fibrosis pulmonar, enfermedad intestinal inflamatoria tal como la enfermedad de Crohn.

15 La cirrosis del hígado es una enfermedad progresiva del hígado que se caracteriza por un daño difuso de las células del parénquima hepático con regeneración nodular, fibrosis y alteración de la arquitectura normal. Se asocia a fallo de la función de las células hepáticas y con interferencia del flujo sanguíneo lo que da lugar a un fallo hepático total y carcinoma hepatocelular (HCC). Hay varios agentes que producen daños hepatocelulares incluyendo el alcohol, los virus de la hepatitis, distintos fármacos y la sobrecarga de hierro (Hemocromatosis), entre otros. La exposición a estos agentes promueve una cascada de eventos que, debido a su exposición repetida, puede dar como resultado el desarrollo de enfermedad crónica que incluye fibrosis progresiva y cirrosis.

25 Enfermedad pulmonar intersticial (ILD) es una expresión que incluye varios trastornos pulmonares crónicos. También se hace referencia a la ILD como fibrosis pulmonar intersticial o fibrosis pulmonar. El pulmón se daña habitualmente de alguna manera, dando como resultado una inflamación en las paredes de los sacos aéreos (alveolitis), en las paredes de los bronquiolos (bronquiolitis) o en los capilares (vasculitis). Entonces, comienza a cicatrizar (o fibrosarse) y el pulmón pierde su elasticidad. La fibrosis da como resultado una pérdida permanente de la capacidad del tejido pulmonar para transportar oxígeno.

30 Hay también un grupo de enfermedades pulmonares crónicas, llamado fibrosis pulmonar idiopática (IPF) que es de origen desconocido.

35 La enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) es un grupo de trastornos crónicos que producen inflamación o ulceración en el intestino delgado y grueso. Más a menudo la IBD se clasifica como colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn, pero se puede hacer referencia a esta como colitis, enteritis, ileítis, y proctitis. La colitis ulcerativa produce la inflamación y ulceración del revestimiento interno del colon y el recto, mientras que la enfermedad de Crohn es una inflamación que se extiende a las capas más profundas de la pared intestinal. La pared intestinal se engrosa y al principio es plegable, pero según se produce la fibrosis, la pared se vuelve rígida con estrechamiento luminal y estenosis ocasional. La enfermedad de Crohn también puede afectar otras partes del tracto digestivo, incluyendo la boca, esófago, estómago, e intestino delgado.

45 Ohga et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 228:391396 (1996) describen que una característica de la fibrosis pulmonar es un aumento de los fibroblastos y tejido conjuntivo. Se ha demostrado que la activina A tiene efectos potenciales sobre la proliferación de los fibroblastos pulmonares y su diferenciación en miofibroblastos, pero que los efectos de la activina A se anulan por la folistatina.

50 Giri et al., Thorax (1993) 48:959966 describieron cómo un aumento de la producción de TGFβ tiene un papel importante en la patofisiología de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y que el tratamiento con anticuerpos contra el TGFβ ofrece una nueva manera de intervención farmacológica en el tratamiento de la fibrosis pulmonar.

Se necesitan nuevos tratamientos antifibróticos para evitar el desarrollo de, o la cura de afecciones asociadas a fibrosis, tales como las que se han identificado anteriormente, ya que estas afecciones son causas importantes de muerte y/o pérdida de calidad de vida y son un aumento de carga para los sistemas médicos.

55 Se desvela ahora en el presente documento que la folistatina se puede utilizar en el tratamiento de la fibrosis pulmonar en un vertebrado.

**Divulgación de la invención**

60 La presente invención se refiere al hallazgo de que el antagonista de la activina, la proteína folistatina, es un agente terapéutico útil para el tratamiento de la fibrosis pulmonar. Normalmente, la fibrosis puede implicar la expresión anormalmente elevada de la hormona activina A. Los resultados desvelados en el presente documento apoyan la posición de que la administración de folistatina, inhibe la hiperproliferación asociada a la hormona activina.

65 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los objetivos que no están englobados en el

ámbito de las reivindicaciones no forman parte de la invención que se reivindica actualmente.

### 1. Composiciones terapéuticas/farmacéuticas para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad

5 Se describe en el presente documento una composición farmacéutica para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad asociada a fibrosis en un vertebrado, comprendiendo dicha composición al menos un antagonista de activina, y opcionalmente un vehículo, adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 También se describe un proceso para preparar una composición farmacéutica como se define en la primera realización de la invención, en el que dicho proceso comprende mezclar homogéneamente al menos un antagonista de activina con un vehículo, adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15 En la presente invención, el vertebrado se selecciona de entre el grupo que se consiste en el ser humano, primates no humanos, ratones, ganado bovino, ovejas, cabras, caballos, conejos, aves, gatos y perros. Más normalmente, el vertebrado es un ser humano, un primate no humano o un ratón. Más normalmente, el vertebrado es un ser humano.

### 2. Tratamiento de la enfermedad utilizando folistatina

20 De acuerdo con la invención, se proporciona folistatina para su uso en un método para el tratamiento de una fibrosis pulmonar en un vertebrado que necesita dicho tratamiento, dicho tratamiento comprende la administración a dicho vertebrado de una cantidad terapéuticamente eficaz de folistatina.

25 De acuerdo con la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende folistatina para su uso en un método para el tratamiento de una fibrosis pulmonar en un vertebrado que tiene necesidad de dicho tratamiento, dicho método comprende la administración a dicho vertebrado, de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica.

30 También se describe el uso de la composición farmacéutica como se ha definido anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad asociada a fibrosis en un vertebrado que necesita dicho tratamiento.

Como se describe en el presente documento, la enfermedad asociada a fibrosis puede ser una enfermedad fibrótica hiperproliferativa o inflamatoria.

35 De acuerdo con un aspecto preferido, la fibrosis pulmonar es una fibrosis pulmonar idiopática o una enfermedad pulmonar intersticial.

40 Como se describe en el presente documento la enfermedad asociada a fibrosis puede ser una enfermedad intestinal inflamatoria, o una afección relacionada tal como la colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn, o es una fibrosis hepática y cirrosis.

45 Normalmente, el tratamiento de una fibrosis pulmonar por medio de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de folistatina se administra en conjunto con otros tratamientos de la enfermedad. Por ejemplo, estos otros tratamientos pueden incluir, la cirugía, tratamiento por radiación, o quimioterapia. Por ejemplo, la quimioterapia puede implicar la administración de fármacos antifibróticos, antitrombóticos o antiinflamatorios.

Normalmente, para los fines de la invención, un experto en la técnica sería capaz, por experimentación de rutina, determinar cuál sería la cantidad de folistatina eficaz, no tóxica con fines de tratamiento de la enfermedad.

50 Normalmente, para los fines de la invención, la folistatina es una proteína de una cadena sencilla que comprende entre 288 y 315 aminoácidos con un peso molecular de entre 30.000 y 60.000 Daltons como se estima por SDS-PAGE en ausencia de agentes reductores, derivada del fluido folicular y capaz de inhibir la secreción de hormona folículoestimulante (FSH). Más normalmente, la folistatina es una proteína de cadena sencilla que se clasifica en el NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) como proteína XP\_003891, AAH04107. Incluso más  
55 normalmente, la folistatina es como la que se describe en la Patente Australiana N° 610858. Más normalmente, la folistatina es como la que se describe en la Patente Australiana N° 620346 o la Patente de Estados Unidos N° US 5.470.826 o la Patente Europea N° EP 0 299 050.

60 Normalmente, la folistatina presente en la composición farmacéutica también puede presentarse en una forma que se selecciona de entre el grupo que consiste en: folistatina/quelato, folistatina/fármaco, folistatina/profármaco, folistatina/toxina, y folistatina/grupo detector y folistatina/marcador de imagen.

### 4. Terapia génica

65 De acuerdo con la invención, se proporciona folistatina para su uso en un método de terapia génica para el tratamiento de una fibrosis pulmonar en un vertebrado, en el que dicho método comprende:

- (a) insertar una molécula de ácido nucleico que codifica folistatina o un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica folistatina, en una célula huésped;
- (b) expresar la molécula de ácido nucleico en la célula transformada.

5 Normalmente, para los fines de cualquiera de estos métodos, la molécula de ácido nucleico o el vector se inserta utilizando métodos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en microinyección, precipitación en  $\text{CaPO}_4$ , electroporación, lipofección/fusión liposómica, bombardeo de partículas y acoplamiento del ácido nucleico con proteínas modificadas químicamente.

10 Normalmente, la molécula de ácido nucleico o el vector se inserta en el núcleo de una célula huésped.

Normalmente, se inserta un vector de expresión que contiene la molécula de ácido nucleico en las células, las células se cultivan *in vitro* y luego se infunden en grandes cantidades en los pacientes. Más normalmente, se pueden utilizar los vectores de expresión se derivan de virus tales como adenovirus, virus adenoasociados, virus vaccinia, herpesvirus, varios virus ARN, retrovirus, o virus del papiloma bovino, para el suministro del ácido nucleico en las células diana. Más normalmente, las células diana comprenden linajes de fibroblastos, por ejemplo células hepáticas estrelladas, o células de músculo liso, fibroblastos pulmonares, miofibroblastos, células renales.

### Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 muestra la expresión de activina A (Fig. 1A) y folistatina (Fig. 1B) en una sección de hígado normal por inmunohistoquímica.

La Figura 2 muestra la expresión de activina en una sección de hígado cirrótico por inmunohistoquímica.

La Figura 3 muestra una microscopía confocal de secciones de hígado de rata que muestra la expresión de activina A y actina alfa del músculo liso.

25 La Figura 4 muestra la expresión de folistatina en una sección de hígado animal fibrótico por inmunohistoquímica.

La Figura 5 muestra la expresión tanto de ARNm de activina A como de folistatina en extractos de hígado completo durante el modelo de daño hepático de rata  $\text{CCl}_4$ .

30 La Figura 6 muestra el análisis PCR en tiempo real sobre células estrelladas hepáticas recién aisladas (HSC) según se transdiferencian *in vitro* para determinar el patrón de expresión de activina A y folistatina en relación con otros marcadores clave de la proliferación HSC y la producción de matriz extracelular (ECM).

La Figura 7 muestra la secreción de proteína activina A por cultivos primarios de HSC según se transforman en el fenotipo activado.

35 La Figura 8 muestra la disminución de la proliferación de células MPC11 (recuentos por minuto, incorporación de  $^3\text{H}$  timidina) tras la adición de sobrenadantes que contienen activina A del cultivo de HSC.

La Figura 9 muestra el efecto de varios mediadores exógenos sobre la proliferación de HSC recién aisladas (% de proliferación en comparación con el control frente a la concentración del mediador exógeno añadido): La Fig. 9A muestra los resultados de la activina como mediador exógeno; la Fig. 9B muestra los resultados de transformación del factor de crecimiento  $\beta$  (TGF) como mediador exógeno; La Fig. 9C muestra resultados de la folistatina como mediador exógeno; la Fig. 9D muestra los resultados del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) como mediador exógeno.

40 La Figura 10 muestra el efecto de varios mediadores sobre la proliferación de HSC activadas/transdiferenciadas (% de proliferación en comparación con un control frente a la concentración del mediador exógeno añadido): La Fig. 10A muestra los resultados para la activina como mediador exógeno; la Fig. 10B muestra los resultados de transformación del factor de crecimiento  $\beta$  (TGF) como mediador exógeno; la Fig. 10C muestra los resultados de la folistatina como mediador exógeno; la Fig. 10D muestra los resultados del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) como mediador exógeno.

45 La Figura 11 muestra el efecto de la exposición a distintas cantidades de activina A, folistatina y TGF $\beta$  de los cultivos de HSC activadas sobre la viabilidad celular (que se evalúa por citometría de flujo por la expresión de anexina V, un marcador temprano de apoptosis celular).

La Figura 12 muestra el cambio de peso corporal de ratas de control en comparación con ratas expuestas al  $\text{CCl}_4$  durante 4 semanas y luego co-inyectadas con 1 mg de folistatina 3 veces a la semana durante las 4 primeras semanas y luego sacrificadas. Los animales de control recibieron  $\text{CCl}_4$  durante la misma cantidad de tiempo.

50 La Figura 13 muestra el peso remanente del hígado en las mismas condiciones experimentales que se describen para la Figura 12.

La Figura 14 muestra el contenido intrahepático de hidroxiprolina en las mismas condiciones experimentales que se describen para la Figura 12.

60 La Figura 15 muestra el cambio en el peso corporal de ratas de control en comparación de las ratas expuestas a  $\text{CCl}_4$  durante 4 semanas y luego co-inyectadas con 1 mg de folistatina 3 veces por semana desde las semanas 8-12 y luego sacrificadas. Los animales de control recibieron  $\text{CCl}_4$  durante la misma cantidad de tiempo.

La Figura 16 muestra el peso remanente del hígado en las mismas condiciones experimentales que se describen para la Figura 15.

65 La Figura 17 muestra el contenido intrahepático de hidroxiprolina en las mismas condiciones experimentales que se describen para la Figura 15.

La Figura 18 muestra la activina A sérica en sujetos humanos con hepatitis vírica crónica y controles normales.

La Figura 19 muestra la folistatina sérica en sujetos humanos con hepatitis vírica crónica y controles normales.

La Figura 20 muestra la correlación de la activina A sérica en pacientes con hepatitis B (VHB) con la alanina aminotransferasa sérica (ALT, un marcador del daño del hepatocito y daño intrahepático).

5 La Figura 21 muestra la correlación de la activina A sérica en pacientes con VHB y replicación vírica (ensayada como VHB sérico, pg/ml).

La Figura 22 muestra la correlación negativa de folistatina sérica en pacientes con VHB y replicación vírica (ensayada como VHB sérico, pg/ml).

## 10 Definiciones

La expresión "antagonista de activina" engloba las moléculas que inhiben la actividad de activina. La expresión incluye moléculas que se unen a la activina y moléculas que antagonizan con la activina por la unión con el receptor de activina (tipo I o II) para bloquear la señalización corriente abajo. Por ejemplo, las moléculas que inhiben la actividad de activina por unión a la activina incluyen la folistatina, la proteína relacionada con la folistatina (número de registro Genbank NP\_005851), y la macroglobulina alfa2, y las moléculas que antagonizan con la activina uniéndose al receptor de la activina (tipo I o II) para bloquear la señalización corriente abajo incluyen la inhibina. "Antagonistas de activina" puede incluir también: moléculas que interfieren con cualquiera de los otros componentes corriente abajo de la ruta de transducción de la señal de activina, tales como las moléculas inhibidoras de la señalización Smad, Smad 6 y 7; mutantes negativos dominantes del receptor de la activina (por ejemplo BAMBI) que si se expresa en una célula interferirá la ruta de transducción de activina en las células; las moléculas que inhiben específicamente los receptores TGF $\beta$ /activina Tipo I tales como los análogos del triarilimidazol como los que se describen en Callahan, J.F., et al (2002), "Identification of novel Inhibitors of the Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) Type I Receptor (ALK5)", J. Med. Chem 45: 9991001.

25 La expresión "ácido nucleico" engloba ácidos nucleicos desoxirribonucleótidos mono o bicatenarios (ADN) y/o ribonucleótidos (ARN), incluyendo todos los análogos conocidos de los nucleótidos naturales.

30 El término "polinucleótido" engloba el desoxirribopolinucleótido mono o bicatenario y/o ribopolinucleótido, incluyendo todos los análogos conocidos de nucleótidos naturales. También se incluye en su ámbito la secuencia relevante como se especifica, junto con la secuencia complementaria de la misma.

Como se utiliza en el presente documento el término "polipéptido" se refiere a un polímero compuesto por una pluralidad de aminoácidos unidos entre ellos por enlaces peptídicos.

35 El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse a un epítipo específico en un antígeno, y que puede estar compuesto por una mezcla policlonal, o ser de naturaleza monoclonal. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas completas derivadas de fuentes naturales, o de fuentes recombinantes. Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede existir en varias formas que incluyen, por ejemplo, un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo u otro fragmento inmunológicamente activo del mismo, tal como una región determinante de complementariedad. De manera similar, el anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo que tenga dominios funcionales de unión al antígeno, es decir, dominios variables de cadena pesada y ligera. El fragmento de anticuerpo puede también existir en una forma que se selecciona de entre el grupo que consiste en Fv, Fab, F(ab)<sub>2</sub>, scFv (Fv de cadena sencilla), dAb (anticuerpo de dominio único), anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y triacuerpos.

50 El término "antisentido" con respecto a las moléculas de ácido nucleico, como se hace referencia en el presente documento, significa una molécula de oligo o polinucleótido que es complementaria a una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido diana. La molécula de ácido nucleico antisentido puede transcribirse en una célula, y es capaz de hibridarse con el ARNm que codifica el péptido que se produce en la célula. Basándose en que la reacción se produce en condiciones que permiten que la secuencia de nucleótido complementaria se hibride al ARNm del polipéptido, de esta manera la cantidad de polipéptido traducido se altera, es decir, se reduce o elimina.

55 Una "cantidad terapéuticamente eficaz", como se hace referencia en el presente documento, incluye una cantidad suficiente, pero no tóxica de un compuesto o composición de la invención para proporcionar el efecto terapéutico que se desee. La "cantidad eficaz" variará de un sujeto a otro dependiendo de uno o más de varios factores entre, por ejemplo, el agente en particular que se va a administrar, la gravedad de la afección que se va a tratar, la especie que se va a tratar, la edad y estado general del sujeto, y el modo de administración. Para cualquier caso determinado, una "cantidad eficaz" adecuada puede determinarla un experto en la técnica utilizando solo experimentación de rutina. Normalmente, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para que dé como resultado uno o más de lo siguiente: recesión/reducción de la extensión de la enfermedad, inhibición del desarrollo de la enfermedad o la progresión, cese del desarrollo de la enfermedad, alivio de las molestias impuestas por la enfermedad, o prolongación de la vida del vertebrado que tenga la enfermedad.

65 El término "aislado" indica que el material en cuestión se ha separado de su ambiente natural en el que existe, y se han reducido o eliminado las impurezas asociadas. Esencialmente, el material 'aislado' se enriquece con respecto a

los otros materiales extraídos de la misma fuente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquiera de las otras especies individuales extraídas de una fuente determinada), y preferentemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que el material ‘aislado’ comprende al menos aproximadamente el 30 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición sustancialmente pura del material comprenderá más de aproximadamente el 80 a 90 por ciento del total de las especies macromoleculares presentes en la composición. Más preferentemente, el material ‘aislado’ se purifica hasta la homogeneidad esencial (las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición por los métodos de detección convencionales) en el que la composición consiste esencialmente en la especie macromolecular del sujeto.

“Sustituciones conservadoras de aminoácidos” se refiere al intercambio de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas incluye glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales hidroxilo alifáticas incluye serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida incluye asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas incluye fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas incluye lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre incluye cisteína y metionina. Normalmente, los grupos de sustitución conservadora de aminoácidos son; valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina.

El término “fragmento” de un compuesto, en referencia a los polipéptidos, es un compuesto que tiene una actividad biológica cualitativamente en común con por ejemplo, un polipéptido de longitud completa del cual puede derivarse.

En referencia a los ácidos nucleicos, nucleótidos y/o polinucleótidos, el término “fragmento” se refiere a compuestos que incluyen, por ejemplo: partes de una secuencia de ácido nucleico diana que codifica un producto que tiene actividad biológica cualitativamente en común con por ejemplo, un polipéptido de longitud completa que se deriva de la secuencia de ácido nucleico de longitud completa; o fragmentos de una secuencia de ácido nucleico que es adecuada para sondas específicas o cebadores para PCR para la detección y/o amplificación de la secuencia de ácido nucleico, o una parte del mismo que codifique un producto funcional.

El término “análogo” como se utiliza en el presente documento en referencia a una secuencia de ácido nucleico significa una secuencia que es un derivado de una secuencia de ácido nucleico diana, comprendiendo el derivado la adición, eliminación o sustitución (incluyendo sustituciones conservadoras de aminoácidos) de una o más bases y en el que el polipéptido codificado mantiene sustancialmente la misma función que el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico diana. De manera similar, el término “análogo” como se utiliza en el presente documento se refiere a un derivado de un polipéptido diana que comprende la adición, eliminación, o sustitución de uno o más aminoácidos, manteniendo el análogo, sin embargo, sustancialmente la misma función que el polipéptido diana.

La expresión “casete de expresión” se refiere a una construcción de ácido nucleico que comprende los elementos de ácido nucleico necesarios (promotores, amplificadores, el ácido nucleico a transcribirse, etc.) que permiten la transcripción del ácido nucleico particular en una célula huésped. La construcción de expresión se puede incorporar en un vector, cromosoma de un huésped, etc.

El término “promotor” se refiere a secuencias de ácido nucleico que tienen influencia sobre y/o promueven el inicio de la transcripción.

La expresión “unido operativamente” se refiere a una situación en la que, por ejemplo, un ácido nucleico se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor unido operativamente a un ADN heterólogo, que codifica una proteína, promueve la producción de ARNm funcional correspondiente al ADN heterólogo.

Como se utiliza en el presente documento “transferencia génica” significa el proceso de introducción de material genético ajeno en una célula, y se lleva a cabo comúnmente para hacer posible la expresión de un producto particular codificado por el gen. El producto puede incluir una proteína, polipéptido, ADN o ARN antisentido, o un ARN enzimáticamente activo. La transferencia génica se puede llevar a cabo en células cultivadas o por la administración directa a los animales, y generalmente implica el proceso de poner en contacto una célula diana con un ácido nucleico que se desee por interacciones no específicas o mediadas por receptor, la captación de ácido nucleico por la célula a través de la membrana o por endocitosis y la liberación del ácido nucleico en el citoplasma de la membrana plasmática o un endosoma. Para la expresión satisfactoria, también puede ser necesario, el movimiento del ácido nucleico en el núcleo de la célula y la unión a factores nucleares adecuados para la transcripción cuando el ácido nucleico de interés es parte de una construcción de expresión.

El término “terapia génica” incluye la transferencia génica y las técnicas biotecnológicas de antisentido, como se ha hecho referencia anteriormente. “Terapia génica” se refiere específicamente a cualquier transferencia génica que exprese un producto terapéutico en una célula *in vivo* o *in vitro*, o a técnicas antisentido por las que las secuencias de oligo o polinucleótido complementarias de una secuencia que codifica un polinucleótido diana se inserta en y se

expresa en células *in vivo* o *in vitro* de forma que dé lugar a la producción del polipéptido diana. La transferencia génica se puede llevar a cabo: *ex vivo* en células que luego se trasplantan en un paciente; por administración directa del ácido nucleico o el complejo ácido nucleico-proteína en el paciente; o por transferencia de células modificadas a un paciente. Las técnicas antisentido se pueden llevar a cabo *in vivo* utilizando vectores de transfección adecuados para suministrar vectores de expresión que comprenden las secuencias que codifican el antisentido a las células diana.

Como se utiliza en el presente documento el término "tratamiento", se refiere a todos y cada uno de los usos que remedian un estado de enfermedad o los síntomas, o de otra manera previenen, dificultan, retrasan o invierten la progresión de la enfermedad u otros síntomas indeseables cualquiera que estos sean.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "que comprende" significa "que incluye principalmente, pero no necesariamente solo". Las variaciones de la expresión "que comprende" y "comprende", tienen en consecuencia significados variados.

### **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

La presente invención describe el uso de la folistatina, para el tratamiento de la fibrosis pulmonar. La folistatina se conoce mejor por su implicación en la supresión de la hormona folículoestimulante, con un papel, en consecuencia, en el tratamiento de los trastornos de fertilidad, pero ahora se ha descubierto que es un antagonista eficaz de la activina, capaz de inhibir la hiperproliferación de células asociadas a enfermedades fibróticas.

Los métodos para producir antagonistas de activina, cuando son proteínas tales como la folistatina, o un fragmento o análogo de la misma, se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, todas ellas se encuentran en la experiencia de la técnica y se explican completamente en cualquiera de varias publicaciones bien conocidas, tales como: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Segunda Edición por Sambrook et al., Cold Spring Harbor Press, 1989. Por ejemplo, se puede aislar el gen de la folistatina a partir de células o tejidos que expresan folistatina: aislando el ARN mensajero del tejido o las células utilizando transcriptasa inversa para generar la secuencia de ADN correspondiente, y finalmente utilizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores adecuados para amplificar la secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de folistatina activa. También, se puede clonar un fragmento de polinucleótido que codifica la folistatina en un vector de expresión adecuado, y luego expresarlo en un huésped procarionta, vírico o eucariota adecuado. Los polipéptidos de folistatina que se expresan se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica, que incluyen uno o más de los siguientes procedimientos establecidos: precipitación proteica, que incluye precipitación en sulfato amónico, etanol o polietilenglicol e inmunoprecipitación; técnicas cromatográficas utilizando intercambio iónico, exclusión por tamaño, de fase inversa, interacción hidrófoba, afinidad, o tecnologías de inmutafinidad y que se llevan a cabo por ejemplo, por cromatografía, HPLC, o FPLC; técnicas electroforéticas tales como cromatografía en gel y HPEC; y similares.

Por ejemplo, para producir folistatina recombinante o fragmentos activos de la misma para su uso en la presente invención, las secuencias de ADN relevantes se insertan en sistemas de expresión adecuados. Preferentemente, se construye una molécula recombinante o un vector en el que la secuencia de polinucleótido que codifica la folistatina está unido operativamente a la secuencia de control de la expresión heteróloga haciendo posible la expresión de la proteína folistatina. Se conocen en la técnica varios vectores de expresión adecuados para la expresión proteica en mamíferos (incluyendo el ser humano), y que se emplean utilizando técnicas de biología molecular convencionales. Dichos vectores se pueden seleccionar de entre los tipos de vectores convencionales que incluyen los de expresión en insectos, tales como baculovirus, o sistemas de expresión en levaduras, fúngicos, bacterianos o víricos.

Las células huésped o líneas celulares adecuadas para la transfección en dicho método incluye células de mamífero, tales como las células 293 humanas, células de ovario de hámster chino (CHO), la línea celular COS1 de mono o las células 3T3 murinas. De manera similar son útiles como huéspedes para la presente invención las células bacterianas tales como las distintas cepas bien conocidas de *E. coli* (por ejemplo, HB101, MC1061), y varias cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas*, otros bacilos y similares. Muchas cepas de células de levadura conocidas por los expertos en la técnica también están disponibles como células huésped para la expresión de los polipéptidos de la presente invención. También se pueden utilizar células de insecto tales como células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9).

Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés se pueden transferir en la célula huésped por uno cualquiera de varios métodos bien conocidos, dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro cálcico y la electroporación se utilizan comúnmente en células procariotas. El tratamiento con fosfato cálcico, electroporación, lipofección, biolística y transfección basada en virus se puede utilizar para otros huéspedes celulares. Los métodos para transformar células de mamífero pueden incluir también el uso de transfección, transformación, conjugación, polybrene, liposomas, electroporación, tecnología de pistola de partículas y microinyección (véase, en general, Sambrook et al., 1989).

Las células huésped recombinantes se cultivan entonces ventajosamente en un medio selectivo, que se selecciona

inherentemente para el crecimiento de las células que contienen el vector introducido. Las condiciones de incubación se seleccionan idealmente para optimizar la expresión del polipéptido recombinante.

Por lo tanto, para su uso en la presente invención la folistatina recombinante se puede producir transfectando una célula huésped con al menos un vector de expresión que contiene un polinucleótido recombinante que codifica folistatina, bajo el control de una secuencia reguladora de la transcripción. La célula transformada se cultiva entonces en condiciones que permiten la expresión de la proteína folistatina. La proteína que se expresa puede recuperarse entonces a partir de la célula o el medio de cultivo, aislarse, y opcionalmente purificarse por medios adecuados conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, las proteínas se pueden aislar en forma soluble después de la lisis celular, o se pueden extraer utilizando técnicas conocidas, tales como en cloruro de guanidina.

Por ejemplo, las células microbianas que contienen el gen exógeno de folistatina se pueden cultivar en reactores de gran volumen, se recolectan por centrifugación y luego se destruyen, por ejemplo, por homogeneización a alta presión. El lisado celular resultante se puede resuspender en un diluyente/tampón adecuado, y filtrarse para obtener una suspensión acuosa de la proteína folistatina. La proteína recombinante que se puede administrar en forma bruta, por ejemplo, diluyéndola en un tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) a una concentración de 50-500 µg/ml, y luego se pasa a través de un filtro estéril de 0,22 micrómetros.

La folistatina o los fragmentos de la misma también se pueden sintetizar por métodos de química en fase sólida bien conocidos por los expertos habitados en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos de folistatina se pueden sintetizar siguiendo los procedimientos de química en fase sólida de Steward y Young (Steward, J. M. y Young, J. D., Solid Phase Peptide Synthesis. (2ª Edn.) Pierce Chemical Co., Illinois, USA (1984). En general, dicho método de síntesis comprende la adición secuencial de uno o más aminoácidos o aminoácidos protegidos adecuadamente a una cadena peptídica en crecimiento. Normalmente, el(los) grupo(s) funcional(es) distinto(s) del grupo amino o carboxilo del primer aminoácido está/n protegido(s) por un grupo protector adecuado. El aminoácido protegido entonces se une a un soporte sólido inerte o se utiliza en solución añadiendo el siguiente aminoácido en la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) adecuadamente protegido y en condiciones adecuadas para formar el enlace amida. El grupo protector se elimina entonces de este nuevo resto de aminoácido que se ha añadido y el siguiente aminoácido (protegido) se añade, y así. Después de que se hayan unido todos los aminoácidos deseados, se retira secuencial o concurrentemente cualquier grupo protector remanente, y si es necesario cualquier soporte sólido, para producir el polipéptido final.

Los cambios de aminoácidos en el polipéptido folistatina o un fragmento de la misma se pueden efectuar por técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica relevante. Por ejemplo, se pueden efectuar cambios de aminoácidos por adición, eliminación o sustitución de nucleótidos (conservadores o no conservadores), mientras se mantenga la fase de lectura apropiada. Tales modificaciones en el polinucleótido diana se pueden producir por técnicas que incluyen la mutagénesis aleatoria, la mutagénesis dirigida al sitio, la mutagénesis mediada por oligonucleótidos o polinucleótidos, la eliminación de regiones seleccionadas por medio del uso de sitios modificados de enzimas de restricción, y por la reacción en cadena de la polimerasa.

La folistatina para su uso en la invención puede producirse alternativamente como una proteína de fusión. Por ejemplo, puede ser deseable producir proteínas de fusión folistatina, para aumentar la expresión de la proteína en una célula huésped seleccionada, para mejorar la purificación, o para utilizarlas en el control de la presencia de folistatina en tejidos, células, o extractos celulares. Las parejas de fusión adecuadas son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, β-galactosidasa, glutatión-S-transferasa, y poli-histidina.

#### **Tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad utilizando antagonistas de activina**

En la presente invención se utiliza folistatina en un método de tratamiento de la fibrosis pulmonar, tal como fibrosis pulmonar idiopática, en un vertebrado.

Normalmente, el vertebrado se selecciona de entre el grupo que consiste en un ser humano, un primate no humano, ratones, ganado bovino, ovejas, cabras, caballos, conejos, aves, gatos y perros. Más normalmente, el vertebrado es un ser humano, un primate no humano o un ratón. Incluso más normalmente, el vertebrado es un ser humano.

El nivel de dosis terapéuticamente eficaz para cualquier paciente depende de varios factores que incluyen: el trastorno que se va a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del antagonista de activina o un fragmento(s) o análogo del mismo que se emplee; la composición empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración, la tasa de excreción del antagonista de activina; la duración del tratamiento; los fármacos que se utilizan en combinación o que coinciden con el antagonista de activina o un fragmento(s) o análogo del mismo, junto con otros factores relacionados bien conocidos en medicina. Por ejemplo, es bien conocido en la técnica que se comienza con dosis de un compuesto terapéutico a niveles más bajos que los que se esperan para alcanzar un efecto terapéutico deseado, y se aumenta gradualmente la dosificación, si es necesario, hasta que se consigue el efecto deseado.

Por lo tanto, la determinación de una cantidad de folistatina eficaz, no tóxica necesaria para tratar un

trastorno/enfermedad a la que se aplica la folistatina la puede determinar fácilmente un experto en la técnica apropiadamente sin más que experimentación de rutina. Normalmente, para la folistatina, una dosificación eficaz se espera que esté en el intervalo de aproximadamente 0,00001 a aproximadamente 100 mg de folistatina por kg de peso corporal cada 24 horas, preferentemente aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10 mg de folistatina por kg de peso corporal cada 24 horas, más preferentemente aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 mg de folistatina por kg de peso corporal cada 24 horas, incluso más preferentemente aproximadamente 0,002 a aproximadamente 0,5 mg de folistatina por kg de peso corporal cada 24 horas, incluso más preferentemente aun aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,20 mg de folistatina por kg de peso corporal cada 24 horas. Además, si se desea, la dosis diaria eficaz se puede dividir en múltiples dosis para los fines de la administración.

De manera alternativa, una dosificación eficaz de folistatina puede ser de hasta aproximadamente 6.500 mg/m<sup>2</sup> cada 24 horas. En general, se espera que una dosificación eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 0,004 a aproximadamente 400 mg/m<sup>2</sup>, preferentemente aproximadamente 0,04 a aproximadamente 40 mg/m<sup>2</sup>, más preferentemente aproximadamente 0,08 a aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup>, aún más preferentemente aproximadamente 0,2 a aproximadamente 8 mg/m<sup>2</sup>.

Normalmente, el tratamiento sería durante la duración de la afección, y las veces de contacto serían normalmente durante la duración de la afección.

Claramente, la cantidad y espaciado óptimos de las dosificaciones individuales de un compuesto de la presente invención se determinará por la naturaleza y extensión de la afección que se va a tratar, la forma, vía y sitio de administración, y la naturaleza del vertebrado en particular que se va a tratar, y estas condiciones óptimas se pueden determinar por procedimientos de rutina por los expertos en el campo.

También se describen en el presente documento profármacos de antagonistas de activina. Normalmente, estos profármacos son derivados funcionales de la folistatina que se convierten fácilmente *in vivo* en el producto necesario para su uso en la presente invención. Los procedimientos típicos para la selección y preparación de profármacos se establece y describe en textos disponibles tales como, por ejemplo, H. Bundgaard (Ed), Design of Prodrugs, Elsevier, 1985.

Cuando se utiliza en el tratamiento de la fibrosis pulmonar, la folistatina se puede administrar sola. Sin embargo, es preferible en general que la folistatina se administre en conjunción con otros tratamientos quimioterápicos que se administran convencionalmente para tratar la enfermedad.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se prepararán normalmente por métodos conocidos por los expertos habituados en la técnica y por lo tanto incluirán normalmente excipientes tales como un vehículo, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables, o combinaciones de los mismos.

Las formulaciones se pueden administrar por las vías convencionales. Por ejemplo, las formulaciones se pueden administrar por las vías oral, rectal, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraespinal, subcutánea o intramuscular), tópica, transdérmica, intraperitoneal, intracraneal, intracerebroventricular, intracerebral, intravaginal o, intrauterina.

La folistatina se puede incorporar también, opcionalmente junto con otros agentes activos, en polímeros biodegradables que permitan una liberación sostenida, los polímeros se van a implantar en la vecindad de donde se desea el suministro del fármaco (tal como en el sitio de una enfermedad localizada), o se implantan de forma que los agentes activos se liberen lentamente sistémicamente. También se pueden utilizar minibombas osmóticas para proporcionar un suministro controlado de altas concentraciones de los agentes activos por medio de una cánula en el sitio de interés, tal como directamente por ejemplo en un desarrollo fibrótico o en el suministro vascular de ese desarrollo.

#### **Composiciones terapéuticas/farmacéuticas para el tratamiento de la enfermedad**

Los vehículos, diluyentes y adyuvantes que se utilizan en las composiciones terapéuticas/farmacéuticas de la invención deben ser "aceptables" en términos de que sean compatibles con los otros ingredientes, y no ser perjudiciales para el paciente. Ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéutica y veterinariamente aceptables son el agua desmineralizada o destilada; solución salina o solución salina fosfato tamponada (PBS); gelatina, gomas vegetales, tales como gomas de xantano, alginatos, agar, carragenano, goma de tragacanto o goma arábica; derivados de la celulosa tales como celulosa microcristalina, metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa o hidroxipropilcelulosa; almidones naturales o modificados y dextrinas; polímeros basados en ácido láctico; alcoholes inferiores, por ejemplo etanol o isopropanol; aralcoholes inferiores; citratos, acetonitrilo; alcohol bencílico; dimetilacetamida; dimetilformamida; monometilacetamida; 2-pirrolidonas tal como N-metilpirrolidona; ftalatos tales como dietilftalato; glicéridos poliglucosados; polialquilenglicoles inferiores o alquilenglicoles inferiores, o alquiléteres o ésteres de los mismos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, monometiléter de propilenglicol, monoetiléter de dietilenglicol y monobutíler de dietilenglicol y ésteres de ácidos grasos polietilenglicol; ésteres grasos y éteres de azúcares o alcoholes polihídricos, derivados alcoxilados de los mismos tales como etoxilatos alcohólicos, sorbitan polietileno o ésteres de ácidos grasos sorbitan, éteres alcohol de

ácidos grasos polioxietileno, y copolímeros de bloque etoxilados propoxilados; glicerol y mono, di o tri ésteres de ácidos grasos de los mismos; esteres sorbitan tales como monolaurato sorbitan; polisorbatos; ácidos grasos; aceites basados en vegetales tales como aceite de maní, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceites de sésamo tales como aceite de maní, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de maní o aceite de coco; ceras o aceites derivados de animales, tales como la cera de abeja o la lanolina, o derivados de los mismos; ésteres de ácido graso tales como palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo, diisobutil adipato o etil oleato; alcoholes grasos, tales como alcohol cetoestearílico; alcoholes grasos sulfatados; compuestos de amonio cuaternario; ésteres grasos sulfato tales como dodecilsulfato sódico; sulfonatos grasos aromáticos tales como sulfonatos de alquil-benceno o sulfonatos de butil-naftaleno; sulfonatos alquil naftaleno; estearatos alcalinos, tales como estearatos de potasio o amonio; alquil y alcaril sulfatos, tales como laurilsulfato sódico, sulfato de cetilo sódico y dodecylbencenosulfonato sódico; aceites de silicona, que incluye polisiloxanos, tales como metil polisiloxano, fenilpolisiloxano y metilfenilpolisiloxano; siliconas volátiles; sílice ahumado, dióxido de sílice coloidal, silicatos aluminomagnésicos; aceites minerales tales como la parafina líquida, parafina blanda o escualeno; polivinilpirrolidona o polímeros de los mismos, y vaselina. Normalmente, el vehículo o vehículos formarán del 10 % al 99,99 % por peso de las composiciones.

En una forma preferida la composición farmacéutica de la invención comprende como agente activo una cantidad eficaz de folistatina, junto con un vehículo, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable como se muestra en el Ejemplo 1.

La composición farmacéutica para su uso en un método de la invención puede estar: en una forma adecuada para la administración parenteral, es decir, por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa; una cápsula adecuada para su ingestión oral; un ungüento, crema o loción adecuados para la administración tópica; en una forma adecuada para el suministro como gotas oftálmicas; o en una forma de aerosol adecuada para la administración por inhalación, tal como por inhalación intranasal o inhalación oral.

Para la administración como solución o suspensión inyectable, los diluyentes o vehículos no tóxicos parenteralmente adecuados pueden incluir solución de Ringer, solución salina isotónica, solución salina fosfato tamponada, etanol y 1,2-propilenglicol.

Los vehículos, diluyentes, excipientes y adyuvantes para el uso oral incluyen, aceite de maní, parafina líquida, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato sódico, goma arábica, goma de tragacanto, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, gelatina y lecitina. Además estas formulaciones orales pueden contener agentes saborizantes y colorantes adecuados. Cuando se utilizan en forma de cápsula las cápsulas pueden revestirse con compuestos tales como el monoestearato de glicerilo o el diestearato de glicerilo que retrasan la desintegración. De manera alternativa, las formulaciones se pueden proporcionar con revestimientos entéricos tales como la hidroxipropilcelulosa y polímeros acrílicos y metacrílicos o copolímeros y/o sus ésteres, o combinaciones de los mismos, que protegen la formulación, por ejemplo, de los jugos gástricos, hasta el lugar en que se desea la absorción, tal como el intestino delgado.

Los adyuvantes para las formulaciones orales incluyen normalmente uno o más de emolientes, emulsionantes, agentes espesantes, conservantes, bactericidas o agentes de tampón.

Las formas sólidas para la administración oral pueden contener aglutinantes aceptables en la práctica farmacéutica humana y veterinaria, edulcorantes, agentes colorantes, agentes desintegrantes, diluyentes, saborizantes, agentes de revestimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes de retraso en el tiempo. Los aglutinantes adecuados incluyen goma arábica, gelatina, almidón de maíz u otros almidones naturales o modificados y dextrinas, goma de tragacanto, alginato sódico, carboximetilcelulosa o polietilenglicol. Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, sorbitol, manitol, xilitol, glucosa, aspartamo, o sacarina. Se conocen muchos agentes colorantes adecuados y se seleccionarán según las propiedades de la formulación en particular, y pueden incluir ventajosamente agentes colorantes naturales tales como por ejemplo, clorofilas, carotenos, cochinilla. Los agentes desintegrantes adecuados incluyen almidón de maíz, derivados de celulosa tales como metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma guar, goma xantano, bentonita, ácido algínico o agar. Los diluyentes adecuados incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato cálcico, silicato cálcico o sales de citrato o fosfato dicálcico. Los agentes saborizantes adecuados incluyen el aceite de saborizantes de menta, aceite de gaulteria, grosella negra, cereza, naranja, limón o frambuesa. Los agentes de revestimiento adecuados incluyen polímeros o copolímeros del ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, derivados de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa, ceras, alcoholes grasos, ceína, goma laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato sódico, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfito sódico. Los lubricantes adecuados incluyen estearato magnésico, ácido esteárico, oleato sódico, cloruro sódico o talco. Los agentes de retraso en el tiempo incluyen el monoestearato de glicerilo o el diestearato de glicerilo.

Las formas líquidas para su administración oral normalmente contendrán , además de los agentes anteriores, un vehículo líquido que se selecciona de entre, por ejemplo, agua, aceites vegetales tales como aceite de oliva, aceite de maní, aceite de sésamo, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de maní, o aceite de coco, parafina líquida, glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol, o polietilenglicol, alcanoles inferiores tales como etanol, propanol, o

isopropanol, glicerol, alcoholes grasos, triglicéridos o mezclas de los mismos.

- 5 Las suspensiones para la administración oral pueden comprender además agentes dispersantes y/o agentes suspensores que se seleccionan de entre, por ejemplo, derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, o hidroxipropilmetilcelulosa, gomas vegetales tales como goma guar, goma xantano, polivinilpirrolidona, alginato sódico o alcohol cetílico. Los agentes dispersantes adecuados incluyen lecitina, ésteres de ácidos grasos polioxietileno tales como el ácido esteárico, mono o dioleato, estearato o laurato de sorbitan polioxietileno, y similares.
- 10 Las emulsiones para administración oral pueden comprender además uno o más agentes emulsionantes. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen agentes dispersantes como se ha ejemplificado anteriormente u otras gomas naturales como la goma arábica o la goma de tragacanto.
- 15 Los métodos para preparar composiciones que se pueden administrar parenteralmente son evidentes para los expertos en la técnica, y se describen con más detalle, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science, 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., por lo que se incorpora en el presente documento por referencia.
- 20 Las formulaciones tópicas para su uso en un método de la presente invención, comprende la folistatina como principio activo junto con uno o más vehículos aceptables, opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen preparaciones líquidas y semilíquidas adecuadas para la penetración a través de la piel al sitio de donde se necesita el tratamiento, tales como linimentos, lociones, cremas, ungüentos o pastas, y gotas adecuadas para su administración al ojo, oído o nariz.
- 25 Las gotas para su uso en un método de la presente invención pueden comprender soluciones o suspensiones acuosas u oleosas estériles. Estas se preparan normalmente disolviendo el ingrediente activo en una solución acuosa de un agente bactericida y/o fungicida y/o cualquier otro conservante adecuado tales como un antioxidante, y opcionalmente incluyen un agente activo de superficie. La solución resultante se puede clarificar entonces por filtración, se transfiere a un envase adecuado y se esteriliza. La esterilización se puede conseguir, por ejemplo, en un autoclave o manteniéndolo a 90° C-100° C durante media hora, o por filtración, seguido por la transferencia a un envase mediante una técnica aséptica. Los agentes bactericidas y fungicidas adecuados para su inclusión en las gotas incluyen, por ejemplo, nitrato o acetato fenilmercúrico (0,002 %), cloruro de benzalconio (0,01 %). Los disolventes adecuados para la preparación de una solución oleosa pueden incluir, por ejemplo, glicerol, alcohol diluido o propilenglicol.
- 30
- 35 Las lociones para su uso en un método de la presente invención incluyen las adecuadas para la piel o el ojo. Una loción ocular puede comprender una solución acuosa estéril que contiene un fungicida, bactericida y/o un conservante tal como un antioxidante, y se puede preparar por métodos similares a los que se han descrito anteriormente en relación a la preparación de las gotas. Las lociones, cremas o linimentos para la aplicación en la piel puede incluir un agente para acelerar el secado y para enfriar la piel, tales como un alcohol o acetona, y/o un humectante tal como el glicerol, o aceites tales como el aceite de ricino o el aceite de maní. Las lociones, cremas o linimentos para la aplicación en la piel también pueden incluir agentes colorantes/tintes apropiados y compatibles que son bien conocidos en la técnica, particularmente en las formulaciones de unción dorsal continua para aplicaciones en veterinaria de forma que facilite la distinción entre animales tratados y no tratados.
- 40
- 45 Las cremas, ungüentos o pastas de acuerdo con su uso en un método de la presente invención son formulaciones semisólidas del ingrediente activo para la aplicación externa. Se pueden fabricar mezclando el ingrediente activo en una forma finamente dividida o en polvo, sola o en solución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con una base grasa o no grasa. La base puede comprender hidrocarburos tales como parafina dura, blanda o líquida, glicerol o mono, di o triésteres de ácidos grasos, cera de abeja, un detergente metálico; un mucílago, un aceite de origen natural tal como aceite de almendras, maíz, maní, ricino u oliva; grasa de lana o sus derivados, o ácidos grasos tales como el ácido esteárico u oleico junto con un alcohol tal como macrogoles o glicoles o éteres y/o ésteres de los mismos, por ejemplo, polietilenglicol, propilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, monometiléter de propilenglicol, monoetiléter de dietilenglicol y monobutiléter de dietilenglicol, alcanos inferiores, por ejemplo etanol o isopropanol, aralcanos inferiores, o 2-pirrolidonas tales como N-metilpirrolidona.
- 50
- 55 Las formulaciones para las aplicaciones en la piel también pueden incorporar ventajosamente cualquier agente activo de superficie que puede ayudar a la difusión sobre, o la absorción a través de, la piel. Tales tensioactivos pueden ser un tensioactivo aniónico, catiónico, no iónico o zwitterónico. Normalmente, el agente activo de superficie será no iónico, y más normalmente se seleccionará de entre ésteres de ácidos grasos y éteres de azúcares o alcoholes polihídricos, y derivados alcoxilados de los mismos tales como alcohol etoxilatos, ésteres de ácidos grasos polioxietileno sorbitan o sorbitol, alcohol éteres grasos polioxietileno, y copolímeros en bloque propoxilados etoxilados. También se pueden incluir agentes antiespumantes adecuados que se conocen en la técnica, si es necesario.
- 60
- 65 También se pueden incluir agentes suspensores y/o modificadores de la viscosidad tales como las gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tales como sílice silicáceo, y otros ingredientes tales como la

lanolina.

Los conservantes adecuados para su uso en formulaciones tópicas de acuerdo con la invención pueden incluir, por ejemplo, benzoato sódico, alcohol bencílico, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, 2,6-ditertbutilo-4-metoxifenol (BHA), metilparabeno, propilparabeno o bisulfito sódico.

Las composiciones farmacéuticas para su uso en los métodos de la invención se pueden administrar también en forma de liposomas. Los liposomas se derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas, y están formados por cristales líquidos hidratados mono o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede utilizar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las formulaciones que comprenden liposomas pueden contener también estabilizadores, conservantes, excipientes y similares que se conocen en la técnica. Para la preparación de liposomas, los lípidos preferidos son fosfolípidos y fosfatidilcolinas (lecitinas) naturales y sintéticos. Los métodos para formar liposomas están establecidos y publicados en textos tales como: Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33 *et seq.*

### Terapia génica

La presente invención también se refiere a un método de terapia génica para el tratamiento de una fibrosis pulmonar. Como se describe en el presente documento, la terapia génica puede incluir transferencia génica y técnicas biotecnológicas antisentido.

La transferencia génica se puede llevar a cabo simplemente inyectando cantidades minuto de ADN en el núcleo de una célula por microinyección. Los genes producidos pueden reconocerse por mecanismos de transcripción y traducción normales en las células y se expresará entonces un producto genético.

También se han intentado varios métodos para introducir ADN en gran cantidad de células, que incluyen: transfección, que incluye la precipitación del ADN diana con  $\text{CaPO}_4$  que entonces es captado por las células por pinocitosis; electroporación, que incluye exponer las células a pulsos de alta tensión para producir perforaciones en la membrana a través de las cuales puede pasar el ADN diana; lipofección/fusión liposómica, que incluye el empaquetamiento del ADN diana en vesículas lipófilas que entonces se pueden fusionar con una célula diana; y bombardeo de partículas por el que el ADN unido a pequeños proyectiles se fuerza a entrar en las células. El ADN diana también puede introducirse en las células acoplando el ADN a proteínas modificadas químicamente.

Normalmente, en un método de transferencia génica de acuerdo con la invención, se inserta un vector de expresión que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica la folistatina o un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la folistatina, en las células. Las células transformadas se multiplican *in vitro* y luego se infunden en grandes cantidades en los pacientes. Los vectores de expresión adecuados para el suministro de estas secuencias de ácido nucleico en la población celular diana (por ejemplo, hepatocitos, otros tipos de células hepáticas, tales como células hepáticas estrelladas, células de músculo liso, fibroblastos pulmonares, fibroblastos, células renales (se pueden derivar de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, varios virus ARN, o virus del papiloma bovino). Los vectores víricos recombinantes que contienen las secuencias de ácido nucleico diana se pueden preparar por uno cualquiera de los varios métodos que son conocidos por los expertos en la técnica. De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican la folistatina, se pueden utilizar como un ADN desnudo o en un sistema reconstituido, por ejemplo, liposomas u otros sistemas lipídicos para el suministro a células diana.

También se ha demostrado que las proteínas de adenovirus son capaces de desestabilizar endosomas y aumentar la captación del ADN por las células. La mezcla de adenovirus con las soluciones que contienen complejos de ADN, o la unión de ADN a polilisina unida covalentemente a los adenovirus utilizando agentes de entrecruzamiento proteico mejora sustancialmente la captación y expresión del gen recombinante.

La invención se describirá ahora con mayor detalle en referencia a los Ejemplos específicos, los cuales, aunque no cubran las realizaciones de la invención, son útiles para entender la invención.

### Ejemplos

#### **Ejemplo 1 La inmunorreactividad de activina A y folistatina indica la expresión constitutiva en el hepatocito del hígado normal de rata.**

Los inventores demostraron la inmunolocalización de la folistatina exclusivamente en hepatocitos del hígado normal (Figura 1).

Se fijaron las muestras de hígado necesarias para el examen histológico en formalina tamponada con PBS al 10 % durante 24 horas a temperatura ambiente, y luego se lavaron dos veces en alcohol al 70 % y se almacenaron en alcohol al 70 % a temperatura ambiente hasta que su uso era necesario. Las muestras de tejido se procesaron

entonces utilizando el siguiente programa. Las muestras se deshidrataron en baños secuenciales de etanol al 70 % durante 1 hora, etanol al 90 % durante 2 h y etanol al 100 % durante 2 h y etanol al 100 % durante 1 h. Los tejidos se sumergieron entonces en HistoSol durante 1 h 3 veces en baños separados, y se sumergieron en cera durante 1 hora cada uno en 2 baños separados. Los tejidos se embebieron entonces en moldes de cera y una vez fijados, se almacenaron a temperatura ambiente hasta que su uso era necesario.

Para la inmunohistoquímica, los bloques de tejido fijados con formalina embebidos en parafina se seccionaron a 4  $\mu$ m y se colocaron en portaobjetos Superfrost Plus™, se incubaron a 60° C durante 30 minutos y se almacenaron a temperatura ambiente hasta que su uso era necesario. Los portaobjetos se des-parafinaron entonces utilizando técnicas convencionales y se sometieron a recuperación por calentamiento en microondas a 400 W durante 10 minutos sumergidos en 0,1 M de tampón de citrato sódico (pH 7,4). La coloración se desarrolló en todos los procedimientos de tinción utilizando 3'-3-diaminobenzadina (DAB) a menos que se describa otra cosa y los portaobjetos se contra-tiñeron con hematoxilina.

Para localizar la activina A en el tejido hepático, se aplicó el anticuerpo monoclonal "E<sub>4</sub>", que se produce contra la subunidad  $\beta_A$  de la activina, con una concentración final de 18  $\mu$ g/ml y se incubó durante una noche a 4° C. El "E<sub>4</sub>" es el mismo anticuerpo monoclonal que se utiliza en el ELISA activina A y se había validado anteriormente para ambos procedimientos (Jarred, RA, Cancilla B, Richards M, Groome NP, McNatty KP, Risbridger GP. Differential localization of inhibin subunit proteins in the ovine testis during fetal gonadal development. Endocrinology 1999; 140:979-86). Se amplificó la reactividad utilizando el kit de amplificación de señal CSA (DAKO) según las instrucciones del fabricante y la coloración se desarrolló y se contra-tiñeron las secciones. Se utilizaron secciones de próstata humana como control positivo, mientras que en el control negativo se sustituyó el anticuerpo primario por un anticuerpo irrelevante (inmunoglobulina de ratón normal). Como la inhibina no se expresa esencialmente en el hígado, la detección de la subunidad  $\beta_A$  representa la proteína activina A y no la inhibina (un heterodímero de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ).

Los anticuerpos monoclonales contra los isoformas principales de la follistatina humana se utilizaron para determinar la inmunorreactividad del tejido. El anticuerpo monoclonal 17/2 (1:150) es específico contra la follistatina humana 288, mientras que el clon H10 (1:100) es específico de la follistatina humana 315 (McPherson SJ, Mellor SL, Wang H, Evans L.W, Groome NP, and Risbridger GP. Expression of activin A and follistatin core proteins by human prostate tumor cell lines. Endocrinology 1999; 140: 53039). El procedimiento de tinción para cada anticuerpo monoclonal se llevó a cabo como para la subunidad  $\beta_A$  de la activina utilizando preparaciones citospin de la línea celular HepG2 como control positivo, mientras que un anticuerpo irrelevante que sustituía al anticuerpo primario funcionaba como control negativo.

#### **Ejemplo 2 La inmunorreactividad contra la activina A es más intensa adyacente a los septos fibrosos que en los lóbulos hepáticos pero la expresión de follistatina no cambia en cirrosis.**

La expresión de activina A en el hígado fibrótico y cirrótico es menos controvertida que en el hígado normal.

Se alojaron ratas Wistar macho que pesaban entre 80-100 g con ciclos convencionales de luz y oscuridad de 12 h a temperatura y humedad constantes y se les permitió el acceso ad libitum al agua y al pienso rat chow. Para establecer un modelo de fibrosis y cirrosis, se inyectó a las ratas por vía intraperitoneal una mezcla de tetracloruro de carbono/aceite de oliva 1:1, 3 veces por semana durante 12 semanas a una dosis de 0,8 ml/kg. Las inyecciones se aplicaban tres días consecutivos. A los animales de control se les inyectó volúmenes iguales, pero solo de aceite de oliva. En este modelo de cirrosis los inventores observaron un cambio en la distribución de la activina A inmunorreactiva de los hepatocitos lobulares a las áreas que rodeaban las bandas fibróticas (Figura 2) y la co-localización ocasional con marcadores de HSC (Figura 3).

El experimento se llevó a cabo como en el Ejemplo 1 y, para evaluar la expresión de activina por las HSC en los septos fibróticos se utilizó microscopía confocal. Se detectó la actina de músculo liso  $\alpha$ , un marcador para las células hepáticas estrelladas activadas, utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra los filamentos de actina presentes en las células hepáticas estrelladas activadas. Las células que expresan actina de músculo liso  $\alpha$  se visualizaron utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti-humano de ratón aplicado a una concentración final de x mg/ml (1:100, DAKO Corporation) durante 1 hora a temperatura ambiente. Este anticuerpo se había validado anteriormente para que presentara reactividad cruzada con el músculo liso  $\alpha$  de rata. Para visualizar la reactividad, las secciones se incubaron con conjugado FITC-anti-ratón de oveja (1:50, Silenus, Victoria) preabsorbido contra el suero normal de rata durante 1 hora a temperatura ambiente. Para evaluar la expresión de activina por las HSC intrafibróticas, se aplicó un conjugado de activina A biotinilado (1:20) durante 1 hora y se visualizó con un conjugado Rojo Texas-estreptavidina (1:50) durante 30 min. Se midió la reactividad en condiciones de fluorescencia con un microscopio confocal BioRad y se analizó utilizando el software BioRad.

Particularmente, no había un cambio discernible en la inmunorreactividad de follistatina en animales fibróticos y cirróticos cuando se comparaban con normales (Figura 4). Este hallazgo es la primera descripción de la expresión de follistatina en hígados fibróticos y cirróticos y sugeriría que el aumento de expresión de activina adyacente a los septos fibrosos no está en oposición a un aumento de actividad neutralizante de follistatina.

**Ejemplo 3 La expresión hepática de ARNm de activina precede a los cambios en ARNm de folistatina durante el desarrollo de la fibrogénesis hepática.**

Como la expresión de activina y folistatina está ampliamente distribuida entre muchos tejidos, las observaciones a nivel proteico se pueden confundir por acumulación de la proteína en fuentes extrahepáticas.

Utilizando el análisis PCR en tiempo real de los extractos hepáticos completos, los inventores analizaron la expresión de ARNm tanto de activina A como de folistatina (Figura 5) durante el modelo de fibrosis descrito en el Ejemplo 2.

El ARN total se purificó utilizando Trizol® con modificaciones. En resumen, tras la extracción inicial, se mezcló el sobrenadante con una solución alta en sal de 0,8 M de citrato sódico y 1,2 M de cloruro sódico para permitir que se produjera una precipitación más eficaz. Para retirar el ADN genómico contaminante, las muestras se trataron entonces con 10 U de DNasa (Roche Biochemicals) a 37° C durante 45 min y la reacción se paró incubando a 95° C durante 3 min. Las muestras se cuantificaron entonces por espectrofotometría  $A_{260}/A_{280}$ . Se transcribieron dos microgramos de ARN para cada muestra utilizando Superscript II® y oligo dT<sub>13-15</sub> (Gibco-BRL).

El análisis de ARNm de la subunidad  $\beta_A$  de activina se llevó a cabo utilizando el LightCycler Roche (Roche) que controla fluorimétricamente la formación de productos PCR en tiempo real. Esto se consigue utilizando el marcador Verde SYBR I, que en su forma no unida tiene una fluorescencia baja pero cuando se une al dsADN presenta fluorescencia fuerte de forma que la intensidad de fluorescencia aumenta en proporción con la cantidad de dsADN. La parte logarítmica lineal de la curva de amplificación de la PCR se identifica con el umbral o el punto de cruzamiento (representado en número de ciclos) definido como la intersección de la línea del mejor ajuste con la región logarítmica lineal y la banda de ruido. En estos estudios, se empleó una preparación de ADNc normal de rata como control de calidad y se utilizó en todas las reacciones para asegurar que las condiciones de ciclado permanecían constantes entre las ejecuciones experimentales. Los niveles de expresión de cada ARNm y sus puntos de cruzamiento estimados en cada muestra se determinaron utilizando el software LightCycler. Se calculó entonces la relación de amplificación ARNm/GAPDH. Los reactivos para la PCR se adquirieron en Roche Biochemicals.

Para la PCR, se diluyeron 2  $\mu$ l de cada preparación de ADNc a una concentración final de 1:400 y se añadieron a tubos capilares individuales con dNTP,  $Mg^{2+}$ , Verde SYBR y los cebadores relevantes. Las concentraciones de magnesio, las temperaturas de hibridación, los tiempos de extensión y las localizaciones de cebadores específicas del nucleótido y las secuencias se muestran en la Tabla 1. Se programaron cuarenta ciclos de PCR para asegurar que se alcanzara la fase logarítmica lineal. Al completar la reacción, se llevó a cabo el análisis de la curva de mezclado para establecer la especificidad de los productos de ADN producidos. Los productos de la PCR se retiraron de los tubos capilares y se visualizaron por electroforesis en gel para confirmar el tamaño del producto y la integridad de la reacción PCR. En cada caso, cada grupo de cebadores para los animales individuales se llevaron a cabo en un único experimento PCR. La variación intra-ensayo era del 4 % para cada grupo de cebadores.

Inmediatamente después de la intoxicación con  $CCl_4$  había una reducción significativa de la expresión de activina A en 1 semana que continuó hasta las 2 semanas. A continuación, los niveles de expresión volvieron a los niveles de la línea base a las 4 semanas y permanecieron constantes a lo largo del resto del modelo.

Por el contrario, la expresión de folistatina estaba elevada inicialmente con respecto a los niveles normales. De manera interesante, este aumento de la expresión de folistatina se correlacionaba con un pico de proliferación de hepatocitos según se midió por la expresión de PCNA. Después del aumento inicial, los niveles de expresión de ARNm de folistatina cayeron significativamente a las 2 semanas, y se asemejaban a la expresión de activina a partir de entonces.

Es probable que esta respuesta inicial de folistatina y activina se deba a la agresión aguda del  $CCl_4$  que da lugar a una respuesta regenerativa.

Estos resultados resaltan la noción de que incluso cuando los niveles de activina A y de folistatina están regulados diferencialmente durante la patogénesis de la fibrosis hepática, esta expresión está unida indisolublemente.

**Ejemplo 4 La expresión de ARNm de activina A aumenta rápidamente durante los estadios tempranos de activación de HSC con respecto a la expresión de ARNm de folistatina.**

Los inventores llevaron a cabo un análisis PCR en tiempo real sobre HSC recién aisladas según se transdiferenciaban *in vitro*, para determinar el patrón de expresión de la activina A y folistatina con respecto a otros marcadores clave de proliferación de HSC y producción de ECM.

Se establecieron cultivos de HSC por perfusión secuencial de pronasa y collagenasa como se había descrito anteriormente (Ramm GA. Isolation and culture of rat hepatic stellate cells. J Gastroenterol Hepatol (1998) 13:846-851). En resumen, se separaron las células en un gradiente discontinuo en dos etapas de Nycodenz (Sigma, Sidney,

Australia) y se evaluó la pureza por autofluorescencia UV característica de vitamina A y citometría de flujo. A continuación se hizo un exclusión por azul de tripano para determinar la viabilidad, se cultivaron  $1 \times 10^6$  células/ml en medio M199 suplementado con un 10 % de suero fetal bovino y un 10 % de suero equino normal (Trace Scientific, Victoria) en condiciones convencionales con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Los medios se cambiaron a las 24 horas y cada 48 horas a partir de entonces.

El aislamiento de ARN y la PCR en tiempo real se llevaron a cabo como en el Ejemplo 3.

Como en las HSC transdiferenciadas, la expresión de ARNm de colágeno tipo I estaba elevada como se esperaba. Sin embargo, los análisis de los inventores revelaron la inducción de la expresión de ARNm de activina A muy temprano durante la activación de HSC que continuó hasta el día 5 (Figura 6). Además, esta expresión estaba elevada antes que la expresión de TGF $\beta$ , sin embargo tras el día 1, la del TGF $\beta$  era mayor que la de la activina A.

El hallazgo clave sin embargo era la observación de que la expresión de ARNm de folistatina tenía un pico alrededor del día 1 post-aislamiento y permanecía constante hasta el día 5 de forma que los niveles de expresión de activina A y FS eran marcadamente diferentes. Esto sugería que la presencia de activina A, sea de una fuente endocrina o autocrina, es capaz de estimular la síntesis de fibronectina y colágeno en HSC. Estas observaciones en conjunto con los hallazgos presentados en los ejemplos anteriores, y el conocimiento de que la folistatina neutraliza la bioactividad de la activina A sugerirían que la adición de folistatina sería capaz de mejorar la producción de ECM en HSC y por lo tanto la fibrogénesis hepática.

**Ejemplo 5 Las células hepáticas estrelladas aisladas producen concentraciones crecientes de activina A bioactiva según se transforman en el fenotipo típico "tipo miofibroblastos".**

Se establecieron los cultivos primarios de HSC a partir de hígados normales como en el Ejemplo 4 y el análisis reveló la producción de cantidades crecientes de activina A según se transformaban en el fenotipo activado (Figura 7).

La inmunorreactividad de la activina A se midió por ELISA como en Knight PG, Muttukrishna S, Groome NP. Development and application of a twosite enzyme immunoassay for the determination of 'total' activin A concentrations in serum and follicular fluid was based on the method described in J Endocrinol (1996), 148:26779.

El medio acondicionado a partir de cultivos de HSC se evaluó en cuanto a la bioactividad de activina utilizando un bioensayo *in vitro* previamente validado (Phillips, D.J., Brauman, J.N., Mason, A.J., de Kretser, D.M. & Hedger, M.P. A sensitive and specific *in vitro* bioassay for activin using a mouse plasmacytoma cell line, MPC11. J Endocrinol (1999), 162:111115). La adición de activina produce una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de las células MPC11 en el ratón. Estas células son refractarias al TGF $\beta$  e inhibina, pero los efectos de la activina se pueden bloquear por la adición de un exceso de folistatina.

La adición de sobrenadantes de los cultivos de HSC a las células MPC11 daba como resultado una disminución, dependiente de la dosis, de la proliferación (Figura 8). Esta disminución de la proliferación se reflejaba en la de rh-activina A.

Se observó que la adición de sobrenadantes del cultivo era más potente que la que se observaba para la rh-activina A.

**Ejemplo 6 La adición de activina A exógena y folistatina a cultivos de HSC daba como resultado una disminución en la proliferación de HSC.**

Los cultivos de HSC recién aisladas y activadas, aisladas como en el Ejemplo 4, se expusieron a activina A exógena y folistatina para determinar sus efectos sobre la proliferación. La adición tanto de activina A como de folistatina daba como resultado la disminución, dependiente de la dosis, de la proliferación de HSC en ambas condiciones experimentales (Figura 9 y 10) en un perfil similar al que se observaba para el TGF $\beta$ .

Se evaluó la respuesta proliferativa de las HSC y las HSC transformadas (miofibroblastos) a varios mediadores exógenos *in vitro* por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. Tras determinarse la densidad celular óptima se sembraron las células en placas de 24 pocillos con  $0,5 \times 10^5$  células/pocillo y se las dejó que se adhirieran durante una noche a 37° C. El medio de cultivo celular se retiró y se sustituyó con medio M199 que contenía un 0,1 % de BSA durante 18 horas para permitir que las células entraran en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular. Las células se expusieron entonces a varias concentraciones de activina (0,15, 0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5, 10 y 20 ng/ml), TGF $\beta$  (0,15, 0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5, 10 ng/ml), Folistatina (1,6, 3,2, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 ng/ml) y PDGF-BB (1,6, 3,2, 6,25, 12,5, 25, 50 ng/ml) durante 18 horas. Los cultivos se pulsaron entonces con 0,5  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-timidina y se incubaron a 37° C durante 16 h más. A continuación, las células adherentes y no adherentes se tripsinizaron y luego se recolectaron con un recolector Biorad (Biorad) en un filtro de papel y se añadieron a un tubo de centelleo Wallac. Se añadieron setecientos cincuenta microlitros de fluido de centelleo a cada tubo y se hizo el recuento durante un minuto en un contador beta Wallac (Wallac).

Estos datos sugieren que la folistatina puede ser un agente terapéutico eficaz para el tratamiento de fibrogénesis hepática.

#### **Ejemplo 7 La activina tiene efectos divergentes sobre la apoptosis de HSC en comparación con TGFβ**

Ya que tanto la activina A como la folistatina reducían la proliferación de HSC, se planteó la hipótesis de que cualquiera de ellas o ambas produjeran apoptosis.

Los cultivos de HSC activadas, aisladas como en el Ejemplo 4, se expusieron a varias cantidades de activina A, folistatina y TGFβ y se evaluó por citometría de flujo la expresión de anexina V; un marcador precoz de apoptosis celular.

Se midió por citometría de flujo la apoptosis de las líneas celulares de miofibroblastos que se habían sometido al menos a 6 subcultivos utilizando la expresión de Anexina V en la superficie celular como marcador. La anexina V es una proteína intracelular que se expresa en la superficie celular de las células que sufren apoptosis. En resumen 2 x 10<sup>5</sup> miofibroblastos HSC se subcultivaron en placas de cultivo de 6 pocillos durante una noche. A continuación, las células se lavaron en HBSS y se trataron con activina (0,1, 1, 10 y 100 ng/ml), TGFβ (1 y 5 ng/ml), folistatina (10 y 100 ng/ml), PDGF-BB (50 ng/ml), activina y TGFβ simultáneamente (1 y 5 ng/ml respectivamente) y activina y FS simultáneamente (10 y 100 ng/ml respectivamente) durante 16 horas. Como control positivo, se utilizó nitroprusiato sódico (SNP) a una concentración final de 0,5 μM. El SNP es un fármaco quimioterápico que se utiliza en el tratamiento de varios cánceres sólidos y leucemias. Las células adherentes y no adherentes se recolectaron tras el tratamiento con tripsina-EDTA, se lavaron con 1 ml de PBS y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. Se aplicó un anticuerpo específico de anexina V-FITC durante 30 min de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche diagnostics) en conjunto con Yoduro de Propidio (PI) para distinguir entre células apoptóticas y necróticas. Las células se lavaron entonces en PBS y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min y se resuspendieron en 300 μl de PBS. La suspensión única se analizó entonces con un analizador MoFlo-cytomation.

Al contrario que con el TGFβ, la adición de activina A y folistatina no inducían apoptosis de HSC (Figura 11).

Esto es un hallazgo significativo, que sugiere fuertemente un mecanismo regulador celular diferente para la activina A en comparación con el TGFβ.

#### **Ejemplo 8 Administración parenteral de folistatina recombinante humana en un modelo a corto plazo y largo plazo de daño hepático.**

Para determinar si la administración parenteral de folistatina era capaz de reducir la progresión de fibrosis hepática, las ratas se expusieron a CCl<sub>4</sub> durante 4 semanas (a corto plazo) o durante 8 semanas (a largo plazo). Los animales se co-inyectaron entonces con 1 μg de folistatina 3 veces por semana durante las 4 primeras semanas (a corto plazo) o desde la 8-12 semanas (a largo plazo) y luego se sacrificaron. Los animales de control recibieron CCl<sub>4</sub> durante la misma cantidad de tiempo.

Se indujo cirrosis en ratas Wistar macho inyectando una mezcla 1:5 vol/vol de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) y aceite de oliva con una concentración final de 0,4 mg/kg 3 veces a la semana durante 4 semanas (modelo a corto plazo) o 12 semanas (modelo a largo plazo). Los animales de control recibieron inyecciones solo de volúmenes equivalentes de aceite de oliva. Los hígados completos se retiraron al final del modelo para el análisis histológico y de ARNm como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 1-3. Adicionalmente, para determinar una estimación de la fibrosis hepática total, se midió el contenido en hidroxiprolina como se había descrito anteriormente (Bergman, I., y R. Loxley, "Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline", Anal Chem (1963) 35: 1961-1965). En resumen, las muestras de hígado congeladas se pesaron y se hidrolizaron en ácido HCl 6 N a 110° C durante 16-18 horas en tubo revestidos de teflón. Las muestras se enfriaron y se añadieron 40 mg de Dowex (Sigma)/carbón activado a cada muestra y se removieron. El hidrolizado se filtró a través de 2 filtros de papel en un tubo nuevo y las muestras se ajustaron a un pH de 7,4. Las muestras se incubaron entonces con isopropanol y cloramina T durante 25 minutos a 60° C. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, se estimó el contenido en hidroxiprolina leyendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 570 nm.

Para el modelo de fibrosis a corto plazo, se inyectó por vía intramuscular 1 mg de FS288 recombinante humana en la extremidad trasera 3 veces por semana durante la duración del modelo (4 semanas). Para el modelo de fibrosis y cirrosis a largo plazo, se inyectaron los animales por la misma vía entre las semanas 8 y 12 del modelo.

En el modelo a corto plazo, los animales que se trataron con folistatina tenían un peso corporal mayor (Figura 12) y un peso del hígado remanente mayor (Figura 13). Además, tenían significativamente menos contenido intrahepático de hidroxiprolina que los controles a las 2 semanas (Figura 14).

En el modelo a largo plazo, los animales que se trataron con folistatina no mostraban cambios en el peso corporal (Figura 15), el peso del hígado remanente (Figura 16), ni en el contenido intrahepático de hidroxiprolina (Figura 17).

A partir de estos datos, los inventores concluyen que el uso de folistatina puede contribuir a la mejora de la función hepática de los hepatocitos remanentes.

Además, los inventores concluyen que el uso de folistatina puede ser beneficioso como agente terapéutico para atenuar la fibrogénesis hepática en nuevos pacientes diagnosticados sea sola o en conjunción con las actuales terapias convencionales.

Unas aplicaciones terapéuticas adicionales podrían incluir: 1) ayudar a la regeneración hepática y absorción de colágeno en pacientes que han completado satisfactoriamente la terapia convencional; 2) restaurar la función hepática en pacientes que se han sometido a resección hepática y atenuar la fibrosis del hígado regenerado.

#### **Ejemplo 9 Estudios en seres humanos**

Se demostró que la activina A estaba elevada en pacientes con hepatitis vírica crónica en comparación con los controles normales (Figura 18) mientras que la folistatina sérica permanecía a niveles normales (Figura 19), como se informa también en Patella, S., et al. (2001), "Characterization of serum activin A and follistatin and their relation to virological and histological determinants in chronic viral hepatitis", J Hepatol., 34(4): 57683. Este estudio es uno de los pocos estudios que han investigado la activina A en la enfermedad humana y es el único estudio que ha estudiado la hepatitis vírica humana con algo de detalle.

En resumen, se analizó el suero de archivo almacenado a -80° C de 15 pacientes normales, 22 con hepatitis B y 47 con hepatitis C. Se llevaron a cabo los ensayos de función hepática, virología y biopsia hepática durante el manejo clínico de rutina. Se midió la activina A sérica total por medio de un ELISA sándwich en dos etapas en el que se utilizaba la activina A recombinante humana como referencia como se había descrito anteriormente (Knight, P.G., Muttukrishna, S. & Groome, N.P. Development and application of a two site enzyme immunoassay for the determination of 'total' activin A concentrations in serum and follicular fluid. J Endocrinol 1996; 148:267279). Se cuantificó la folistatina sérica total utilizando un ELISA ultrasensible utilizando anticuerpos monoclonales recombinantes como se había validado anteriormente (Evans, L.W., Muttukrishna, S. & Groome, N.P. Development, validation and application of an ultrasensitive twosite enzyme immunoassay for human follistatin. J Endocrinol 1998; 156: 275282). La referencia utilizada era la folistatina 288 humana recombinante que se obtuvo del Programa Nacional de Hormonas y Pituitaria (Rockville, MD, USA). Se llevó a cabo la inmunohistoquímica de la subunidad de activina A y folistatina como se detalla en el Ejemplo 2.

Los análisis adicionales de pacientes infectados con HBV revelaban que la activina A sérica se correlacionaba significativamente con la ALT, un marcador del daño del hepatocito y la inflamación intrahepática (Figura 20). También se observó que la activina A sérica en pacientes con VHB se correlacionaba positivamente con la replicación vírica (Figura 21), mientras que la folistatina sérica se correlacionaba negativamente (Figura 22). Esto sugería que la presencia de activina A en este sistema sin oposición, podía contribuir a la patogénesis de la infección de hepatitis crónica por su influencia en la replicación vírica.

#### **Ejemplo 10 Expresión de folistatina recombinante humana en células CHO**

El gen de la folistatina humana 288 (FS288) se amplificó a partir del ADNc ovárico humano (Clontech) utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Se generó un fragmento de 954 pares de bases utilizando cebadores complementarios de los extremos 5' y 3' del gen FS288 humano. Este fragmento se clonó en un plásmido pGem7Zf(-) (Promega) utilizando técnicas convencionales. Después de determinar que la secuencia de FS288 insertada era el gen FS288 correcto, se subclonó en un vector de mamífero, pDSVC, detrás del promotor temprano SV40. El vector recombinante se transfectó entonces en una línea celular de mamífero (Ovario de hámster chino, CHO) por el método de precipitación en fosfato cálcico. Las células transfectadas se cultivaron en un medio selectivo hasta que aparecieron las colonias. Estas colonias se agruparon y se cultivaron en medio selectivo (alfa-MEM sin nucleótidos más un 5 % de FBS dializado), con metotrexato para amplificar el DHFR de ratón y se unió a los genes FS288. Los grupos que secretaban los niveles más altos de FS288 se seleccionaron y la dilución se colocó en placas. Tras unos días, las colonias que se originaban de células únicas eran visibles. Estas colonias se transfirieron a pocillos separados de una placa multipocillo. Se determinó la cantidad de folistatina secretada por cada clon. Se seleccionó una línea celular clonada, cD15, que secretaba aproximadamente 8 µg de FS288/ml/24 horas, y se expandió a ~ 1 x 10<sup>9</sup> células. Estas células se utilizaron para inocular un biorreactor Braun de 30 litros que contenía el medio (alfa-MEM, glucosa más un 5 % de FBS) y perlas microvehículo (Cytodex 2). El volumen de trabajo del fermentador era de 20-25 litros. Las células se cultivaron en el fermentador utilizando el método "filldraw". El cultivo se retiró periódicamente y se reemplazó con medio recién preparado y perlas microvehículo. El medio de cultivo recolectado se separó de las células por filtración sin salida a través de filtros de 5, 1,2 y 0,2 µm. El filtrado final se concentró ~ 5 veces por filtración de flujo tangencial en un cartucho de ultracentrifugación con un corte de 10 kDa (AG technologies). El concentrado, que contenía folistatina secretada por las células, se almacenó congelado a -20° C.

**Ejemplo 11 Purificación de Folistatina recombinante humana 288**

Se descongeló el concentrado de medio acondicionado que contenía FS288 recombinante humana y se sometió a cromatografía en sefarosa heparina. El material se cargó en una columna de sefarosa heparina en 50 mM de tampón de fosfato Na (Tampón A), y se eluyó en un gradiente de tampón A y tampón B (tampón A + 2 M de NaCl). Las fracciones que contenían folistatina se agruparon y se concentraron utilizando una membrana YM10. El agrupamiento se cargó en una columna Sephacryl S200 HR en PBS pH 7,0. Las fracciones que contenían folistatina se agruparon y se concentraron de nuevo, y se filtraron en esterilidad a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenaron a -20° C. La concentración de folistatina en el agrupamiento final se estimó que era ~ 900 µg/ml por el ensayo de Bradford y ELISA específico para folistatina (Nigel Groome). Se estimó que la pureza era > 90 % por electroforesis en gel de poliácridamida-SDS.

**Ejemplo 12 Formulaciones y métodos de administración**

La folistatina de las mismas se administrará con o sin vehículos, adyuvantes o excipientes, pero se administrará preferentemente como una formulación farmacéutica. Para la administración parenteral, la formulación estará normalmente en solución acuosa, y puede comprender folistatina en una cantidad de desde un 0,001 % a un 5 % p/v, por ejemplo, desde un 0,01 % a un 2 % p/v de la formulación, aunque puede comprender un 5 % p/v como mucho, preferentemente no excede de un 2 % p/v, y más preferentemente desde un 0,01 % a un 1 % p/v de la formulación.

Para la administración oral, la formulación puede comprender folistatina, en una cantidad desde un 0,001 % a un 10 % por peso, por ejemplo, desde un 0,01 % a un 5 % por peso de la formulación, aunque puede comprender un 10 % por peso como mucho, preferentemente no excederá un 5 % por peso, y más preferentemente desde un 0,1 % a un 2 % por peso de la formulación.

Para la administración tópica, la formulación puede comprender folistatina en una cantidad de desde un 0,005 % a un 5 % por peso, por ejemplo, desde un 0,05 % a un 2 % por peso de la formulación, aunque comprende un 5 % por peso como mucho, preferentemente no excede un 2 % por peso, y más preferentemente desde un 0,1 % a un 1 % por peso de la formulación.

De acuerdo con la descripción de la invención se pueden preparar las composiciones farmacéuticas específicas preferidas que se proporcionan anteriormente, y se proporcionan ejemplos de las cuales posteriormente. Las siguientes formulaciones específicas se consideran como ejemplos simplemente ilustrativos de formulaciones.

**Ejemplo 12(a) Composición de crema tópica**

Se presenta a continuación una composición típica para el suministro como una crema tópica:

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| Folistatina                   | 0,1-1,0 g |
| Metil hidroxibenzoato         | 0,2 g     |
| Lanolina (Anhidra)            | 6,0 g     |
| Cera de abeja blanca          | 7,5 g     |
| Polawax GP 200                | 25,0 g    |
| Solución salina estéril hasta | 100,0 g   |

El Polawax, cera de abeja y lanolina se calientan juntas a 60° C, se añade una solución de metilhidroxibenzoato y se consigue la homogeneización utilizando agitado de alta velocidad. La temperatura se deja caer entonces por debajo de 50° C. Se añade entonces la folistatina y se dispersa concienzudamente, y la composición se deja enfriar con agitado de baja velocidad.

**Ejemplo 12(b) Composición de loción tópica**

Se presenta a continuación una composición típica para el suministro como una loción:

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| Folistatina                     | 0,1-1,0 g |
| Metil hidroxibenzoato           | 0,2 g     |
| Monolaurato sorbitan            | 1,0 g     |
| Polisorbato 20                  | 1,0 g     |
| Alcohol cetostearílico          | 1,5 g     |
| Glicerina                       | 10,0 g    |
| Solución salina isotónica hasta | 100,00 ml |

El metil hidroxibenzoato y la glicerina se disolvieron en 70 ml de solución salina isotónica a 75° C. El monolaurato de sorbitan, polisorbato 20 y alcohol cetostearílico se mezclaron juntos a 75° C y se añadió a la solución acuosa. La emulsión resultante se homogeneizó, se dejó enfriar por debajo de 50° C con agitado continuo y se añadió la

folistatina como una suspensión en el agua restante. Toda la suspensión se agitó hasta que estaba homogénea.

**Ejemplo 12(c) Composición de gotas oftálmicas**

Se presenta a continuación una típica composición para su suministro como gotas oftálmicas.

|   |                                                            |            |
|---|------------------------------------------------------------|------------|
| 5 | Folistatina                                                | 0,01-0,1 g |
|   | Metil hidroxibenzoato                                      | 0,003 g    |
|   | Propil hidroxibenzoato                                     | 0,08 g     |
|   | Solución salina isotónica purificada hasta aproximadamente | 100,00 ml  |

El metil y propil hidroxibenzoato se disolvieron en 70 ml de solución salina isotónica a 75° C, y la solución resultante se dejó enfriar hasta por debajo de 50° C. Se añadió entonces la folistatina, y la solución se esterilizó por filtración por medio de un filtro de membrana (tamaño del poro 0,22 µm), y se envasó asépticamente en envases estériles.

10 **Ejemplo 12(d) Composición para la administración por inhalación**

Para un envase de aerosol con una capacidad de 20-30 ml; se dispersó una mezcla de 10-50 mg de folistatina con un 0,5-1,0 % por peso de un agente lubricante, tal como el polisorbato 85 o ácido oleico, en un propulsor adecuado, tal como el freón, y se colocó en un envase de aerosol apropiado para la administración por inhalación intranasal u oral.

**Ejemplo 12(e) Composición para la administración parenteral**

20 Se puede preparar una composición farmacéutica de la presente invención para inyección intramuscular para que contenga 1 ml de solución salina isotónica estéril, y 0,52 mg de folistatina.

De manera similar, una composición farmacéutica para infusión intravenosa puede comprender 250 ml de solución de Ringer estéril y 15 mg de folistatina.

25 **Ejemplo 12(f) Composición en cápsulas**

Se puede preparar una composición de folistatina en forma de una cápsula llenando una cápsula de gelatina dura de dos piezas convencional con 0,5-5,0 mg de folistatina, en forma de polvo, 180 mg de lactosa, 65 mg de talco y 12 mg de estearato magnésico.

**Ejemplo 12(g) Composición parenteral inyectable**

35 Se puede preparar una composición farmacéutica de la presente invención en una forma adecuada para la administración por inyección mezclando un 0,1 % por peso de folistatina en un 12 % por volumen de propilenglicol y solución salina isotónica. La solución se esteriliza por filtración.

**Ejemplo 12(h) Composición de un ungüento**

40 Una composición típica para el suministro como un ungüento incluye de 0,1-0,5 g de folistatina, junto con parafina blanda blanca hasta 100,0 g dispersada para producir un producto suave, homogéneo.

**Ejemplo 12(i) Formulación de unción dorsal continua**

45 Una típica composición para el suministro como una formulación para unción dorsal continua, por ejemplo, para el ganado bovino, incluye un 0,05-0,1 % por peso de folistatina, como se presenta a continuación:

|                         |             |
|-------------------------|-------------|
| Folistatina             | 0,05-0,10 g |
| Hidroxitolueno butilado | 0,02 g      |
| Azul brillante FCF      | 0,16 g      |
| Goma xantano            | 0,4 g       |
| Alcohol bencílico       | 3,0 g       |

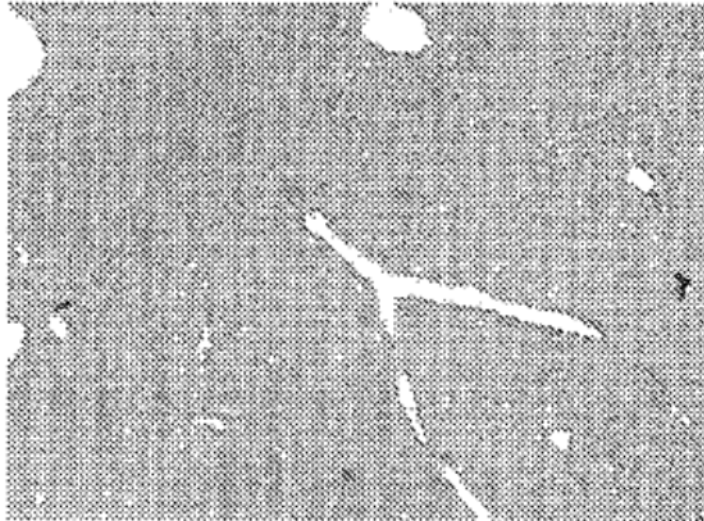
Monobutíler de dietilenglicol hasta 100 g

50 Si se desea incluir una agente activo de superficie en la formulación de forma que ayude a la dispersión de la formulación sobre la piel y/o el pelo del animal, y/o de forma que ayude a la absorción de la formulación a través de la piel, se puede incluir en la formulación un tensioactivo adecuado, preferentemente un tensioactivo aniónico tal como Ecoteric T80 (monooleato sorbitan polioxietileno (20)) con una concentración de, por ejemplo, un 20 % por peso.

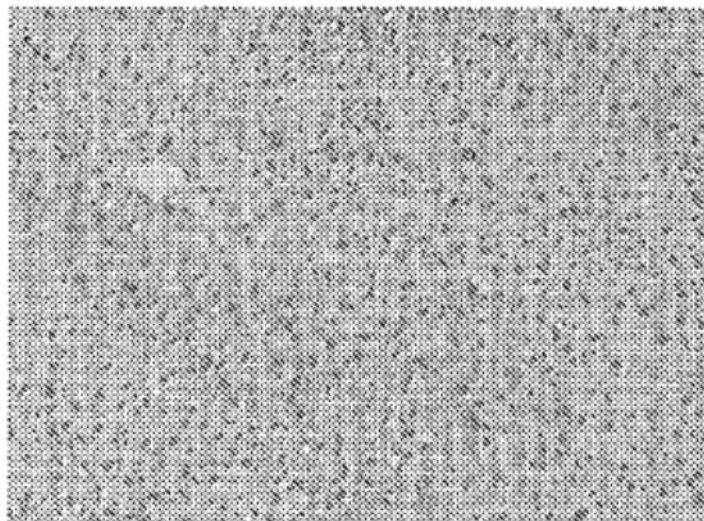
**REIVINDICACIONES**

1. Una folistatina para su uso en un método de tratamiento de una fibrosis pulmonar en un vertebrado.
- 5 2. La folistatina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar idiopática o una enfermedad pulmonar intersticial.
3. La folistatina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde  
10 la folistatina es una proteína de cadena sencilla de entre 288 y 315 aminoácidos con un peso molecular de entre aproximadamente 30.000 y 60.000 Daltons estimados por SDS-PAGE en ausencia de agentes reductores y capaz de inhibir la secreción de hormona folículoestimulante (FSH).
4. La folistatina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el  
15 vertebrado se selecciona de entre el grupo que consiste en el ser humano, un primate no humano, ratones, ganado bovino, ovejas, cabras, caballos, conejos, aves, gatos y perros.
5. Una composición farmacéutica que comprende folistatina para su uso en un método de tratamiento de una fibrosis pulmonar en un vertebrado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y que comprende  
20 opcionalmente un vehículo, un adyuvante y/o un diluyente farmacéuticamente aceptables.

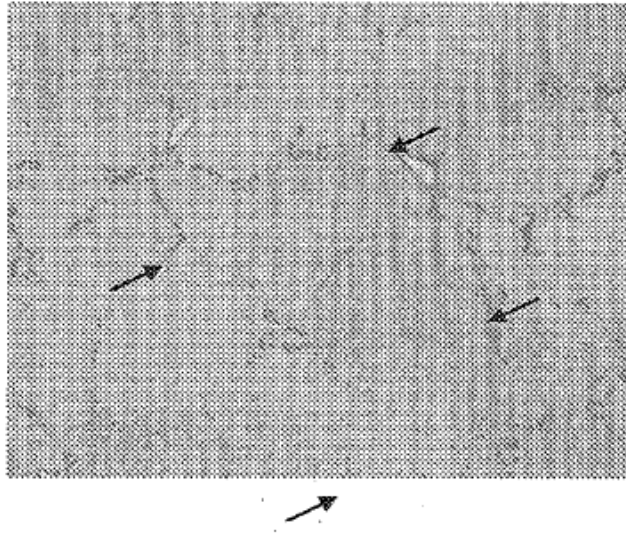
**Fig. 1A**



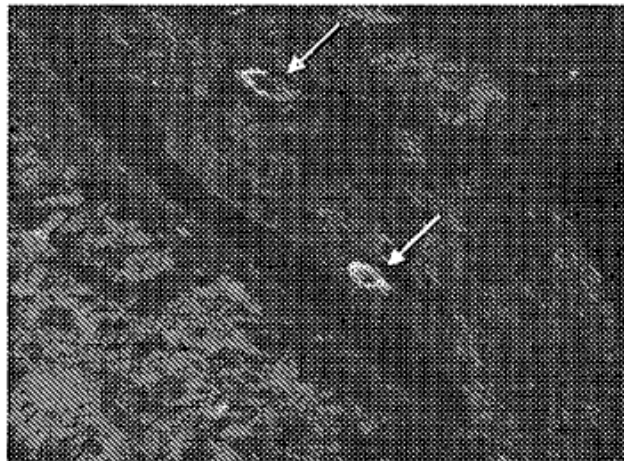
**Fig. 1B**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**



Fig. 5

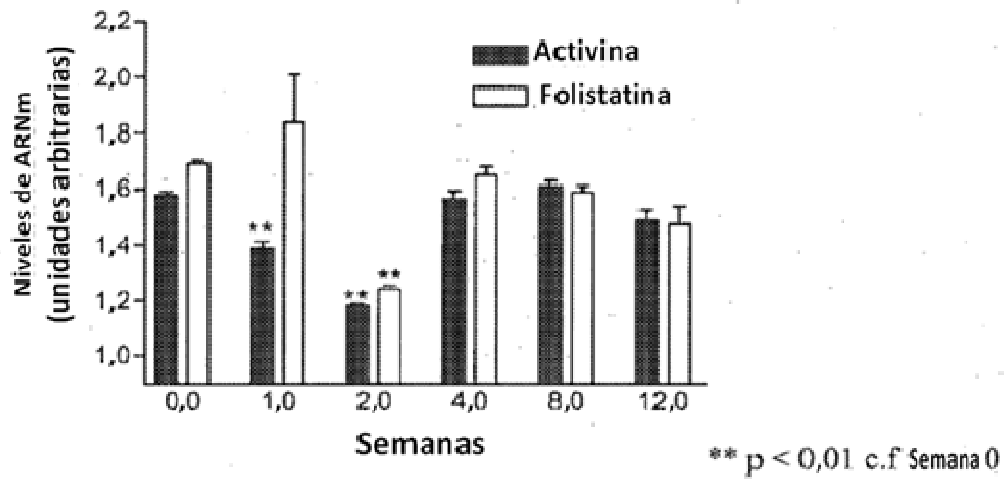
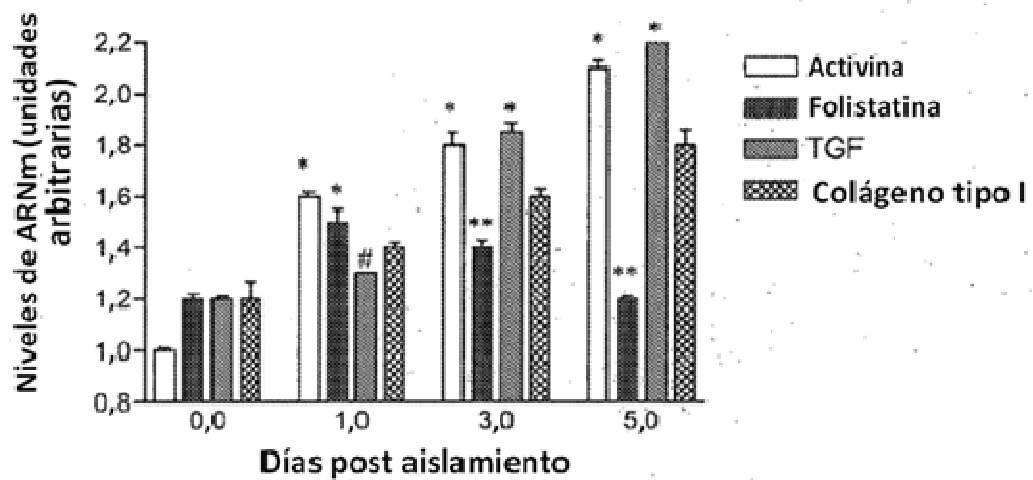


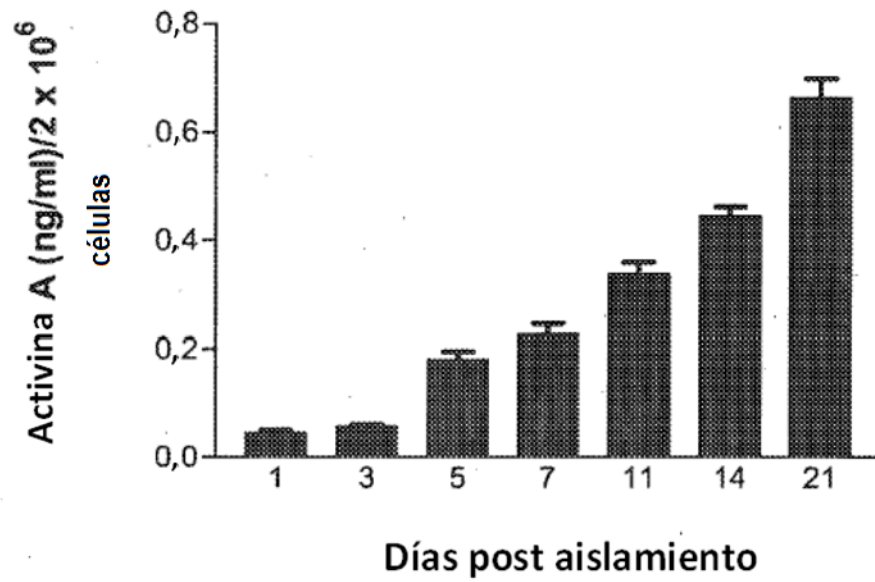
Fig. 6



\*  $p < 0,01$  cf Día 0; mismo grupo, \*\*  $p < 0,01$  Activina A vs FS en puntos de tiempo relevantes;

#  $p < 0,05$  Activina A vs TGF

**Fig. 7**



**Fig. 8**

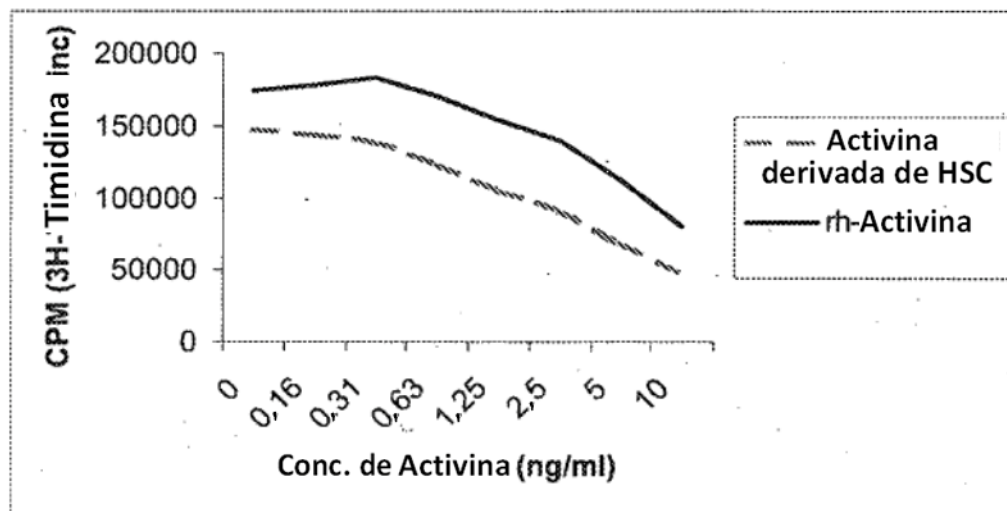


Fig. 9A

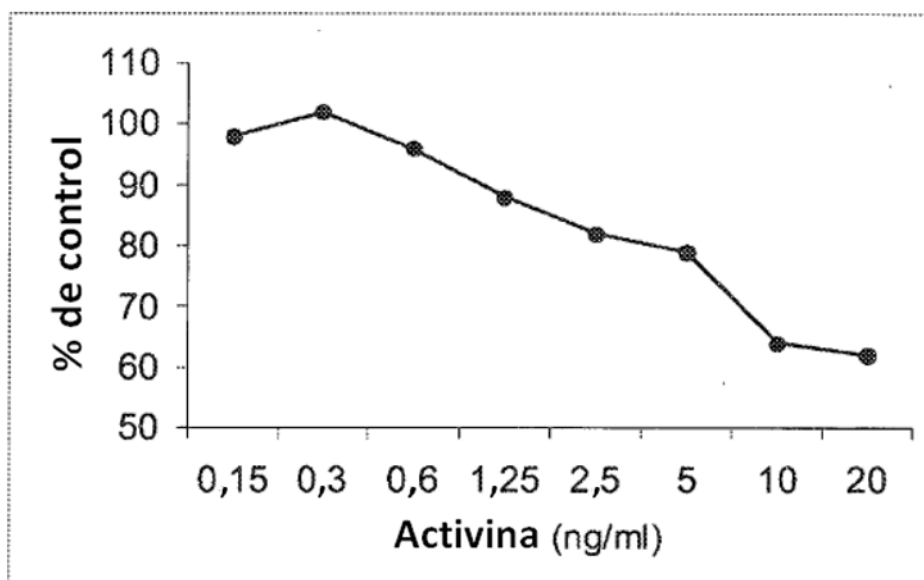


Fig. 9B

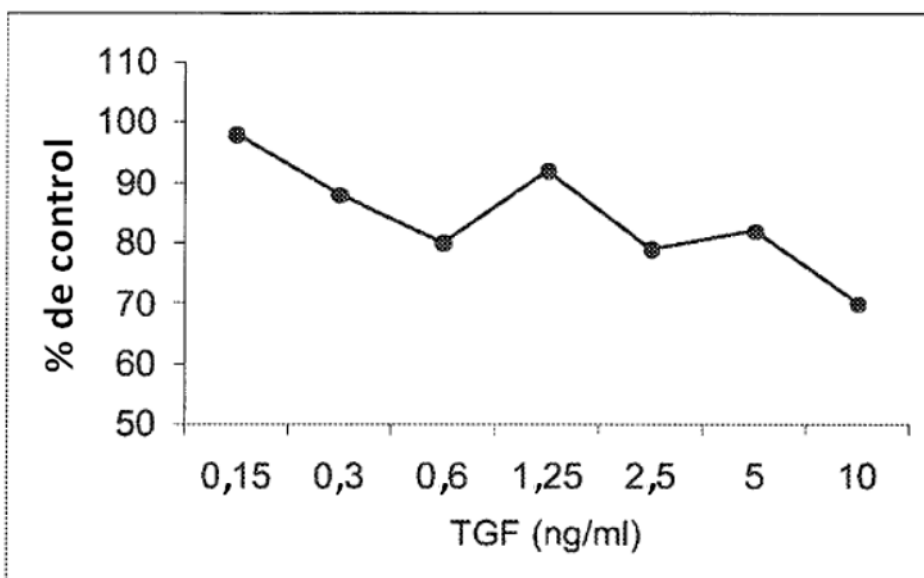


Fig. 9C

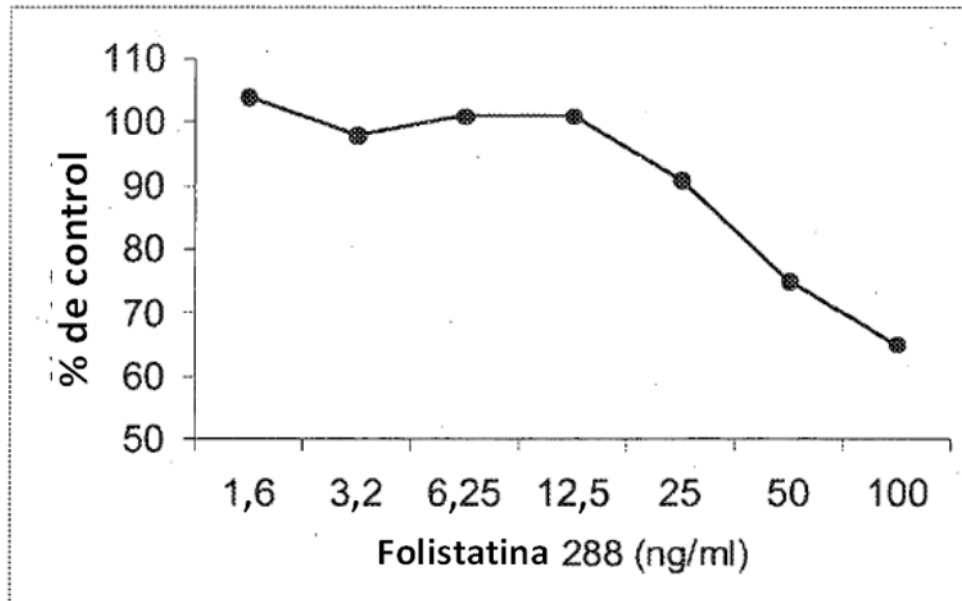
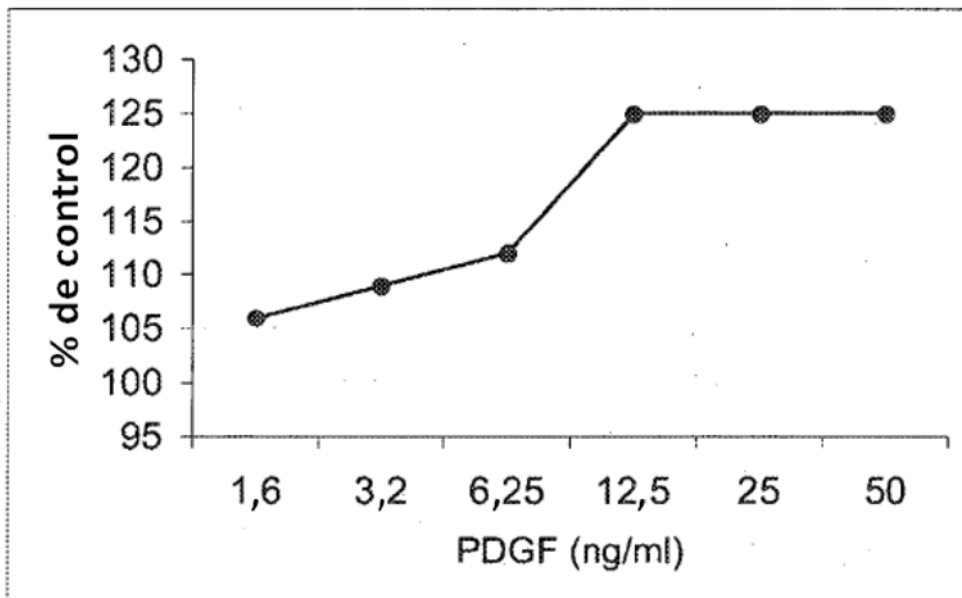
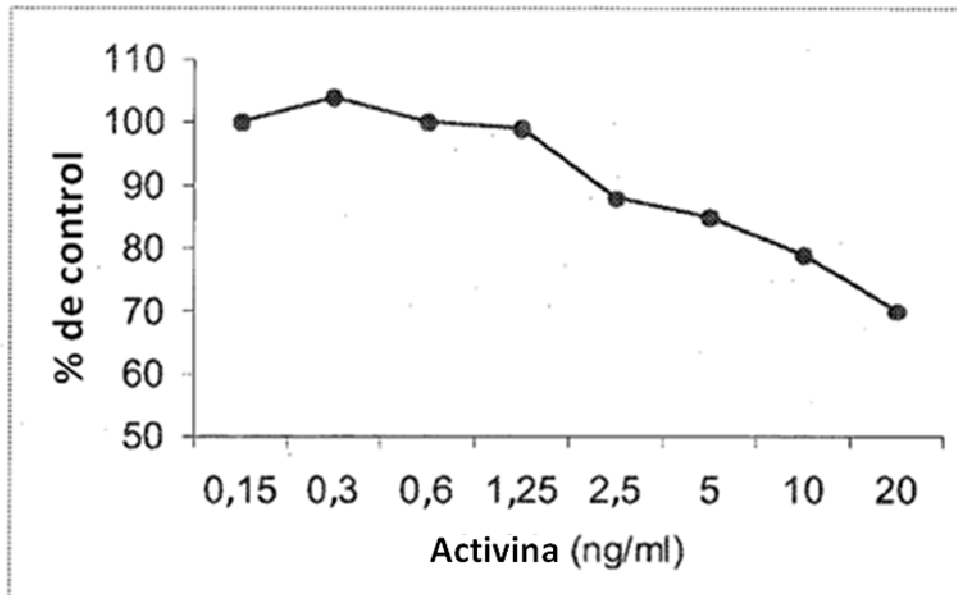


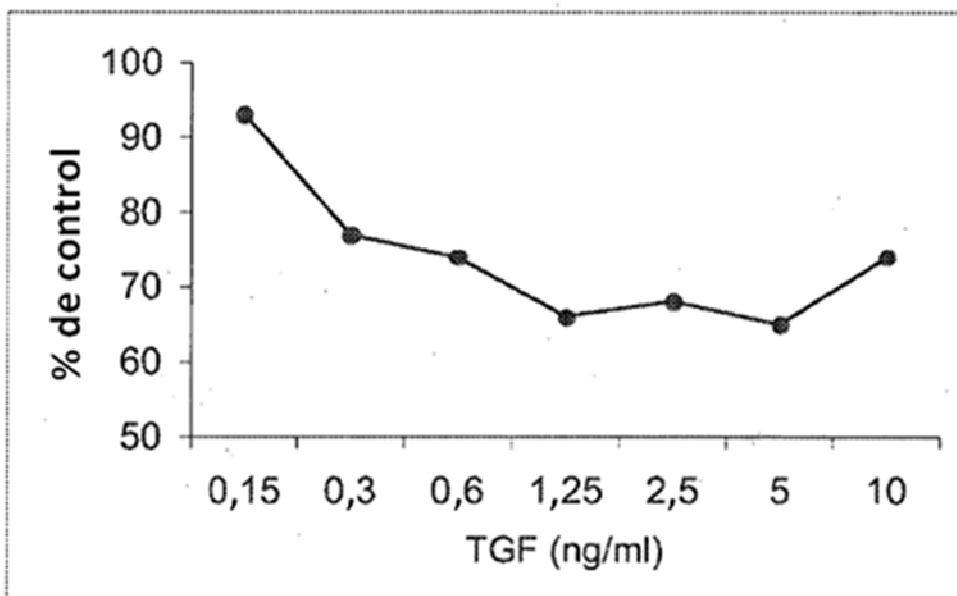
Fig. 9D



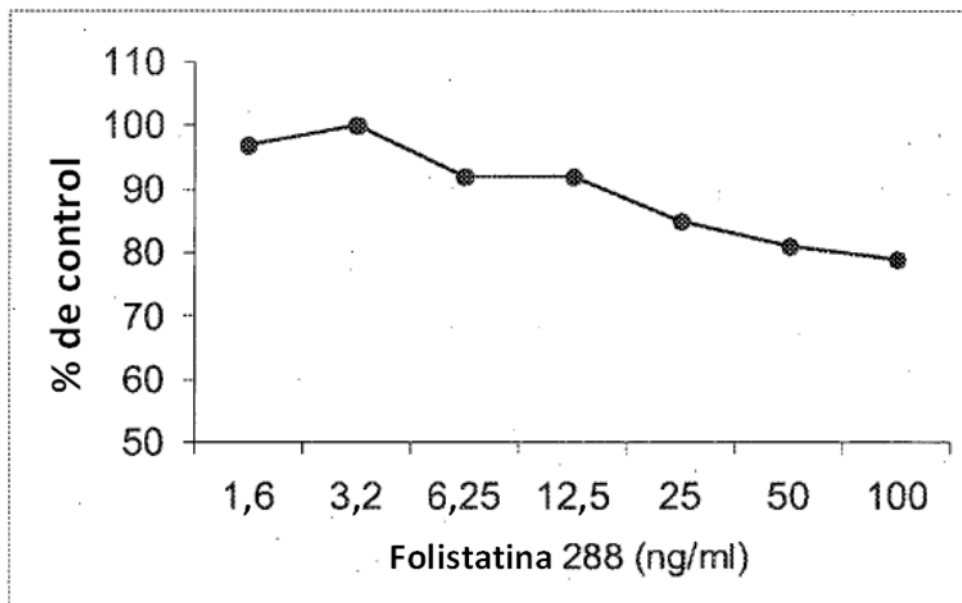
**Fig. 10A**



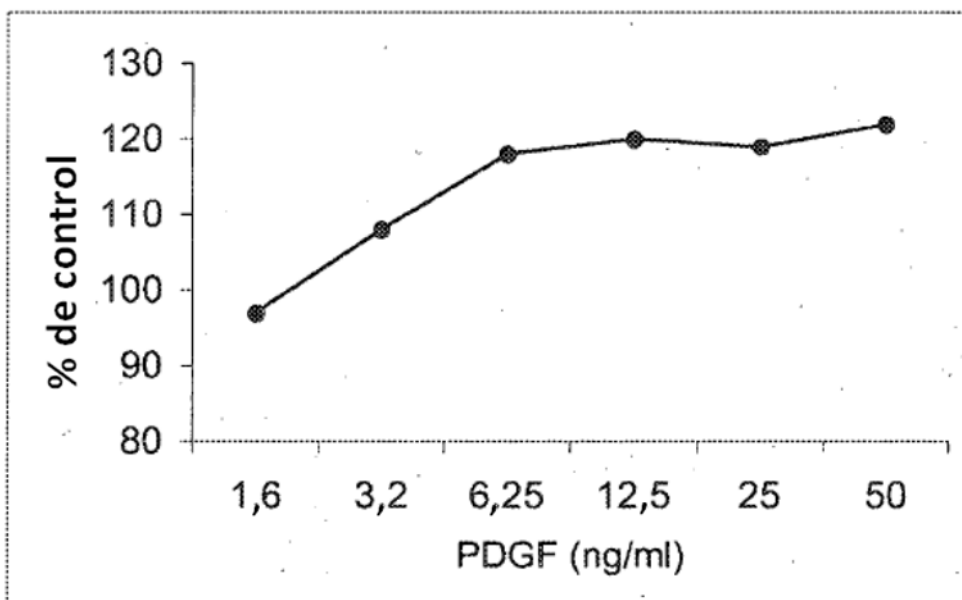
**Fig. 10B**



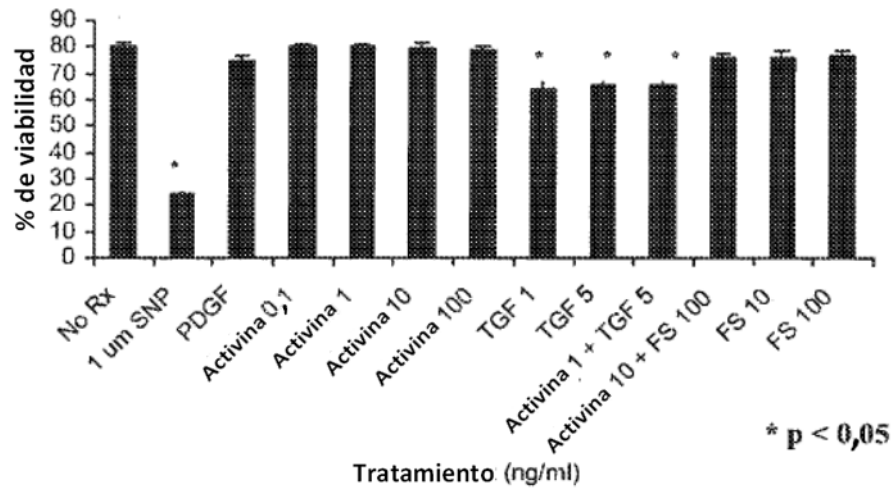
**Fig. 10C**



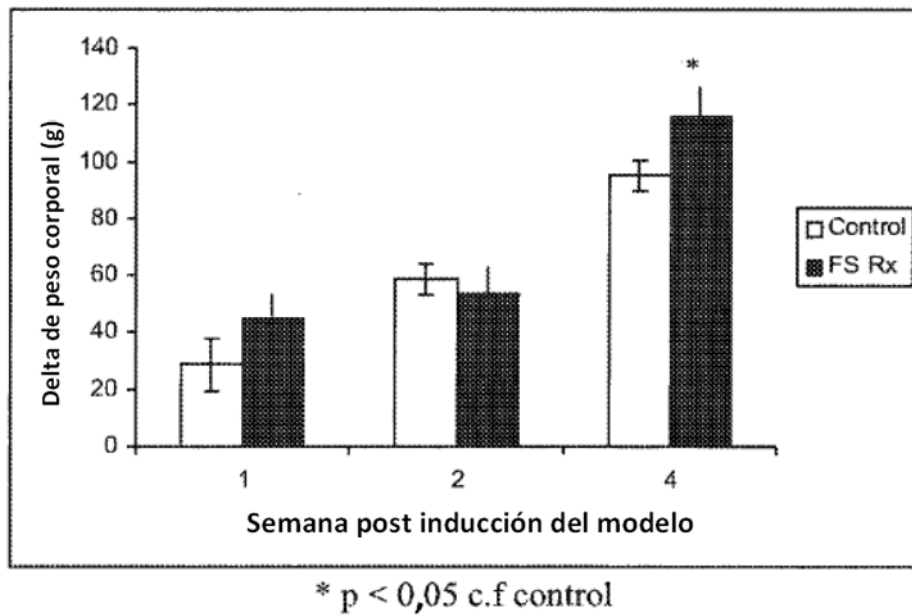
**Fig. 10D**



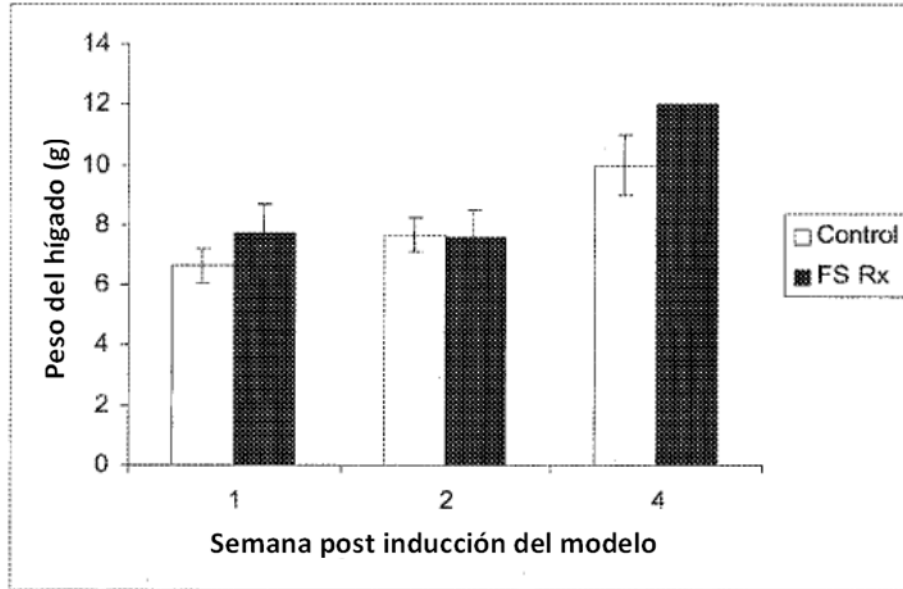
**Fig. 11**



**Fig. 12**

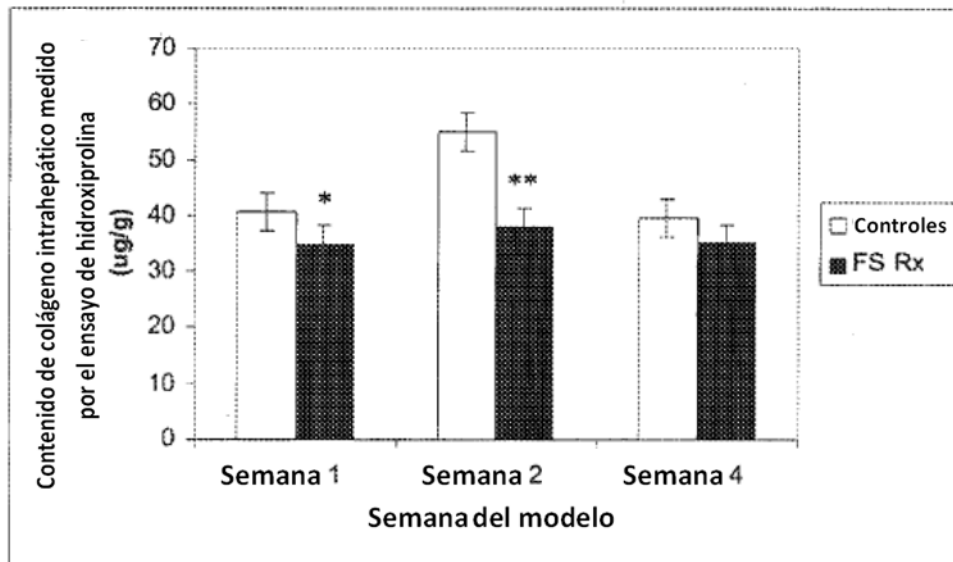


**Fig. 13**



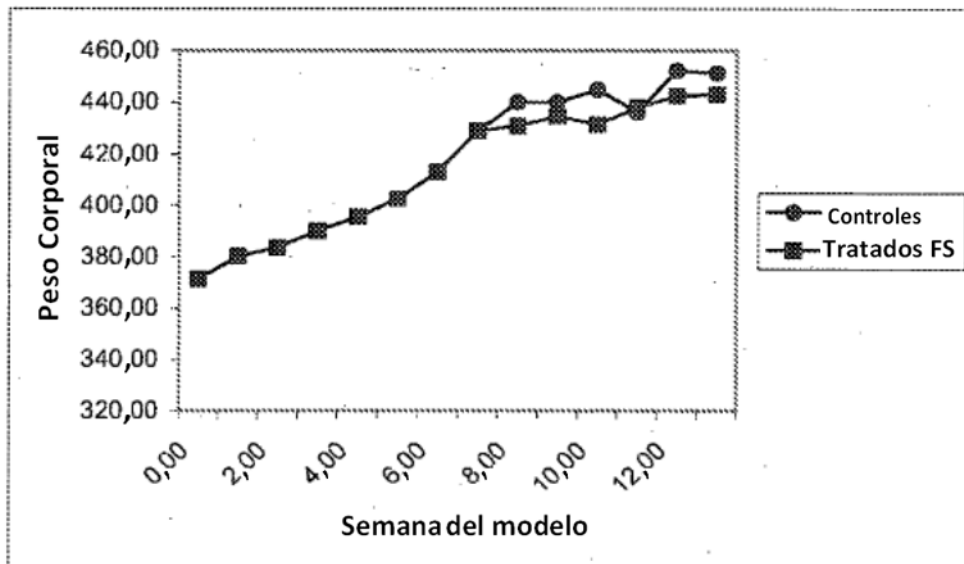
**Todos los datos no significativos**

**Fig. 14**



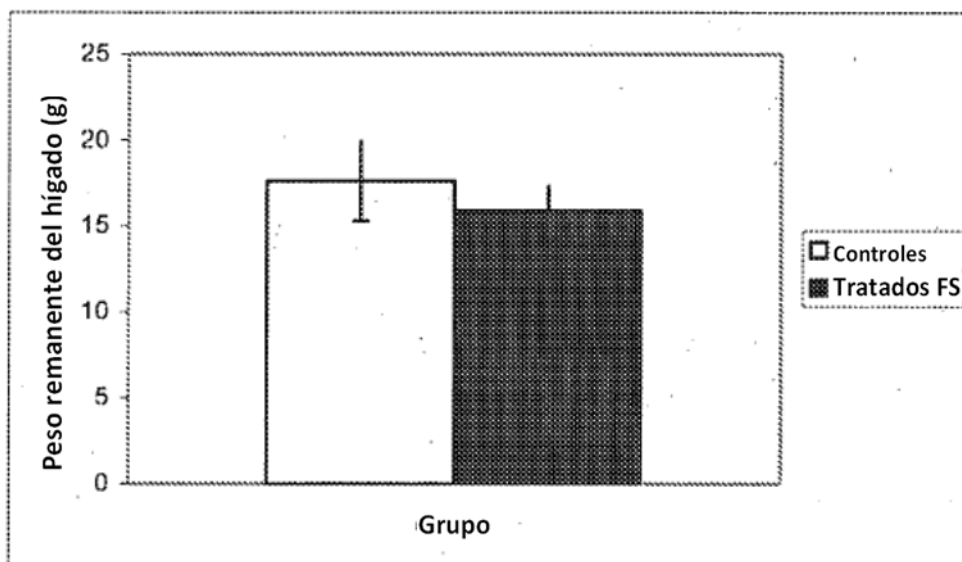
\*  $p = 0,057$ , \*\*  $p < 0,005$  cf Con controles

**Fig. 15**



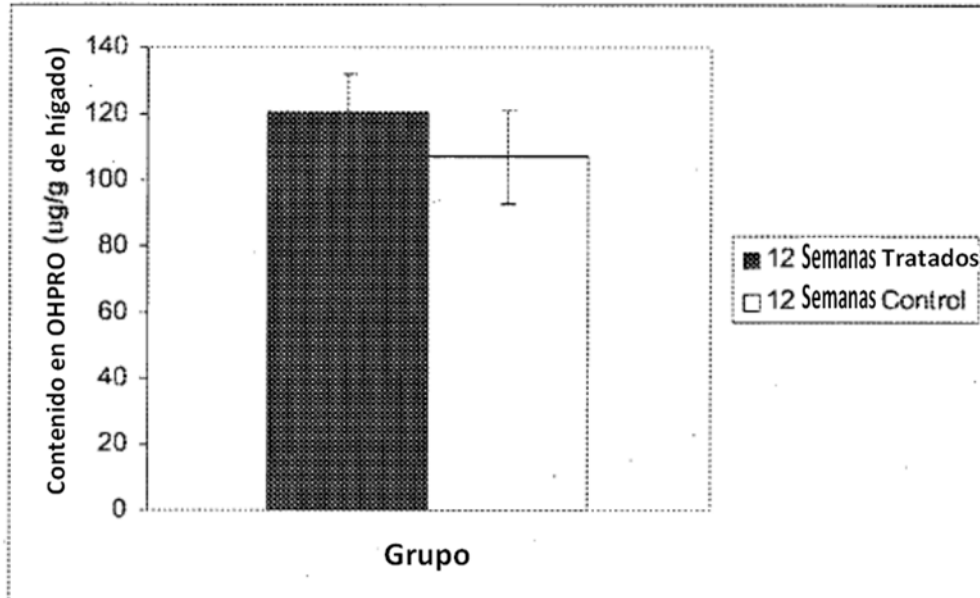
Todos los datos no significativos

**Fig. 16**



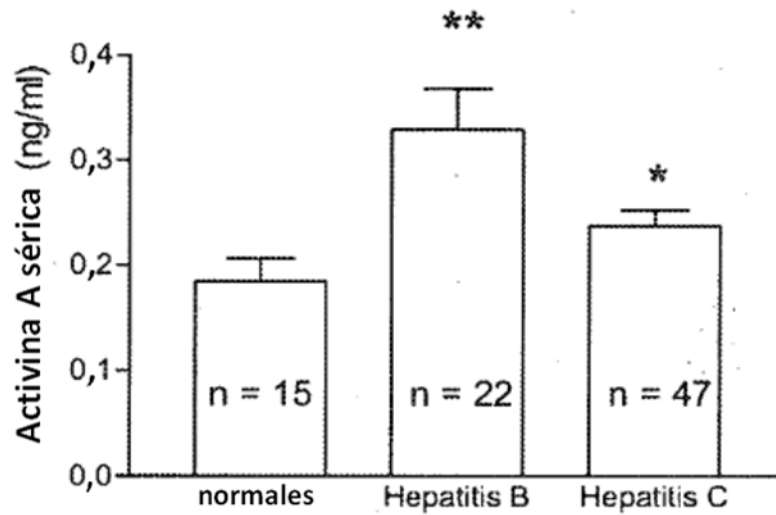
Todos los datos no significativos

**Fig. 17**



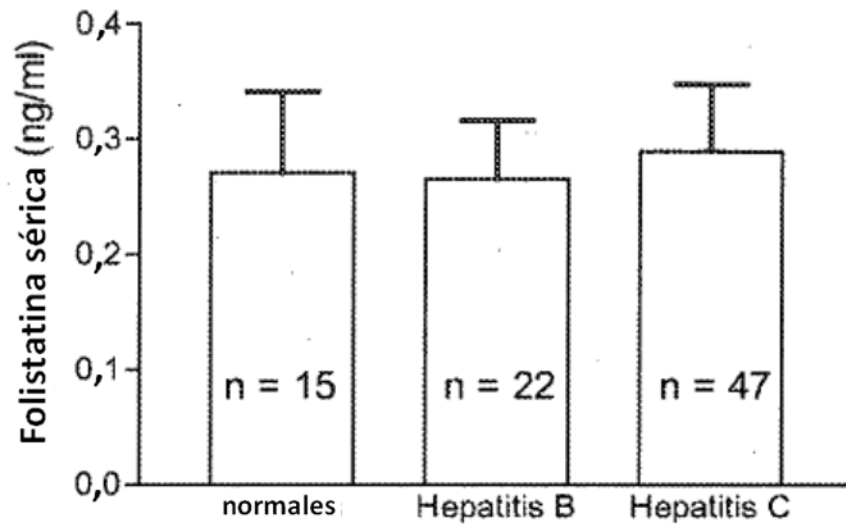
Todos los datos no significativos

**Fig. 18**



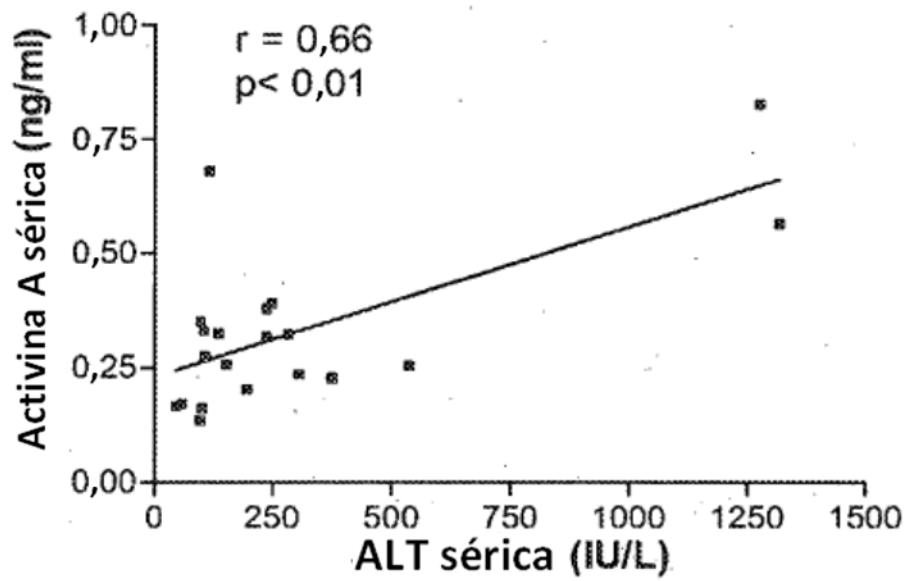
\*  $p < 0,01$  cf normales; \*\*  $p < 0,05$  cf normales y  $0,01$  cf VHC

**Fig. 19**

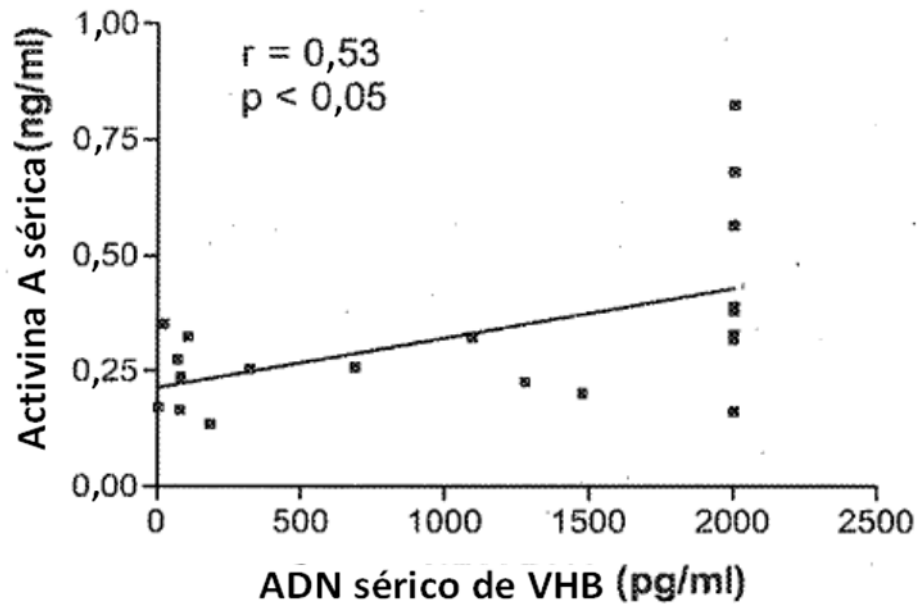


Todos los datos no significativos

**Fig. 20**



**Fig. 21**



**Fig. 22**

