

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 431**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2011 PCT/US2011/035110**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11140173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2011 E 11778233 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2566967**

54 Título: **Antagonista de cadherina-11 para el tratamiento de fibrosis**

30 Prioridad:

**04.05.2010 US 331355 P**  
**04.05.2010 US 331357 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.01.2017**

73 Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.**  
**(50.0%)**  
**75 Francis Street**  
**Boston, MA 02115, US y**  
**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF**  
**TEXAS SYSTEM (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AGARWAL, SANDEEP, K.;**  
**SCHNEIDER, DANIEL, J. y**  
**BRENNER, MICHAEL, B.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 596 431 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**

Antagonista de cadherina-11 para el tratamiento de fibrosis

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La invención proporciona un antagonista de cadherina-11 para tratar fibrosis interfiriendo con la actividad de cadherina-11, que incluye unión a cadherina-11, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 Las enfermedades pulmonares intersticiales, ahora conocidas como enfermedades pulmonares proliferativas difusas, son un espectro de enfermedad pulmonar difusa del parénquima que se caracteriza por grados variables de fibrosis pulmonar<sup>3</sup>. La fibrosis pulmonar es un componente de diversas neumonías intersticiales<sup>3</sup>. Estos trastornos se caracterizan por grados variables de inflamación, proliferación aberrante de fibroblastos y deposición de matriz extracelular que producen la distorsión de la arquitectura pulmonar que compromete la función pulmonar<sup>3,4</sup>. Hay muchas causas de fibrosis pulmonar que incluyen exposición a agentes inductores de la fibrosis tales como sílice<sup>5</sup>, polvo del carbón<sup>6</sup>, radiación<sup>7</sup> y ciertos agentes quimioterapéuticos<sup>7</sup>. A pesar de su prevalencia, la patogénesis de la fibrosis pulmonar no es completamente entendida y carece de opciones de tratamiento para la resolución de la fibrosis pulmonar.

15 Aproximadamente el 35 % de las enfermedades pulmonares intersticiales pueden agruparse en una afección conocida como fibrosis pulmonar idiopática (FPI)<sup>12</sup>. Un completo estudio epidemiológico que investiga la incidencia de FPI reveló una tasa de prevalencia general de aproximadamente 20 casos por cada 100.000<sup>12</sup>. Esta incidencia fue mayor en individuos de más de 75 años de edad en los que se indicaron 175 casos por cada 100.000. Un estudio más reciente demostró una prevalencia de aproximadamente 43 casos por cada 100.000 y una incidencia de 16,3 casos por cada 100.000 paciente-años.<sup>13</sup> Estos datos sugieren que la incidencia y la prevalencia de FPI está en aumento. La FPI es una forma crónica y particularmente devastadora de la enfermedad pulmonar intersticial. Es en gran parte no tratable y conduce a la muerte en el plazo 3 a 8 años desde el diagnóstico<sup>14</sup>. No hay tratamientos modificadores de la enfermedad eficaces para la FPI.

20 El documento WO2009/101059 describe que la cadherina-11 está regulada por incremento en la transición endotelial-mesenquimatoso, en la fase temprana y los estados tardíos de la fibrosis renal y en riñones de rechazo crónico de aloinjerto.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

30 La invención argumenta, en parte, el hallazgo inesperado de que la cadherina-11 participa en afecciones fibróticas, que incluyen fibrosis no dérmicas tales como fibrosis de pulmón (o pulmonar), y que como resultado la cadherina-11 es un marcador de diagnóstico, marcador de pronóstico y diana terapéutica para tales afecciones. Como se describe en mayor detalle en el presente documento, se encontró que la cadherina-11 se regulaba por incremento en fibrosis, y se encontró que sujetos que carecían de cadherina-11 eran menos susceptibles a fibrosis experimentalmente inducida. Por consiguiente, la divulgación proporciona composiciones y métodos de evaluación del riesgo de desarrollar fibrosis, además de diagnosticar, monitorizar y tratar fibrosis. La fibrosis puede ser, pero no se limita a, fibrosis no dérmica que incluyen fibrosis pulmonar.

35 La invención argumenta adicionalmente, en parte, otro hallazgo inesperado de que la cadherina-11 se expresa en macrófagos alveolares y células epiteliales alveolares, ambos de los cuales están presentes en lavado broncoalveolar (BAL). Por consiguiente, se encontró que la presencia de fibrosis pulmonar o el riesgo de desarrollar fibrosis pulmonar podrían determinarse analizando los niveles de cadherina-11 en muestras de BAL en vez de requerir una biopsia de tejido del pulmón. Tal análisis puede o puede no comprender identificar las células que expresan la cadherina-11.

La invención proporciona un antagonista de cadherina-11:

45 (a) en una cantidad eficaz para reducir la fibrosis para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene fibrosis; o

(b) en una cantidad eficaz para prevenir o retrasar la aparición de síntomas asociados a la fibrosis para su uso en un método de tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar fibrosis;

en el que el antagonista de cadherina-11 es un péptido de unión a cadherina-11 o un antagonista de ácido nucleico de cadherina-11.

50 En otra realización, la fibrosis es fibrosis no dérmica. En una realización, la fibrosis no dérmica es fibrosis pulmonar o fibrosis hepática. En algunas realizaciones, la fibrosis no dérmica es fibrosis pulmonar, más específicamente fibrosis pulmonar idiopática, e incluso más específicamente fibrosis pulmonar idiopática grave.

- 5 En una realización, el antagonista de cadherina-11 es un péptido de unión a cadherina-11. En una realización, el péptido de unión a cadherina-11 es un anticuerpo anti-cadherina-11 o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno. En una realización, el péptido de unión a cadherina-11 es una proteína de fusión de cadherina-11. En una realización, el péptido de unión a cadherina-11 comprende cadherina de longitud completa o un fragmento de la misma.
- 10 En una realización, el antagonista de cadherina-11 es un antagonista de ácido nucleico de cadherina-11. En una realización, el antagonista de ácido nucleico de cadherina-11 es un ARNip de cadherina-11. En una realización, el antagonista de ácido nucleico de cadherina-11 es una ribozima de cadherina-11. En una realización, el antagonista de ácido nucleico de cadherina-11 es una molécula antisentido de cadherina-11. En una realización, el antagonista de ácido nucleico de cadherina-11 es un ácido nucleico que codifica cadherina-11 de longitud completa o un fragmento de la misma. En una realización, el antagonista de ácido nucleico de cadherina-11 es un aptámero.
- 15 En una realización, el antagonista de cadherina-11 se administra por inhalación o por vía intranasal. En una realización, el antagonista de cadherina-11 se administra por vía intraperitoneal.
- 20 En una realización, el método comprende además administrar al sujeto un segundo agente terapéutico. En una realización, el segundo agente terapéutico es un inmunosupresor. En una realización, el inmunosupresor es un esteroide.
- 25 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método que comprende medir el nivel de cadherina-11 en una muestra recogida de un sujeto, y comparar el nivel de cadherina-11 en la muestra con un control normal, en el que un nivel de cadherina-11 en la muestra recogida del sujeto que es mayor que el nivel de cadherina-11 en el control normal indica fibrosis o un riesgo de desarrollar fibrosis. En una realización, la muestra es una muestra de piel o de dermis. En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un método que comprende medir el nivel de cadherina-11 en una muestra recogida de un sujeto, y comparar el nivel de cadherina-11 en la muestra con un control normal, en el que un nivel de cadherina-11 en la muestra recogida del sujeto que es mayor que el nivel de cadherina-11 en el control normal indica fibrosis no dérmica o un riesgo de desarrollar fibrosis no dérmica. En una realización, la muestra es una muestra de pulmón. En una realización, la muestra es una muestra de lavado broncoalveolar (BAL). En una realización, la muestra comprende macrófagos alveolares y/o células epiteliales alveolares. En una realización, la muestra es una muestra de hígado.
- 30 En diversos aspectos, el nivel de cadherina-11 se mide manipulando la muestra, que incluye, por ejemplo, lisar células dentro de la muestra y ensayar el contenido de tal lisado usando técnicas conocidas en la técnica.
- 35 En una realización, el nivel de cadherina-11 es un nivel de proteína de cadherina-11. En una realización, el nivel de cadherina-11 es un nivel de ARNm de cadherina-11.
- 40 En una realización, el control normal es una muestra de tejido normal o células del sujeto. En una realización, el control normal es un nivel de cadherina-11 en una población de sujetos.
- 45 En una realización, el nivel de cadherina-11 se mide usando inmunohistoquímica.
- 50 En una realización, un nivel de cadherina-11 en la muestra recogida del sujeto que es mayor que el control normal indica que el sujeto tiene fibrosis. La fibrosis pueden ser fibrosis dérmica o fibrosis no dérmica tal como fibrosis pulmonar o fibrosis hepática.
- En una realización, un nivel de cadherina-11 en la muestra recogida del sujeto que es mayor que el control normal indica que el sujeto está en riesgo de desarrollar fibrosis. La fibrosis puede ser fibrosis dérmica o fibrosis no dérmica tal como fibrosis pulmonar o fibrosis hepática.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de inhibición del desarrollo (o diferenciación) de miofibroblastos a partir de fibroblastos usando antagonistas de cadherina-11. En realizaciones importantes, la diferenciación fibroblasto a miofibroblasto está asociada al desarrollo de fibrosis. El grado de inhibición puede determinarse midiendo el número o porcentaje absoluto o relativo de miofibroblastos tras el contacto con el antagonista de cadherina-11. En algunos casos, la inhibición puede incluir retrasar (o ralentizar la cinética del) desarrollo de miofibroblastos.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de inhibición de una transición epitelial a mesenquimatosa (EMT). En realizaciones importantes, la EMT está asociada a desarrollo de fibrosis. En algunos casos, la inhibición puede incluir retrasar (o ralentizar la cinética de) EMT. Marcadores de EMT incluyen fenotipo (por ejemplo, pérdida de polaridad de las células epiteliales, separación de células entre sí, expresión de factores de crecimiento (por ejemplo, TGF-beta y wnt), expresión de factores de transcripción (por ejemplo, SNAILS, SMAD, LEF y beta-catenina nuclear), expresión de moléculas de adhesión a células (por ejemplo, E-cadherina), y similares. Estos marcadores son conocidos para aquellos expertos habituales en la materia.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Debe entenderse que las figuras no están necesariamente a escala, poniéndose en su lugar énfasis en ilustrar generalmente los diversos conceptos tratados en el presente documento.

5 FIG. 1. Se aislaron lisados de proteína de pulmones de ratones no mutantes administrados con solución salina o bleomicina por vía intratraqueal. Los pulmones se recogieron en el día 12. Los lisados de proteína se separaron sobre un gel al 10 % de acrilamida por electroforesis, luego transferencia a una membrana para transferencia Western usando anticuerpo de control de isotipo, anticuerpo anti-cadherina-11 (Invitrogen) o anticuerpo anti-GAPDH. Se usaron sinoviocitos similares a fibroblastos no mutantes y nulos para cadherina-11 como controles positivos y negativos para la expresión de cadherina-11. El pulmón de bleomicina tenía niveles de cadherina-11 elevados, pero niveles de GAPDH similares, que indica que la cadherina-11 ha aumentado durante el proceso de la fibrosis pulmonar.

15 FIG. 2. Análisis inmunohistoquímicos de pulmones de ratones no mutantes administrados con solución salina o bleomicina por vía intratraqueal. Los pulmones se recogieron en el día 12. Las secciones de pulmón de ratones administrados con bleomicina intratraqueal demostraron una importante tinción de cadherina-11 sobre las células similares a fibroblasto en las áreas que están formando focos fibróticos (tinción de rojo).

FIG. 3. Elevada expresión de cadherina-11 en biopsias de piel de pacientes con esclerodermia (n=6) con respecto a sujetos sanos de control (n=9). Se aisló ARN total de biopsias de piel y se evaluó para los niveles de col1a1 y CTGF, dos genes asociados a fibrosis, además de cadherina-11.

20 FIG. 4. Inmunotinción histológica de biopsias de piel con esclerodermia y de control sano para cadherina-11. Las biopsias de piel se tiñeron con anticuerpo anti-cadherina-11 policlonal de conejo, seguido de anticuerpo secundario conjugado con HRP. Se marcan células positivas de color marrón rojizo. (A) Ampliación con pocos aumentos de piel normal teñida con anticuerpo anti-cadherina-11. (B) Ampliación con muchos aumentos de piel normal teñida con anticuerpo anti-cadherina-11. (C) Ampliación con pocos aumentos de piel SSC teñida con anticuerpo anti-cadherina-11. (D) y (E) Ampliación con muchos aumentos de piel SSC teñida con anticuerpo anti-cadherina-11. Las secciones son representativas de 4 biopsias de control y 4 de piel SSC.

FIG. 5. Biopsias representativas de piel de ratones en el modelo de fibrosis dérmica por bleomicina teñidas con hematoxilina y eosina. (A) Ratones no mutantes inyectados con PBS (n=7 ratones), (B) ratones Cad-11 KO inyectados con PBS (n=8 ratones), (C) Ratones no mutantes inyectados con bleomicina (n=11 ratones), (D) ratones Cad-11 KO inyectados con bleomicina (n=10 ratones).

30 FIG. 6. Cuantificación del espesor dérmico (A) y fibrosis (B, contenido de colágeno como se ha determinado por el ensayo de Sircol) en el modelo de fibrosis dérmica por bleomicina. n=6 ratones no mutantes inyectados con PBS, n=8 ratones no mutantes inyectados con bleomicina, n=7 ratones Cad-11 KO inyectados con PBS, n=8 ratones Cad-11 KO inyectados con bleomicina (n=10 ratones). Los datos se dan como media, las barras de error representan el error estándar de la media. El valor de p se determinó usando la prueba de la t de Student que compara ratones no mutantes y Cad-11 KO inyectados con bleomicina.

35 FIG. 7. Los niveles de ARNm de Col1a1 y cadherina-11 en tejido del pulmón aumentan en pacientes con FPI grave. Se obtuvo tejido de pulmón del Lung Tissue Research Consortium de 8 sujetos con FPI leve y función pulmonar normal (control, azul) y 10 sujetos con FPI grave y función pulmonar anormal (FPI, rojo). Col1a1 se usó como control y aumentó en pacientes con FPI grave. Los niveles de cadherina-11 también aumentaron en pacientes con FPI grave. Los valores de p se determinaron usando la prueba de la t de Student.

FIG. 8. Inmunolocalización de la expresión de cadherina-11 en los pulmones de pacientes con FPI leve (A) y grave (B, C). Las flechas indican tinción presente en macrófagos alveolares (C) y células epiteliales alveolares hiperplásicas (B). Barras de escala = 100  $\mu$ m. Las secciones presentadas son representativas de n = 10 (FPI leve) y n = 10 (FPI grave).

45 FIG. 9. Inmunolocalización de la expresión de cadherina-11 en los pulmones de ratones no mutantes administrados por vía intratraqueal con solución salina o bleomicina. Las flechas indican la tinción presente en células epiteliales alveolares hiperplásicas. Barras de escala = 50  $\mu$ m. Las secciones presentadas son representativas de n = 12 (solución salina) y n = 20 (bleomicina).

50 FIG. 10. Histopatología dependiente de cadherina-11 en fibrosis pulmonar. Secciones histológicas de pulmón de ratones no mutantes y Cdh11<sup>-/-</sup> en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Se tomaron los pulmones de ratones 21 días después de la instilación de 3,5 U de bleomicina y se procesaron por seccionamiento y tinción con H&E. (A) Ratones no mutantes administrados con solución salina intratraqueal (n=6), (B) ratones Cdh11<sup>-/-</sup> administrados con solución salina intratraqueal (n=6), (C) ratones no mutantes administrados con bleomicina intratraqueal (n=13), (D) ratones Cdh11<sup>-/-</sup> administrados con solución salina intratraqueal (n=11). Barras de escala = 500  $\mu$ m. Las secciones son representativas de n = 6 WT solución salina, n = 6 Cdh11<sup>-/-</sup> solución salina, n = 13 WT bleomicina, n = 11 Cdh11<sup>-/-</sup> bleomicina.

FIG. 11. Histopatología dependiente de cadherina-11 en fibrosis pulmonar. Secciones histológicas de pulmón de ratones no mutantes y *Cdh11*<sup>-/-</sup> en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Se tomaron los pulmones de ratones 21 días después de la instilación de 3,5 U de bleomicina y se procesaron por seccionamiento y tinción con tricromo de Masson (A, B) o análisis IHC para alfa actina de músculo liso, un marcador para miofibroblastos (C, D). Barras de escala = 200  $\mu$ m. Las secciones son representativas de n = 13 WT bleomicina, n = 11 *Cdh11*<sup>-/-</sup> bleomicina.

FIG. 12. Criterios de valoración fibróticos cuantificables asociados a la eliminación genética de *Cdh11*. La fibrosis se cuantificó por determinación de (A) colágeno en BAL mediante ensayo colorimétrico y (B) puntuación de Ashcroft en secciones de pulmón teñidas con H&E. Las puntuaciones se determinaron en 20 imágenes por pulmón de ratón. n = 6 WT solución salina, n = 6 *Cdh11*<sup>-/-</sup> solución salina, n = 13 WT bleomicina, n = 11 *Cdh11*<sup>-/-</sup> bleomicina. \*P  $\leq$  0,05 frente a WT solución salina; #P  $\leq$  0,05 frente a WT bleomicina.

FIG. 13. Los anticuerpos bloqueantes de cadherina-11 mejoran la fibrosis pulmonar establecida. Se observó mejora histopatológica en fibrosis pulmonar inducida por bleomicina asociada a la administración sistémica de anticuerpos bloqueantes de cadherina-11 (23C6 o 13C2) en comparación con el control de isotipo. Los ratones recibieron anticuerpo cada dos días empezando 10 días después de la exposición a bleomicina. Entonces se tomaron los pulmones en el día 21 y se procesaron por seccionamiento y tinción con H&E. Barras de escala = 500  $\mu$ m. Las secciones son representativas de n = 6 solución salina, n = 7 Bleo + isotipo, n = 8 Bleo + 13C2 y n = 6 Bleo + 23C6.

FIG. 14. El anticuerpo bloqueante de cadherina-11 reduce el colágeno del pulmón y los miofibroblastos. Se procesaron los pulmones de ratón administrados con bleomicina más anticuerpo sistémico y se tñeron para (A) deposición de colágeno (tinción con tricromo de Masson) y (B) miofibroblastos (inmunohistoquímica de  $\alpha$ -SMA). Barras de escala = 200  $\mu$ m. (C) Colágeno soluble en líquido BAL cuantificado con ensayo colorimétrico. n = 6 solución salina, n = 7 Bleo + isotipo, n = 8 Bleo + 13C2 y n = 6 Bleo + 23C6. \*P  $\leq$  0,05 frente a solución salina; #P  $\leq$  0,05 frente a bleomicina + isotipo.

FIG. 15. EMT inducida por TGF- $\beta$  y expresión de *Cdh11* en células epiteliales de pulmón A549. Las células epiteliales de pulmón A549 se estimularon con TGF- $\beta$  (10 ng/ml) y a las 24 horas, se aisló ARN y se determinó el cambio en veces de los transcritos (frente a BSA) para (A) E-cadherina, (B) N-cadherina, (C)  $\alpha$ 1-pro-colágeno y (D) cadherina-11. \*P < 0,05 frente a BSA. \*\*P = 0,06 frente a BSA. Datos representativos de 3 experimentos separados.

FIG. 16. La inactivación de *Cdh11* previene la EMT inducida por TGF- $\beta$  de células epiteliales de pulmón. Se transfectaron células epiteliales de pulmón A549 con *Cdh11* o ARNip de control, posteriormente se estimularon con TGF- $\beta$  y a las 24 horas se aisló ARN y se determinó el cambio en veces de los transcritos (frente a BSA + ARNip de control) para (A) E-cadherina, (B) N-cadherina, (C)  $\alpha$ 1-pro-colágeno y (D) cadherina-11. Datos representativos de 3 experimentos separados.

FIG. 17. La inactivación de *Cdh11* previene la transición inducida por TGF- $\beta$  a morfología mesenquimatosas en células epiteliales de pulmón. Se transfectaron células epiteliales de pulmón A549 con *Cdh11* o ARNip de control y posteriormente se estimularon con TGF- $\beta$ . A las 24 horas, se evaluó la morfología celular usando microscopía de contraste de fases.

FIG. 18. La inactivación de *Cdh11* previene la regulación por incremento de SNAIL2 inducida por TGF- $\beta$  en células epiteliales de pulmón. Se transfectaron células epiteliales de pulmón A549 con *Cdh11* o ARNip de control, posteriormente se estimularon con TGF- $\beta$  y a las 24 horas se aisló ARN y se determinó el cambio en veces de los transcritos (frente a BSA + ARNip de control) para SNAIL2, un factor de transcripción de EMT. Datos representativos de 3 experimentos separados.

FIG. 19. Secuencia de nucleótidos de cadherina-11 humana (SEQ ID NO: 1).

FIG. 20. Secuencia de aminoácidos de cadherina-11 humana (SEQ ID NO: 2).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se basa, en parte, en el hallazgo inesperado de que la cadherina-11 está regulada por incremento en fibrosis que incluye fibrosis no dérmica tal como fibrosis de pulmón o pulmonar, y que la ausencia de cadherina-11 proporciona alguna resistencia a fibrosis experimentalmente inducida que incluye fibrosis no dérmica tal como fibrosis de pulmón o pulmonar. Basándose en estos hallazgos, la invención contempla y proporciona un antagonista de cadherina-11 para su uso en un método de tratamiento de fibrosis como se define en las reivindicaciones adjuntas. Los ejemplos adjuntos demuestran, entre otras cosas, que el tejido del pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática grave y el tejido de piel de pacientes humanos que tienen esclerodermia tienen elevados niveles de cadherina-11, y que los ratones que tienen fibrosis de pulmón y/o dérmica experimentalmente inducida también tienen elevados niveles de cadherina-11 en tejidos respectivos. Lo más sorprendente, los ratones que carecen de cadherina-11 (es decir, ratones inactivados en cadherina-11) tienen fibrosis de tejido reducida en este mismo modelo experimental. Los ejemplos muestran adicionalmente que los antagonistas de cadherina-11, tales como los anticuerpos anti-cadherina-11, son eficaces en el tratamiento de (por ejemplo, reducción de) fibrosis incluso después de establecerse. Estos datos son la primera evidencia de que, entre otras cosas, la cadherina-11 no solo es un

mediador clave de la fibrosis, sino también una diana terapéutica en el tratamiento de la fibrosis, que incluye fibrosis de pulmón/pulmonar.

*Fibrosis:*

5 Fibrosis se refiere al desarrollo de tejido conjuntivo fibroso en exceso en un órgano o tejido. Es una manifestación subyacente de muchos estados de enfermedad. La fibrosis puede producirse en una variedad de tejidos u órganos. Estas afecciones fibróticas incluyen fibrosis dérmica (por ejemplo, asociada a esclerodermia). La fibrosis dérmica es fibrosis que se manifiesta ella misma en la piel (o dermis). Las afecciones fibróticas también incluyen cicatrices hipertróficas, queloides, quemaduras, enfermedad de Peyronie y contracturas de Dupuytren.

10 Las afecciones fibróticas también incluyen fibrosis no dérmica. La fibrosis no dérmica es fibrosis que se manifiesta ella misma en un órgano distinto de la piel (o dermis). Como ejemplo importante de la fibrosis no dérmica es la fibrosis de pulmón (o pulmonar). La fibrosis pulmonar puede asociarse a enfermedad pulmonar intersticial y enfermedad pulmonar proliferativa difusa. Un ejemplo de la fibrosis pulmonar es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), que incluye FPI con restricción de las vías respiratorias grave (denominada en el presente documento FPI grave).

15 Otros ejemplos de fibrosis no dérmica incluyen fibrosis del hígado/hepática, fibrosis ocular, fibrosis del intestino, fibrosis de riñón/renal, fibrosis pancreática, fibrosis vascular, fibrosis cardíaca, mielofibrosis, y similares.

Algunas formas de fibrosis se denominan fibrosis intersticial, e incluyen fibrosis intersticial dérmica o no dérmica.

20 La fibrosis puede clasificarse adicionalmente por su etiología, hasta el punto que tal etiología sea conocida. Por ejemplo, la fibrosis puede asociarse a o resultar de una infección (por ejemplo, una infección viral o una infección parasítica), o puede ser fibrosis inducida por fármaco (por ejemplo, quimioterapia), o puede asociarse a o resultar del abuso de sustancias (por ejemplo, fibrosis inducida por el alcohol), o puede asociarse a o resultar de cirugía u otro procedimiento invasivo, o puede asociarse a o resultar de una afección subyacente o acontecimiento (por ejemplo, un infarto de miocardio o diabetes), o puede asociarse a o resultar de exposición a radiación (por ejemplo, tratamiento de radiación para el cáncer). Ejemplos incluyen fibrosis del hígado/hepática asociada al consumo de alcohol, hepatitis viral y/o esquistosomiasis; fibrosis cardíaca después de infarto de miocardio; fibrosis de riñón/renal asociada a diabetes; y fibrosis de riñón/renal post-inflamatoria.

30 La fibrosis puede ser inducida por trasplante, o puede producirse independientemente del trasplante (es decir, en un sujeto que no se ha sometido a un trasplante y que no está en necesidad de un trasplante). En algunas realizaciones de la invención, el sujeto no se ha sometido a un trasplante de riñón (o renal) ni el sujeto está en necesidad de un trasplante tal. En otras realizaciones más, el sujeto no se ha sometido a un trasplante de corazón ni el sujeto está en necesidad de un trasplante tal. En otras realizaciones más, el sujeto no tiene y/o no está en un riesgo elevado de desarrollar un trastorno inflamatorio de las articulaciones tal como artritis reumatoide. En otras realizaciones más, los sujetos no tienen un cáncer y/o no tienen un riesgo elevado de desarrollar cáncer.

35 Diversos aspectos de la divulgación pretenden detectar (por ejemplo, diagnosticar), y/o monitorizar, y/o tratar (incluyendo prevenir) la fibrosis en cualquier sujeto que tenga o sea susceptible a tener fibrosis. Los sujetos pueden ser sujetos humanos y no humanos. Los sujetos no humanos incluyen, pero no se limitan a, animales de compañía (por ejemplo, perros y gatos), animales agrícolas o de competición (por ejemplo, vacas, caballos, etc.).

40 Debe entenderse que la divulgación contempla métodos de detección de la fibrosis, basándose en la presencia de niveles anormalmente elevados de cadherina-11 en células, órganos o tejidos. Las células, órganos o tejidos que van a analizarse dependerán en parte del tipo de fibrosis que se sospecha que existe o que se desarrolla o que se sabe que existe. Por ejemplo, las células, órganos o tejidos pueden ser tejido de piel o células de piel, que incluyen fibroblastos o células similares a fibroblasto residentes en el tejido de piel. Como otro ejemplo, las células, órganos o tejidos pueden ser tejido de pulmón o células tales como macrófagos alveolares y células epiteliales alveolares. Estos últimos tipos de células pueden obtenerse en el lavado broncoalveolar. Tales métodos pueden ser diagnósticos en la naturaleza (es decir, pueden indicar, solos o junto con otros síntomas o manifestaciones, que el sujeto tiene fibrosis) o pueden ser pronósticos en la naturaleza (es decir, pueden indicar, solos o con información de la historia del paciente, que es probable que el sujeto desarrolle fibrosis). La divulgación contempla adicionalmente tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar fibrosis administrando a tal sujeto un antagonista de cadherina-11, como se describe en mayor detalle en el presente documento.

*Cadherina-11:*

50 La cadherina-11 es una cadherina de tipo II clásica. Comprende un dominio intracelular corto, un dominio transmembranario y un dominio extracelular. El dominio extracelular comprende 5 subdominios (algunas veces denominados ellos mismos dominios), cada uno de los cuales consiste en aproximadamente 110 aminoácidos. Los genes de cadherina-11 humana y de ratón han sido aislados y secuenciados previamente (Suzuki S. et al. Cell Reg 2:261-70, 1991). Véase, por tanto, N° de acceso de GenBank NM\_001797, para el ADNc de cadherina-11 humana y secuencias de aminoácidos predichas (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2), respectivamente. La cadherina-11 también se denomina OB-cadherina, cadherina de osteoblasto, OSF-4 y CDH11.

La principal función de las cadherinas es facilitar la adhesión de una célula a otra célula, algunas veces similar. Las cadherinas participan en el contacto célula a célula y la invasión celular durante la embriogénesis. En el tejido post-natal, sirven para mantener el contacto célula a célula en estructuras epiteliales. Las cadherinas probablemente tienen otras funciones más allá de la adhesión célula a célula. Por ejemplo, como se describe en los ejemplos, la cadherina-11 participa en la transición epitelial a mesenquimatososa (EMT) durante el desarrollo de la fibrosis. Por tanto, como se muestra en los ejemplos, la cadherina-11 participa en la diferenciación de miofibroblastos de fibroblastos.

*Antagonistas de cadherina-11:*

Como se usa en el presente documento, el término antagonista se refiere a cualquier proteína, polipéptido, péptido, peptidomimético, glucoproteína, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, hidrato de carbono, ácido nucleico, molécula orgánica, molécula inorgánica, molécula grande o molécula pequeña que bloquee, inhiba, reduzca o neutralice la función, actividad y/o expresión de otra molécula. Como se usa en el presente documento, un antagonista de cadherina-11 es un agente que bloquee, inhibe, reduce o neutraliza la función, actividad y/o expresión de la cadherina-11. Como se ha descrito anteriormente, la cadherina-11 participa en la unión, interacción y/o migración de células. La cadherina-11 es conocida por unirse a sí misma en lo que se denomina la unión homófila u homotípica. Los antagonistas de cadherina-11 pueden interferir con la unión homotípica o unión heterotípica a cadherina-11 (es decir, la unión de cadherina-11 a un contra-receptor que no es cadherina-11). El antagonista de cadherina-11 puede interferir con la función de la cadherina-11 reduciendo la cantidad de cadherina-11 que se expresa por una célula o interaccionando con cadherina-11 (o su contra-receptor), previniendo así la interacción de la cadherina-11 con su diana. Por consiguiente, el antagonista de cadherina-11 puede interferir, por completo o en parte, con la transcripción de la cadherina-11 o con la traducción de la cadherina-11 (interfiriendo así con la expresión de la cadherina-11), o puede interferir con la capacidad de la cadherina-11 para unirse a otra cadherina-11 o a otro contra-receptor de cadherina-11. El antagonista de cadherina-11 puede reducir la función o actividad de cadherina-11 aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 100 %, con respecto a un control tal como PBS. Se entenderá que el antagonista de cadherina-11 puede usarse en una cantidad que reduce la función o actividad de la cadherina-11 aproximadamente estas cantidades. Se entenderá adicionalmente que algunos antagonistas de cadherina-11 se usan preferentemente *in vitro*, mientras que otros son más adecuados para los métodos *in vivo* proporcionados en el presente documento.

Algunos antagonistas de cadherina-11 se unen al dominio extracelular de cadherina-11, algunos se unen a regiones particulares del dominio extracelular de cadherina-11. Como se ha tratado en el presente documento, el dominio extracelular de cadherina-11 comprende cinco (5) subdominios, cada uno de aproximadamente 110 aminoácidos de tamaño (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 7589074 y Yagi et al. Genes and Development, 14:1169-1180, 2000.) La invención contempla el uso de antagonistas de cadherina-11 que se unen a EC1 de cadherina-11 o a un fragmento de EC1 de cadherina-11 (por ejemplo, un fragmento que comprende aproximadamente los primeros 33 a los primeros 37 aminoácidos de EC1), o a un fragmento de cadherina-11 que comprende EC1 (o los primeros 33-37 aminoácidos de EC1). En algunas realizaciones, el antagonista se une a una región de EC1 que tiene una secuencia de aminoácidos de GWVWN QFFVI EEYTG PDPVL VGRLH SDIDS GDGN (SEQ ID NO: 3, los primeros 34 aminoácidos de EC1). Alternativamente o adicionalmente, el antagonista puede comprender algo o toda de esta secuencia de aminoácidos.

El antagonista de cadherina-11 puede ser un péptido o proteína, o puede ser un ácido nucleico, o puede ser una molécula pequeña orgánica o inorgánica. Los antagonistas pueden existir de forma natural o no existir de forma natural. Pueden aislarse de una fuente que existe de forma natural o pueden sintetizarse *in vitro*.

Los antagonistas de cadherina-11 pueden conjugarse con otro agente tal como un agente de obtención de imágenes o un agente citotóxico. Los agentes de obtención de imágenes pueden usarse para visualizar la expresión de cadherina-11 *in vitro* (por ejemplo, para análisis inmunohistoquímico) o *in vivo* (por ejemplo, para la obtención de imágenes del cuerpo). Ejemplos incluyen radionúclidos, agentes de contraste y partículas rutinariamente usadas en la obtención de imágenes médicas. Los agentes citotóxicos son agentes que son tóxicos para las células. Ejemplos incluyen agentes quimioterapéuticos, toxinas, y similares. El uso de estos agentes conjugados con un antagonista de cadherina-11 dirigirá tales agentes a tejido fibrótico y células. En estos casos, puede proporcionarse beneficio terapéutico por una combinación del antagonista de cadherina-11 que interfiere con la capacidad de la cadherina-11 para unirse a un contra-receptor y el agente citotóxico que es directamente tóxico para las células.

*Péptidos de unión a cadherina-11:*

Los antagonistas de cadherina-11 que son péptido o proteína en la naturaleza incluyen (1) una proteína cadherina-11 de longitud completa, (2) un fragmento de la proteína de longitud completa, en el que el fragmento comprende el dominio transmembranario de cadherina-11 o un fragmento del dominio extracelular que incluye, por ejemplo, un fragmento que comprende o que consiste en EC1 (por ejemplo, un fragmento que comprende EC1, un fragmento que comprende EC1 y EC2, un fragmento que comprende EC1-EC3, un fragmento que comprende EC1-EC4, un fragmento que comprende EC1-EC5, un fragmento que comprende EC1 y EC3, un fragmento que comprende EC1 y EC4, un fragmento que comprende EC1 y EC5), (3) un fragmento de la proteína de longitud completa, en el que el fragmento comprende uno o más de subdominios extracelulares de la cadherina-11 (por ejemplo, EC1, EC2, EC3,

EC4, o EC5 de los 5 subdominios extracelulares de la cadherina-11, o cualquier combinación de los mismos), (4) proteínas de fusión que comprenden cadherina-11 de longitud completa o un fragmento de la misma, y (5) anticuerpos y fragmentos de los mismos. En realizaciones importantes, el antagonista de cadherina-11 se une a y/o comprende el dominio EC1 de cadherina-11 o un fragmento del mismo (tal como SEQ ID NO: 3 proporcionada en el presente documento). Los antagonistas de cadherina-11 que son péptido o proteína en la naturaleza preferentemente se unirán preferencialmente (o selectivamente) a cadherina-11. La unión preferencial (o selectiva) a cadherina-11 significa que el péptido o proteína se une con mayor afinidad a cadherina-11 que a otra proteína. En algunos casos, el péptido o proteína se une a cadherina-11 con una afinidad que es aproximadamente 2 veces más, aproximadamente 3 veces más, aproximadamente 4 veces más, aproximadamente 5 veces más, aproximadamente 10 veces más, aproximadamente 25 veces más, aproximadamente 50 veces más, aproximadamente 100 veces más, aproximadamente 1000 veces más, o superior a su afinidad por una proteína que no es cadherina-11 o por cualquier otro resto. Tales diferencias en la afinidad se manifiestan preferentemente bajo condiciones fisiológicas como se producen *in vivo*. En algunas realizaciones, los péptidos de unión a cadherina-11 se unen a EC1 de cadherina-11, y opcionalmente a los primeros 33-37 aminoácidos, que incluye los primeros 33, primeros 34, primeros 35, primeros 36, o primeros 37 aminoácidos de EC1 de cadherina-11, como se muestra en SEQ ID NO: 2 proporcionada en el presente documento. La unión a esta región de cadherina-11 puede determinarse mediante ensayos de unión competitiva usando otros ligantes conocidos por unirse a esta región de cadherina-11 tal como aquellos descritos en el documento WO2009/089062. Los antagonistas anteriormente mencionados se denominan conjuntamente péptidos de unión a cadherina-11. Los péptidos de unión a cadherina-11 pueden recogerse y aislarse de fuentes que existen de forma natural o pueden sintetizarse y cribarse para su capacidad para unirse a cadherina-11.

Como se usa en el presente documento con respecto a péptidos y proteínas, el término "aislado" significa separado de su entorno nativo en forma suficientemente pura de manera que pueda manipularse o usarse para uno cualquiera de los fines de la invención.

Los péptidos de unión también pueden derivarse de fuentes distintas de la tecnología de anticuerpos. Por ejemplo, pueden proporcionarse péptidos de unión por bibliotecas de péptidos degeneradas que pueden prepararse fácilmente en disolución, en forma inmovilizada, como bibliotecas de expresión en péptidos de flagelos bacterianos o como bibliotecas de presentación en fagos. También pueden sintetizarse bibliotecas combinatorias de péptidos que contienen uno o más aminoácidos. También pueden prepararse bibliotecas que comprenden péptidos y restos sintéticos de no péptido.

La cadherina-11, o un fragmento de la misma, también puede usarse para aislar otros péptidos de unión a cadherina-11 o componentes. El aislamiento de componentes de unión puede realizarse según métodos muy conocidos. Por ejemplo, la cadherina-11 o un fragmento de la misma (por ejemplo, un fragmento extracelular) puede unirse a un sustrato, y entonces un péptido de unión a cadherina-11 putativo puede aplicarse al sustrato. Si está presente un péptido de unión a cadherina-11, se unirá a la cadherina-11 unida al sustrato, y puede entonces aislarse y analizarse adicionalmente.

*Cadherina-11 de longitud completa y fragmentos de cadherina-11:*

Basándose en la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos conocida de la cadherina-11, pueden identificarse y generarse fragmentos de cadherina-11 adecuados usando tecnología convencional. Puede hacerse referencia a las patentes de EE.UU. N.º 5597725, 5639634, 5646250, 6787136, 6946768, 7488478 y 7589074, y publicación de patente PCT N.º WO 93/21302 y WO2009/089062, que se refieren a secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de cadherina-11 y a fragmentos.

Ejemplos de fragmentos adecuados incluyen aquellos que consisten en o comprenden los aminoácidos 1-40, 1-39, 1-38, 1-37, 1-36, 1-35, 1-34, 1-33, 1-32, 1-31 o 1-30 de EC1 de cadherina o aquellos que consisten en o comprenden los aminoácidos 15-34, 15-35, 15-36, 15-37, 15-38, 15-39 o 15-40 de EC1 de cadherina. Los primeros 40 aminoácidos de EC1 están subrayados y los primeros 35 aminoácidos de EC1 están en negrita en SEQ ID NO: 2 como se proporciona en el presente documento. Ejemplos de fragmentos adecuados también se proporcionan en el documento WO2009/089062 (representado por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 3, 10, 12 y 13, y también descritas en el documento US 2009/0253200). Otros fragmentos pueden comprender los aminoácidos 1-160, o 1-259, o 1-269 de SEQ ID NO: 2, y opcionalmente pueden carecer de los aminoácidos 1-53 de SEQ ID NO: 2 que representan el conductor y la pro-región de cadherina-11 humana.

Los péptidos de unión a cadherina-11 también pueden ser variantes de cadherina-11 de longitud completa o fragmentos de cadherina-11. Tales variantes pueden diferenciarse de la secuencia de aminoácidos de cadherina-11 por un grado. Por ejemplo, las variantes pueden ser aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % idénticas a la cadherina-11 de longitud completa o a un fragmento de cadherina-11. Las variantes pueden comprender un fragmento de cadherina-11 y constituyentes flanqueantes adicionales en el extremo amino y/o carboxi del fragmento. Tales constituyentes pueden ser



aminoácido en la naturaleza. En todos los casos, las variantes se unen a cadherina-11 e interfieren con la función o actividad de la cadherina-11.

Los péptidos de unión a cadherina-11 pueden ser al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 aminoácidos de longitud o más largos. Por ejemplo, pueden ser aproximadamente o al menos 220, 330, 440, 550 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones importantes, el agente inhibidor de cadherina-11 es un análogo peptídico funcionalmente equivalente de cadherina-11. Como se usa en el presente documento, el término análogo peptídico funcionalmente equivalente se refiere a un análogo peptídico que es capaz de inhibir la unión de la cadherina-11 a, por ejemplo, ella misma. Análogos peptídicos funcionalmente equivalentes de la cadherina-11 se identifican, por ejemplo, usando ensayos de adhesión *in vitro* que miden la capacidad del análogo peptídico para inhibir la adhesión mediada por cadherina-11 tanto entre células que expresan la cadherina-11 como entre proteínas cadherina-11 aisladas, o alguna combinación de las mismas. Por consiguiente, análogos peptídicos funcionalmente equivalentes a modo de ejemplo de la cadherina-11 incluyen análogos de cadherina-11 de longitud completa o un fragmento de cadherina-11 que, por ejemplo, comprende sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto a la secuencia no mutante.

Todavía otros péptidos de unión a cadherina-11 se proporcionan en las solicitudes publicadas PCT N.º WO99/57149, WO2004/048411 y WO2009/089062.

*Proteínas de fusión de cadherina-11:*

El péptido de unión a cadherina-11 puede ser una proteína de fusión. Una proteína de fusión, como se usa en el presente documento, es una proteína que contiene regiones de péptido de al menos dos proteínas diferentes. Por ejemplo, una proteína de fusión de cadherina-11 contiene la secuencia de aminoácidos de la cadherina-11 y al menos una proteína no de cadherina-11. Tales proteínas de fusión pueden formarse fusionando, normalmente al nivel de nucleótidos, la secuencia codificante de la cadherina-11 con la secuencia codificante de una proteína no cadherina-11. Ejemplos de proteínas de fusión de cadherina-11 incluyen proteína de fusión de cadherina-11-GST, proteína de fusión de cadherina-11-Fc, proteína de fusión de cadherina-11-beta-galactosidasa, proteína de fusión de cadherina-11-poli-His y proteína de fusión de cadherina-11-GFP. Las proteínas de fusión de Fc pueden comprender regiones del dominio constante de Ig, que incluyen, sin limitación, la región bisagra, el dominio CH1, el dominio CH2 y/o el dominio CH3, opcionalmente conjugados con el fragmento de cadherina-11 mediante el dominio bisagra. La porción Fc puede derivarse de anticuerpos humanos o anticuerpos no humanos. Los anticuerpos pueden ser IgG1 o IgG2, aunque no están así limitados. Métodos de preparación de proteínas de fusión de Fc se conocen en la técnica y se describen al menos en el documento EP0464533.

En algunas realizaciones, las proteínas de fusión de cadherina-11 comprenden el dominio extracelular entero de la cadherina-11. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de cadherina-11 comprende uno o más subdominios extracelulares de la cadherina-11, tales como EC1. Ejemplos incluyen proteínas de fusión que comprenden EC1, EC1/2, EC1-3, EC1-4, EC1/3, EC1/4 y EC1/5, o fragmentos de EC1. En realizaciones importantes, la proteína de fusión se une al dominio EC1 de la cadherina-11. Ejemplos de proteínas de fusión de cadherina-11 incluyen la proteína de fusión cadherina-11-EC1-Fc (que comprende el dominio EC1 de la cadherina-11), proteína de fusión cadherina-11-EC1/2-Fc (que comprende los dominios EC1 y EC2 de la cadherina-11) y la proteína de fusión cadherina-11-EC1-5-Fc (que comprende los dominios EC1, EC2, EC3, EC4 y EC5 de la cadherina-11). Algunas proteínas de fusión pueden comprender los primeros 40, primeros 39, primeros 38, primeros 37, primeros 36, primeros 35 o primeros 34 aminoácidos del dominio EC1 de la cadherina-11, como se describe en el documento WO 2009/089062.

Métodos de síntesis de proteínas de fusión de cadherina-11 pueden encontrarse al menos en las patentes de EE.UU. N.º 5597725, 5639634, 5646250, 6787136, 6946768, 7488478 y 7589074, y las publicaciones de patente PCT N.º WO 93/21302 y WO2009/089062 (véase, por ejemplo, SEQ ID NOs: 6 y 7, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de una proteína de fusión cadherina-11 humana-EC1-hlgG2-Fc).

*Anticuerpos de cadherina-11 y fragmentos de anticuerpos:*

Los antagonistas de cadherina-11 que son péptidos de unión a cadherina-11 pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales. Pueden ser anticuerpos quiméricos que incluyen anticuerpos humanizados. Pueden ser anticuerpos de cuatro cadenas que comprenden dos cadenas pesadas y dos ligeras, o pueden ser anticuerpos de dos cadenas tales como aquellos que comprenden dos cadenas pesadas (tales como los anticuerpos de camélido) o aquellos que comprenden una única cadena pesada asociada a una única cadena ligera (tales como Fv de una sola cadena). Pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase. Como se trata más adelante, estas diversas formas de anticuerpo pueden prepararse según metodología convencional. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pueden existir de forma natural o no existir de forma natural, que incluyen, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos recombinantemente producidos.

Significativamente, como es muy conocido en la técnica, solo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratope, participa en la unión del anticuerpo a su epítotope (véase, en general, Clark, W.R. (1986) The

Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones pFc' y Fc, por ejemplo, son efectores de la cascada del complemento, pero no participan en la unión al antígeno. Un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región pFc', o que se ha producido sin la región pFc', designado un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, retiene ambos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. Similarmente, un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región Fc, o que se ha producido sin la región Fc, designado un fragmento Fab, retiene uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacto. Siguiendo adelante, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera del anticuerpo covalentemente unida y una porción de la cadena pesada del anticuerpo indicada Fd. Los fragmentos Fd son los principales determinantes de la especificidad del anticuerpo (un fragmento Fd individual puede asociarse a hasta diez cadena ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd retienen la capacidad de unión al epítoto en aislamiento.

Los términos Fab, Fab', Fc, Fd, pFc', F(ab')<sub>2</sub>, Fv y dAb se emplean con cualquier significado inmunológico convencional [Klein, Immunology (John Wiley, New York, NY, 1982); Clark, W.R. (1986) The Experimental Foundation of Modern Immunology (Wiley & Sons, Inc., New York); Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7th Ed., (Blackwell Scientific Publications, Oxford)]. Fragmentos de anticuerpos funcionalmente activos muy conocidos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de anticuerpos F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv y Fd. Estos fragmentos que carecen del fragmento Fc de anticuerpo intacto se eliminan más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos unión no específica a tejido que un anticuerpo intacto (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)). Por ejemplo, pueden construirse anticuerpos monocatenarios según los métodos descritos en la patente de EE.UU. N.º 4.946.778 a Ladner et al. Tales anticuerpos monocatenarios incluyen las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas unidas por un resto de conector flexible. También se ha informado de métodos de obtención de un anticuerpo de solo dominio ("Fd") que comprende un solo dominio de la cadena pesada variable aislada (véase, por ejemplo, Ward et al., Nature 341:644-646 (1989), que desvela un método de cribado para identificar una región variable de la cadena pesada del anticuerpo (anticuerpo de un solo dominio V<sub>H</sub>) con afinidad suficiente por su epítoto diana para unirse al mismo en forma aislada). Métodos de preparación de fragmentos Fv recombinantes basándose en la cadena pesada del anticuerpo conocida y secuencias de la región variable de la cadena ligera se conocen en la técnica y se han descrito, por ejemplo, Moore et al., patente de EE.UU. N.º 4.462.334. Otras referencias que describen el uso y la generación de fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab (Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985)), fragmentos Fv (Hochman et al., Biochemistry 12: 1130 (1973); Sharon et al., Biochemistry 15: 1591 (1976); Ehrlich et al., patente de EE.UU. N.º 4.355.023) y porciones de moléculas de anticuerpo (Audilore-Hargreaves, patente de EE.UU. N.º 4.470.925). Así, aquellos expertos en la materia pueden construir fragmentos de anticuerpos de diversas porciones de anticuerpos intactos sin destruir la especificidad de los anticuerpos.

Dentro de la porción de unión al antígeno de un anticuerpo, como es muy conocido en la técnica, hay regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que interaccionan directamente con el epítoto del antígeno, y regiones estructurales (FR), que mantienen la estructura terciaria del paratope (véase, en general, Clark, 1986; Roitt, 1991). En tanto el fragmento Fd de la cadena pesada como la cadena ligera de IgG inmunoglobulinas, hay cuatro regiones estructurales (FR1 a FR4) separadas respectivamente por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR, y en particular las regiones CDR3, y más particularmente la CDR3 de la cadena pesada, son ampliamente responsables de la especificidad del anticuerpo.

Está ahora bien establecido en la materia que las regiones no CDR de un anticuerpo de mamífero pueden sustituirse con regiones similares de anticuerpos conespecíficos o heteroespecíficos mientras que retengan la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se manifiesta lo más claramente en el desarrollo y uso de anticuerpos "humanizados" en los que las CDR no humanas se unen covalentemente a regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional. Así, por ejemplo, la publicación internacional PCT N.º WO 92/04381 y la solicitud de patente europea publicada N.º EP 0239400 enseñan la producción y el uso de anticuerpos murinos humanizados en los que al menos una porción de las regiones FR murinas se han sustituido por regiones FR de origen humano. Tales anticuerpos, que incluyen fragmentos de anticuerpos intactos con capacidad de unión al antígeno, se denominan frecuentemente anticuerpos "quiméricos". Hay entidades en los Estados Unidos que sintetizarán comercialmente anticuerpos humanizados a partir de regiones específicas de anticuerpos murinos, tales como Protein Design Labs (Mountain View California), Abgenix y Medarex.

Así, como será evidente para un experto habitual en la materia, la presente divulgación también proporciona fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera se han sustituido con secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera se han sustituido con secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos de fragmentos Fab en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera se han sustituido con secuencias homólogas humanas o no humanas; y anticuerpos quiméricos de fragmentos Fd en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se han sustituido con secuencias homólogas humanas o no humanas. La presente divulgación también incluye anticuerpos monocatenarios.

Además, pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, tales como los desvelados en la patente de EE.UU. N.º 5.567.610, concedida a Borrebaeck et al., patente de

EE.UU. N.º 565.354, concedida a Ostberg, patente de EE.UU. N.º 5.571.893, concedida a Baker et al. Kozber, J. Immunol. 133: 3001 (1984), Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc, new York, 1987) y Boerner et al., J. Immunol., 147: 86-95 (1991). Además de los métodos convencionales para preparar anticuerpos monoclonales humanos, tales anticuerpos también pueden prepararse inmunizando animales transgénicos que son capaces de producir anticuerpos humanos (por ejemplo, Jakobovits et al., PNAS USA, 90: 2551 (1993), Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993), Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993) y la patente de EE.UU. N.º 5.569.825 concedida a Lonberg).

Anticuerpos para cadherina-11 a modo de ejemplo y métodos de preparación de tales anticuerpos se describen en las patentes de EE.UU. N.º 5597725, 5639634, 5646250, 6787136, 6946768, 7488478 y 7589074, y la publicación de patente PCT N.º WO 93/21302 y WO2009/089062. Ejemplos de anticuerpos para cadherina-11 incluyen 23C6, 13C2, 27F3, 5F82 (comercialmente disponible de Lifespan Science), anticuerpo H1M1 (anticuerpo específico de EC1 de cadherina-11 producido por el hibridoma H1M1 que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-9699), anticuerpo H14 (anticuerpo específico de EC1 de cadherina-11 producido por hibridoma H14 que tiene el N.º de acceso de ATCC PTA-9701), BM5096/1A6 (comercialmente disponible de Acris Antibodies GmbH), 283416 (comercialmente disponible de R&D Systems) y MAB2014 (comercialmente disponible de Millipore). Ejemplos de fragmentos de anticuerpos para cadherina-11 incluyen el fragmento Fab de los anticuerpos 23C6, 13C2, 27F3, 5F82, H1M1 anticuerpo, anticuerpo H14, BM5096/1A6, 283416 y MAB2014. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden comprender una o más CDR de anticuerpos conocidos tales como los anticuerpos H1M1 o H14, como se describe en el documento US 2009/0253200.

Anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen al dominio EC1 de cadherina-11 se describen en los documentos US 2009/0253200 y WO2009/089062.

Los anticuerpos para cadherina-11 también pueden ser anticuerpos biespecíficos o bifuncionales capaces de unirse a dos epítopes diferentes en virtud de sus diferentes sitios de unión al antígeno.

Todavía otros anticuerpos para cadherina-11 son anticuerpos de camélido como se describen en la publicación PCT N.º WO 94/04678 y la publicación de patente de EE.UU. N.º 20080124324, y sus derivados en forma de nanocuerpos de camélido como en la patente de EE.UU. N.º 5759808. Los anticuerpos de camélido y nanocuerpos de camélido están comercialmente disponibles de fuentes tales como Ablynx (Bélgica). Debe entenderse que los anticuerpos de camélido de cadherina-11 pueden humanizarse de un modo similar al descrito en el presente documento para otros tipos de anticuerpo.

#### *Antagonista de ácido nucleico de cadherina-11:*

Un antagonista de cadherina-11 también puede ser un ácido nucleico. Estos antagonistas incluyen ácidos nucleicos que (1) codifican un polipéptido de cadherina-11 o un fragmento del mismo; (2) son moléculas antisentido de cadherina-11 que inhiben la transcripción o traducción de las anteriores moléculas de ácidos nucleicos; (3) son ARN inhibidor de cadherina-11 (por ejemplo, ARNip o ARNhp); (4) son ribozimas de cadherina-11; (5) aptámeros que son ácido nucleico en la naturaleza pero se unen a la cadherina-11 como lo harían los péptidos de unión, interfiriendo así con la unión de cadherina-11 a otra cadherina-11 o a otro contra-receptor de cadherina-11. En algunas realizaciones, un antagonista de cadherina-11 que es un ácido nucleico (1) se hibrida bajo condiciones rigurosas con un ácido nucleico que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1, y (2) codifica un polipéptido de cadherina-11 o un fragmento del mismo que es capaz de unirse específicamente a la cadherina-11.

#### *Ácidos nucleicos que codifican cadherina-11:*

Los antagonistas de cadherina-11 incluyen ácidos nucleicos que codifican cadherina-11 y fragmentos de cadherina-11. La secuencia de nucleótidos de longitud completa de cadherina-11 se proporciona como SEQ ID NO: 1. Los ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 pueden usarse como antagonistas, como ejemplo. Los antagonistas de cadherina-11 de la invención también incluyen homólogos y alelos de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1.

Los antagonistas de ácidos nucleicos de cadherina-11 pueden codificar polipéptidos que son polipéptidos de cadherina-11 solubles o polipéptidos unidos a la membrana, o fragmentos de cadherina-11 tales como fragmentos que consisten en o comprenden EC1 o un fragmento del mismo (por ejemplo, los primeros 33-37 aminoácidos de EC1). Los polipéptidos de cadherina-11 solubles carecen de un dominio transmembrana y, óptimamente, contienen aminoácidos adicionales que hacen al polipéptido soluble (por ejemplo, proteínas de fusión, que contiene toda o parte de la cadherina-11, que inhiben la unión de cadherina-11 a otra cadherina-11). Los fragmentos de cadherina-11 que están unidos a la membrana (o asociados a la membrana) contienen preferentemente un dominio transmembranario.

Antagonistas de ácidos nucleicos de cadherina-11 engloban adicionalmente moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína cadherina-11 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (o SEQ ID NO: 3, por ejemplo), pero que pueden diferenciarse de la secuencia de SEQ ID NO: 1 debido a la degeneración del código genético.

Ciertos antagonistas de ácidos nucleicos de cadherina-11 pueden identificarse por técnicas convencionales, por ejemplo, identificando secuencias de ácidos nucleicos que codifican cadherina-11 y que se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 bajo condiciones rigurosas. El término "condiciones rigurosas", como se usa en el presente documento, se refiere a parámetros con los que la materia está familiarizada. Más específicamente, condiciones rigurosas, como se usa en el presente documento, se refieren a hibridación a 65 °C en tampón de hibridación (3,5 x SSC, 0,02 % de formamida, 0,02 % de polivinilpirrolidona, 0,02 % de albúmina de suero bovino, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM (pH 7), 0,5 % de SDS, EDTA 2 mM). SSC es cloruro sódico 0,15 M / citrato de sodio 0,15 M, pH 7; SDS es dodecilsulfato de sodio; y EDTA es ácido etilen-diamina-tetra-acético. Después de la hibridación, la membrana a la que el ADN se transfiere se lava a 2x SSC a temperatura ambiente y luego a 0,1x SSC/0,1x SDS a 65 °C.

Hay otras condiciones, reactivos, etc., que pueden usarse, que producen un grado de rigurosidad similar. El experto estará familiarizado con tales condiciones y, así, no se dan aquí. Se entenderá, sin embargo, que el experto será capaz de manipular las condiciones de un modo para permitir la clara identificación de homólogos y alelos de las moléculas de ácidos nucleicos de la invención. El experto también está familiarizado con la metodología de cribado de células y bibliotecas para la expresión de moléculas de ácidos nucleicos adicionales que pueden aislarse y secuenciarse. En el cribado de secuencias de cadherina-11, por ejemplo, puede realizarse una transferencia Southern usando las condiciones anteriores, junto con una sonda radiactiva. Después de lavar la membrana a la que el ADN se transfiere finalmente, la membrana puede colocarse contra película de rayos X para detectar la señal radiactiva.

En general, los homólogos y alelos de la cadherina-11 normalmente compartirán al menos el 70 % de identidad de nucleótidos con SEQ. ID. NO: 1; y en algunos casos, compartirán al menos el 75 % de identidad de nucleótidos; y en todavía más casos, compartirán al menos el 80 % de identidad de nucleótidos. Los complementos de Watson-Crick de los ácidos nucleicos anteriores también están englobados por la divulgación. Los homólogos de cadherina-11 preferidos tienen al menos el 85 % de homología de secuencias con SEQ. ID. NO: 1. Más preferentemente, los homólogos de cadherina-11 tienen al menos el 90 % y lo más preferentemente al menos el 95 % de homología de secuencias con SEQ. ID. NO: 1. La homología puede calcularse usando diversas herramientas de software públicamente disponible desarrolladas por NCBI (Bethesda, Maryland) que pueden obtenerse mediante internet. Herramientas a modo de ejemplo incluyen el sistema BLAST disponible en la página web de NCBI. Pueden obtenerse alineamientos por pares y de ClustalW (establecimiento de la matriz BLOSUM30), además de análisis hidropático de Kyte-Doolittle, usando el software de análisis de secuencias MacVector (Oxford Molecular Group).

La divulgación también incluye ácidos nucleicos degenerados que incluyen codones alternativos a aquellos presentes en el ácido nucleico que existe de forma natural que codifica, por ejemplo, el polipéptido cadherina-11 humana. Como es muy conocido en la técnica, y como un ejemplo, los restos de serina están codificados por los codones TCA, AGT, TCC, TCG, TCT y AGC. Cada uno de los seis codones es equivalente para los fines de codificar un resto de serina. Así, será evidente para un experto habitual en la materia que cualquiera de los codones de nucleótidos que codifican serina puede emplearse para dirigir el aparato de síntesis de proteínas, *in vitro* o *in vivo*, para incorporar un resto de serina. Similarmente, los tripletes de secuencia de nucleótidos que codifican otros restos de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, CCA, CCC, CCG y CCT (codones de prolina); CGA, CGC, CGG, CGT, AGA y AGG (codones de arginina); ACA, ACC, ACG y ACT (codones de treonina); AAC y AAT (codones de asparagina); y ATA, ATC y ATT (codones de isoleucina). Otros restos de aminoácidos pueden codificarse similarmente por múltiples secuencias de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento con respecto a ácidos nucleicos, el término "aislado" significa: (i) amplificado *in vitro* por, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) producido recombinantemente clonando; (iii) purificado, como por escisión y separación en gel; o (iv) sintetizado por, por ejemplo, síntesis química. Un ácido nucleico aislado es uno que es fácilmente manipulable por técnicas de ADN recombinante muy conocidas en la técnica. Así, se considera aislada una secuencia de nucleótidos contenida en un vector en el que se conocen sitios de restricción de 5' y 3' o para los que se han desvelado secuencias de cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero no es una secuencia de ácidos nucleicos que existe en su estado nativo en su huésped natural. Un ácido nucleico aislado puede estar sustancialmente purificado, pero no necesita. Por ejemplo, un ácido nucleico que se aísla en un vector de clonación o de expresión no es puro porque puede comprender solo un minúsculo porcentaje del material en la célula en la que reside. Un ácido nucleico tal está aislado, sin embargo, como el término se usa en el presente documento debido a que es fácilmente manipulable por técnicas convencionales conocidas para aquellos expertos habituales en la materia.

El antagonista de ácido nucleico de cadherina-11, en una realización, está operativamente enlazado a una secuencia de expresión de gen que dirige la expresión del antagonista de ácido nucleico de cadherina-11 a una célula tal como una célula eucariota. La "secuencia de expresión de gen" es cualquier secuencia de nucleótidos reguladora, tal como una secuencia promotora o combinación de promotor-potenciador, que facilita la eficaz transcripción y traducción del antagonista de ácido nucleico de cadherina-11 con el que está operativamente enlazado. La secuencia de expresión de gen puede, por ejemplo, ser un promotor de mamífero o viral, tal como un promotor constitutivo o inducible. Los promotores de mamífero constitutivos incluyen, pero no se limitan a, los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPTR), adenosina desaminasa, piruvato cinasa, promotor de beta-actina y otros promotores constitutivos. Promotores virales a modo de ejemplo que

funcionan constitutivamente en células eucariotas incluyen, por ejemplo, promotores del virus simio, virus del papiloma, adenovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del sarcoma de Rous, citomegalovirus, las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney y otros retrovirus, y el promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Otros promotores constitutivos son conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. Los promotores útiles como secuencias de expresión de gen de la divulgación también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles se expresan en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, el promotor de la metalotioneína se induce para promover la transcripción y traducción en presencia de ciertos iones metálicos. Otros promotores inducibles son conocidos para aquellos expertos habituales en la materia.

En general, la secuencia de expresión del gen debe incluir, según sea necesario, secuencias no de transcripción de 5' y no de traducción de 5' implicadas en la iniciación de la transcripción y la traducción, respectivamente, tal como una caja TATA, secuencia de terminación, secuencia CAAT, y similares. Especialmente, tales secuencias no de transcripción de 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del antagonista de ácido nucleico de cadherina-11 operablemente unido. Las secuencias de expresión de gen opcionalmente incluyen secuencias potenciadoras o secuencias activadoras en la dirección 5', según se desee.

El antagonista de ácido nucleico de cadherina-11 puede usarse en métodos tanto *in vivo* como *in vitro*. Las moléculas de ácidos nucleicos pueden introducirse en una célula *in vitro*, seguido de la transferencia de la célula al sitio de fibrosis. La célula dentro de la que la molécula de ácido nucleico se introduce puede recogerse del sitio de fibrosis (por ejemplo, un fibroblasto) o puede ser una célula que no está normalmente presente en el sitio de inflamación. Una secuencia que permite la expresión del ácido nucleico en un tejido particular (o célula), tal como por ejemplo el pulmón, es una que es selectivamente transcripcionalmente activa en el tejido (o célula) y así produce la expresión del ácido nucleico en el tejido (o célula). Aquellos expertos habituales en la materia serán capaces de identificar fácilmente promotores alternativos que son capaces de expresar una molécula de ácido nucleico tal en tejido de pulmón, tejido de hígado, tejido renal, y similares, como se menciona en el presente documento. Alternativamente, una célula transducida con el antagonista de ácido nucleico de cadherina-11 puede cultivarse *in vitro* con el fin de producir un antagonista de la proteína cadherina-11 o puede usarse en ensayos de cribado *in vitro*. Por ejemplo, la secuencia de expresión del gen puede usarse para expresar cadherina-11 en una célula que no expresa inherentemente cadherina-11.

Se dice que las secuencias de la molécula de ácido nucleico y la secuencia de expresión del gen están "operativamente enlazadas" cuando están covalentemente enlazadas de tal forma que pongan la transcripción y/o traducción del antagonista de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia codificante de cadherina-11) bajo la influencia o el control de la secuencia de expresión del gen. Si se desea que la molécula de ácido nucleico sea traducida en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están operativamente enlazadas si la inducción de un promotor en la secuencia de expresión del gen 5' produce la transcripción de la molécula de ácido nucleico y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) produce la introducción de una mutación por desplazamiento del marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción de la molécula de ácido nucleico, o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente que va a traducirse en un polipéptido. Así, una secuencia de expresión de gen estaría operativamente enlazada a una molécula de ácido nucleico si la secuencia de expresión de gen fuera capaz de efectuar la transcripción de esa molécula de ácido nucleico de forma que el transcrito resultante pudiera traducirse en el polipéptido deseado.

#### *ARNip de cadherina-11:*

La invención contempla el uso de agentes de interferencia de ARN tales como ARNip y ARNhp como antagonistas de cadherina-11. El ARNip son moléculas de ARN capaces de causar la interferencia y así silenciar post-transcripcionalmente genes específicos en células, que incluyen células de mamífero. Los ARNip comprenden una región bicatenaria que normalmente tiene aproximadamente 5-50 pares de bases, más normalmente 10-40 pares de bases, e incluso más normalmente 15-30 pares de bases de longitud. Los ARNip pueden tener 20-50, 25-50 o 30-40 pares de bases de longitud. Estos ARNip pueden ser digeridos por la RNasa III Dicer para dar ARNip más pequeños en el intervalo de 19-28 pares de bases, que incluyen 19 pares de bases, 21 pares de bases, 23 pares de bases, 25 pares de bases y 27 pares de bases de longitud. Se sabe que los ARNip en este intervalo de tamaño pueden incorporarse en y ser actuados por el complejo enzimático llamado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), con un resultado neto de degradación y/o inhibición de ARN diana de cualquier traducción de proteína del mismo. De una manera similar, también pueden usarse ARN bicatenarios con otras funciones reguladoras tales como microARN (miARN). Puede hacerse referencia a Bass, Nature 411: 428-29 (2001); Elbashir et al., Nature 411: 494-98 (2001); Fire et al., Nature 391: 806-11 (1998); documento WO 01/75164 y las patentes de EE.UU. 6506559, 7056704, 7078196, 7432250, para mayor detalle sobre ARNip, además de métodos de preparación de ARNip. Los ARNip para la cadherina-11 están comercialmente disponibles de fuentes tales como Dharmacon.

Formas de ARNip tales como la forma R y L tendrán nucleótidos protuberantes en uno o ambos extremos. Como se trata en el presente documento, un ARNip de forma R tiene un nucleótido protuberante en 3' sobre su hebra no codificante. Puede ser romo en su otro extremo y/o puede tener un nucleótido protuberante en 3' en su otro extremo, que incluye un nucleótido protuberante que comprende residuos de ADN. Alternativamente, un ARNip de forma L

tiene un nucleótido protuberante en 3' en su hebra codificante. Puede ser romo en su otro extremo y/o puede tener un nucleótido protuberante en 3' en su otro extremo, que incluye un nucleótido protuberante que comprende residuos de ADN.

5 El ARNip puede estar comprendido de ribonucleótidos o una combinación de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, que incluyen, en algunos casos, versiones modificadas de uno o ambos. Por ejemplo, los ribonucleótidos que contienen una base que no existe de forma natural (en lugar de una base que existe de forma natural) tal como uridinas y/o citidinas modificadas en la posición 5, por ejemplo, 5-(2-amino)propiluridina, 5-bromouridina, o adenosinas y/o guanosinas modificadas en la posición 8, por ejemplo, 8-bromo guanosina, o deazanucleótidos, por ejemplo 7-deaza-adenosina, o nucleótidos alquilados en O y N, por ejemplo N6-metiladenosina, pueden incorporarse en el ARNip. Como otro ejemplo, ribonucleótidos modificados con azúcar que tienen un grupo 2' OH sustituido con un grupo seleccionado de H, OR, R, halógeno, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub> o CN, en el que R es alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno o alquino y halo es F, Cl, Br o I. Como otro ejemplo más, el esqueleto puede modificarse para comprender enlaces de esqueleto modificados tales como, pero no se limitan a, fosforotioatos. El ARNip puede comprender modificaciones en la base, azúcar y/o esqueleto, que incluyen una variedad de tales modificaciones.

20 Así, las moléculas de ARNip pueden proporcionarse como y/o derivarse de una o más formas que incluyen, por ejemplo, como uno o más dúplex bicatenarios de ARN interferente pequeño (ARNip) aislado, como ARN bicatenario (ARNbc) más largo, o como ARNip o ARNbc transcrito de un casete transcripcional en un ADN plásmido. Las moléculas de ARNip pueden tener nucleótidos protuberantes (por ejemplo, nucleótidos protuberantes en 3' o 5' como se describe en Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15:188 (2001) o Nykanen et al., *Cell*, 107:309 (2001)), o pueden carecer de nucleótidos protuberantes (es decir, tener extremos romos). El experto habitual en la materia apreciará y entenderá cómo tales fuentes de partida pueden modificarse con el fin de llegar a las formas R y L descritas en el presente documento.

25 Los ARNip se dirigen a genes *in vivo* o *in vitro* si toda o parte de la secuencia de nucleótidos de sus dúplex (o bicatenaria) es complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen elegido como diana, tal como cadherina-11. Los ARNip producidos pueden sintetizarse basándose en secuencias de nucleótidos conocidas (o predichas) de ácidos nucleicos que codifican proteínas u otros productos génicos. La secuencia puede ser complementaria a una secuencia traducida o sin traducir en la diana. El grado de complementariedad entre el ARNip y la diana puede ser el 100 % o inferior al 100 %, a condición de que exista identidad suficiente con una diana para mediar en el silenciamiento específico de diana. La materia está familiarizada con ARNip eficaces que son menos del 100 % complementarios a su diana.

30 El nivel de silenciamiento o interferencia puede medirse de cualquier número de formas, que incluyen la cuantificación de especies de ARNm y/o especies de proteína. En algunos casos, la cuantificación de ARNm se prefiere particularmente donde la proteína sea intracelular o de otro modo difícil de observar y/o ensayar. Los niveles de ARNm pueden medirse usando RT-PCR o RACE, como un ejemplo. Los niveles de proteína pueden medirse usando tinción inmunohistoquímica. Los niveles de ARNm o de proteína pueden reducirse el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, o incluso el 100 %. Dependiendo de la aplicación, reducción parcial (es decir, inferior al 100 % puede ser suficiente) en comparación con el nivel en ausencia del ARNip exógenamente aplicado. En algunas realizaciones, el nivel se reduce el 80 % o más del 80 % en comparación con un control que no se ha expuesto a ARNip exógenamente aplicado.

#### *Ribozimas de cadherina-11:*

35 Una ribozima de cadherina-11 es una molécula de ARN enzimática capaz de catalizar la escisión específica de ARN de cadherina-11. La ribozima de cadherina-11 se une a ARN de cadherina-11 en un modo específico de secuencia (es decir, mediante hibridación de secuencias específicas), y esto va seguido de escisión endonucleolítica del ARN de cadherina-11. Ejemplos de ribozimas incluyen ribozimas de horquilla o con motivo de cabeza de horquilla manipuladas. Secuencias de ribozimas complementarias a una diana, tales como cadherina-11, pueden identificarse seleccionando la diana para sitios de escisión de ribozima (por ejemplo, GUA, GUU y GUC), y entonces generando una secuencia que tiene aproximadamente 15-20 ribonucleótidos que abarcan el sitio de escisión.

#### *Antisentido de cadherina-11:*

40 El antagonista de ácido nucleico de cadherina-11 puede ser una molécula antisentido (o oligonucleótido). Oligonucleótidos antisentido que se unen selectivamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido cadherina-11, o un fragmento del mismo, para reducir la actividad de cadherina-11 o función están englobados por la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido antisentido" o "antisentido" describe un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, oligorribonucleótido modificado, u oligodesoxirribonucleótido modificado que se hibrida bajo condiciones fisiológicas con ADN que comprende un gen particular o con un transcrito de ARNm de ese gen y, así, inhibe la transcripción de ese gen y/o la traducción de ese ARNm. Las moléculas antisentido se diseñan para interferir con la transcripción o traducción de un gen diana tras la hibridación con el gen diana o transcrito. Aquellos expertos en la materia reconocerán que la longitud exacta del oligonucleótido antisentido y su grado de complementariedad con su diana

5 dependerán de la diana específica seleccionada, que incluye la secuencia de la diana y las bases particulares que comprenden esa secuencia. Se prefiere que el oligonucleótido antisentido se construya y disponga de manera que se una selectivamente con la diana bajo condiciones fisiológicas, es decir, que se hibride sustancialmente más con la diana secuencia que con cualquier otra secuencia en la célula diana bajo condiciones fisiológicas. Basándose en SEQ ID NO: 1 o en el homólogo alélico o genómico y/o secuencias de ADNc, un experto en la materia puede elegir y sintetizar fácilmente cualquiera de varias moléculas antisentido apropiadas para su uso según la presente invención. Con el fin de ser suficientemente selectivo y potente para la inhibición, tales oligonucleótidos antisentido deben comprender al menos 10 y, más preferentemente, al menos 15 bases consecutivas que son complementarias a la diana, aunque en ciertos casos oligonucleótidos modificados de tan solo 7 bases en longitud se han usado satisfactoriamente como oligonucleótidos antisentido (Wagner et al., Nat. Med. 1(11):1116-1118, 1995). Lo más preferentemente, los oligonucleótidos antisentido comprenden una secuencia complementaria de 20-30 bases.

10 Aunque pueden elegirse oligonucleótidos que son antisentido para cualquier región del gen o transcritos de ARNm, en realizaciones preferidas los oligonucleótidos antisentido se corresponden con sitios del extremo N o aguas arriba de 5' tales como iniciación de la traducción, iniciación de la transcripción o sitios de promotor. Además, las regiones no traducidas de 3' pueden ser elegidas como diana por oligonucleótidos antisentido. El direccionamiento a sitios de corte y empalme de ARNm también se ha usado en la materia, pero puede ser menos preferido si se produce corte y empalme de ARNm alternativo. Además, el antisentido se dirige, preferentemente, a sitios en los que no se espera la estructura secundaria de ARNm (véase, por ejemplo, Sainio et al., Cell Mol. Neurobiol. 14(5):439-457, 1994) y en los que no se espera que se unan las proteínas. Finalmente, aunque la SEQ ID NO: 1 desvela una secuencia de ADNc, un experto habitual en la materia puede derivar fácilmente el ADN genómico correspondiente a esta secuencia. Así, la presente invención también proporciona oligonucleótidos antisentido que son complementarios al ADN genómico correspondiente a SEQ ID NO: 1. Similarmente, se posibilitan el antisentido para cadherina-11 alélica u homóloga o alternativamente, ADNc y ADN genómicos de contra-receptor de cadherina-11 sin excesiva experimentación.

15 En un conjunto de realizaciones, los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden estar compuestos de desoxirribonucleótidos "naturales", ribonucleótidos, o cualquier combinación de los mismos. Es decir, el extremo 5' de un nucleótido nativo y el extremo 3' de otro nucleótido nativo pueden enlazarse covalentemente, como en sistemas naturales, mediante un enlace internucleosídico fosfodiéster. Estos oligonucleótidos pueden prepararse por métodos reconocidos en la técnica que pueden llevarse a cabo manualmente o por un sintetizador automatizado. También pueden producirse recombinantemente por vectores.

20 En realizaciones preferidas, sin embargo, los oligonucleótidos antisentido de la invención también pueden incluir oligonucleótidos "modificados". Es decir, los oligonucleótidos pueden modificarse de varias formas que no previenen que se hibriden con su diana, pero que potencian su estabilidad o direccionamiento o que potencian de otro modo su eficacia terapéutica.

25 El término "oligonucleótido modificado", como se usa en el presente documento, describe un oligonucleótido en el que (1) al menos dos de sus nucleótidos están covalentemente enlazados mediante un enlace internucleosídico sintético (es decir, un enlace distinto de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' del otro nucleótido) y/o (2) un grupo químico no normalmente asociado a ácidos nucleicos se ha unido covalentemente al oligonucleótido. Enlaces internucleosídicos sintéticos preferidos son fosforotioatos, alquilfosfonatos, fosforoditioatos, ésteres de fosfato, alquilfosfonotioatos, fosforamidatos, carbamatos, carbonatos, triésteres de fosfato, acetamidatos, ésteres carboximetílicos y péptidos.

30 El término "oligonucleótido modificado" también engloba oligonucleótidos con una base covalentemente modificada y/o azúcar. Por ejemplo, los oligonucleótidos modificados incluyen oligonucleótidos que tienen azúcares de esqueleto que están covalentemente unidos a grupos orgánicos de bajo peso molecular distintos de un grupo hidroxilo en la posición 3' y distintos de un grupo fosfato en la posición 5'. Así, los oligonucleótidos modificados pueden incluir un grupo ribosa 2'-O-alquilado. Además, los oligonucleótidos modificados pueden incluir azúcares tales como arabinosa en lugar de ribosa.

#### *Administración de antagonistas de cadherina-11:*

35 Pueden administrarse antagonistas de ácido nucleico a un sujeto solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar: (1) la administración de una molécula de ácido nucleico a una célula diana y/o (2) la captación de una molécula de ácido nucleico por una célula diana. Preferentemente, los vectores transportan el antagonista de ácido nucleico de cadherina-11 dentro de la célula diana con degradación reducida con respecto al grado de degradación que se produciría en ausencia del vector. Opcionalmente, un "ligando de direccionamiento" puede unirse al vector para administrar selectivamente el vector a una célula que expresa sobre su superficie el receptor relacionado para el ligando de direccionamiento. Metodologías de direccionamiento incluyen conjugados, tales como aquellos descritos en la patente de EE.UU. 5.391.723. En algunos casos, las moléculas de ácidos nucleicos de la invención son dirigidas para la administración a un tejido fibrótico tal como un pulmón afectado, hígado, riñón, y similares.

40 En general, los vectores útiles en la invención se dividen en dos clases: vectores biológicos y vectores químicos/físicos. Los vectores biológicos son útiles para la administración/captación de ácidos nucleicos a/por una

célula diana. Los vectores biológicos incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que han sido manipulados por la inserción o incorporación de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención, y fragmentos de ácido nucleico adicionales (por ejemplo, potenciadores, promotores) que pueden unirse a las secuencias de ácidos nucleicos de la invención. Vectores virales son un tipo preferido de vector biológico e incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácidos nucleicos de los siguientes virus: adenovirus; virus adeno-asociado; retrovirus, tales como virus de la leucemia murina de Moloney; virus del sarcoma murino de Harvey; virus del tumor mamario murino; virus del sarcoma de Rous; virus tipo SV40; virus del poliovirus; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus de la variolovacuna; virus de la poliomielitis; y virus de ARN tales como un retrovirus. Pueden emplearse fácilmente otros vectores no mencionados, pero conocidos en la técnica.

Un virus particularmente preferido para ciertas aplicaciones es el virus adeno-asociado, un virus de ADN bicatenario. El virus adeno-asociado es capaz de infectar una amplia gama de tipos de células y especies y puede manipularse para ser deficiente en la replicación. Tiene adicionalmente ventajas, tales como estabilidad al calor y disolventes lipídicos, altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, que incluyen células hemopoyéticas, y carece de inhibición de superinfección, permitiendo así múltiples series de transducciones. Supuestamente, el virus adeno-asociado puede integrarse dentro de ADN celular humano en un modo específico de sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis insercional y variabilidad de la expresión génica insertada. Además, se han seguido las infecciones por virus adeno-asociados no mutantes en cultivo de tejido durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, que implica que la integración genómica del virus adeno-asociado es un evento relativamente estable. El virus adeno-asociado también puede funcionar de forma extracromosómica.

En general, otros vectores virales preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que genes no esenciales se han sustituido con el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus, cuyo ciclo vital implica la transcripción inversa de ARN viral genómico en ADN con posterior integración proviral en ADN celular del huésped. Los adenovirus y retrovirus han sido autorizados para ensayos de terapia de genes humanos. En general, los retrovirus son deficientes en la replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de producir una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retroviral genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de alta eficiencia de genes *in vivo*. Protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes en la replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una línea celular de encapsidación con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de encapsidación, recogida de partículas virales de medios de cultivo de tejido e infección de las células diana con partículas virales) se proporcionan en Kriegler, M., "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual", W.H. Freeman C.O., New York (1990) y Murry, E.J. Ed. "Methods in Molecular Biology", vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991). Otro vector retroviral preferido es el vector derivado del virus de la leucemia murina de Moloney, como se describe en Nabel, E. G., et al., Science, v. 249, p. 1285-1288 (1990).

Además de los vectores biológicos, vectores químicos/físicos son útiles para la administración/captación de ácidos nucleicos o polipéptidos a/por una célula diana. Como se usa en el presente documento, un "vector químico/físico" se refiere a una molécula natural o sintética, distinta de aquella derivada de fuentes bacteriológicas o virales, capaces de administrar el antagonista de cadherina-11 a una célula.

Un vector químico/físico preferido para la invención es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal preferido para la invención es un liposoma. Los liposomas son vasos de membrana artificial que son útiles como vector de administración *in vivo* o *in vitro*. Se ha mostrado que vasos unilaminares grandes (LUV), que oscilan en tamaño de 0,2 - 4,0  $\mu\text{m}$ , pueden encapsular grandes macromoléculas. Pueden encapsularse ARN, ADN y viriones intactos en el interior acuoso y administrarse a células en una forma biológicamente activa (Fraleley, et al., Trends Biochem. Sci., v. 6, p. 77 (1981)). Con el fin de que un liposoma sea un vector de transferencia génica eficiente, deben estar presentes una o más de las siguientes características:

- (1) encapsulación del gen de interés a alta eficiencia con retención de la actividad biológica;
- (2) unión preferencial y sustancial a una célula diana en comparación con células no diana;
- (3) administración de los contenidos acuosos de la vesícula al citoplasma de la célula diana a alta eficiencia; y (4) expresión precisa y eficaz de la información genética.

Los liposomas pueden ser dirigidos a un tejido particular, acoplado el liposoma a un ligando específico tal como un anticuerpo monoclonal, azúcar, glicolípido, o proteína específica para el tejido particular o tipo de célula. Adicionalmente, el vector puede acoplarse a un péptido de direccionamiento nuclear, que dirigirá la molécula de ácido nucleico moduladora de la cadherina-11 al núcleo de la célula huésped.

Están comercialmente disponibles liposomas de Gibco BRL, por ejemplo, como LIPOFECTIN™ y LIPOFECTACE™, que se forman a partir de lípidos catiónicos tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y bromuro de dimetildiocetadecilamonio (DDAB). Métodos de preparación de liposomas son muy conocidos



en la técnica y se han descrito en muchas publicaciones. Los liposomas también han sido revisados por Gregoriadis, G. en Trends in Biotechnology, V. 3, p. 235-241 (1985).

En general, los antagonistas de ácidos nucleicos de cadherina-11 pueden administrarse al sujeto (cualquier receptor mamífero) usando los mismos modos de administración que actualmente se usan para la terapia génica en seres humanos (por ejemplo, terapia génica mediada por adenovirus). Un procedimiento patentado para realizar la terapia génica *ex vivo* se expone brevemente en la patente de EE.UU. 5.399.346 y en exposiciones presentadas en la historia de archivos de esa patente, todos los cuales son documentos públicamente disponibles. En general, la terapia génica *ex vivo* implica la introducción *in vitro* de una copia funcional de un gen o fragmento del mismo en una célula(s) de un sujeto y devolver la(s) célula(s) genéticamente manipulada(s) al sujeto. La copia funcional del gen o fragmento del mismo está bajo control operable de elementos reguladores que permiten la expresión del gen en la(s) célula(s) genéticamente manipulada(s). Numerosas técnicas de transfección y transducción, además de vectores de expresión apropiados, son muy conocidos para aquellos expertos habituales en la materia, algunos de los cuales se describen en la solicitud PCT WO95/00654.

Como un ejemplo ilustrativo, un vector que contiene una molécula de ácido nucleico se administra a un sitio de fibrosis en un sujeto que es un candidato para tal terapia génica. Entonces, el vector modifica genéticamente uno o más tipos de células en el entorno fibrótico con ADN que codifica, por ejemplo, cadherina-11. Se espera que tales células genéticamente modificadas interfieran con la unión a cadherina-11 a otra cadherina-11.

En una realización alternativa, pueden obtenerse células humanas primarias de un sujeto que es un candidato para tal terapia génica. Entonces, tales células pueden manipularse genéticamente *ex vivo* con ADN que codifica, por ejemplo, una cadherina-11 de longitud completa. Se espera que tales células recombinantes inhiban la adhesión mediada por cadherina-11 *in vivo*. En otro ejemplo más, otro tipo de célula que no expresa cadherina-11 puede manipularse genéticamente *in vitro* para expresar un antagonista de cadherina-11 y entonces introducirse en el sitio de la fibrosis.

Composiciones a modo de ejemplo que pueden usarse para facilitar la captación *in vitro* de ácidos nucleicos por una célula diana incluyen fosfato de calcio y otros mediadores químicos de transporte intracelular, composiciones de microinyección, electroporación y composiciones de recombinación homóloga (por ejemplo, para integrar un ácido nucleico en una localización preseleccionada dentro del cromosoma de la célula diana).

*Composiciones farmacéuticas, formulación, cantidades eficaces:*

La divulgación proporciona además una composición farmacéutica (es decir, una preparación farmacéutica) que comprende un antagonista de cadherina-11. La composición incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable y un antagonista de cadherina-11.

Las preparaciones farmacéuticas, como se han descrito anteriormente, se administran en cantidades eficaces. Para aplicaciones terapéuticas, es generalmente aquella cantidad suficiente para lograr un resultado médicamente deseable. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz es aquella cantidad necesaria para retardar la aparición de, inhibir la progresión de, o detener por completo la afección particular que está tratándose. Como un ejemplo, la cantidad eficaz puede ser aquella cantidad que sirve para reducir, aliviar o retrasar la aparición de los síntomas (por ejemplo, dolor, inflamación, etc.) del trastorno que está siendo tratado o prevenido. La cantidad eficaz dependerá del modo de administración, la afección particular que está tratándose y el resultado deseado. También dependerá de la etapa de la afección, la gravedad de la afección, la edad y estado físico del sujeto que está tratándose, la naturaleza de la terapia simultánea, si la hay, la duración del tratamiento, la vía de administración específica y factores similares dentro del conocimiento y experiencia del profesional médico. Para aplicaciones profilácticas, es aquella cantidad suficiente para retardar la aparición de, inhibir la progresión de o detener por completo la afección particular que se previene, y puede medirse por la cantidad requerida para prevenir la aparición de síntomas.

Generalmente, las dosis de compuestos activos de la presente invención serían de aproximadamente 0,01 mg/kg por día a 1000 mg/kg por día, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a 200 mg/kg, y lo más preferentemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o más días. Se espera que sean adecuadas dosis que oscilan de 1-500 mg/kg, y preferentemente dosis que oscilan de 1-100 mg/kg, e incluso más preferentemente dosis que oscilan de 1-50 mg/kg. La cantidad preferida puede determinarse por un experto habitual en la materia según práctica estándar para determinar niveles de dosificación óptimos del agente. Generalmente se prefiere usar una dosis máxima de un antagonista de cadherina-11 que es la mayor dosis segura según el criterio médico sensato.

Los antagonistas de cadherina-11 pueden administrarse a un sujeto en necesidad de tal tratamiento en combinación con terapia simultánea para tratar fibrosis. La terapia simultánea puede ser invasiva o no invasiva (por ejemplo, farmacoterapia). Ejemplos de farmacoterapias para fibrosis incluyen, pero no se limitan a, metiazol, piperlongumina, antimicina a, tioestreptona, benzbromarona, luteolina, ácido tolfenámico, ciclopirox etanolamina, (r)-(-)-apomorfina calciferol, GBR 12909, harmol, hicantona, ácido flufenámico, halofantrina y zardaverina, como se describen en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20100093613. También se han usado inmunosupresores en el tratamiento de fibrosis. Ejemplos incluyen rapamicina, metotrexato, azatioprina, ciclosporina, FK-506, inhibidores de CDK, y

esteroides y corticosteroides tales como cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona. Otros agentes que pueden usarse incluyen agentes antiinflamatorios tales como los AINE. Estas farmacoterapias son muy conocidas para aquellos expertos habituales en la materia y se administran por modos conocidos para aquellos de tal experiencia. Las farmacoterapias se administran en cantidades que son eficaces para lograr los objetivos fisiológicos, en combinación con antagonistas de cadherina-11. Así, se contempla que en algunos casos las farmacoterapias pueden administrarse en cantidades que no son capaces de prevenir o reducir las consecuencias fisiológicas de la fibrosis cuando las farmacoterapias se administran solas, pero que son capaces de reducir las consecuencias cuando se administran en combinación con los antagonistas de cadherina-11. El antagonista de cadherina-11 puede formularse con tales agentes terapéuticos secundarios o puede formularse por separado. Puede administrarse al mismo tiempo o en momentos separados. Por ejemplo, el antagonista de cadherina-11 puede administrarse antes, y/o con, y/o después del agente terapéutico secundario. Alternativamente, el agente terapéutico secundario puede administrarse antes, y/o con, y/o después del antagonista de cadherina-11.

Los antagonistas de cadherina-11 pueden administrarse solos o en combinación con las farmacoterapias anteriormente descritas como parte de una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica tal puede incluir el antagonista de cadherina-11 en combinación con cualquier vehículo fisiológica y/o farmacéuticamente aceptable convencional que se conoce en la técnica. Las composiciones deben ser estériles y contener una cantidad terapéuticamente eficaz del agente modulador de la cadherina-11 en una unidad de peso o volumen adecuada para administración a un paciente.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa una o más carga sólida o líquida compatible, diluyentes o sustancias de encapsulación que son adecuadas para administración en un ser humano u otro animal. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos. Farmacéuticamente aceptable significa además un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo celular, tejido u organismo. El término "vehículo" indica un componente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que el principio activo se combina para facilitar la administración. Las características del vehículo dependerán de la vía de administración. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de ser combinados con los agentes de la presente divulgación, y entre sí, de un modo de forma que no haya interacción que altere sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada. El vehículo farmacéuticamente aceptable debe ser estéril para administración *in vivo*. Vehículos fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizadores, solubilizantes, y otros materiales que son muy conocidos en la técnica.

Composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril de los agentes moduladores de la cadherina-11, que es preferentemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación acuosa puede formularse según métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución inyectable estéril o suspensión en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, disolución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, aceites no volátiles estériles se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite no volátil suave que incluye mono- o di-glicéridos sintéticos. Además, pueden usarse ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. Formulaciones de vehículo adecuadas para administraciones oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc. pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Están disponibles una variedad de vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, del tipo particular de fibrosis que está tratándose, la gravedad de la afección que está tratándose, y la dosificación requerida para eficacia terapéutica. Los métodos de la divulgación, en términos generales, pueden ponerse en práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, que significa cualquier modo que produce niveles eficaces de los compuestos activos sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Tales modos de administración incluyen vías tópica, oral, rectal, nasal, intranasal, inhalación o parenteral. El término "parenteral" incluye subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o infusión.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos muy conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de poner los antagonistas de cadherina-11 en asociación con un vehículo que constituye uno o más componentes accesorios. En general, las composiciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente los antagonistas de cadherina-11 en asociación con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y entonces, si fuera necesario, moldeando el producto. Composiciones adecuadas para administración por vía oral pueden presentarse como unidades discretas, tales como cápsulas, comprimidos, pastillas para chupar, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del antagonista de cadherina-11. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como un jarabe, elixir o una emulsión.

En una realización particular, el vehículo preferido para la administración de los antagonistas de cadherina-11 es una micropartícula biocompatible o implante que es adecuado para implantación en un sujeto. Implantes bioerosionables a modo de ejemplo que son útiles según este método se describen en la solicitud internacional PCT N.º

PCT/US/03307 (publicación N.º WO 95/24929, titulada "Polymeric Gene Delivery System", que reivindica prioridad a la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 213.668, presentada el 15 de marzo de 1994). El documento PCT/US/03307 describe una matriz polimérica biocompatible, preferentemente biodegradable, para contener un gen exógeno bajo el control de un promotor apropiado. La matriz polimérica se usa para lograr la liberación sostenida del gen exógeno en el sujeto. Según la presente invención, los agentes moduladores de la cadherina-11 descritos en el presente documento están encapsulados o dispersos en la matriz polimérica biocompatible, preferentemente biodegradable, desvelada en el documento PCT/US/03307. La matriz polimérica está preferentemente en forma de una micropartícula tal como una microesfera (en la que, por ejemplo, el agente inhibidor de la cadherina-11 se dispersa en toda una matriz polimérica sólida) o una microcápsula (en la que, por ejemplo, el agente inhibidor de la cadherina-11 se almacena en el núcleo de una vaina polimérica). Otras formas de la matriz polimérica para contener el agente modulador de cadherina-11 incluyen películas, recubrimientos, geles, implantes y prótesis endovasculares. El tamaño y la composición del dispositivo de matriz polimérica están seleccionados para producir cinética de liberación favorable en el tejido dentro del que se implanta el dispositivo de matriz. El tamaño del dispositivo de matriz polimérica se selecciona adicionalmente según el método de administración que va a usarse, que incluye, por ejemplo, administración de una suspensión por aerosol en las áreas nasal y/o pulmonar. La composición de matriz polimérica puede seleccionarse para tener tanto tasas de degradación favorables como también para formarse en un material que es bioadhesivo. La composición de matriz también puede seleccionarse no para degradarse, sino para liberarse por difusión durante un periodo de tiempo prolongado.

Tanto las matrices poliméricas no biodegradables como biodegradables pueden usarse para administrar los antagonistas de cadherina-11 al sujeto. Se prefieren matrices biodegradables. Tales polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. Se prefieren polímeros sintéticos. El polímero se selecciona basándose en el periodo de tiempo durante el cual se desea la liberación, generalmente en el orden de algunas horas a un año o más. Normalmente, lo más deseable es la liberación durante un periodo que oscila de entre algunas horas y tres a doce meses. El polímero opcionalmente está en forma de un hidrogel que puede absorber hasta aproximadamente el 90 % de su peso en agua y además, opcionalmente está reticulado con iones multivalentes u otros polímeros.

En general, los antagonistas de cadherina-11 se administran usando el implante bioerosionable mediante difusión, o más preferentemente, por degradación de la matriz polimérica. Polímeros sintéticos a modo de ejemplo que pueden usarse para formar el sistema de administración biodegradable incluyen: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, poli(óxidos de alquileno), poli(tereftalatos de alquileno), poli(alcoholes vinílicos), poli(éteres vinílicos), poli(ésteres vinílicos), poli(haluros de vinilo), polivinilpirrolidona, poliglicolidas, polisiloxanos, poliuretanos y co-polímeros de los mismos, alquilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato-butirato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa, carboxietilcelulosa, triacetato de celulosa, sal de sodio de sulfato de celulosa, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(alcoholes vinílicos), poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilo), poliestireno y polivinilpirrolidona.

Ejemplos de polímeros biodegradables incluyen polímeros sintéticos tales como polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido butílico), poli(ácido valérico) y poli(lactida-coprolactona), y polímeros naturales tales como alginato y otros polisacáridos que incluyen dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileno, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones rutinariamente hechas por aquellos expertos en la materia), albúmina y otras proteínas hidrófilas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrófobas, copolímeros y mezclas de los mismos. En general, estos materiales se degradan tanto por hidrólisis enzimática como exposición a agua *in vivo*, por erosión superficial o de masa.

Polímeros bioadhesivos de particular interés incluyen hidrogeles bioerosionables (descritos por H.S. Sawhney, C.P. Pathak y J.A. Hubell en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587), ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo) y poli(acrilato de octadecilo).

Ejemplos de polímeros no biodegradables incluyen etileno-acetato de vinilo, poli(ácido (met)acrílico), poliamidas, copolímeros y mezclas de los mismos.

Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de administración de liberación con el tiempo, liberación retardada o de liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas de los antagonistas de cadherina-11 descritos anteriormente, aumentando la conveniencia al sujeto y al médico. Están disponibles muchos tipos de sistemas de administración de liberación y son conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. Incluyen los sistemas poliméricos anteriormente descritos, además de sistemas basados en polímero tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, polioctoésteres, poli(ácido hidroxibutírico) y

polianhídridos. Microcápsulas de los anteriores polímeros que contienen fármacos se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no de polímero que son: lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres y ácidos grasos de colesterol o grasas neutras tales como mono- di- y tri-glicéridos; sistemas de liberación de hidrogeles; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; comprimidos usando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en los que el agente modulador de la cadherina-11 está contenido en una matriz tal como aquella descrita en las patentes de EE.UU. N.º 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152 y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo permea a una velocidad controlada de un polímero tal como se describe en las patentes de EE.UU. N.º 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, pueden usarse sistemas de administración de hardware basados en bomba, algunos de los cuales están adaptados para implantación.

El uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento de afecciones crónicas. La liberación a largo plazo, se usa en el presente documento, significa que el implante se construye y dispone para niveles terapéuticos de administración del principio activo durante al menos 30 días, y preferentemente 60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son muy conocidos para aquellos expertos habituales en la materia e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

*Detección de los niveles de cadherina-11 y medición de los niveles de cadherina-11:*

Como se ha tratado en el presente documento, la divulgación contempla detectar los niveles de cadherina-11 en tejidos o células de sujetos con el fin de determinar si el sujeto tiene fibrosis (produciendo un diagnóstico de fibrosis) o si es probable que el sujeto desarrolle fibrosis (produciendo un pronóstico de fibrosis). También como se trata anteriormente, el diagnóstico o pronóstico puede implicar la consideración de otros factores tales como síntomas contemporáneos de fibrosis, historia familiar, o historia del paciente (incluyendo información sobre factores etiológicos conocidos por contribuir a o producir fibrosis).

La detección de los niveles de cadherina-11 puede implicar detectar niveles de ADN genómico de cadherina-11, niveles de ARNm, niveles de miARN, y/o niveles de proteína. Métodos de detección de cualquiera de los anteriores se conocen en la técnica e incluyen PCR, RT-PCR, inmunohistoquímica, análisis FACS, ELISA, análisis Southern, análisis Northern, análisis Western, análisis de micromatrices, etc. El diagnóstico y/o pronóstico de la fibrosis puede indicarse por la presencia de los niveles de cadherina-11 que son anormalmente elevados en el tejido o células de interés. Niveles anormalmente elevados se definen como niveles que son superiores al nivel en un tejido normal (o una sección de tejido) o células que son no fibróticas. Así, con el fin de determinar si el nivel de cadherina-11 es anormalmente elevado, normalmente se compara con el nivel de cadherina-11 en un tejido normal (no fibrótico) (o una región no fibrótica de un tejido) o células, o a un nivel normal pre-determinado de cadherina-11. Niveles normales pre-determinados de cadherina-11 para un tejido dado pueden estar disponibles basándose en estudios de población u otros datos históricos. Por consiguiente, la comparación no necesita hacerse estrictamente con el tejido o células en el sujeto.

El nivel de cadherina-11 en un sujeto normalmente se determina a partir de una muestra recogida de un sujeto. La naturaleza de la muestra normalmente dependerá del tipo de fibrosis que se sospecha que existe o se desarrolla o que se sabe que existe. Por ejemplo, si la fibrosis es fibrosis dérmica, la muestra puede ser una muestra de piel. Muestras "en sacabocados" de piel son rutinarias en la materia. Como otro ejemplo, si la fibrosis es fibrosis pulmonar, la muestra puede ser, por ejemplo, una biopsia de pulmón, tejido de pulmón reseccionado, o puede ser una muestra de lavado broncoalveolar (BAL). La divulgación proporciona, entre otras cosas, el hallazgo inesperado de que, en sujetos que tienen fibrosis pulmonar, las células que expresan cadherina-11 incluyen macrófagos alveolares y células epiteliales alveolares, ambas de las cuales pueden obtenerse en una muestra de BAL. La recogida de tales muestras se conoce en la técnica.

Un nivel anormalmente elevado de cadherina-11 puede ser un nivel que es aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, o aproximadamente el 100 % superior al nivel en una muestra de control normal. El grado al que el nivel de cadherina-11 se eleva puede indicar el grado de enfermedad, de forma que niveles elevados más bajos pueden ser indicativos de aparición de enfermedad, mientras que niveles elevados más altos pueden ser indicativos de establecimiento de la enfermedad.

Debe entenderse que la cadherina-11 puede detectarse y medirse usando los antagonistas de cadherina-11 descritos en el presente documento, como será rápidamente evidente para un experto habitual en la materia.

Los siguientes ejemplos están incluidos para fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

55

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

5 Para investigar si los niveles de cadherina-11 están regulados por incremento durante el proceso de fibrosis pulmonar, se usó el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Se administraron ratones no mutantes (C57BL/6) tanto con solución salina (control) como bleomicina por vía intratraqueal. Doce días después de la administración de bleomicina o solución salina, los ratones se sacrificaron humanamente y los pulmones se procesaron para análisis de histología y de transferencia Western para determinar si la cadherina-11 aumenta durante la fibrosis pulmonar en este modelo de ratón. Los lisados de proteína se separaron sobre un gel al 10 % de acrilamida por electroforesis, luego se transfirieron a una membrana para transferencia Western usando anticuerpo de control de isotipo, anticuerpo anti-cadherina-11 (Invitrogen) o anticuerpo anti-GAPDH. Se usaron sinoviocitos similares a fibroblastos no mutantes y nulos para cadherina-11 como controles positivos y negativos para la expresión de cadherina-11. El pulmón con bleomicina tuvo niveles elevados de cadherina-11, pero niveles similares de GAPDH (FIG. 1). Estos datos indican que la cadherina-11 aumenta durante el proceso de fibrosis pulmonar.

15 Para determinar la localización celular de la tinción de cadherina-11, se procesó tejido para análisis histológicos y se tiñó con anticuerpos policlonales de conejo contra cadherina-11 o control de isotipo. Como se observa en la FIG. 2, las secciones de pulmón de ratones administrados con bleomicina intratraqueal demostraron una importante tinción de cadherina-11 en células similares a fibroblasto en las áreas que están formando focos fibróticos (tinción de rojo). En secciones de pulmón administradas con solución salina, no hay tinción de cadherina-11 dentro de estas áreas.

20 Juntos estos datos demuestran que los niveles de cadherina-11 aumentan pronto (día 12) en los pulmones fibróticos en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y sugieren encarecidamente que la cadherina-11 puede participar en el desarrollo de fibrosis y servir de diana terapéutica.

Ejemplo 2:

25 Este ejemplo demuestra que los niveles de cadherina-11 son elevados en biopsias de piel de pacientes con esclerodermia y pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. Usando ratones que carecen genéticamente de cadherina-11 y modelos de ratón de fibrosis de piel y pulmonar, los presentes inventores también demuestran que la cadherina-11 es un mediador crítico de fibrosis en la piel y pulmón. Estos datos indican que la cadherina-11 es una diana terapéutica para fibrosis de piel y fibrosis pulmonar.

MÉTODOS:

30 Sujetos humanos. Para el aislamiento de ARN, se obtuvieron especímenes de biopsia de piel de piel clínicamente no implicada de pacientes con SSc y pacientes de control sin una historia de enfermedad autoinmunitaria. Todos los pacientes con SSc cumplieron los criterios del Colegio Americano de Reumatología para SSc. Se obtuvieron 16 biopsias de piel para estudios inmunohistológicos como biopsias de piel incorporadas en parafina de 4 sujetos con esclerodermia y 4 sujetos sin esclerodermia del National Disease Research Interchange.

35 Se obtuvieron muestras de tejido de biopsia de pulmón quirúrgica del Lung Tissue Research Consortium. Los pacientes se clasificaron como que tenían FPI leve y FPI grave según espirometría, examen patológico y tomografía axial computarizada de alta resolución. Se obtuvo líquido de lavado broncoalveolar (BAL) de BAL desechado obtenido para fines clínicos rutinarios en la evaluación de pacientes con FPI o enfermedades pulmonares fibrosantes. Los estudios fueron autorizados por el Comité para la protección de sujetos humanos en el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en Houston.

40 Ratones. Se usaron ratones hembra de 6-10 semanas de edad para estos estudios. Se mantuvieron ratones de fecundación cruzada B6:129 F1 nulos para cadherina-11 y de control en la instalación de cuidado de animales en el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en Houston. Se criaron 17 ratones no mutantes C57BL/6 en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Todos los protocolos para animales fueron autorizados por el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Houston.

45 Modelo de ratón de fibrosis dérmica por bleomicina. Se usaron ratones hembra de edades 6-10 semanas para estos experimentos. Se administró bleomicina esterilizada por filtración 0,02 u por ratón disuelta en solución salina tamponada con fosfato (PBS)] (Teva Parenteral Medicines, Irvine, CA) o PBS por inyecciones subcutáneas diarias en los lomos rasurados de ratones usando una aguja de calibre 27 durante 28 días. Al final del experimento, los ratones se sacrificaron humanamente y se procesó la piel lesional para análisis.

50 Modelo de fibrosis pulmonar por bleomicina. Se usaron ratones hembra de 8-10 semanas de edad para estos experimentos. Los ratones se anestesiaron con avertina (250 mg/kg, por vía intraperitoneal) y 3,5 U/kg de bleomicina (Teva Parenteral Medicines, Irvine, CA) diluida en 50 µl de solución salina estéril o se instiló por vía intratraqueal solución salina sola. En el día 21, los ratones se sacrificaron humanamente y los pulmones se recogieron para análisis. Antes de la recogida de los pulmones, se obtuvieron lavados broncoalveolares con 3 lavados de 0,4 ml de PBS. Entonces, los pulmones se infundieron con 10 % de formalina tamponada a 25 cm de presión y se fijaron durante la noche a 4 °C.

Imunohistoquímica. Se obtuvieron biopsias de piel de 4 pacientes SSc y 4 sujetos normales sin una historia de enfermedad autoinmunitaria conocida del National Disease Research Interchange (Philadelphia, PA). Se desparafinaron secciones de cinco  $\mu\text{m}$ , se rehidrataron y se sumergieron en tampón TBS-T (solución salina tamponada con Tris y 0,1 % de Tween 20), y se trataron con disolución de recuperación de diana (DAKO, Carpintería, CA) a 95 °C durante 10 minutos. Se usaron anticuerpos primarios policlonales de conejo contra cadherina-11 (Invitrogen Inc) o anticuerpo de control del mismo isotipo (Abcam Inc., Cambridge, MA). Se detectaron anticuerpos unidos usando anticuerpos secundarios de Dako Cytomation Envision System-HRP (tetraclorhidrato de 3,3-diaminobencidina). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina.

Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real. Se usaron biopsias de tejido congelado en RNALater (Qiagen, Valencia, CA) para el aislamiento de ARN. Se aisló ARN usando el kit RNeasy Fibrous Tissue Mini usando las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA). Se determinó la concentración y pureza del ARN usando el método Nanodrop. Se usó un microgramo de ARN total para sintetizar ADNc usando kits de transcripción inversa Quantitect usando las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA). Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) usando ensayos de expresión génica TaqMan validados para genes específicos de interés y se normalizó a ciclofilina (Applied Biosystems Inc) en un sistema de PCR en tiempo real 7900HT Fast de Applied Biosystems (Applied Biosystems Inc). Se usó ciclofilina como control endógeno para normalizar los niveles de transcrito de ARN total de cada muestra. Los datos se analizaron con software SDS 2.3 usando el método de CT comparativo (método 2-ddCT). Se calculó el cambio en veces como 2ddCT.

Inactivación de ARNip de cadherina-11. Se sembraron células A549 (ATCC) en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche en DMEM que contenía 10 % de FBS y 1 % de antibióticos. Para la inactivación del ARNip de Cdh11, las células se lavaron con medio libre de antibiótico y posteriormente se incubaron con Optimem (Invitrogen) con Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) y tanto ARNip no de direccionamiento como ARNip de Cdh11 humana (secuencia antisentido: 5'-UUUGAAUGGAGUCAUAAGGUU) (SEQ ID NO:4) (Dharmacon RNAi Technologies, Thermo) durante 48 horas. Entonces, las células se tripsinaron y volvieron a sembrarse en medio libre de antibiótico. Seis horas después, las células se privaron de suero durante la noche en DMEM que contenía 0,1 % de BSA. Entonces, las células se estimularon con o sin TGF- $\beta$  a 10 ng/ml en DMEM + 0,1 % de BSA durante 24 horas. Se aisló ARN usando reactivos Cell to Ct (Ambion) según instrucciones del fabricante. Los transcritos para CDH11, COL1A1, N-cadherina (Cdh2) y E-cadherina (Cdh1) se obtuvieron con sondas Taqman correspondientes (Applied Biosystems) y se presentaron como cambio en veces medio frente a control. Se realizó la obtención de imágenes de células A549 con un microscopio de contraste de fases invertido BX60 (Olympus) para la determinación de la morfología celular.

#### RESULTADOS:

Regulación por incremento de cadherina-11 en piel con esclerodermia. Para determinar si la cadherina-11 se expresó a niveles más altos en biopsias de piel de pacientes con esclerodermia en comparación con sujetos sanos de control, se aisló ARN de biopsias de piel de 3 mm del brazo superior de 6 pacientes con esclerodermia y 9 sujetos sanos de control. Se determinaron los niveles de expresión de cadherina-11 y 2 genes relacionados con fibrosis (Colla1 y CTGF) usando PCR cuantitativa en tiempo real. Como era de esperar, las biopsias de esclerodermia tuvieron niveles más altos de Col1a1 y CTGF en comparación con las biopsias de control sano (véase la FIG. 3). De acuerdo con la hipótesis de los presentes inventores, los niveles de expresión de cadherina-11 también aumentaron en biopsias de piel con esclerodermia con respecto a sujetos sanos de control. Estos datos demuestran que la expresión de cadherina-11 aumenta en piel de pacientes con esclerodermia.

Estos datos se extendieron y se confirmaron por tinción de las biopsias de piel usando un anticuerpo específico para cadherina-11 en estudios inmunohistológicos (véase la FIG. 4). Como se observa en la FIG. 4, la tinción de biopsias de piel de controles sanos no mostraron ninguna tinción de cadherina-11 en los fibroblastos en la dermis de piel normal (FIG. 4A Ampliación con pocos aumentos de piel normal, FIG. 4B Ampliación con muchos aumentos de piel normal). Por el contrario, se observó la expresión de cadherina-11 (color marrón rojizo) en fibroblastos localizados en la dermis de piel obtenida de pacientes con esclerodermia (FIG. 4C Ampliación con pocos aumentos de piel con esclerodermia, FIG. 4D, E Ampliación con muchos aumentos de piel con esclerodermia). Juntos estos datos demuestran que la expresión de cadherina-11 aumenta en piel con esclerodermia con respecto a piel de control sano y la expresión se localiza ampliamente en el fibroblasto dérmico de biopsias de esclerodermia.

Ratones deficientes en cadherina-11 desarrollan menos fibrosis dérmica. Dada la elevada expresión de la cadherina-11 en piel con esclerodermia, los presentes inventores quisieron determinar a continuación si la cadherina-11 desempeñó una función crítica en el desarrollo de fibrosis dérmica. El modelo de fibrosis dérmica inducida por bleomicina es un modelo ampliamente aceptado de fibrosis de la piel y se ha usado para el entendimiento adicional de la patogénesis de la fibrosis de piel y esclerodermia. Se obtuvieron ratones deficientes en cadherina-11 con permiso del Brigham and Women's Hospital (laboratorio de Michael Brenner). Estos ratones se inyectaron por vía subcutánea con bleomicina o PBS durante 28 días como se describe en la sección Métodos anterior. En el día 28, los ratones se sacrificaron humanamente y la piel se procesó para estudios histológicos y estudios cuantitativos para determinar el grado de fibrosis dérmica y deposición de matriz extracelular. Como se observa en la FIG. 5, ratones no mutantes (Wt) inyectados con bleomicina durante 28 días (FIG. 5A) tuvieron un aumento en el espesor de la capa dérmica (flecha) en comparación con ratones Wt inyectados con PBS (FIG. 5C). De forma interesante, ratones para

cadherina-11 (Cad-11 KO) inyectados con bleomicina (FIG. 5D) tuvieron un espesor dérmico I elevado atenuado con respecto a ratones no mutantes inyectados con PBS inyectados con bleomicina. Estos datos se cuantificaron en la FIG. 6A midiendo el espesor dérmico en 5 áreas al azar por biopsia de piel. Similar a las imágenes histológicas, estos datos demuestran que los ratones deficientes en cadherina-11 desarrollan menos fibrosis dérmica en comparación con los ratones Wt cuando se inyectan con bleomicina diariamente durante 28 días. Finalmente, para cuantificar adicionalmente la diferencia, se cuantificó la cantidad de colágeno, un componente de la matriz extracelular importante de fibrosis dérmica, usando el ensayo de Sircol. Como se observa en la FIG. 6B, la inyección de bleomicina aumentó la cantidad de colágeno en ratones no mutantes y los ratones deficientes en cadherina-11 tuvieron un aumento marcadamente atenuado en el contenido de colágeno dérmico tras la inyección de bleomicina en la piel. Estos datos demuestran convincentemente que la cadherina-11 es una molécula crítica expresada en la piel para el desarrollo de dérmica fibrosis.

Juntos los datos en la FIG. 3-6 demuestran que la expresión de cadherina-11 aumenta en la piel de pacientes con esclerodermia y que la cadherina-11 es un mediador crítico de fibrosis dérmica en un modelo de ratón de esclerodermia. Estos datos argumentan enérgicamente que la cadherina-11 es una diana terapéutica en fibrosis dérmica y esclerodermia.

Fibrosis pulmonar. Expresión y localización de cadherina-11 en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial. Para determinar si la expresión de cadherina-11 aumenta en pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar similar a en la piel de pacientes con esclerodermia, se evaluaron los niveles de ARNm de cadherina-11 de ARN total aislado de pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) con restricción grave de las vías respiratorias frente a pacientes con FPI con función pulmonar normal (se usaron pulmones con FPI leve como "control"). Como se observa en la FIG. 7, el tejido del pulmón de pacientes con FPI grave tenía elevados niveles de colágeno tipo I (Col1a1), un componente importante de la matriz extracelular fibrótica. De acuerdo con la hipótesis de los presentes inventores, el tejido del pulmón de pacientes con FPI grave tuvo elevados niveles de cadherina-11.

Se realizó inmunolocalización para determinar los tipos de células que expresan cadherina-11 en pulmones de pacientes con FPI usando anticuerpos anti-cadherina-11 policlonales de conejo. Los pacientes con FPI leve (FIG. 6A) tuvieron expresión de cadherina-11 solo en macrófagos alveolares. El tipo de célula que expresa cadherina-11 identificada en pacientes con FPI grave fue el macrófago alveolar (FIG. 8C), pero también expresión muy importante sobre las células epiteliales alveolares (AEC) hiperplásicas adyacentes a focos fibróticos (FIG. 8B). Juntos los datos de las FIGs. 7 y 8 indican una asociación de la expresión de la cadherina-11 con la gravedad de la enfermedad y se expresa en tanto AEC hiperplásicas como macrófagos alveolares en los pulmones de pacientes afectados.

Expresión de cadherina-11 en el modelo de ratón de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. El modelo de bleomicina intratraqueal es un modelo animal comúnmente utilizado para estudiar los mecanismos de fibrosis pulmonar y fibrosis pulmonar idiopática. Para examinar la función de la cadherina-11 en este modelo, se realizó caracterización inicial usando inmunolocalización para cadherina-11 en ratones no mutantes administrados con solución salina intratraqueal o bleomicina. Similar a sujetos humanos con FPI, la inmunohistoquímica de pulmones de ratones administrados con bleomicina muestra una importante expresión de la cadherina-11 en las AEC hiperplásicas y macrófagos alveolares (FIG. 9). Estos resultados demuestran similitudes entre este modelo de ratón y seres humanos y soportan el análisis de estos tipos de células en tratar el mecanismo de fibrosis dependiente de cadherina-11.

Contribución de la cadherina-11 a la fibrosis pulmonar. Dada la elevada expresión de cadherina-11 en pulmones con FPI grave y pulmones en el modelo de fibrosis pulmonar por bleomicina, los presentes inventores quisieron determinar a continuación si la cadherina-11 participaba en el desarrollo de fibrosis pulmonar. Para examinar la contribución de la cadherina-11 a la fibrosis pulmonar, se administró bleomicina intratraqueal a ratones que carecían de cadherina-11 (Cdh11<sup>-/-</sup>) y en comparación con ratones no mutantes administrados con bleomicina. Todos los criterios de valoración se evaluaron 21 días después de la instilación de bleomicina o solución salina. Los resultados de la tinción con H&E no muestran diferencia detectable en la histología pulmonar entre ratones no mutantes (WT) y Cdh11<sup>-/-</sup> administrados con solución salina (FIGs. 10A y B). El examen de las secciones de pulmón de ratones no mutantes (WT) administrados con bleomicina muestra características histopatológicas convencionales de acuerdo con la fibrosis pulmonar que incluye inflamación, focos fibróticos y alteración de la arquitectura alveolar normal (FIG. 10C). Estos criterios de valoración histológicos son sustancialmente reducidos en ratones Cdh11<sup>-/-</sup> (FIG. 10D).

La tinción con tricromo de Masson de secciones histológicas (la matriz se tiñe de azul, las células de rojo) demuestra la elevada deposición de colágeno en ratones no mutantes administrados con bleomicina, que es reducida en ratones Cdh11<sup>-/-</sup> administrados con bleomicina (FIGs. 11A y B). También se realizaron análisis de IHC para alfa-actina de músculo liso, un marcador para miofibroblastos. Los miofibroblastos son un mediador celular clave en la patogénesis de la fibrosis que producen citocinas inflamatorias y matriz extracelular. Ratones no mutantes administrados con bleomicina tuvieron elevados números de células que se tiñen con alfa-actina de músculo liso (FIG. 11C) mientras que el número de células que se tiñen con alfa-actina de músculo liso de ratones Cdh11<sup>-/-</sup> (FIG. 11D) fue marcadamente reducido con respecto a ratones no mutantes. Los datos en FIG. 11 soportan la hipótesis de que la cadherina-11 es un mediador crítico de fibrosis pulmonar en este modelo de ratón.

Para cuantificar adicionalmente la atenuación en fibrosis pulmonar en los ratones Cdh11<sup>-/-</sup> administrados con bleomicina intratraqueal, se determinaron niveles de colágeno usando el ensayo de Sircol en el líquido broncoalveolar (BAL) de ratones no mutantes y Cdh11<sup>-/-</sup> administrados con solución salina o bleomicina. Como se observa en la FIG. 12A, la bleomicina intratraqueal aumentó significativamente la cantidad de colágeno en el líquido BAL en ratones no mutantes. A diferencia, el líquido BAL de ratones Cdh11<sup>-/-</sup> administrados con bleomicina tuvo una disminución estadísticamente significativa en el contenido de colágeno con respecto a ratones no mutantes. Finalmente, los presentes inventores usaron la puntuación de Ashcroft, un método de puntuación comúnmente usado para cuantificar la cantidad de fibrosis pulmonar sobre secciones teñidas con H&E de pulmones en el modelo. Como se observa en la FIG. 12B, los pulmones de ratones no mutantes administrados con bleomicina intratraqueal tuvieron significativamente una puntuación significativamente más alta en comparación con los pulmones de ratones Cdh11<sup>-/-</sup> administrados con bleomicina. Juntos los datos de las FIGs. 10-12 demuestran claramente que la cadherina-11 es un mediador crítico de la fibrosis pulmonar. Dados los elevados niveles de cadherina-11 en pulmones con FPI humanos, estos datos sugieren que la cadherina-11 es una diana terapéutica para la fibrosis pulmonar.

La administración sistémica del anticuerpo bloqueante CDH11 mejora la fibrosis pulmonar establecida. Los datos presentes en las FIGs. 10-12 demuestran claramente que los ratones Cdh11<sup>-/-</sup> tienen una respuesta fibrótica pulmonar atenuada en el modelo de fibrosis inducida por bleomicina. Aunque no hay diferencias histológicas macroscópicas en los pulmones de ratones no mutantes y Cdh11<sup>-/-</sup>, es importante determinar si el bloqueo de la cadherina-11 también disminuye la fibrosis pulmonar. Además, es de interés determinar si el bloqueo de la cadherina-11 es eficaz en el tratamiento de fibrosis pulmonar y no solo en prevenir el desarrollo de fibrosis como se sugiere por los estudios en ratones Cdh11<sup>-/-</sup>. La fibrosis pulmonar en el modelo de bleomicina se establece al menos 7 días después de la instilación de bleomicina (A. Moeller et al., Int Journal of Biochem and Cell Biol. 2008). Por tanto, para determinar si ratones con fibrosis establecida pueden tratarse satisfactoriamente dirigiendo la cadherina-11, ratones no mutantes se administraron con uno de los dos anticuerpos bloqueantes de cadherina-11 sistémicos (clon 23C6 o 13C2) empezando 10 días después de la instilación de bleomicina.

Se administraron ratones no mutantes con bleomicina intratraqueal. En el día 10, cuando la fibrosis ya se ha establecido, los ratones se administraron con 500 ug de tanto 23C6, 13C2, como anticuerpo de control de isotipo por vía intraperitoneal, seguido de 100 ug de anticuerpos IP cada dos días hasta el día 21. Se sacrificaron los ratones y los pulmones se procesaron para histología. Las secciones de pulmón, teñidas con H&E (FIG. 13), demostraron que los ratones no mutantes administrados con bleomicina y anticuerpos de isotipo desarrollaron fibrosis pulmonar que fue marcadamente atenuada en los ratones no mutantes que recibieron bleomicina, seguido de IP 23C6 o 13C2 empezando en el día 10.

Análisis adicionales en estos experimentos confirmaron la capacidad de 23C6 y 13C2 para tratar fibrosis pulmonar existente en el modelo de bleomicina. Como se observa en la FIG. 14, las secciones de pulmón, teñidas con tricromo de Masson, demostraron que los pulmones de ratones no mutantes administrados con bleomicina y anticuerpos de isotipo desarrollaron una deposición elevada marcada de la matriz extracelular que fue marcadamente atenuada en los ratones no mutantes que recibieron bleomicina seguido de IP 23C6 o 13C2 empezando en el día 10. Además, la tinción con alfa actina de músculo liso, el marcador del miofibroblasto, demostró que los anticuerpos anti-cadherina-11 monoclonales, 13C2 y 23C6, redujeron eficazmente el número de miofibroblastos en los pulmones de ratones administrados con bleomicina intratraqueal en comparación con anticuerpos de control de isotipo. Finalmente, los niveles de colágeno soluble, como se ha determinado por el ensayo de Sircol en líquido BAL de ratones tratados con anticuerpos anti-cadherina-11 monoclonales 13C2 o 23C6, fueron significativamente reducidos en comparación con ratones administrados con anticuerpos de control de isotipo. Estos resultados confirman los hallazgos en ratones Cdh11<sup>-/-</sup> de que CDH11 contribuye a la fibrosis pulmonar y demuestra que la administración sistémica de anticuerpo bloqueante para cadherina-11 trata satisfactoriamente la fibrosis pulmonar establecida en el modelo de fibrosis inducida por bleomicina.

Transición epitelial a mesenquimatosa (EMT). La EMT participa en la patogénesis de fibrosis, y TGF-beta puede desempeñar una función en este proceso de transición. Se sabe que durante la EMT, la expresión de E-cadherina se reduce y/o elimina. La FIG. 15 muestra que TGF-beta aumenta la expresión de cadherina-11 en células A549, una línea de células epiteliales de pulmón. Además, la expresión de Col1a1 aumenta, la expresión de E-cadherina disminuye (como era de esperar), y la expresión de N-cadherina también aumenta. Las FIGs. 16 y 17 muestran que cuando la expresión de cadherina-11 se bloquea en células A549, por ejemplo usando un ARNip específico de cadherina-11, y entonces las células se estimulan con TGF-beta, la regulación por incremento de la expresión de Col1a1 por TGF-beta se reduce espectacularmente. Además, usando microscopía de contraste de fases, es evidente que la inactivación de cadherina-11 con ARNip previene el desarrollo del fenotipo mesenquimatoso inducido por TGF-beta. En presencia de TGF-beta, las células A549 pierden los contactos célula a célula, llegan a tener forma fusiforme, y se extienden. La reducción en el nivel de cadherina-11 con ARNip previene estos cambios fenotípicos, sugiriendo que el ARNip de cadherina-11 bloquea la EMT y que la cadherina-11 participa en y media posiblemente en EMT. La FIG. 18 muestra adicionalmente que la cadherina-11 también bloquea la regulación por incremento inducida por TGF-beta de SNAIL2, un factor de transcripción de EMT clave.



REFERENCIAS

1. Mayes MD, Lacey JV, Jr., Beebe-Dimmer J et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 2003; 48(8):2246-2255.
- 5 2. Wilson L. Cost-of-illness of scleroderma: the case for rare diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 27(2):73-84.
3. Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP, III, Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med* 2004; 55:395-417.
4. Sime PJ, O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. *Clin Immunol* 2001; 99(3):308-319.
- 10 5. Wagner GR. Asbestosis and silicosis. *Lancet* 1997; 349(9061):1311-1315.
6. Vanhee D, Gosset P, Wallaert B, Voisin C, Tonnel AB. Mechanisms of fibrosis in coal workers' pneumoconiosis. Increased production of platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor type I, and transforming growth factor beta and relationship to disease severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150(4):1049-1055.
- 15 7. Abid SH, Malhotra V, Perry MC. Radiation-induced and chemotherapy-induced pulmonary injury. *Curr Opin Oncol* 2001; 13(4):242-248.
8. Steen VD, Owens GR, Fino GJ, Rodnan GP, Medsger TA, Jr. Pulmonary involvement in systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1985; 28(7):759-767.
- 20 9. Majumdar S, Li D, Ansari T et al. Different cytokine profiles in cryptogenic fibrosing alveolitis and fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis: a quantitative study of open lung biopsies. *Eur Respir J* 1999; 14(2):251-257.
10. Lewis MJ, Lewis EH, III, Amos JA, Tsongalis GJ. Cystic fibrosis. *Am J Clin Pathol* 2003; 120 Suppl:S3-13.
11. Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest* 2003; 111(3):291-297.
- 25 12. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150(4):967-972.
13. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(7):810-816.
- 30 14. Panos RJ, Mortenson RL, Niccoli SA, King TE, Jr. Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: causes and assessment. *Am J Med* 1990; 88(4):396-404.
15. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134(2):136-151.
- 35 16. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1980; 23(5):581-590.
17. Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK et al. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* 2007; 315(5814):1006-1010.

EQUIVALENTES

40 Debe entenderse que todas las definiciones, como se definen y usan en el presente documento, controlan por encima de las definiciones del diccionario, definiciones en documentos citados y/o significados habituales de los términos definidos.

Todas las referencias, patentes y solicitudes de patente desveladas en el presente documento se incorporan por referencia con respecto a la materia para la que cada una se cita, que en algunos casos puede englobar la totalidad del documento.

45 Debe entenderse que los artículos indefinidos "un" y "una", como se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, significan "al menos uno".

La expresión "y/o", como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, debe entenderse que significa "cualquiera o ambos" de los elementos así unidos, es decir, elementos que están

conjuntivamente presentes en algunos casos y disyuntivamente presentes en otros casos. Múltiples elementos enumerados con "y/o" deben interpretarse del mismo modo, es decir, "uno o más" de los elementos así unidos. Otros elementos pueden estar opcionalmente presentes distintos de los elementos específicamente identificados por la cláusula "y/o", tanto relacionados como sin relacionar con aquellos elementos específicamente identificados. Así, como ejemplo no limitante, una referencia a "A y/o B", cuando se usa conjuntamente con el lenguaje de extremos abiertos tal como "que comprende" puede referirse, en una realización, a A solo (que incluye opcionalmente elementos distintos de B); en otra realización a B solo (que incluye opcionalmente elementos distintos de A); en otra realización más a tanto A como a B (que incluye opcionalmente otros elementos); etc.

Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, debe entenderse que "o" tiene el mismo significado que "y/o" como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, cuando se separan puntos en una lista, debe interpretarse que "o" o "y/o" son incluyentes, es decir, la inclusión de al menos uno, pero que también incluye más de uno, de un número o lista de elementos, y, opcionalmente, puntos sin enumerar adicionales. Solo términos claramente indicados al contrario, tales como "solo uno de" o "exactamente uno de", o, cuando se usa en las reivindicaciones, "que consiste en", se referirán a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término "o", como se usa en el presente documento, solo debe interpretarse como que indica alternativas exclusivas (es decir, "uno o el otro, pero no ambos") cuando va precedido por términos de exclusividad, tales como "cualquiera", "uno de", "solo uno de", o "exactamente uno de". "Que consiste esencialmente en", cuando se usa en las reivindicaciones, debe tener su significado habitual como se usa en el campo de la ley de patentes.

Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, debe entenderse que significa al menos un elemento seleccionado de uno cualquiera o más de los elementos en la lista de elementos, pero no necesariamente que incluye al menos uno de todos y cada uno de los elementos específicamente enumerados dentro de la lista de elementos y que no excluye ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que puedan estar opcionalmente presentes elementos distintos de los elementos específicamente identificados en la lista de elementos a los que se refiere la expresión "al menos uno", tanto si está relacionado como sin relacionar con aquellos elementos específicamente identificados. Así, como ejemplo no limitante, "al menos uno de A y B" (o, equivalentemente, "al menos uno de A o B," o, equivalentemente "al menos uno de A y/o B") puede referirse, en una realización, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A, sin B presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de B); en otra realización, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B, sin A presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de A); en otra realización más, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A, y al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B (y opcionalmente que incluye otros elementos); etc.

Debe también entenderse que, a menos que se indique claramente al contrario, en cualquier método reivindicado en el presente documento que incluye más de una etapa o acto, el orden de las etapas o actos del método no está necesariamente limitado al orden en el que se citan las etapas o actos del método.

En las reivindicaciones, además de en la memoria descriptiva anterior, debe entenderse que todas las expresiones de transición tales como "que comprende", "que incluye", "que lleva", "que tiene", "que contiene", "que implica", "que conserva", "compuesto de" y similares son de extremos abiertos, es decir, significa que incluyen, pero no se limitan a. Solo las expresiones de transición "que consisten en" y "que consisten esencialmente en" deben ser expresiones de transición cerradas o semi-cerradas, respectivamente, como se exponen en el United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures, Section 2111.03.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc. Board of Regents, The University of Texas System Agarwal, Sandeep K. Schneider, Daniel J. Brenner, Michael B.

<120> DETECCIÓN Y TRATAMIENTO DE FIBROSIS

<130> B0801.70366WO00

<140> Todavía no asignado

<141> 04-05-2011

<150> US 61/331.355

ES 2 596 431 T3

<151> 04-05-2010

<150> US 61/331.357

<151> 04-05-2010

5

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 3654

<212> ADN

<213> H. sapiens

15

<400> 1

```
agatgccgcg ggggccgctc gcagccgccg ctgacttgtg aatgggaccg ggactggggc      60
cgggactgac accgcagcgc ttgccctgcg ccagggactg gcggtctgga ggttgcgtcc      120
accctcaagg gccccagaaa tcactgtggt ttcagctcag cggccctgtg acattccttc      180
gtgttgtcat ttgttgagtg accaatcaga tgggtggagt gtgttacaga aattggcagc      240
aagtatccaa tgggtgaaga agaagctaac tggggacgtg ggcagccctg acgtgatgag      300
ctcaaccagc agagacattc catccaaga gaggtctgcg tgacgcgtcc gggaggccac      360
cctcagcaag accaccgtac agttggtgga aggggtgaca gctgcattct cctgtgccta      420
ccacgtaacc aaaaatgaag gagaactact gtttacaagc cgccctggtg tgcctgggca      480
tgctgtgcca cagccatgcc tttgccccag agcggcgggg gcacctgcgg ccctccttcc      540
atgggcacca tgagaagggc aaggaggggc aggtgctaca gcgctccaag cgtggtggg      600
tctggaacca gttcttcgtg atagaggagt acaccgggcc tgaccccgctg cttgtgggca      660
ggcttcattc agatattgac tctggtgatg ggaacattaa atacattctc tcaggggaag      720
gagctggaac catttttgtg attgatgaca aatcagggaa cattcatgcc accaagacgt      780
tggatcgaga agagagagcc cagtacacgt tgatggctca ggcggtggac agggacacca      840
atcgccact ggagccaccg tcggaattca ttgtcaaggt ccaggacatt aatgacaacc      900
ctccggagtt cctgcacgag acctatcatg ccaacgtgcc tgagaggtcc aatgtgggaa      960
cgtcagtaat ccaggtgaca gcttcagatg cagatgacct cacttatgga aatagcgcca     1020
```

ES 2 596 431 T3

agttagtgta cagtatcctc gaaggacaac cctatTTTTc ggtggaagca cagacaggtg 1080  
 tcatcagaac agccctaccc aacatggaca gggaggccaa ggaggagtac cacgtggtga 1140  
 tccaggccaa ggacatgggt ggacatatgg ggggactctc agggacaacc aaagtgacga 1200  
 tcacactgac cgatgtcaat gacaaccac caaagtttcc gcagagcgta taccagatgt 1260  
 ctgtgtcaga agcagccgtc cctggggagg aagtaggaag agtgaaagct aaagatccag 1320  
 acattggaga aatggctta gtcacataca atattgttga tggagatggt atggaatcgt 1380  
 ttgaaatcac aacggactat gaaacacagg agggggtgat aaagctgaa aagcctgtag 1440  
 attttgaaac caaaagagcc tatagcttga aggtagaggc agccaacgtg cacatcgacc 1500  
 cgaagtttat cagcaatggc cctttcaagg aactgtgac cgtcaagatc tcagtagaag 1560  
 atgctgatga gccccctatg ttcttggccc caagttacat ccacgaagtc caagaaaatg 1620  
 cagctgctgg caccgtggtt gggagagtgc atgccaaaga cctgatgct gccaacagcc 1680  
 cgataaggta ttccatcgat cgtcacactg acctcgacag atttttcaact attaatccag 1740  
 aggatggttt tattaact acaaacctc tggatagaga ggaaacagcc tggctcaaca 1800  
 tcaactgctt tgcagcagaa atccacaatc ggcacagga agccaaagtc ccagtggcca 1860  
 ttagggtcct tgatgtcaac gataatgctc ccaagtttgc tgccccttat gaaggttca 1920  
 tctgtgagag tgatcagacc aagccactt ccaaccagcc aattgttaca attagtgcag 1980  
 atgacaagga tgacacggcc aatggaccaa gatttatctt cagcctaccc cctgaaatca 2040  
 ttcacaatcc aaatttcaca gtcagagaca accgagataa cacagcaggc gtgtacgccc 2100  
 ggcgtggagg gttcagtcgg cagaagcagc acttgtacct tctgcccata gtgatcagcg 2160  
 atggcggcat cccgcccag agtagcacca acaccctcac catcaaagtc tgcgggtgcg 2220  
 acgtgaacgg ggcactgctc tctgcaacg cagaggccta cattctgaac gccgcctga 2280  
 gcacagggcg cctgatcgcc atcctgcct gcatcgctcat tctcctggtc attgtagtat 2340  
 tgtttgtgac cctgagaag caaaagaaag aaccactcat tgtctttgag gaagaagatg 2400  
 tccgtgagaa catcattact tatgatgatg aaggggtgg ggaagaagac acagaagcct 2460  
 ttgatattgc caccctccag aatcctgatg gtatcaatgg atttatcccc cgcaaagaca 2520  
 tcaaacctga gtatcagtac atgcctagac ctgggctccg gccagcggcc aacagcgtgg 2580  
 atgtcgatga cttcatcaac acgagaatac aggaggcaga caatgacccc acggctcctc 2640  
 cttatgactc cattcaaac tacggttatg aaggcaggg ctcagtggcc gggtcctga 2700  
 gctccctaga gtcggccacc acagattcag acttgacta tgattatcta cagaactggg 2760  
 gacctcgtt taagaaacta gcagatttgt atggttcaa agacactttt gatgacgatt 2820  
 cttacaata acgatacaaa tttggcctta agaactgtgt ctggcgttct caagaatcta 2880  
 gaagatgtgt aaacaggtat tttttaaat caaggaaagg ctcatthaaa acaggcaaag 2940  
 ttttacagag aggatacatt taataaaact gcgaggacat caaagtggta aatactgtga 3000

ES 2 596 431 T3

aatacctttt ctcacaaaaa ggcaaatatt gaagttgttt atcaacttcg ctgaaaaaa 3060  
 aaaacacttg gcatacaaaa tatttaagtg aaggagaagt ctaacgctga actgacaatg 3120  
 aagggaattt gtttatgtgt tatgaacatc caagtctttc ttctttttta agttgtcaaa 3180  
 gaagcttcca caaaattaga aaggacaaca gttctgagct gtaatttcgc cttaaactct 3240  
 ggacactcta tatgtagtgc atttttaaac ttgaaatata taatattcag ccagcttaaa 3300  
 cccatacaat gtatgtacaa tacaatgtac aattatgtct cttgagcatc aatcttgta 3360  
 ctgctgattc ttgtaaactc ttttgcttct actttcatct taaactaata cgtgccagat 3420  
 ataactgtct tgtttcagtg agagacgccc tatttctatg tcatttttaa tgtatctatt 3480  
 tgtacaattt taaagttctt attttagtat acgtataaat atcagtattc tgacatgtaa 3540  
 gaaaatgta cggcatcaca cttatatttt atgaacattg tactgttgct ttaatatgag 3600  
 cttcaatata agaagcaatc tttgaaataa aaaaagattt ttttttaaaa aaaa 3654

<210> 2

<211> 796

5

<212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 2

Met Lys Glu Asn Tyr Cys Leu Gln Ala Ala Leu Val Cys Leu Gly Met  
 1 5 10 15  
 Leu Cys His Ser His Ala Phe Ala Pro Glu Arg Arg Gly His Leu Arg  
 20 25 30  
 Pro Ser Phe His Gly His His Glu Lys Gly Lys Glu Gly Gln Val Leu  
 35 40 45  
 Gln Arg Ser Lys Arg Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu  
 50 55 60  
 Glu Tyr Thr Gly Pro Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp  
 65 70 75 80  
 Ile Asp Ser Gly Asp Gly Asn Ile Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Glu Gly  
 85 90 95  
 Ala Gly Thr Ile Phe Val Ile Asp Asp Lys Ser Gly Asn Ile His Ala  
 100 105 110  
 Thr Lys Thr Leu Asp Arg Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Thr Leu Met Ala  
 115 120 125  
 Gln Ala Val Asp Arg Asp Thr Asn Arg Pro Leu Glu Pro Pro Ser Glu  
 130 135 140

ES 2 596 431 T3

Phe Ile Val Lys Val Gln Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Glu Phe Leu  
 145 150 155 160  
 His Glu Thr Tyr His Ala Asn Val Pro Glu Arg Ser Asn Val Gly Thr  
 165 170 175  
 Ser Val Ile Gln Val Thr Ala Ser Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr Gly  
 180 185 190  
 Asn Ser Ala Lys Leu Val Tyr Ser Ile Leu Glu Gly Gln Pro Tyr Phe  
 195 200 205  
 Ser Val Glu Ala Gln Thr Gly Ile Ile Arg Thr Ala Leu Pro Asn Met  
 210 215 220  
 Asp Arg Glu Ala Lys Glu Glu Tyr His Val Val Ile Gln Ala Lys Asp  
 225 230 235 240  
 Met Gly Gly His Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Lys Val Thr Ile  
 245 250 255  
 Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Lys Phe Pro Gln Ser Val  
 260 265 270  
 Tyr Gln Met Ser Val Ser Glu Ala Ala Val Pro Gly Glu Glu Val Gly  
 275 280 285  
 Arg Val Lys Ala Lys Asp Pro Asp Ile Gly Glu Asn Gly Leu Val Thr  
 290 295 300  
 Tyr Asn Ile Val Asp Gly Asp Gly Met Glu Ser Phe Glu Ile Thr Thr  
 305 310 315 320  
 Asp Tyr Glu Thr Gln Glu Gly Val Ile Lys Leu Lys Lys Pro Val Asp  
 325 330 335  
 Phe Glu Thr Lys Arg Ala Tyr Ser Leu Lys Val Glu Ala Ala Asn Val  
 340 345 350  
 His Ile Asp Pro Lys Phe Ile Ser Asn Gly Pro Phe Lys Asp Thr Val  
 355 360 365  
 Thr Val Lys Ile Ser Val Glu Asp Ala Asp Glu Pro Pro Met Phe Leu  
 370 375 380  
 Ala Pro Ser Tyr Ile His Glu Val Gln Glu Asn Ala Ala Ala Gly Thr  
 385 390 395 400

ES 2 596 431 T3

Val Val Gly Arg Val His Ala Lys Asp Pro Asp Ala Ala Asn Ser Pro  
 405 410 415

Ile Arg Tyr Ser Ile Asp Arg His Thr Asp Leu Asp Arg Phe Phe Thr  
 420 425 430

Ile Asn Pro Glu Asp Gly Phe Ile Lys Thr Thr Lys Pro Leu Asp Arg  
 435 440 445

Glu Glu Thr Ala Trp Leu Asn Ile Thr Val Phe Ala Ala Glu Ile His  
 450 455 460

Asn Arg His Gln Glu Ala Lys Val Pro Val Ala Ile Arg Val Leu Asp  
 465 470 475 480

Val Asn Asp Asn Ala Pro Lys Phe Ala Ala Pro Tyr Glu Gly Phe Ile  
 485 490 495

Cys Glu Ser Asp Gln Thr Lys Pro Leu Ser Asn Gln Pro Ile Val Thr  
 500 505 510

Ile Ser Ala Asp Asp Lys Asp Asp Thr Ala Asn Gly Pro Arg Phe Ile  
 515 520 525

Phe Ser Leu Pro Pro Glu Ile Ile His Asn Pro Asn Phe Thr Val Arg  
 530 535 540

Asp Asn Arg Asp Asn Thr Ala Gly Val Tyr Ala Arg Arg Gly Gly Phe  
 545 550 555 560

Ser Arg Gln Lys Gln Asp Leu Tyr Leu Leu Pro Ile Val Ile Ser Asp  
 565 570 575

Gly Gly Ile Pro Pro Met Ser Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Lys Val  
 580 585 590

Cys Gly Cys Asp Val Asn Gly Ala Leu Leu Ser Cys Asn Ala Glu Ala  
 595 600 605

Tyr Ile Leu Asn Ala Gly Leu Ser Thr Gly Ala Leu Ile Ala Ile Leu  
 610 615 620

Ala Cys Ile Val Ile Leu Leu Val Ile Val Val Leu Phe Val Thr Leu  
 625 630 635 640

Arg Arg Gln Lys Lys Glu Pro Leu Ile Val Phe Glu Glu Glu Asp Val  
 645 650 655

ES 2 596 431 T3

Arg Glu Asn Ile Ile Thr Tyr Asp Asp Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp  
 660 665 670

Thr Glu Ala Phe Asp Ile Ala Thr Leu Gln Asn Pro Asp Gly Ile Asn  
 675 680 685

Gly Phe Ile Pro Arg Lys Asp Ile Lys Pro Glu Tyr Gln Tyr Met Pro  
 690 695 700

Arg Pro Gly Leu Arg Pro Ala Pro Asn Ser Val Asp Val Asp Asp Phe  
 705 710 715 720

Ile Asn Thr Arg Ile Gln Glu Ala Asp Asn Asp Pro Thr Ala Pro Pro  
 725 730 735

Tyr Asp Ser Ile Gln Ile Tyr Gly Tyr Glu Gly Arg Gly Ser Val Ala  
 740 745 750

Gly Ser Leu Ser Ser Leu Glu Ser Ala Thr Thr Asp Ser Asp Leu Asp  
 755 760 765

Tyr Asp Tyr Leu Gln Asn Trp Gly Pro Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp  
 770 775 780

Leu Tyr Gly Ser Lys Asp Thr Phe Asp Asp Asp Ser  
 785 790 795

<210> 3

<211> 34

5 <212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 3

Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu Glu Tyr Thr Gly Pro  
 1 5 10 15

Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp Ile Asp Ser Gly Asp  
 20 25 30

Gly Asn

10

<210> 4

<211> 21

<212> ARN

<213> secuencia artificial

15

<220>



<223> ARNip de Cdh11 humana

<400> 4

uuugaaugga gucauaaggu u 21

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un antagonista de cadherina-11:

(a) en una cantidad eficaz para reducir la fibrosis para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene fibrosis; o

5 (b) en una cantidad eficaz para prevenir o retrasar la aparición de síntomas asociados a la fibrosis para su uso en un método de tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar fibrosis;

en el que el antagonista de cadherina-11 es un péptido de unión a cadherina-11 o un antagonista de ácido nucleico de cadherina-11.

2. Un antagonista de cadherina-11 para su uso según la reivindicación 1, en el que la fibrosis es:

10 (a) fibrosis dérmica;

(b) fibrosis no dérmica;

(c) fibrosis pulmonar

(d) fibrosis hepática;

(e) fibrosis pulmonar idiopática;

15 (f) fibrosis pulmonar idiopática grave

3. Un antagonista de cadherina-11 para su uso según la reivindicación 1 o 2(a), en el que el sujeto tiene esclerodermia.

4. Un antagonista de cadherina-11 para su uso según la reivindicación 1, en el que el antagonista de cadherina-11 es un péptido de unión y:

20 (a) es un anticuerpo anti-cadherina-11 o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno;

(b) es una proteína de fusión de cadherina-11; o

(c) comprende cadherina de longitud completa o un fragmento de la misma.

5. Un antagonista de cadherina-11 para su uso según la reivindicación 1, en el que el antagonista de cadherina-11 es un antagonista de ácido nucleico y es:

25 (a) un ARNip de cadherina-11;

(b) una ribozima de cadherina-11;

(c) una molécula antisentido de cadherina-11; o

(d) un ácido nucleico que codifica cadherina-11 de longitud completa o un fragmento de la misma.

30 6. Un antagonista de cadherina-11 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el antagonista de cadherina-11 se administra por inhalación, por vía intranasal o por vía intraperitoneal.

7. Un antagonista de cadherina-11 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el método comprende además administrar al sujeto un inmunosupresor, opcionalmente en el que el inmunosupresor es un esteroide.

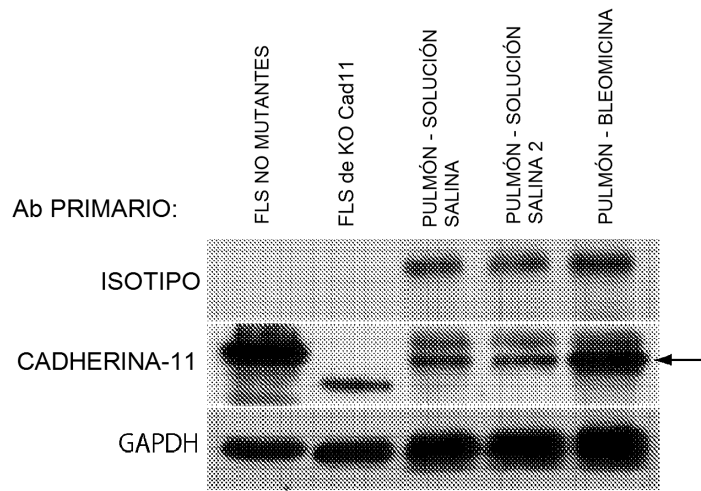


Fig. 1

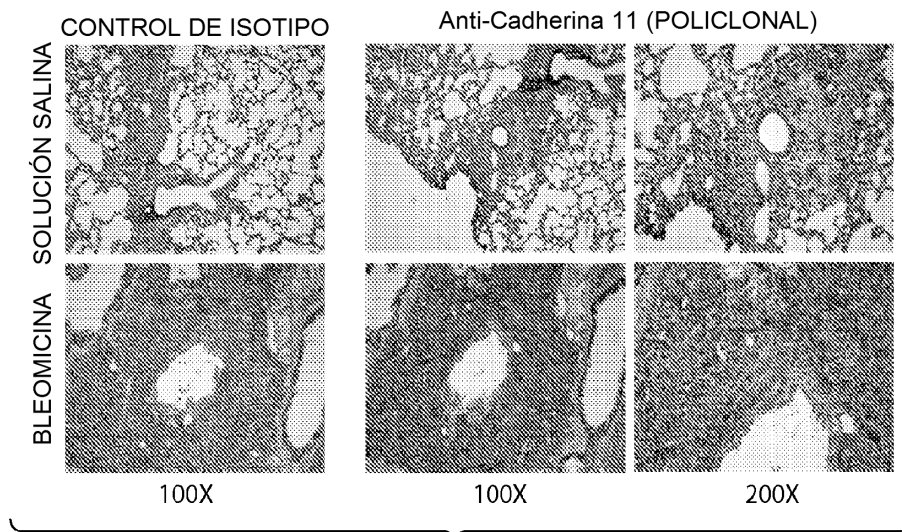


Fig. 2

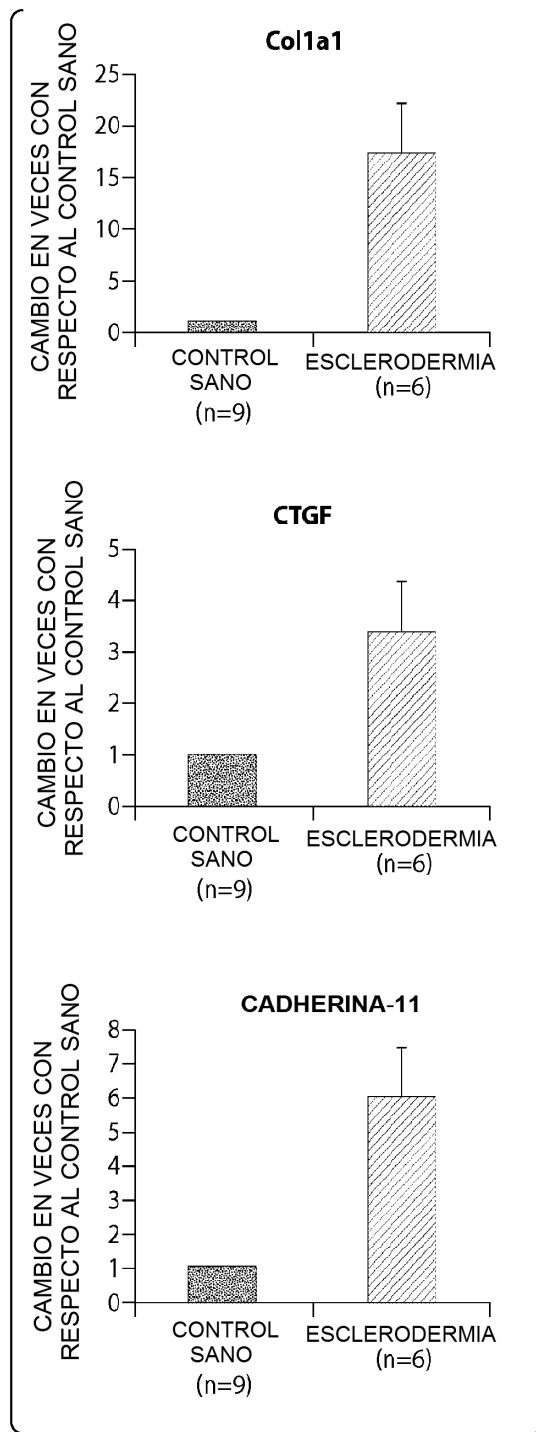


Fig. 3

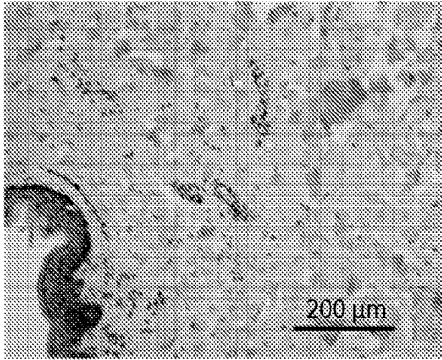


Fig. 4A

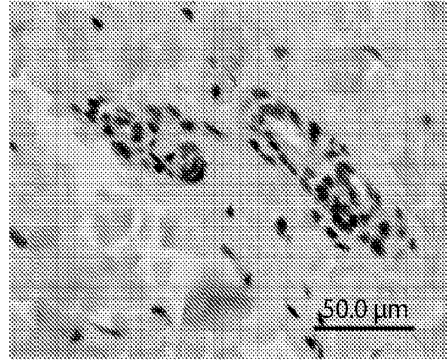


Fig. 4B

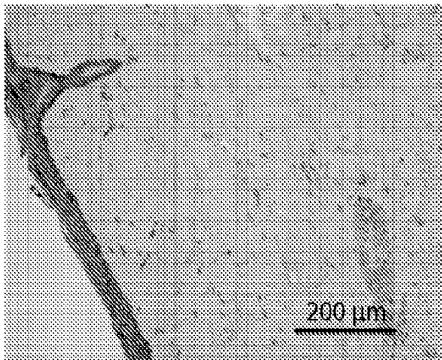


Fig. 4C

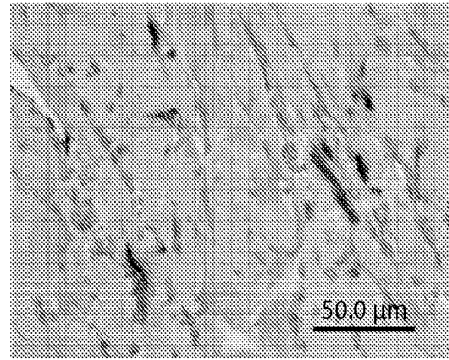


Fig. 4D

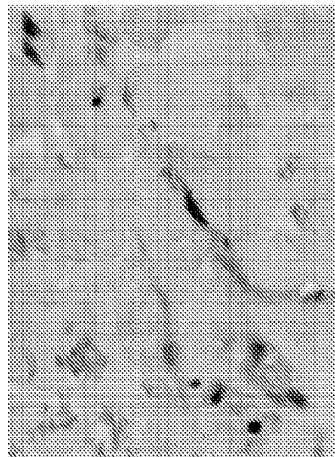


Fig. 4E

Wt

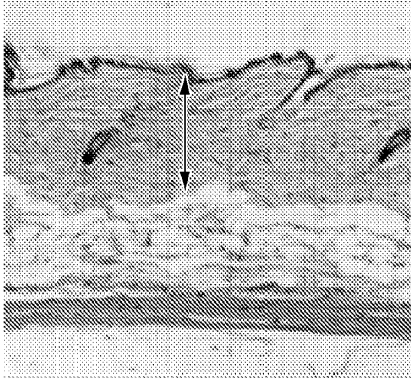


Fig. 5A

Cad-11 Ko

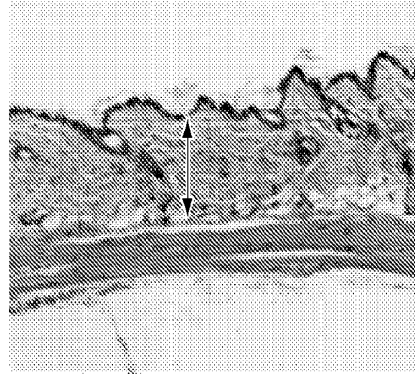


Fig. 5B

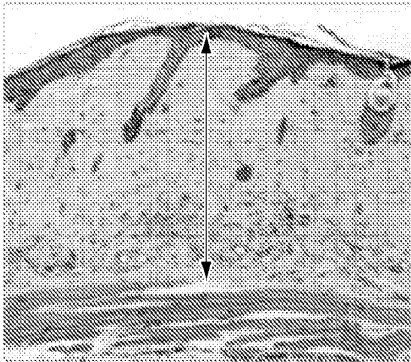


Fig. 5C

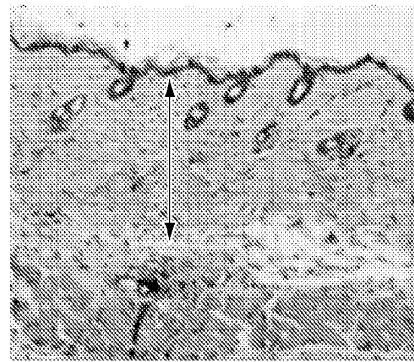


Fig. 5D

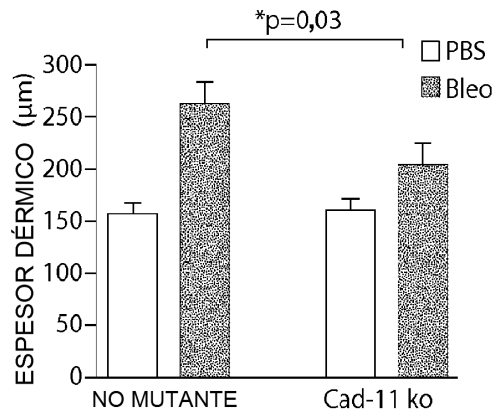


Fig. 6A

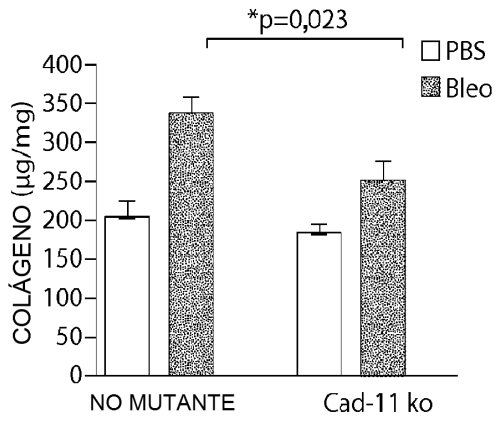


Fig. 6B

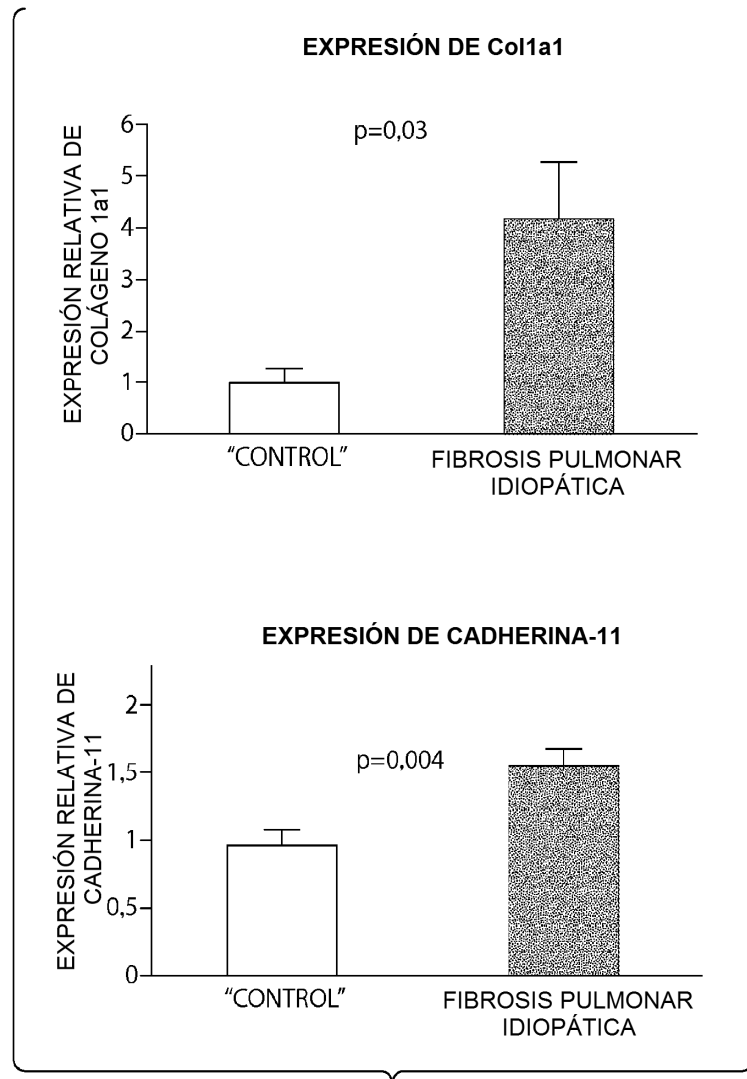


Fig. 7



FPI LEVE

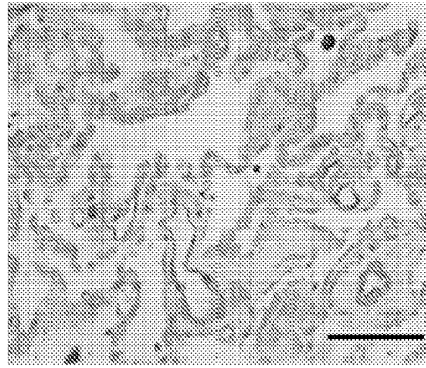


Fig. 8A

FPI GRAVE

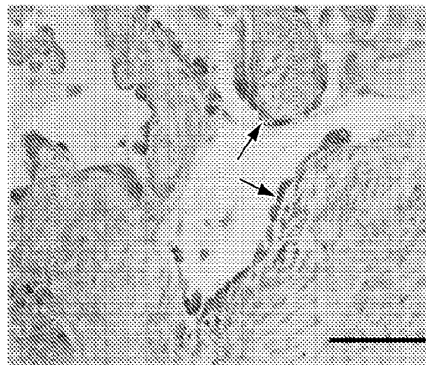


Fig. 8B

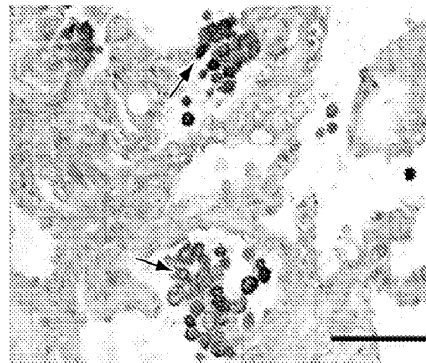


Fig. 8C

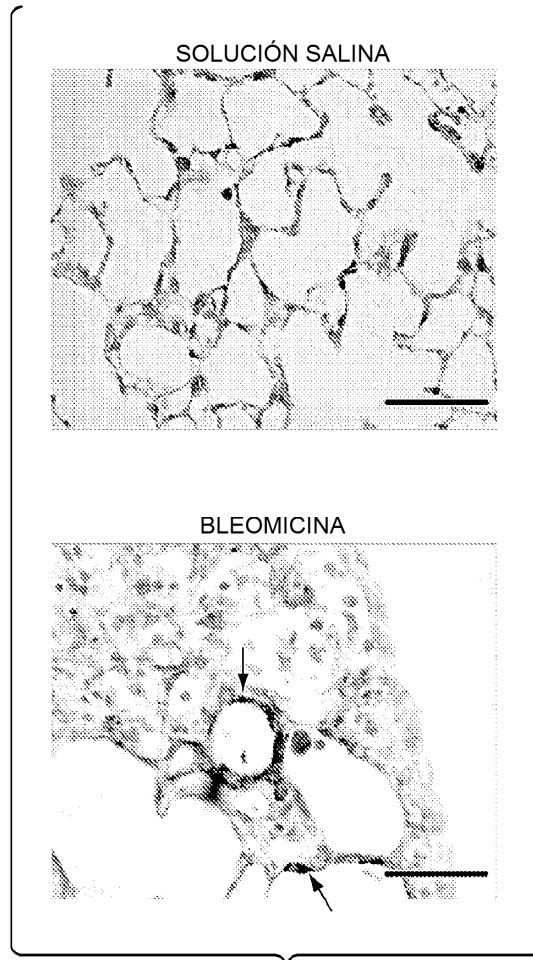


Fig. 9

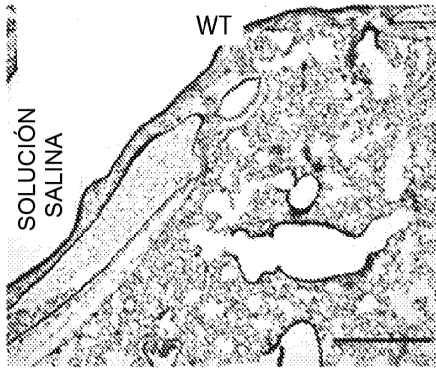


Fig. 10A

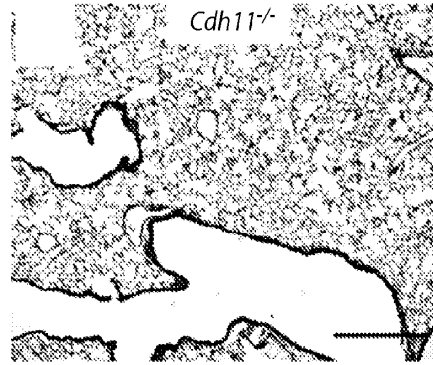


Fig. 10B

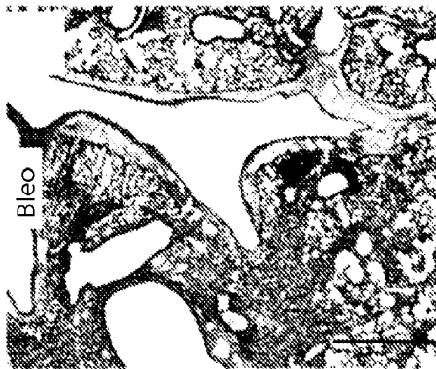


Fig. 10C

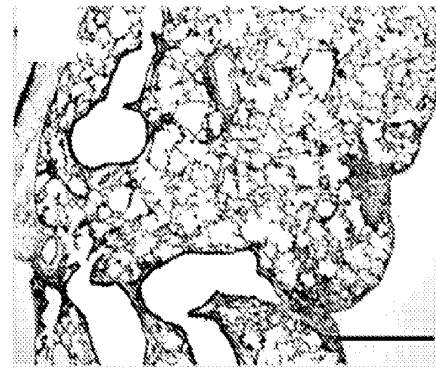


Fig. 10D

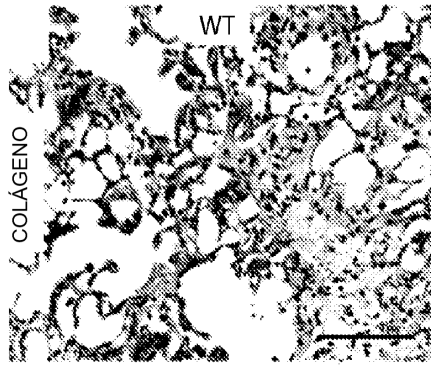


Fig. 11A

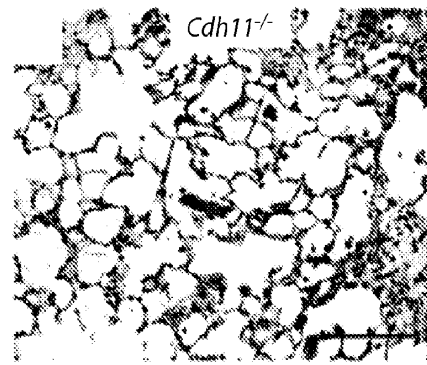


Fig. 11B

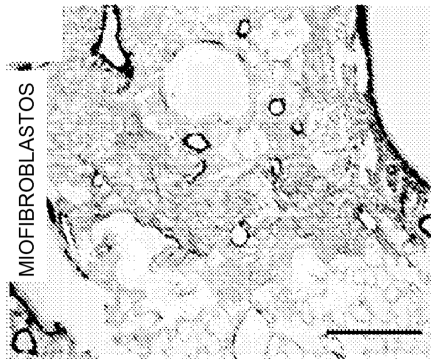


Fig. 11C

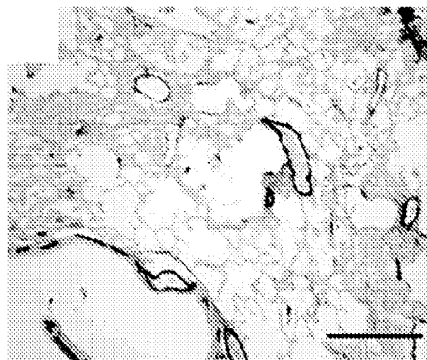


Fig. 11D

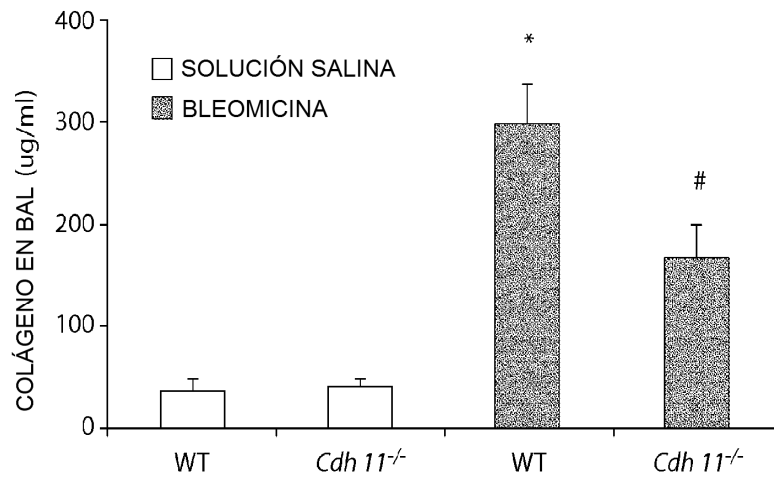


Fig. 12A

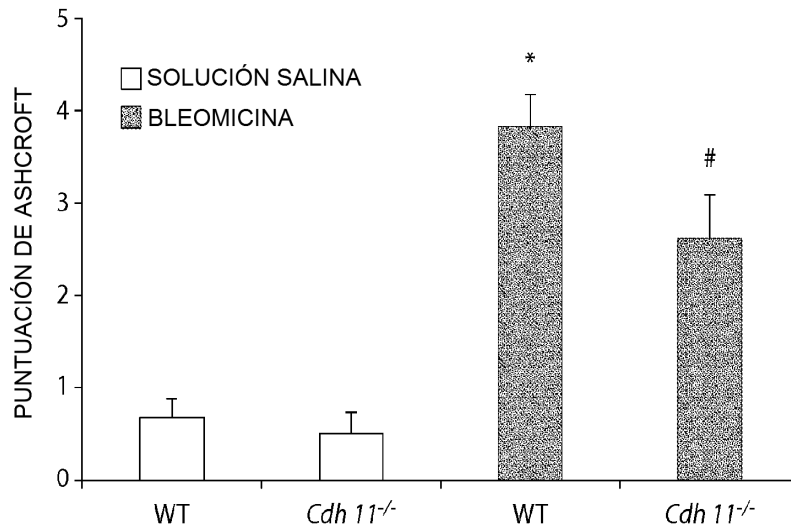


Fig. 12B

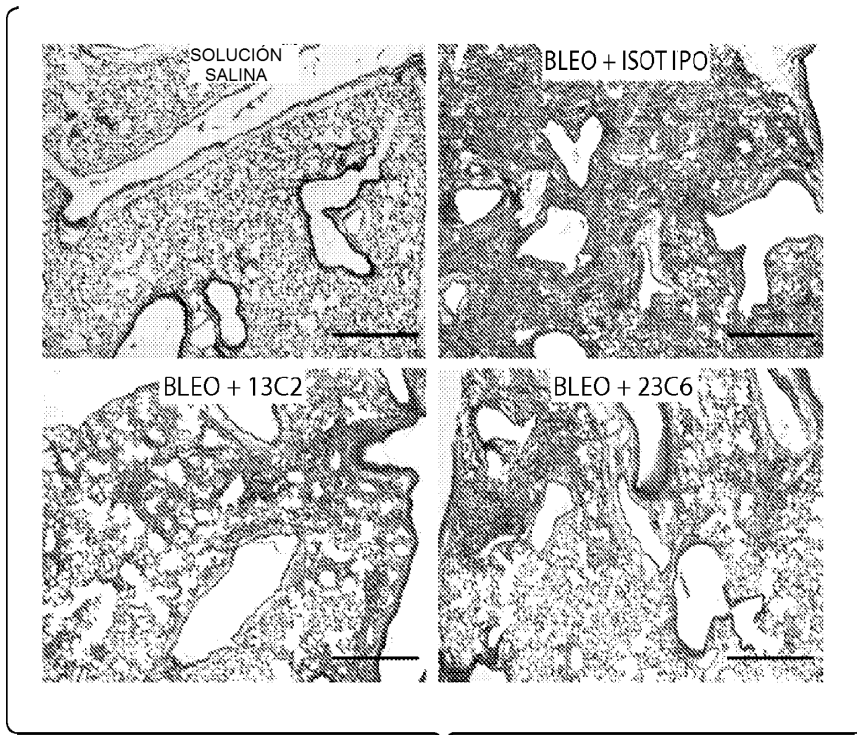


Fig. 13

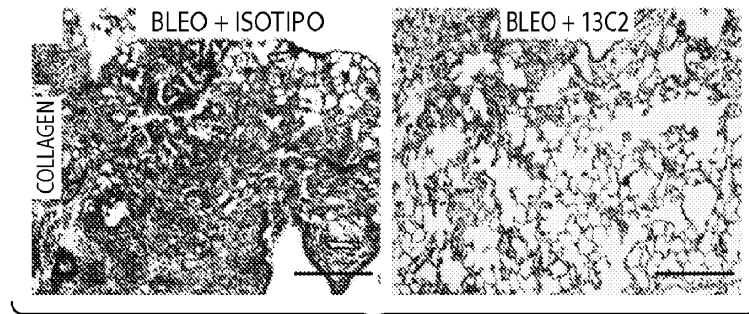


Fig. 14A

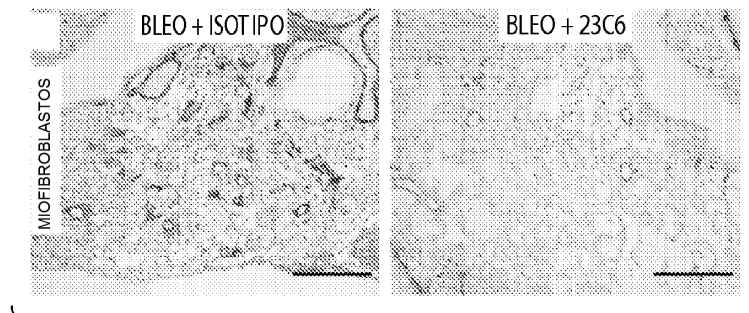


Fig. 14B

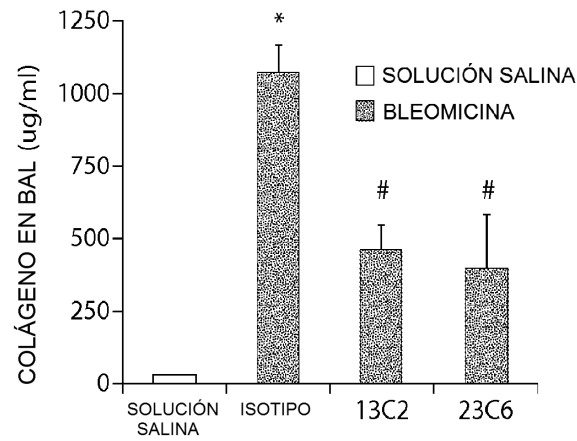


Fig. 14C

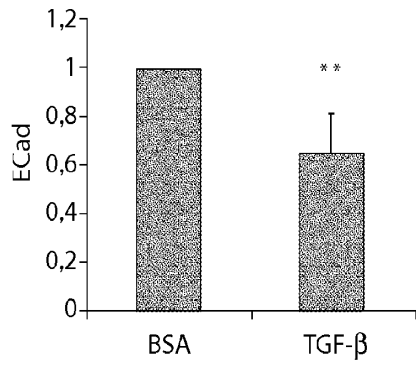


Fig. 15A

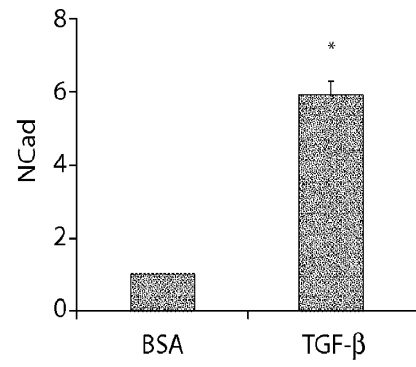


Fig. 15B

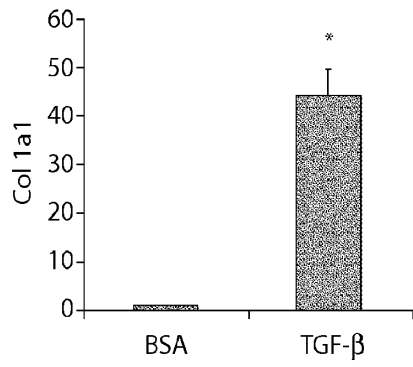


Fig. 15C

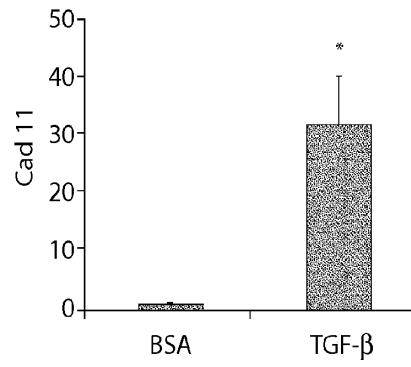


Fig. 15D



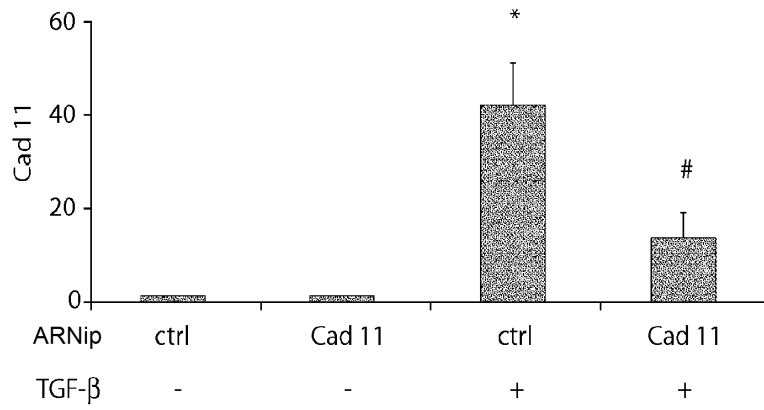


Fig. 16A

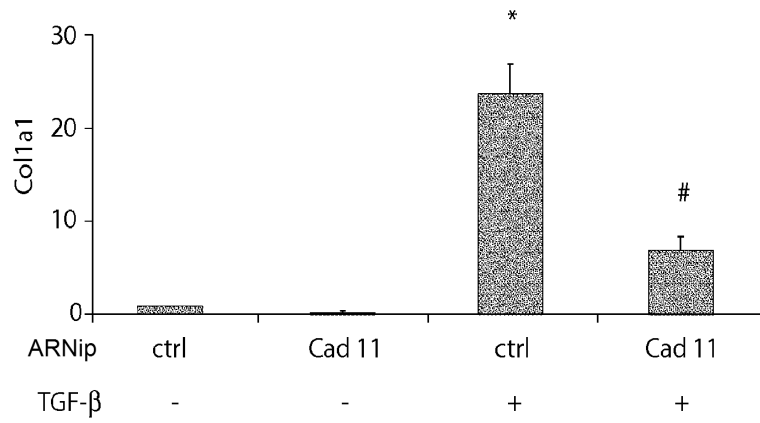


Fig. 16B

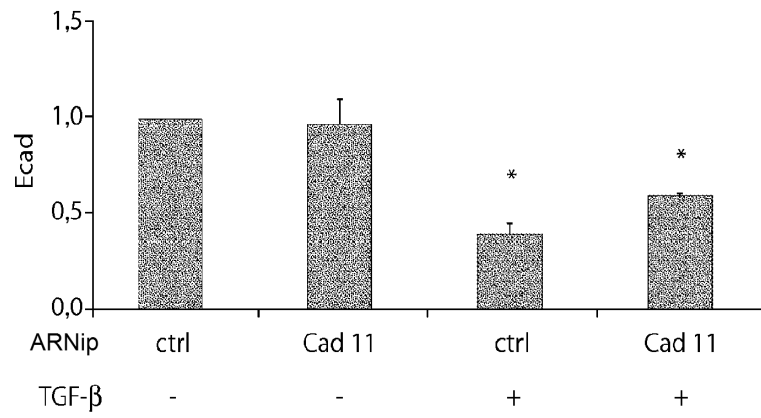


Fig. 16C

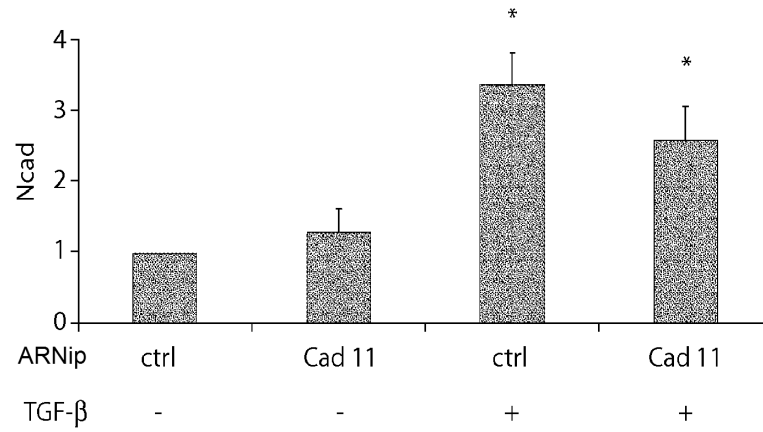


Fig. 16D

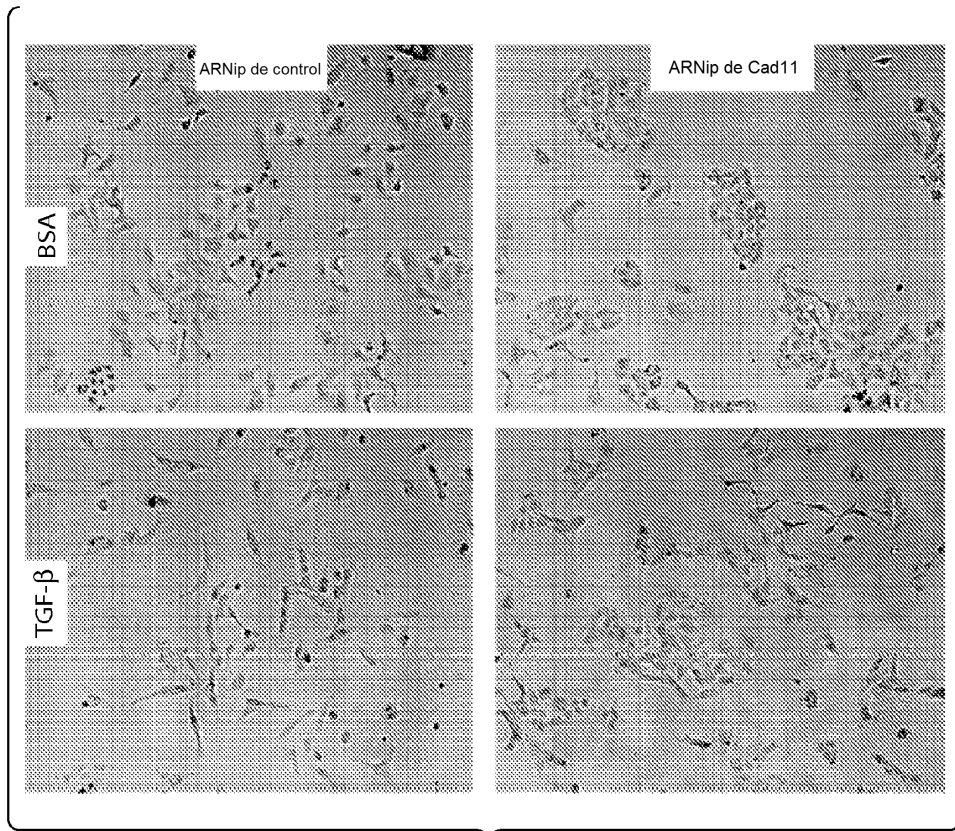


Fig. 17

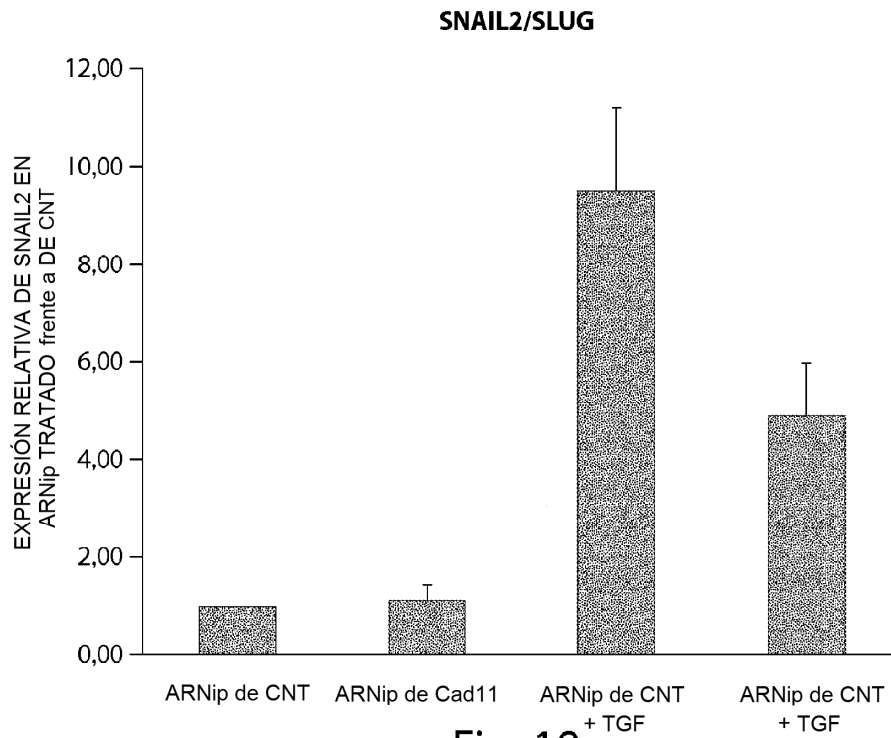


Fig. 18

ES 2 596 431 T3

SEQ ID NO:1

```

1 agatgccgcg ggggccgctc gcagccgccc ctgacttgtg aatgggaccg ggactggggc
61 cgggactgac accgcagcgc ttgccctgcg ccagggactg gcggctcggg gggttgcgtcc
121 accctcaagg gccccagaaa tcaactgtgtt ttcagctcag cggccctgtg acattccttc
181 gtgttgtcat ttgttgagtg accaatcaga tgggtggagt gtgttacaga aattggcagc
241 aagtatocaa tgggtgaaga agaagctaac tggggacgtg ggcagcccctg acgtgatgag
301 ctcaaccagc agagacattc catccaaga gaggtctgcg tgacgcgtcc gggaggccac
361 cctcagcaag accaccgtac agttggtgga aggggtgaca gctgcattct cctgtgecta
421 ccacgtaacc aaaaatgaag gagaactact gtttacaagc cgccctggtg tgccctgggca
481 tgctgtgcca cagccatgcc tttgccccag agcggcgggg gcacctgcgg ccctccttcc
541 atgggcacca tgagaagggc aaggaggggc aggtgctaca gcgctccaag cgtggctggg
601 tctggaacca gttcttcgtg atagaggagt acaccgggcc tgaccccgtg cttgtgggca
661 ggcttcattc agatattgac tctggtgatg ggaacattaa atacattctc tcagggggag
721 gagctggaac catttttgtg attgatgaca aatcagggaa cattcatgcc accaagacgt
781 tggatcgaga agagagagcc cagtacacgt tgatggctca ggcggtggac agggacacca
841 atcggccact ggagccaccg tcggaattca ttgtcaaggt ccaggacatt aatgacaacc
901 ctccggagtt cctgcacgag acctatcatg ccaacgtgcc tgagaggctc aatgtgggaa
961 cgtcagtaat ccaggtgaca gcttcagatg cagatgacct cacttatgga aatagcgcca
1021 agtttagtga cagtatctc gaaggacaac cctatttttc ggtggaagca cagacaggta
1081 tcatcagaac agccctaccc aacatggaca gggaggccaa ggaggagtac cacctggtga
1141 tccaggccaa ggacatgggt ggacatatgg gcggactctc agggacaacc aaagtgacga
1201 tcacactgac cgatgtcaat gacaacccac caaagtttcc gcagagcgta taccagatgt
1261 ctggtgcaga agcagccgctc cctggggagg aagtaggaag agtgaagctc aaagatccag
1321 acattggaga aaatggctta gtcacataca atattgttga tggagatggt attggaatcgt
1381 ttgaaatcac aacggactat gaaacacagg agggggtgat aaagctgaaa aagcctgtag
1441 attttgaaac caaaagagcc tatagcttga aggtagaggc agccaacgtg cacatcgacc
1501 cgaagtttat cagcaatggc cctttcaagg acactgtgac cgtcaagatc tcagtagaag
1561 atgctgatga gccccctatg ttcttggccc caagttacat ccacgaagtc caagaaaatg
1621 cagctgctgg caccgtggtt gggagagtgc atgccaaga ccctgatgct gccaacagcc
1681 cgataaggta ttccatcgat cgtcacactg acctcgacag atttttcact attaatccag
1741 aggatggttt tattaaaact acaaaacctc tggatagaga ggaaacagcc tggctcaaca
1801 tcaactgtctt tgcagcagaa atccacaatc ggcacagga agccaagtc ccagtggcca
1861 ttagggtcct tgatgtcaac gataatgctc ccaagtttgc tgccccttat gaaggtttca
1921 tctgtgagag tgatcagacc aagccacttt ccaaccagcc aattgttaca attagtgcag
1981 attgacaagga tgacacggcc aatggaccaa gatttatctt cagcctacce cctgaaatca
2041 ttcacaatcc aaatttcaca gtcagagaca accgagataa cacagcaggc gtgtacgccc
2101 ggcgtggagg gttcagtcgg cagaagcagg acttgtacct tctgcccata gtgatcagcg
2161 atggcggcat cccgcccattg agtagacca acaccctcac catcaaagtc tgcgggtgcg
2221 acgtgaacgg ggcactgctc tcctgcaacg cagaggccta cattctgaac gccggcctga
2281 gcacagggcg cctgatcgcc atcctcgcc tgcacgtcat tctcctggtc attttagtat
2341 tgtttgtgac cctgagaagg caaaagaaag aaccactcat tgtctttgag gaagaagatg
2401 tccgtgagaa catcattact tatgatgatg aagggggtgg ggaagaagac acagaagcct
2461 ttgatattgc caccctccag aatcctgatg gtatcaatgg atttatcccc cgcaaagaca
2521 tcaaacctga gtatcagtac atgcctagac ctgggctccg gccagcgccc aacagcgtgg
2581 atgtcgatga cttcatcaac acgagaatac aggaggcaga caatgacccc acggctcctc
2641 cttatgactc cattcaaatc tacggttatg aaggcagggg ctcagtggcc gggtccttga
2701 gctccctaga gtcggccacc acagattcag acttggacta tgattatcta cagaactggg
2761 gacctcgttt taagaaacta gcagatttgt atggttccaa agacactttt gatgacgatt
2821 cttacaataa acgatacaaaa tttggcctta agaactgtgt ctggcgctct caagaatcta
2881 gaagatgtgt aaacaggtat ttttttaaat caaggaaagg ctcatttaaa acaggcaaaag
2941 ttttacagag aggatacatt taataaaaact gcgaggacat caaagtggta aatactgtga
3001 aatacctttt ctcacaaaaa ggcaaatatt gaagttgttt atcaacttcg ctagaaaaaa
3061 aaaacacttg gcatacaaaa tatttaagtg aaggagaagt ctaacgctga actgacaatg
3121 aagggaattt gtttatgtgt tatgaacatc caagtctttc ttctttttta agttgtcaaa

```

Fig. 19

## ES 2 596 431 T3

```
3181 gaagcttcca caaaattaga aaggacaaca gttctgagct gtaatttcgc cttaaactct
3241 ggacactcta tatgtagtgc atttttaaac ttgaaatata taatattcag ccagcttaaa
3301 cccatacaat gtatgtacaa tacaatgtac aattatgtct cttgagcacc aatcttgta
3361 ctgctgattc ttgtaaactc ttttgcttct actttcatct taaactaata cgtgocagat
3421 ataactgtct tgtttcagtg agagacgccc tatttctatg tcatttttaa tgtatctatt
3481 tgtacaattt taaagtctt attttagtat acgtataaat atcagtatcc tgacatgtaa
3541 gaaaatgtta cggcatcaca cttatatttt atgaacattg tactgttgct ttaatatgag
3601 cttcaatata agaagcaatc tttgaaataa aaaaagattt ttttttaaaa aaaa
```

Fig. 19 Cont.

SEQ ID NO:2

MKENYCLQAALVCLGMLCHSHAFAPERRGHLRPSFHGHHEKGKE  
GQVLQRSKRGWVWNQFFVIEEYTGPDVPLVGRRLHSDIDSGDGNIKYILSGEGAGTIFV  
IDDKSGNIHATKTLDREERAQYTLMAQAVDRDTNRPLEPPSEFIVKVQDINDNPPEFL  
HETYHANVPERSNVGTSVIQVTASDADDPTYGNSAKLVYSILEGQPYFSVEAQTGIIR  
TALPNMDREAKEEYHVVIQAKDMGGHMGGLSGTTKVTITLTDVNDNPPKFPQSVYQMS  
VSEAAVPGEEVGRVKAKDPDIGENGLVTYNIVDGDMESFEITTDYETQEGVIKLLKP  
VDFETKRAYSLKVEAANVHIDPKFISNGPFKDTVTVKISVEDADEPPMFLAPSYIHEV  
QENAAAGTVVGRVHAKDPDAANSPIRYSIDRHTDLDRFFFTINPEDGFIKTTKPLDREE  
TAWLNITVFAAEIHNHRHQEAKVPVAIRVLDVNDNAPKFAAPYEGFICESDQTKPLSNQ  
PIVTISADDKDDTANGPRFIFSLPPEIIHNPNFTVRDNRDNTAGVYARRGGFSRQKQD  
LYLLPIVISDGGIPPMSSTNTLTIKVCGCDVNGALLSCNAEAYILNAGLSTGALIAL  
ACIVILLVIVVLFVTLRRQKKEPLIVFEEEDVRENIITYDEGGGEEDTEAFDIATLQ  
NPDGINGFIPRKDIKPEYQYMPRGLRPAPNSVDVDDFINTRIQEADNDPTAPPYDSI  
QIYGYEGRGSVAGSLSSLESATTDSDLDYDYLQNWGPRFKKLADLYGSKDTFDDDS

Fig. 20