

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 028**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2009 PCT/US2009/062355**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO10051307**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2009 E 09824091 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2349330**

54 Título: **Métodos de mediación de la respuesta fibrótica**

30 Prioridad:

31.10.2008 US 110127 P
27.10.2009 US 606575

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BRANIGAN, PATRICK y
EKERT, JASON

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 609 028 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).

Métodos de mediación de la respuesta fibrótica**Descripción****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para mediar la respuesta fibrótica modulando la señalización de IL-25 en los fibrocitos, y sus usos.

10 Antecedentes de la invención

15 La inflamación es la respuesta coordinada a la lesión tisular o a la infección. La inflamación comienza con la liberación local de factores quimiotácticos, la activación plaquetaria, y la iniciación de las vías de la coagulación y del complemento. Estos eventos estimulan el endotelio local, promoviendo la extravasación de neutrófilos y monocitos. La segunda fase de la inflamación se caracteriza por la afluencia al tejido de células del sistema inmunitario adaptativo, incluidos los linfocitos. La fase de resolución posterior, cuando tiene lugar la apoptosis y la fagocitosis de los leucocitos excedentes por los macrófagos tisulares, también se caracteriza por la reparación del daño tisular por las células estromales, tales como los fibroblastos.

20 En tales mecanismos de reparación los fibroblastos migran a la zona afectada y pueden presentar un fenotipo modificado que es hiperproliferativo o que produce colágeno en exceso. Suele pensarse que los fibroblastos son predominantemente células residentes, sin embargo, nuevos datos han indicado que las células precursoras de los fibroblastos circulantes, los fibrocitos, migran a los sitios de reparación o lesión, donde se diferencian e intervienen en la cicatrización de heridas, la reparación tisular y otras respuestas fibróticas, tal como la fibrosis patológica.

25 Los fibrocitos se originan en la médula ósea, se diferencian a partir de una población precursora de monocitos de sangre periférica CD14+ y expresan marcadores de las células hematopoyéticas (CD45, MHC de clase II, CD34), las células estromales (colágeno de tipo I y III, y fibronectina), así como receptores de quimiocinas (CCR3, CCR5, CCR7 y CXCR4) (Abe *et al.*, J. Immunol. 166:7556-62, 2001; Moore *et al.*, Am. J. Pathol. 166:675-84, 2005; Bucala *et al.*, Mol. Medicine 1:71-81, 1994). Los fibrocitos no expresan diversos marcadores endoteliales, epiteliales o de músculo liso, y son negativos para los marcadores específicos de monocitos/macrófagos y células dendríticas CD4, CD16 y CD25 (Bucala *et al.*, Mol. Med. 1:71-81, 1994; Freudenthal y Steinman PNAS 87:7698-7702, 1990). Por lo tanto, un fibrocito aislado es un tipo de célula único con un fenotipo definido fácilmente distinguible de las células circulantes o mesenquimales residentes.

30 Una vez liberados de la médula ósea, la migración y la diferenciación de los fibrocitos a fibroblastos y miofibroblastos es inducida por diversos mediadores. Se han relacionado los pares de receptor/ligando CCL2/CCR2, CXCR4/CXCL12, CCR7/CCL21 con el reclutamiento y la acumulación de fibrocitos en los tejidos durante los procesos fibróticos (Phillips *et al.*, J. Clin. Invest. 114:438-46, 2004; Sakai *et al.*, PNAS 103:14098-103, 2006; Tacke y Randolph, Immunobiology 211:609-18, 2006). Se ha demostrado que TGF- β 1, ET-1, PDGF, IL-4 e IL-13 promueven la diferenciación de los fibrocitos a fibroblastos y miofibroblastos maduros con la adquisición de un aumento de la producción de colágeno y otras proteínas de la ECM, la regulación por disminución de CD34 y CD45, y la expresión del marcador de miofibroblastos alfa actina de músculo liso (α -SMA). La diferenciación *in vivo* de los fibrocitos a partir de precursores circulantes puede producirse principalmente en el sitio del tejido y no en la sangre periférica (Haudek *et al.*, PNAS 103:18284-289, 2006; Frid *et al.*, Am. J. Pathol. 168:659-69, 2006). Además de la producción de proteínas de la ECM, los fibrocitos secretan citocinas inflamatorias (TNF- α y TGF- β), factores de crecimiento hematopoyéticos (IL-6, IL-10, M-CSF), factores de crecimiento (TGF- α , VEGF, PDGF-A, HGF, CNTGF, bFGF) y quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8) (Abe *et al.*, J. Immunol. 166:7556-62, 2001; Chesney *et al.*, J. Immunol. 160:419-25, 2006; Chesney *et al.*, Curr. Rheumatol. Rep. 2:501-5, 2000).

35 Los fibrocitos maduros entran rápidamente en los sitios de la lesión tisular donde secretan citocinas inflamatorias, proteínas de la matriz extracelular, otras citocinas y moléculas proangiogénicas, desempeñando un papel en varias enfermedades humanas. Los estudios en seres humanos y en ratones han demostrado que los fibrocitos de sangre periférica migran a cámaras de heridas cutáneas (Bucala *et al.*, Mol. Med. 1:71-81, 1994; Chesney *et al.* J. Immunol. 160:419-25, 1998; Abe *et al.*, J. Immunol. 166:7556-62, 2001) y a la mucosa bronquial después de la exposición a antígenos. Se han registrado fibrocitos en enfermedades con patologías fibróticas incluidas el asma y la fibrosis pulmonar idiopática (Schmidt *et al.*, J. Immunol. 171:380-89, 2003; Abe *et al.*, AM J. Prespir. Crit. Care Med. 170:1158-63, 2004; Moore *et al.* Am. J. Pathol. 166:675-84, 2005), y la excesiva proliferación de miofibroblastos está relacionada con la enfermedad de Crohn (Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 295:G581-90, 2008). En modelos murinos, los fibrocitos han demostrado contribuir a la patogenia de la fibrosis pulmonar y la fibrosis hepática, contribuyendo los fibrocitos en el hígado a la deposición de colágeno (Kisselva *et al.*, J. hepatology 45:429-38, 2006; Gomperts y Stierter, J. leukocyte Biol. 82:449-56, 2007). Existen pruebas de que los fibrocitos tienen una función en la cicatrización hipertrófica o queloides, las quemaduras, la esclerodermia y trastornos relacionados. Los fibrocitos pueden contribuir a la fibrogénesis de varias maneras, ya que estas células producen colágeno y han demostrado diferenciarse a un fenotipo de miofibroblasto más residente, que puede

empeorar aún más el ambiente fibrótico (Moore *et al.*, Am. J. Pathol. 166:675-84, 2005; Mehrad *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 353:104-8, 2007; Phillips *et al.*, J. Clin. Invest. 114:438-46, 2004; Epperly *et al.*, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 29:213-24, 2003; Hashimoto *et al.*, J. Clin. Invest. 113:243-52, 2004; Moore *et al.*, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 35:175-81, 2006). Los fibrocitos también constituyen parte de la respuesta del estroma a la invasión por tumores, y estas células pueden ser un pronosticador del potencial del tumor (Barth *et al.*, J. Exp. Med. 11:11, 2002; Chauhan *et al.*, J. Clin. Pathol. 56:271-76, 2003). La diferenciación de los fibrocitos a miofibroblastos también está relacionada con la remodelación del estroma en carcinomas invasivos de la vejiga urinaria (Nimphius *et al.*, Virchows Arch. 450:179-85, 2007).

Las señales que modulan la proliferación y diferenciación, la secreción de citocinas y quimiocinas, y la migración de los fibrocitos están definidas sólo parcialmente. Una mejor comprensión de estas señales puede posibilitar nuevos tratamientos para prevenir enfermedades o afecciones humanas con una función de los fibrocitos modificada, por ejemplo, la fibrosis patológica. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar y modular las interacciones receptor/ligando que intervienen en las funciones de los fibrocitos.

Resumen de la invención

Un aspecto de la invención es un método *in vitro* de supresión de la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito utilizando un inhibidor que actúa sobre IL-25 y/o el receptor de IL-25, o inhibe específicamente la interacción de IL-25 con el receptor de IL-25, que comprende inhibir la señalización de IL-25 en el fibrocito.

Otro aspecto de la invención es un inhibidor de la señalización de IL-25 que actúa sobre IL-25 y/o el receptor de IL-25, o inhibe específicamente la interacción de IL-25 con el receptor de IL-25 para utilizarse en un método de tratamiento, tratamiento que se consigue suprimiendo la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito en un sujeto con una afección relacionada con la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito.

Otro aspecto de la invención es un método *in vitro* de identificación de moduladores de la señalización de IL-25 que suprimen la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito, que comprende:

- a) proporcionar los fibrocitos;
- b) proporcionar un modulador de ensayo;
- c) poner en contacto los fibrocitos con el modulador de ensayo;
- d) determinar un efecto del modulador de ensayo sobre la señalización de IL-25;
- e) determinar el efecto del modulador de ensayo sobre la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, y la secreción de proteínas por el fibrocito; y
- f) seleccionar el modulador que
 - i) modula la señalización de IL-25; y
 - ii) modula la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Respuesta de citocinas frente a IL-25 e IL-25 con TNF- α en fibrocitos.

Figura 2. Aumento de la proliferación de fibrocitos en respuesta a IL-25 e inhibición por un antagonista de IL-25.

Figura 3. Aumento de la diferenciación de fibrocitos en respuesta a IL-25 e inhibición por un antagonista de IL-25.

Descripción detallada de la invención

Tal como se utilizan en el presente documento y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una", "la" y "el" incluyen la referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido" es una referencia a uno o más polipéptidos e incluye equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia.

A menos que defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece una invención. Aunque en la práctica o en los ensayos de la invención puede utilizarse cualquier composición y método similar o equivalente a los descritos en el presente documento, en el presente documento se describen métodos y composiciones ejemplares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "suprimir" o la expresión "que suprime" se refieren a bloquear la estimulación, disminuir, prevenir, retrasar la activación, inactivar, desensibilizar, inhibir, o regular por disminución, parcial o totalmente, un cambio mensurable en la función celular, por ejemplo un cambio en la

señalización de IL-25 o un cambio en una actividad no deseada en un fibrocyto. Suprimir un cambio mensurable en la función celular se consigue cuando el valor de la actividad asignado a la función celular con respecto al control es del 50%-80%, opcionalmente del 25%-50% o del 0%-25%, en el que se asigna a las muestras de control un valor de la actividad relativo del 100%. Suprimir un cambio mensurable en la función celular puede conseguirse mediante diversas estrategias. Por ejemplo, la supresión de la señalización de IL-25 puede conseguirse bloqueando la interacción de IL-25 y el receptor de IL-25, o suprimiendo la expresión del receptor de IL-25.

"Actividad no deseada en un fibrocyto" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una función mensurable no deseada por parte de un fibrocyto, por ejemplo la secreción de colágeno por el fibrocyto, la secreción de proteínas por el fibrocyto, la diferenciación de los fibrocytos, la proliferación de los fibrocytos, o la migración de los fibrocytos. Los fibrocytos son células progenitoras mesenquimales que presentan características morfológicas y moleculares de los monocitos, los fibroblastos y las células hematopoyéticas. Los fibrocytos pueden ser fibrocytos circulantes o residentes en tejido, por ejemplo fibrocytos residentes pulmonares, hepáticos o renales. La expresión superficial de CD45 y la producción de colágeno se considera un criterio suficiente para distinguir los fibrocytos tanto *in vivo* como *in vitro* de otras células mesenquimales circulantes o residentes en tejido (Bellini y Mattoli, Lab. Investig. 87:858-870, 2007).

"Proliferación de los fibrocytos" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la capacidad del fibrocyto para dividirse, por ejemplo tras el estímulo con PDGF.

"Diferenciación de los fibrocytos" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la capacidad del fibrocyto para diferenciarse a un miofibrocyto o fibrocyto. La diferenciación de los fibrocytos a miofibrocytos puede ser inducida por ejemplo por TGF- β 1 y endotelina-1 (ET-1), y la diferenciación puede valorarse evaluando la expresión de marcadores de diferenciación de los miofibrocytos, por ejemplo alfa actina de músculo liso (α -SMA).

"Secreción de proteínas por el fibrocyto" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una secreción inducida o en el estado de equilibrio de proteínas y péptidos por los fibrocytos, por ejemplo citocinas tales como IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α y TGF- β , factores de crecimiento hematopoyéticos tales como IL-6, IL-10 y M-CSF, factores de crecimiento tales como TGF- α VEGF, PDGF-A, HGF, CNTGF, bFGF, y quimiocinas tales como CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL8, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, IL-8 y GRO α (Chesney *et al.* 1998; Chesney y Bucala, 2000; Abe *et al.* 2001).

La expresión "receptor de IL-25" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un receptor o a un complejo receptor que interviene en la señalización de IL-25. La señalización de IL-25 requiere dos receptores, IL17RB e IL17RA, que pueden formar un complejo heteromérico. IL-25 se une a IL17RB con alta afinidad, mientras que IL17RA no se une a IL-25 pero es necesario para activar las vías de señalización tras la unión del ligando (Rickel *et al.*, J. Immunology 181:4299-310, 2008). Por lo tanto, "receptor de IL-25" contempla tanto IL17RB como IL17RA. El término "IL17RB" (IL-17BR, CRL4, EVI27, IL17RH1 o MGC5245) tal como se utiliza en el presente documento se refiere al "receptor B de la interleucina 17", un polipéptido con una secuencia de aminoácidos según el número de registro del GenBank NP_061195, el producto del gen humano del receptor IL17RB, e incluye todas las variantes, isoformas y homólogos de especie de IL17RB. Tanto IL-25 como IL-17B son ligandos para IL17RB, pero el receptor se une a IL-25 con mayor afinidad (Lee, *et al.*, J. Biol. Chem. 276, 1660-64, 2001). El término "IL17RA" (CD217, IL17R, CDw217, IL-17RA, hIL-17R o MGC10262) tal como se utiliza en el presente documento se refiere al "receptor A de la interleucina 17", un polipéptido con una secuencia de aminoácidos según el número de registro del GenBank NP_055154, el producto del gen humano del receptor IL17RA, e incluye todas las variantes, isoformas y homólogos de especie de IL17RA. Las variantes de IL17RB e IL17RA también incluyen los receptores maduros solubles.

El término "IL-25" o la expresión "polipéptido IL-25" (IL17E, o IL-17E) tal como se utilizan en el presente documento se refieren a "interleucina-25", un polipéptido con una secuencia según el número de registro del GenBank NP_073626 o NP_758525, el producto del gen humano de la IL-25, e incluye todas las variantes, isoformas u homólogos de especie de IL-25.

"Señalización de IL-25" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a los procesos iniciados por IL-25 o un segundo ligando para el receptor de IL-25 que interactúa con el receptor de IL-25 en la superficie celular, lo que da como resultado cambios mensurables en la función celular. El complejo receptor de IL-25 incluye IL17RB e IL17RA, y la unión del ligando activa las vías de transducción de señales aguas abajo, por ejemplo la molécula adaptadora TRAF6, ERK, JNK/p38 y NF- κ B, lo que conduce a la producción de citocinas y quimiocinas (Maezawa *et al.*, J. Immunol. 176:1013-18, 2006). La señalización de IL-25 puede medirse por ejemplo evaluando la cantidad de citocinas y quimiocinas producidas tras la inducción con un ligando para el receptor de IL-25, por ejemplo midiendo la producción de CXCL-8, IL-6, G-CSF, MCP-1, MIP-1 α , RANTES o CCL2 (Cai *et al.*, Cytokine 16:10-21, 2001; Lee *et al.*, J. Biol. Chem. 276:1660-64, 2001; Pan *et al.*, J. Immunol. 167:6559-67, 2001; Wong *et al.*, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 33:186-194, 2005). La señalización de IL-25 también puede evaluarse mediante ensayos funcionales que miden por ejemplo el efecto del ligando para el receptor de IL-25 sobre la proliferación o la diferenciación celular, o utilizando genes indicadores y constructos génicos indicadores unidos operativamente a un promotor sensible a NF- κ B. Los ejemplos de tales promotores incluyen aquellos para IL-6, IL-8 e IL-12 p40 (Murphy *et al.*, Mol. Cell. Biol.

15:5258-67, 1995; Libermann y Baltimore, *Mol. Cell. Biol.* 10:2327-34, 1990; Mauviel *et al.*, *J. Immunol.* 149:2969-76, 1992). La activación de quinasas intracelulares, por ejemplo JNK/p38, puede medirse mediante fosfoanticuerpos, y la evaluación de las moléculas secretadas o la medición de la proliferación o la diferenciación celular pueden realizarse mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o una gama de bioensayos. Los métodos y sistemas de lectura adecuados son conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado. Por ejemplo, la señalización de IL-25 en los fibrocitos puede medirse estimulando los fibrocitos con IL-25 solo o junto con un segundo estímulo, por ejemplo TNF- α , y midiendo la cantidad de IL-6 y de RANTES secretados en los medios de cultivo en comparación con un cultivo de fibrocitos de control no estimulado con IL-25.

10 El término "ligando" se refiere a un péptido o polipéptido, una molécula pequeña, o un oligonucleótido que se une a, o forma complejos con, el receptor de IL-25 o una variante del mismo. El ligando puede ser un antagonista, inhibidor, supresor, agonista, estimulador o activador, o similar, del receptor de IL-25. Los ligandos ejemplares son IL-25 e IL-17F.

15 El término "agente" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a polipéptidos, péptidos o proteínas, proteínas de fusión, peptidomiméticos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, oligonucleótidos sintéticos, moléculas pequeñas, y similares, que inhiben la señalización de IL-25. El agente puede identificarse utilizando ensayos de medición de la señalización de IL-25, que se han descrito anteriormente. Los ejemplos de agentes incluyen un IL17RB maduro soluble, un polipéptido de IL-25, un anticuerpo contra IL-25, un anticuerpo antagonista contra el receptor de IL-25 o un anticuerpo antagonista contra IL17RB.

20 El término "modulador" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula o preparación que se cree proporciona un beneficio terapéutico en seres humanos u otros animales, y se cree proporciona ese beneficio terapéutico, en parte, a través de la activación o supresión de la señalización de IL-25 en los fibrocitos. El término "modulador" incluye inhibidores y activadores. Los "inhibidores" son agentes que bloquean la estimulación, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan por disminución, parcial o totalmente, un proceso mensurable en una célula, por ejemplo la señalización de IL-25, por ejemplo, los antagonistas o antagonísticos. Los activadores son agentes que estimulan, aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan, o regulan por aumento un proceso mensurable en una célula, por ejemplo la señalización de IL-25, por ejemplo, los agonistas. Por ejemplo, el modulador de la señalización de IL-25 puede interactuar directamente con IL-25 o componentes del receptor de IL-25, uniéndose por lo general al receptor de IL-25, cualquier componente del receptor de IL-25 o ligando para el receptor de IL-25, con una constante de afinidad de aproximadamente 10^{-6} M, aproximadamente 10^{-8} M, aproximadamente 10^{-9} M o aproximadamente 10^{-10} M. El modulador también puede modular la señalización de IL-25 indirectamente, por ejemplo modulando la expresión del receptor de IL-25. Los moduladores incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos, polipéptidos, oligonucleótidos, moléculas químicas pequeñas, y similares.

35 "Modulador de ensayo" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un modulador que se está evaluando para la capacidad de activar o suprimir el proceso mensurable en una célula, por ejemplo la actividad no deseada en el fibrocito mediante la modulación de la señalización de IL-25.

40 El término "anticuerpo" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula que se une específicamente a un antígeno, e incluye anticuerpos diméricos, triméricos y multiméricos, y anticuerpos híbridos, humanizados y totalmente humanos. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo completo o un fragmento funcional de una molécula de anticuerpo, tal como un fragmento que conserva al menos su función de unión al antígeno, e incluyen Fab, F(ab')₂, scFv, dsFv y diacuerpos. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse utilizando enzimas proteolíticas (p. ej., un anticuerpo entero se digiere con papaína para producir fragmentos Fab, y el tratamiento con pepsina da como resultado la producción de fragmentos F(ab')₂). Las técnicas para la preparación y utilización de los diversos anticuerpos son conocidas en la técnica (Ausubel, *et al.*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, 1987-2001; Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Harlow y Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Colligan, *et al.*, ed., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, 1994-2001; Colligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, NY, NY, 1997-2001; Kohler *et al.*, *Nature* 256:495-497, 1975; U.S. 4.816.567, Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:10029-10033, 1989). Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales totalmente humanos que carezcan de cualquier secuencia no humana a partir de ratones transgénicos para inmunoglobulinas humanas o a partir de genotecas de presentación en fagos (Lönberg *et al.*, *Nature* 368:856-859, 1994; Fishwild *et al.*, *Nature Biotech.* 14:845-851, 1996; Méndez *et al.*, *Nature Genetics* 15:146-156, 1997; Knappik *et al.*, *J. Mol. Biol.* 296:57-86, 2000; Krebs *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 265:67-84, 2001).

60 Un agente, un modulador, una molécula de anticuerpo, o similar, "se une específicamente" a un determinado antígeno o proteína cuando se une a este antígeno o proteína con mayor afinidad y de manera específica, en contraposición a de manera no específica, en comparación con un segundo antígeno o proteína no idéntico. Dicho de otra manera, la "unión específica" de un agente, un modulador, una molécula de anticuerpo, o similar, puede utilizarse para distinguir dos polipéptidos diferentes.

Un "fragmento" es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que comprende una porción, pero no la totalidad, de cualquier secuencia de aminoácidos de cualquier polipéptido de la invención. Los fragmentos pueden incluir, por ejemplo, un polipéptido truncado que tiene una porción de una secuencia de aminoácidos correspondiente a un péptido señal, dominio extracelular, dominio transmembrana o dominio citoplásmico, o variantes de los mismos, tal como una serie continua de residuos que incluye una secuencia de aminoácidos amino terminal y/o carboxilo terminal heteróloga. También se incluyen las formas de degradación de los polipéptidos de la invención producidos por, o en, una célula hospedadora. Otros fragmentos ejemplares se caracterizan por atributos estructurales o funcionales tales como fragmentos que comprenden la hélice alfa o las regiones que forman la hélice alfa, la lámina beta o las regiones que forman la lámina beta, la vuelta o las regiones que forman la vuelta, el enrollamiento o las regiones que forman el enrollamiento, las regiones hidrófilas, las regiones hidrófobas, las regiones alfa-anfipáticas, las regiones beta-anfipáticas, las regiones flexibles, las regiones que forman la superficie, las regiones de unión al sustrato, las regiones extracelulares y las regiones con alto índice antigénico. Los polipéptidos de la invención pueden utilizarse o proporcionarse como fragmentos.

El término "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende al menos dos residuos de aminoácidos unidos por un enlace peptídico para formar un polipéptido. Las proteínas pequeñas de menos de 30 aminoácidos pueden denominarse "péptidos". Los polipéptidos también pueden denominarse "proteínas".

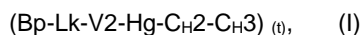
La presente invención se refiere a métodos de supresión de la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito mediante la inhibición de la señalización de IL-25. La invención se basa en el descubrimiento de que el receptor de IL-25 está presente en los fibrocitos, y la inhibición o activación de la señalización de IL-25 modula diversas actividades en los fibrocitos, por ejemplo la proliferación, la diferenciación, y la secreción de proteínas de los fibrocitos; actuando así IL-25 como un factor proinflamatorio, proproliferativo y de diferenciación para este tipo de célula. Los fibrocitos migran al sitio de la lesión tisular en el que secretan proteínas de la matriz extracelular, citocinas inflamatorias, otras citocinas y moléculas proangiogénicas, que desempeñan un papel en diversas enfermedades humanas, incluidas las afecciones fibróticas. Por lo tanto, la inhibición de la señalización de IL-25 en el fibrocito puede ser útil para tratar afecciones relacionadas con la actividad no deseada en los fibrocitos, por ejemplo las afecciones fibróticas.

En una forma de realización, la invención proporciona un método *in vitro* de supresión de la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito que comprende inhibir la señalización de IL-25 en el fibrocito como se detalla en la reivindicación 1. IL-25 (también conocido como IL-17E), un miembro de la familia de IL-17, está implicado en la inmunidad mediada por células Th2 (Fort *et al.*, Immunity 15:985-995 2001; Hurst *et al.*, J. Immunol. 169:443-453. 2002). Los modelos animales de IL-25 o la administración de IL-25 a animales demuestran que IL-25 induce respuestas tipo Th2 relacionadas con la inflamación multiorgánica, la infiltración de células inflamatorias y la hiperplasia de las células epiteliales, activada por la expresión inducida por IL-25 de IL-4, IL-5 e IL-13 (Shi *et al.*, J. Biol. Chem. 275:19167-76, 2000; Lee *et al.*, J. Biol. Chem. 276:1660-64, 2001; Hurst *et al.*, 2002; J. Immunol. 169:443-53, 2002; Kim *et al.*, Blood 100:2330-42, 2002). Aún no están claros los mecanismos moleculares mediante los que IL-25 regula la inmunidad de tipo 2. Se descubrió que una población de linfocitos no B/T estaba regulada por IL-25 y producía citocinas Th2 en respuesta a la infección por *Nippostrongylus brasiliensis* (Fallon *et al.*, J. Exp. Med. 203:1105-1116, 2006). Sin embargo, dada la amplia expresión de IL17RB, pueden existir dianas adicionales de IL-25 para regular las respuestas de IL-25. *In vitro*, se ha descubierto que IL-25 se expresa en los mastocitos derivados de la médula ósea y las células Th2 activadas (Fort *et al.*, Immunity 15:985-995 2001; Ikeda *et al.*, Blood 101:3594-96, 2003). Se ha descubierto que los eosinófilos y basófilos activados de sujetos normales y atópicos secretan la proteína IL-25 bioactiva (Wang *et al.*, J. Exp. Med. 204:1837-47, 2007). IL-25 está también regulada por aumento en los macrófagos alveolares en un modelo de inflamación de las vías respiratorias inducida por partículas en ratas y en ratón (estirpe celular MLE12) y en las células epiteliales pulmonares humanas (A549) después de la estimulación con alérgenos (Fort *et al.*, Immunity 15:985-995 2001; Ikeda *et al.*, Blood 101:3594-96, 2003). Las células diana para IL-25 que se han identificado también incluyen células dendríticas, fibroblastos pulmonares, células de músculo liso de las vías respiratorias, linfocitos T vírgenes, células TH2 y macrófagos activados alternativamente, que expresan IL17RB *in vitro* (Gratchev *et al.*, J. Immunol. 60:233-37, 2004; Lajoie-Kadoch *et al.*, Am. J. Physiol. Lung cell Mol. Physiol. 290:L1238-46, 2006; Letuve *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 117:590-96, 2006; Angkasekwina *et al.*, J. Exp. Med. 11:11, 2007).

La señalización de IL-25 en un fibrocito puede inhibirse mediante diversos agentes e inhibidores de la señalización de IL-25. Los agentes y los inhibidores pueden actuar sobre IL-25 y/o el receptor de IL-25, o inhibir específicamente la interacción de IL-25 con el receptor de IL-25. Tales agentes e inhibidores son, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra IL-25 o contra el receptor de IL-25, que reconocen porciones extracelulares de los polipéptidos receptores, moléculas de ARNip o antisentido diseñadas contra los genes de IL-25 o del receptor de IL-25, o receptores de IL-25 solubles que comprenden los polipéptidos receptores IL17RB soluble o IL17RA soluble. Pueden utilizarse péptidos, oligonucleótidos o moléculas pequeñas que bloquean la interacción entre la IL-25 y el receptor de IL-25. Tales agentes e inhibidores también pueden ser péptidos, proteínas, proteínas de fusión o moléculas pequeñas que impiden la interacción de IL-25 con el receptor de IL-25. Se han descrito agentes que inhiben IL-25 (patente de EE.UU. n° 6.562.578 concedida a Gorman; n° 6.635.443 concedida a Shi). La señalización de IL-25 en un fibrocito y la actividad no deseada en un fibrocito pueden medirse utilizando diversos métodos como se ha descrito anteriormente.

Es posible modificar la estructura de los polipéptidos o fragmentos que se utilizan como agentes para inhibir la señalización de IL-25 en un fibrocyto para fines tales como potenciar la estabilidad, solubilidad, especificidad de sustrato, y similares. Por ejemplo, puede producirse un polipéptido modificado en el que se ha modificado la secuencia de aminoácidos, tal como mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos. Se contempla que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadoras) no tenga, en algunos casos aunque no en todos, un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservadoras son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que son afines en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente pueden dividirse en cuatro familias: (1) ácidos (aspartato, glutamato); (2) básicos (lisina, arginina, histidina); (3) no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano); y (4) polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces conjuntamente como aminoácidos aromáticos. De manera similar, el repertorio de aminoácidos puede agruparse como (1) ácidos (aspartato, glutamato); (2) básicos (lisina, arginina, histidina), (3) alifáticos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina), agrupándose opcionalmente la serina y la treonina por separado como alifáticos-hidroxilo; (4) aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano); (5) amida (asparagina, glutamina); y (6) azufrados (cisteína y metionina) (Stryer (ed.), *Biochemistry*, 2ª ed., WH Freeman and Co., 1981). Puede determinarse fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o fragmento del mismo da como resultado un homólogo funcional evaluando la capacidad del polipéptido o fragmento modificado para producir una respuesta de una manera similar al polipéptido o fragmento sin modificar mediante los ensayos descritos en el presente documento. Pueden ensayarse fácilmente de la misma manera los péptidos, polipéptidos o proteínas en los que se haya producido más de una sustitución.

El agente que inhibe la señalización de IL-25 en un fibrocyto puede conjugarse con un segundo polipéptido para formar una proteína de fusión que puede conferir propiedades deseables, por ejemplo, un aumento de la estabilidad. Pueden formarse proteínas de fusión ejemplares conjugando a la vez un IL17RB maduro soluble y un armazón alternativo tal como la proteína con repeticiones de anquirina diseñada (DARPs) (Stumpff y Amstutz, *Curr. Opin. Durg Discov. Devel.* 10:153-159, 2007), un constructo MIMETIBODY™ (Picha *et al.*, *Diabetes* 57:1926-1934, 2008), u otros dominios proteicos. Las proteínas, péptidos o proteínas de fusión pueden generarse en general mediante cualquier método de ácidos nucleicos recombinantes o mediante métodos de síntesis química conocidos en la técnica. Un constructo MIMETIBODY™ tiene la fórmula genérica (I):



en la que Bp es un péptido o polipéptido capaz de unirse a una molécula de interés, Lk es un polipéptido o enlace químico, V2 es una porción de un extremo C-terminal de una región variable de inmunoglobulina, Hg es al menos una porción de una región bisagra variable de inmunoglobulina, C_{H2} es una región constante C_{H2} de la cadena pesada de inmunoglobulina y C_{H3} es una región constante C_{H3} de la cadena pesada de inmunoglobulina, y t es independientemente un número entero del 1 al 10. Sin desear restringirse a teoría alguna, se cree que el método de inhibición de la señalización de IL-25 en un fibrocyto inhibe la diferenciación, la proliferación o la secreción de citocinas y quimiocinas del fibrocyto en un tejido, reduciendo la cantidad de colágeno, proteínas de la matriz extracelular y citocinas proinflamatorias que los fibrocytos producen en un sitio de la lesión, inflamación o zona fibrótica.

Otra forma de realización de la invención es un inhibidor de la señalización de IL-25 que actúa sobre IL-25 y/o el receptor de IL-25, o inhibe específicamente la interacción de IL-25 con el receptor de IL-25 para utilizarse en un método de tratamiento, tratamiento que se consigue suprimiendo la proliferación de los fibrocytos, la diferenciación de los fibrocytos, o la secreción de proteínas por el fibrocyto en un sujeto con una afección relacionada con la proliferación de los fibrocytos, la diferenciación de los fibrocytos, o la secreción de proteínas por el fibrocyto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la señalización de IL-25.

"Sujeto" se refiere a cualquier animal, preferentemente un paciente humano, ganado o mascota doméstica. Sin desear restringirse a ninguna teoría concreta, se cree que el beneficio terapéutico de la invención se debe a la inhibición de la señalización de IL-25 que da como resultado la reducción de la secreción de colágeno y citocinas proinflamatorias en un sitio de lesión, reparación, o en estados patológicos tales como la fibrosis.

"Una afección relacionada con la actividad no deseada en el fibrocyto" tal como se utiliza en el presente documento incluye las afecciones que están relacionadas con una actividad anómala en los fibrocytos tisulares o en los circulantes, por ejemplo, afecciones relacionadas con un aumento de la secreción de colágeno o un aumento de la diferenciación de los fibrocytos a miofibrocyto. Los ejemplos de tales afecciones son las afecciones fibróticas, el cáncer y la cicatrización de heridas.

La afección fibrótica puede ser una fibrosis específica de órgano o una fibrosis sistémica. La fibrosis específica de órgano puede ser la fibrosis pulmonar, la fibrosis hepática, la fibrosis renal, la fibrosis cardíaca, la fibrosis pancreática, la fibrosis vascular, la fibrosis cutánea, la fibrosis ocular o la fibrosis de médula ósea. La fibrosis pulmonar puede estar relacionada con la fibrosis pulmonar idiopática, la fibrosis pulmonar de origen medicamentoso,

5 el asma, la sarcoidosis, la neumonía intersticial idiopática o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. La fibrosis hepática puede estar relacionada con la cirrosis, la esquistosomiasis o la colangitis. La cirrosis puede seleccionarse de entre la cirrosis post-hepatitis C, la cirrosis post-hepatitis B, la cirrosis inducida por alcohol, fármacos o sustancias químicas, o la cirrosis biliar primaria. La colangitis puede ser la colangitis esclerosante. La fibrosis renal puede estar
 10 relacionada con la nefropatía diabética, la glomeruloesclerosis lúpica, la glomerulonefritis proliferativa, la glomerulonefritis esclerosante o la dermatopatía fibrosante nefrogénica. La fibrosis cardíaca puede estar relacionada con el infarto de miocardio, la reestenosis coronaria, la miocardiopatía congestiva, o la insuficiencia cardíaca. La fibrosis pancreática puede estar relacionada con la remodelación del estroma, la pancreatitis o la fibrosis estromal. La fibrosis vascular puede estar relacionada con la reestenosis arterial tras la angioplastia, o la aterosclerosis. La fibrosis cutánea puede estar relacionada con la cicatrización de quemaduras, la cicatrización hipertrófica, los
 15 queloides, la esclerodermia, la psoriasis, o la dermatopatía fibrosante nefrogénica. La fibrosis ocular puede estar relacionada con la fibrosis retroorbital, la post-cirugía de cataratas, la vitreorretinopatía proliferativa, la fibrosis corneal, la cicatrización corneal por cirugía, o la catarata de la cápsula anterior. La fibrosis de médula ósea puede estar relacionada con la mielofibrosis idiopática o la mielofibrosis de origen medicamentoso. Otras afecciones fibróticas pueden estar relacionadas con la enfermedad de Peyronie, la contractura de Dupuytren, la enfermedad de Crohn, la dermatomiositis, la artritis reumatoide, lesiones fibróticas tales como las que se forman tras la infección por *Schistosoma japonicum*, enfermedades autoinmunitarias, la fibrosis patógena, la enfermedad de Lyme, la cistitis crónica, los fibromas uterinos, la fibrosis ovárica, otras formaciones fibroquísticas, la trabeculotomía de glaucoma de ángulo abierto, o las adherencias fibróticas resultado de procedimientos quirúrgicos. La fibrosis sistémica puede
 20 estar relacionada con la esclerosis sistémica, la fibrosis sistémica nefrogénica, o la enfermedad de injerto contra hospedador.

25 Por ejemplo, en el asma, los fibrocitos se diferencian aún más a miofibroblastos, que persisten en las paredes engrosadas de las vías respiratorias. Sin desear limitarse a teoría alguna, se cree que la inhibición de la señalización de IL-25 en el fibrocito puede suprimir la diferenciación de los fibrocitos a miofibroblasto, mejorando así los síntomas del asma.

30 Por ejemplo, en la cirrosis hepática los fibrocitos pueden migrar al hígado y contribuir a la secreción de colágeno y a la fibrosis (Kisselva *et al.*, J. Hepatology, 45:429-438, 2000). Sin desear limitarse a teoría alguna, se cree que la inhibición de la señalización de IL-25 en el fibrocito puede suprimir la producción de colágeno del fibrocito en el hígado, previniendo o retrasando así la fibrosis debida a la cirrosis hepática.

35 Los cánceres ejemplares pueden ser la leucemia, la leucemia aguda, la leucemia linfoblástica aguda (ALL), ALL de linfocitos B, linfocitos T o FAB, la leucemia mieloide aguda (AML), la leucemia mieloide crónica (CML), la leucemia linfocítica crónica (CLL), la leucemia de células pilosas, el síndrome mielodisplásico (MDS), un linfoma, la enfermedad de Hodgkin, un linfoma maligno, el linfoma no Hodgkin, el linfoma de Burkitt, el mieloma múltiple, el sarcoma de Kaposi, el carcinoma colorrectal, el carcinoma pancreático, el carcinoma de células renales, el cáncer de mama, el cáncer de piel, el cáncer de cuello uterino, el cáncer de páncreas, el carcinoma nasofaríngeo, la histiocitosis maligna, el síndrome paraneoplásico/hipercalcemia por malignidad, los tumores sólidos, los
 40 adenocarcinomas, los carcinomas de células escamosas, los sarcomas, el melanoma maligno, particularmente el melanoma metastásico, el hemangioma, la enfermedad metastásica, el cáncer relacionado con la resorción ósea, el cáncer relacionado con el dolor óseo, y similares.

45 La cicatrización de heridas ejemplar puede estar relacionada con traumatismos o una lesión tisular o con afecciones crónicas resultado de o relacionadas con ello, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, por ejemplo una lesión corporal o un traumatismo relacionados con una cirugía, incluidas una cirugía torácica, abdominal, craneana u oral; o en la que la herida puede seleccionarse del grupo que consiste en heridas asépticas, heridas contusas, heridas incisivas, laceraciones, heridas no penetrantes, heridas abiertas, heridas penetrantes, heridas perforantes, heridas punzantes, heridas sépticas, infartos y heridas subcutáneas; o en la que la herida puede
 50 seleccionarse del grupo que consiste en úlceras isquémicas, úlceras por decúbito, fistulas, picaduras graves, quemaduras térmicas y heridas del sitio donante; o en la que la herida es una úlcera aftosa, una herida traumática o una lesión relacionada con el herpes. Las heridas del sitio donante son heridas que se producen, por ejemplo, en relación con llevar tejido duro de una parte del cuerpo a otra parte del cuerpo, por ejemplo, en relación con un trasplante. Las heridas resultado de tales operaciones son muy dolorosas y por lo tanto, una mejor curación resulta muy valiosa. La fibrosis de las heridas es abordable por la supresión de la actividad no deseada por un fibrocito inhibiendo la señalización de IL-25, ya que los fibrocitos migran a la zona de la herida y comienzan a producir colágeno, así como factores proangiogénicos. Casi todos los procesos de reparación tisular incluyen la formación temprana de tejido conectivo, una estimulación de este y los posteriores procesos mejora la cicatrización del tejido, sin embargo, la sobreproducción de tejido conectivo y colágeno puede conducir a un tejido fibrótico caracterizado por
 55 ser no elástico e hipóxico. La supresión de la producción de colágeno por los fibrocitos inhibiendo la señalización de IL-25 en un sujeto puede ser útil para modular, tratar o prevenir tales secuelas de la cicatrización de heridas.

60 Con “métodos de supresión de la actividad no deseada en el fibrocito en un sujeto” debe entenderse que cualquier supresión de la actividad no deseada por el fibrocito es un efecto beneficioso y puede dar como resultado la mejora de los síntomas en un sujeto con una afección relacionada con la actividad no deseada en el fibrocito. Por
 65

lo tanto, los métodos pueden dar como resultado prevenir la aparición de un síntoma clínico, inhibir, detener o retrasar la afección, o aliviar o provocar la regresión de la afección.

5 Los inhibidores de la señalización de IL-25 se han descrito anteriormente, y pueden ser por ejemplo un anticuerpo contra IL-25, un anticuerpo contra el receptor de IL-25 o un polipéptido receptor de IL-25 maduro soluble. Las cantidades de un determinado inhibidor suficientes para suprimir la actividad no deseada en el fibrocito en un sujeto pueden determinarse fácilmente. El inhibidor puede administrarse individualmente o en combinación con un segundo inhibidor. Tal segundo inhibidor puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido, polipéptido, oligonucleótido, o molécula pequeña que inhibe la señalización de IL-25. "En combinación con" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a que el inhibidor descrito puede administrarse a un sujeto a la vez en una mezcla, al mismo tiempo como único inhibidor o secuencialmente como inhibidores individuales en cualquier orden.

15 La "cantidad terapéuticamente eficaz" del inhibidor de la señalización de IL-25 para suprimir la actividad no deseada en el fibrocito en un sujeto con una afección relacionada con la actividad no deseada en el fibrocito puede determinarse mediante técnicas de investigación convencionales. Por ejemplo, la dosificación del inhibidor que será eficaz en la supresión de la actividad no deseada en el fibrocito en afecciones tales como la fibrosis pulmonar o la fibrosis hepática puede determinarse administrando el inhibidor a un modelo animal de fibrosis pulmonar o de fibrosis hepática.

20 Un modelo ejemplar para la fibrosis pulmonar se genera inyectando bleomicina en sus pulmones. La bleomicina es un antineoplásico que, cuando se inyecta en las vías respiratorias, provoca fibrosis en los pulmones de un animal y es una forma convencional de estudiar la fibrosis pulmonar (Crouch, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 259:L159-L184). Un modelo ejemplar para la fibrosis hepática se genera mediante la ligadura del colédoco, y es una forma convencional de estudiar la fibrosis hepática (Hellebrand C *et al.*, Hepatology 24:670-76, 1996).

25 Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los márgenes posológicos óptimos. Un experto puede determinar la selección de una dosis eficaz particular (por ejemplo, mediante ensayos clínicos) basándose en la consideración de varios factores. Tales factores incluyen la enfermedad a tratar o prevenir, los síntomas involucrados, la masa corporal del paciente, el estado inmunitario del paciente y otros factores conocidos por el experto. La dosis exacta a emplearse en la formulación dependerá también de la vía de administración y la gravedad del debilitamiento relacionado con la enfermedad, y debe ser decidida según el juicio del facultativo y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas de dosis-respuesta obtenidas de sistemas de ensayo en modelos animales o *in vitro*. La dosis del inhibidor a administrar a un paciente, tal como un ser humano, es muy variable y puede ser objeto de juicio independiente. Con frecuencia resulta práctico administrar la dosis diaria del inhibidor a diferentes horas del día. Sin embargo, en cada caso concreto, la cantidad del inhibidor administrada dependerá de factores tales como la solubilidad del inhibidor, la formulación utilizada, el estado del paciente (tal como el peso), y/o la vía de administración.

40 El modo de administración para suprimir la actividad no deseada en un fibrocito de un inhibidor de la señalización de IL-25 puede ser cualquier vía conveniente que lleve el agente al hospedador. Las proteínas, fragmentos de proteínas, proteínas de fusión, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos y las composiciones farmacéuticas de estos inhibidores son particularmente útiles para la administración parenteral, por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea o intranasal.

45 Los inhibidores de la señalización de IL-25 pueden prepararse como composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz del agente como principio activo en un transportador farmacéuticamente aceptable. El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra el compuesto activo. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tal como agua y aceites, incluidos los de origen animal, vegetal, sintético o procedentes del petróleo, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y similares. Por ejemplo, puede utilizarse solución salina al 0,4% y glicina al 0,3%. Estas soluciones son estériles y están generalmente libres de partículas. Pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales conocidas (por ejemplo, filtración). Las composiciones pueden contener las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables que sean necesarias para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes amortiguadores y de ajuste del pH, agentes estabilizadores, espesantes, lubricantes y colorantes, etc. La concentración del agente de la invención en tales formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente un 0,5%, normalmente un o al menos aproximadamente un 1% a tanto como un 15% ó 20% en peso y se seleccionará basándose principalmente en los volúmenes de fluido, las viscosidades, etc., según el modo de administración concreto seleccionado. Los métodos reales de preparación de composiciones administrables por vía parenteral son conocidos y se describen con más detalle por ejemplo en "Remington's Pharmaceutical Science", 15ª ed., Mack publishing Company, Easton, PA.

60 Otro aspecto de la invención es un método *in vitro* de identificación de moduladores de la señalización de IL-25 que suprimen la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito, proporcionando fibrocitos; proporcionar un modulador de ensayo; poner en contacto los fibrocitos con el modulador de ensayo; determinar un efecto del modulador de ensayo sobre la señalización de IL-25; determinar el efecto del modulador de ensayo sobre la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, y la

secreción de proteínas por el fibrocito; y seleccionar el modulador que modula la señalización de IL-25; y que modula la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito. Estos moduladores pueden ser naturales o sintéticos, inhibidores o activadores de la señalización de IL-25, y pueden identificarse utilizando uno o más ensayos que evalúan la señalización de IL-25 y la actividad en un fibrocito como se ha descrito anteriormente.

Los fibrocitos pueden aislarse a partir de sangre periférica o tejido, purificarse y cultivarse como cultivos adherentes mediante métodos convencionales (Bucala *et al.*, Mol. Medicine 1:71-81, 1994). Por ejemplo, las PBMC se aíslan mediante centrifugación en Ficoll-Paque, y se cultivan en cultivo adherente. Se eliminan las células no adherentes, y los fibrocitos se purifican adicionalmente de linfocitos T, linfocitos B y monocitos contaminantes mediante inmunoselección negativa con anticuerpos anti-CD2, anti-CD19 y anti-CD14, respectivamente. La expresión de CD45, CD34 y colágeno I en la población purificada confirma el origen fibrocítico (Bellini y Mattoli, Lab. Investigation 87:858-70, 2007).

El modulador de ensayo se incuba con fibrocitos sensibles a IL-25, y se evalúa el efecto del modulador sobre la señalización de IL-25 y sobre la actividad en un fibrocito. El modulador de ensayo puede unirse directamente a IL-25 o al receptor de IL-25, o modular indirectamente la señalización de IL-25 en el fibrocito. El modulador de ensayo puede cribarse en forma sustancialmente purificada o en una mezcla bruta. Los moduladores de ensayo pueden ser anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas, péptidos, moléculas pequeñas u oligonucleótidos.

En un ensayo de cribado ejemplar, los fibrocitos en cultivo se ponen en contacto con IL-25 y un modulador de ensayo, y se mide el efecto del modulador de ensayo sobre la secreción de citocinas inducida por IL-25 y la diferenciación de los fibrocitos. Las citocinas medidas son por ejemplo IL-6 y RANTES, y la diferenciación de los fibrocitos puede medirse evaluando la cantidad de α -SMA en el fibrocito. Los métodos de detección de la secreción de citocinas y la evaluación de la diferenciación de los fibrocitos son conocidos y se han descrito anteriormente.

Una vez que la presente invención se ha descrito en su totalidad, será evidente para un experto en la materia que pueden realizarse en la misma muchos cambios y modificaciones sin alejarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las formas de realización específicas descritas en el presente documento se ofrecen a modo de ejemplo solamente, y la invención será limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance total de los equivalentes a los que tales reivindicaciones tienen derecho, y la invención no debe quedar limitada por las formas de realización específicas que se han presentado en el presente documento a modo de ejemplo.

Ejemplo 1

Expresión de IL17RB en fibrocitos humanos y de roedores

Se ha descrito que los fibrocitos son una de las fuentes de aumento de miofibroblastos junto con los fibroblastos derivados de la EMT y los fibroblastos residentes que son una característica distintiva de las patologías fibróticas. Los fibrocitos derivados de la médula ósea que tienen que migrar a los sitios de lesión tisular pueden potenciar la fibrosis debido a la producción de factores profibróticos y proinflamatorios. Alterar la diferenciación, proliferación o migración de los fibrocitos podría proporcionar una vía terapéutica distinta para tratar diversas afecciones fibróticas.

Se aislaron y cultivaron fibrocitos pulmonares y sanguíneos murinos, y fibrocitos sanguíneos humanos, según los materiales y métodos. Las células aisladas mostraron morfología con forma de huso o estrella irregular con prolongaciones ramificadas, características del tipo de célula. La inmunocitoquímica demostró que los fibrocitos pulmonares y sanguíneos murinos mostraban tinción positiva conjunta para CD45 y colágeno I, marcadores de fibrocitos (datos no mostrados). La expresión positiva de IL17RB se demostró utilizando microscopía confocal en todas las clases de fibrocito ensayadas, incluidos los fibrocitos pulmonares y sanguíneos murinos (datos no mostrados).

Para cuantificar la expresión de IL17RB de los fibrocitos, las células se sometieron a tinción triple con CD45, colágeno e IL17RB y se enumeraron mediante citometría de flujo. El 80% de los fibrocitos pulmonares murinos y el 49% de los fibrocitos sanguíneos murinos dieron positivo para CD45 y el colágeno I. De esta población de células, el 40% de los fibrocitos pulmonares y el 99% de los fibrocitos sanguíneos dieron positivo para IL17RB. Las células pulmonares murinas colágeno I⁺ CD45⁻ (fibroblastos) también expresaron IL17RB. Los fibrocitos sanguíneos humanos también se evaluaron para la expresión de IL17RB; el 88% de los fibrocitos seleccionados dieron positivo para CD45 y colágeno I. De esa población de células, el 93% dio positivo para IL17RB. Por lo tanto, los fibrocitos circulantes sanguíneos murinos y humanos expresaban IL17RB a niveles comparables.

Ejemplo 2

Señalización de IL-25 intacta en los fibrocitos

Se evaluó el efecto de IL-25 sobre la liberación de citocinas en los fibrocitos para demostrar las vías de señalización de IL-25 intacta y de IL17RB funcional en los fibrocitos. La estimulación específica *in vitro* de IL17RB ha demostrado aumentar la secreción de citocinas proinflamatorias en otros tipos de células. IL-25 potenciaba la secreción de RANTES, IL-6, KC y CCL2 inducida por TNF- α en los fibrocitos, pero no estimulaba en solitario la liberación de citocinas.

Los fibrocitos pulmonares murinos (Fig. 1) estimulados con IL-25 en solitario durante 24 horas no mostraron un aumento de la expresión de citocinas mediante Luminex. 10 ng/ml de TNF- α en solitario aumentaron significativamente RANTES (Fig. 1A) en comparación con el control ($p = 0,022$) y con las tres concentraciones de IL-25 ($p = 0,021$, $p = 0,025$, $p = 0,018$ para 1 ng/ml, 10 ng/ml y 100 ng/ml de IL-25, respectivamente), pero fue significativamente menor que IL-25 + 10 ng/ml de TNF- α ($p < 0,001$). La coestimulación de los fibrocitos con IL-25 y TNF- α dio como resultado un aumento significativo de RANTES en comparación con todos los demás grupos ($p < 0,001$ para cada grupo). KC (Fig. 1B) fue significativamente mayor para IL-25 + 10 ng/ml de TNF- α en comparación con el control ($p = 0,015$), con las tres concentraciones de IL-25 ($p = 0,004$, $p = 0,009$, $p = 0,001$ para 1 ng/ml, 10 ng/ml y 100 ng/ml de IL-25, respectivamente) y TNF- α en solitario ($p = 0,05$). CCL2 (Fig. 1) fue significativamente mayor para IL-25 + 10 ng/ml de TNF- α en comparación con el control ($p = 0,012$), con las tres concentraciones de IL-25 ($p = 0,002$, $p = 0,005$, $p < 0,001$ para 1 ng/ml, 10 ng/ml y 100 ng/ml de IL-25, respectivamente) y con TNF- α en solitario ($p = 0,017$). El cambio en IL-6 (Fig. 2D) no resultó ser significativo mediante un ensayo para una diferencia global entre todos los grupos ($p = 0,153$), aunque IL-6 fue significativamente mayor comparando individualmente 10 ng/ml de IL-25 combinada con TNF- α con las tres concentraciones de IL-25 ($p = 0,020$, $p = 0,048$, $p = 0,025$ para 1 ng/ml, 10 ng/ml y 100 ng/ml de IL-25, respectivamente), pero no TNF- α en solitario.

RANTES está implicado en los procesos inmunorreguladores e inflamatorios, y es transcrito y secretado por los linfocitos T, otras células inflamatorias y las células estromales. RANTES es un ligando para los receptores de quimiocinas CCR1, CCR3, CCR4 y CCR5, que se expresan en las células epiteliales, los macrófagos, los linfocitos, las células dendríticas y las células estromales (Ruster *et al.*, *Front Biosci.* 13:944-55, 2008; van Deventer *et al.*, *Cancer Res.* 65:3374-9, 2005). CXCL8 es un factor proangiogénico secretado por los fibrocitos y se encuentra presente durante la respuesta de cicatrización de heridas (Kovacs *et al.*, *FASEB J.* 8:854-61, 1994). Se sabe que CCL2 es fundamental para el desarrollo de la fibrosis pulmonar y está implicado en el reclutamiento de fibrocitos al pulmón (Moore *et al.*, *Am. J. Pathol.* 166:675-84, 2005) y es la vía probable mediante la que promueve la fibrosis. El CCL2 secretado por los fibrocitos es un potente quimioatrayente de linfocitos T y puede actuar para reclutar específicamente linfocitos T CD4⁺ al entorno de reparación tisular. IL-6 es un factor de crecimiento hematopoyético secretado por los fibrocitos sanguíneos y está activo en muchas células, incluidos los fibroblastos, y por lo tanto, puede hacer de mediador autocrino o paracrino (Moodley *et al.*, *Am. J. Pathol.* 163:345-54, 2003; Fries *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11:552-60, 1994). Se ha demostrado que regula la diferenciación de macrófagos, la proliferación de linfocitos, el desarrollo de Th17 (Weaver *et al.*, *Immunity* 24:677-88, 2006), es un factor profibrogénico (Moodley *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29:490-98, 2003), puede inhibir la apoptosis en algunas células (Liu *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37:121-8, 2007) y se sabe que es liberado durante la fase temprana de la reparación tisular (Kishimoto *et al.*, *Science* 258:593-97, 1992). Se ha descubierto que RANTES, CXCL8 y CCL2 están aumentados en los pacientes con FPI, y se ha descubierto que CCL2 está elevado en el epitelio bronquiolar de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Chung, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 4:619-25, 2005; Kodama *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18:526-31, 1998; Tsoutsou *et al.*, *Respir. Med.* 100:938-45, Epub del 19 de octubre de 2005).

TNF- α tiene efectos pleiotrópicos, la mayoría de los cuales estimula una respuesta inflamatoria al actuar sobre las células mononucleares, los neutrófilos y las células endoteliales. En este estudio, TNF- α demostró tener un papel coestimulador en los fibrocitos con IL-25 para aumentar la secreción de citocinas proinflamatorias. TNF- α es producido por los macrófagos y linfocitos activados, las células epiteliales y las células endoteliales. Tiene un papel central en los eventos tempranos que conducen a la cascada de producción de citocinas y quimiocinas. Estimula directa o indirectamente la producción de varios factores, tales como TGF- β , IL-1, IL-6, CXCL8, CCL2, PDGF y el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos. Un gran número de estudios sobre la FPI y la EPOC ha demostrado que esta citocina está presente en las zonas de fibrosis pulmonar (Emad *et al.*, *J. Interferon Cytokine Res.* 27:38-43, 2007; Chung, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 4:619-25, 2005). TNF- α ha demostrado anteriormente en combinación con IL-25 en las células de músculo liso y los fibroblastos pulmonares humanos aumentar el ARNm de IL17RB e inducir la expresión de citocinas proinflamatorias (Letuve *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.* 117:590-6, 2006; Lajoie-Kadoch *et al.*, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 290:L1238-46, Epub del 20 de enero de 2006). La señalización intracelular inducida por IL-25 puede implicar la activación de la familia MAPK, así como NF- κ B (Lee *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:1660-4, 2001). La vía de señalización principal de TNF- α también es a través de la vía de NF- κ B y, por lo tanto, las vías de señalización solapantes pueden desempeñar un papel en el efecto sinérgico de IL-25 y TNF- α que induce la liberación de citocinas en los fibrocitos. Esto sugiere que IL-25 y TNF- α podrían actuar juntos en eventos fibróticos tempranos para activar las citocinas proinflamatorias liberadas desde los fibrocitos estimulados. La demostración en este estudio de que los fibrocitos tienen un IL17RB funcional puede sugerir que IL-25 actúa como mediador fibrótico a través de la estimulación de los fibrocitos circulantes y residentes.

Ejemplo 3**La modulación de la señalización de IL-25 modifica la función del fibrocito**

Se estudió el efecto de IL-25 sobre la capacidad proliferativa del fibrocito mediante la estimulación con IL-25 en solitario o en combinación con PDGF-AB durante 96 horas en medio sin suero. PDGF-AB ha demostrado potenciar la proliferación *in vitro* de los fibroblastos pulmonares [27]. PDGF-AB en solitario generó un aumento del 27% ($p < 0,001$) en la proliferación de fibrocitos pulmonares murinos (Fig. 2A). IL-25 en solitario aumentó significativamente la proliferación de fibrocitos pulmonares murinos a todas las concentraciones ensayadas ($p < 0,001$ para cada comparación), produciendo 1 ng/ml y 10 ng/ml de IL-25 un aumento del 30% en la proliferación de los fibrocitos (Fig. 2A). La adición de PDGF-AB a los fibrocitos pulmonares murinos estimulados con IL-25 incrementó el aumento de la actividad proliferativa en comparación con 10 ng/ml de IL-25 ($p = 0,04$) o con 10 ng/ml de PDGF-AB ($p = 0,02$) en solitario (Fig. 2A). El efecto proliferativo ($p < 0,02$) de PDGF-AB sobre los fibrocitos pulmonares murinos se confirmó mediante incorporación de BrdU (datos no mostrados). Por lo tanto, IL-25 y/o PDGF-AB exógenos pueden aumentar la proliferación de fibrocitos pulmonares murinos *in vitro*. La adición exógena de IL-25 a 1 ng/ml ($p = 0,006$) y 10 ng/ml ($p = 0,001$) también podía aumentar la proliferación de fibrocitos sanguíneos humanos significativamente en comparación con el control sin suero, al igual que 10 ng/ml de PDGF ($p = 0,024$) (Fig. 2B).

Se estudió el efecto del bloqueo de IL-25 sobre la proliferación de fibrocitos pulmonares murinos mediante AcMo de rata anti-IL-25 murina (AcMo 1923). La proliferación de fibrocitos pulmonares inducida por IL-25 se redujo significativamente con concentraciones de AcMo anti-IL-25 de 5,5 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,011$), 16,7 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,026$) y 50 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,001$) en comparación con IL-25 en solitario (Fig. 2). Para verificar que la respuesta de IL-25 era un efecto proliferativo y no un efecto apoptótico sobre los fibrocitos pulmonares murinos, se realizaron en los fibrocitos estudios de incorporación de BrdU, lo que dio como resultado una respuesta similar de AcMo anti-IL-25 de inhibición de la proliferación inducida por IL-25 en los fibrocitos pulmonares murinos (datos no mostrados). El AcMo de rata anti-IL-25 murina produjo un efecto dependiente de la dosis significativamente lineal ($p < 0,001$) sobre la proliferación de los fibrocitos pulmonares murinos inducida por IL-25 (10 ng/ml) (Fig. 2A) al reducir la proliferación en un 3,75% por cada aumento de 3 veces de la concentración de AcMo anti-IL-25 (Fig. 2C). También se observó una disminución significativa en la proliferación de fibrocitos pulmonares murinos inducida por IL-25 (1 ng/ml) utilizando un híbrido de IL17RB-Fc a 11 $\mu\text{g/ml}$ o más ($p < 0,001$ para 11 $\mu\text{g/ml}$, 33 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ de IL-25R) (Fig. 2D).

La diferenciación de los fibrocitos murino a células tipo miofibroblasto se potenció gracias a la estimulación con IL-25 exógena durante 96 horas en medio sin suero. TGF- β , una importante citocina fibrogénica y de regulación del crecimiento implicada en la remodelación tisular, aumenta la diferenciación y la actividad funcional de los fibrocitos en cultivo (Chesney *et al.*, J. Immunol. 160:419-25, 1998; Schmidt *et al.*, J. Immunol. 171:380-9, 2003). Los fibrocitos cultivados en medios sin suero expresaron constitutivamente α -SMA (Fig. 3) y el tratamiento con TGF- β aumentó la expresión de α -SMA en los fibrocitos pulmonares murinos ($p < 0,001$) (Fig. 3C). La estimulación de los fibrocitos pulmonares murinos con IL-25 a todas las concentraciones ensayadas (Fig. 3A) provocó aumentos significativos ($p < 0,001$) en la expresión de α -SMA en comparación con el control. Dentro de las concentraciones de IL-25 evaluadas, 10 ng/ml de IL-25 provocaron significativamente mayor expresión de α -SMA que 0,5 ng/ml ($p = 0,010$), 1 ng/ml ($p = 0,017$) y 20 ng/ml ($p = 0,007$) de IL-25. IL-25 aumentó la expresión de α -SMA también en los fibrocitos sanguíneos humanos a concentraciones de 1 ng/ml, 20 ng/ml y 50 ng/ml de IL-25, aunque el aumento sólo fue significativo para 50 ng/ml de IL-25 ($p = 0,025$) en comparación con el control sin suero (Fig. 3B).

Se evaluó el efecto del bloqueo de la diferenciación de los fibrocitos pulmonares murinos inducida por IL-25 mediante un AcMo de rata anti-IL-25 murina (AcMo 1923). El AcMo de rata anti-IL-25 murina ($p < 0,005$) a 50 $\mu\text{g/ml}$ podía bloquear completamente la diferenciación de los fibrocitos pulmonares murinos inducida por 10 ng/ml de IL-25 ($p < 0,001$ comparado con el control) (Fig. 3C). El grupo de 50 $\mu\text{g/ml}$ de AcMo anti-IL-25 fue significativamente diferente a todas las demás combinaciones de AcMo anti-IL-25 ($p < 0,001$ para cada comparación) y el grupo de IL-25 en solitario ($p < 0,001$). El AcMo de rata anti-IL-25 murina todavía mostró una reducción significativa en la expresión de α -SMA en comparación con el grupo de IL-25 en solitario a las concentraciones de 16,7 $\mu\text{g/ml}$ de grupo AcMo anti-IL-25 ($p = 0,001$), 5,5 $\mu\text{g/ml}$ de grupo AcMo anti-IL-25 ($p = 0,002$) y 1,9 $\mu\text{g/ml}$ de grupo AcMo anti-IL-25 ($p = 0,040$). Existía una relación dosis-respuesta significativa (Fig. 3C) entre la concentración de AcMo anti-IL-25 y la expresión de α -SMA cuando se combinaba el AcMo anti-IL-25 con IL-25. Estos estudios de diferenciación realizados en células de ratón y humanas demostraron que IL-25 podía aumentar la diferenciación de los fibrocitos a miofibroblastos y que la diferenciación podía ser bloqueada por un inhibidor de la señalización de IL-25.

Metodologías

Aislamiento de fibrocitos a partir de pulmones murinos, y de sangre periférica murina y humana.

Se extrajeron pulmones murinos en condiciones asépticas. Los pulmones combinados se picaron con tijeras en medio completo DMEM que contenía suero bovino fetal al 20%. Los pulmones se colocaron en 10 ml de medio en una placa de cultivo de tejidos de 100 cm^2 . Las células no adherentes se eliminaron después de 3 días y

las células se dejaron crecer durante otros 4 días en cultivo cuando las células alcanzaron el 80%-90% de confluencia. Las células se recolectaron utilizando Accutase y se tiñeron con anticuerpos anti-CD45 acoplados a bolas magnéticas (Miltenyi Biotec). A continuación, las células marcadas se clasificaron como positivas una o dos veces utilizando un aparato autoMacs según las instrucciones del fabricante. La tinción para citometría de flujo sobre esta población confirmó que estas células eran CD45⁺ colágeno (col) 1⁺.

Para la recogida de sangre humana, se recogieron y mantuvieron todos los permisos, autorizaciones y licencias necesarias, incluida la autorización de un Comité Institucional de Revisión (IRB) tercero pertinente de un Formulario y Protocolo de Consentimiento Informado y cualquier documentación pertinente relacionada con el estudio exigida por el IRB, para obtener, manipular, almacenar, guardar en un banco, transportar o utilizar muestras biológicas de empleados voluntarios del Centocor, R&D, Inc. En primer lugar, se aisló el total de PBMC de sangre humana o murina mediante centrifugación sobre Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Suecia) seguido del protocolo del fabricante. Después de 2 días en cultivo en placas de cultivo sin recubrimiento en DMEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementadas con FCS al 20% (HyClone Labs, Logan, UT), se eliminaron las células no adherentes mediante una única aspiración suave. Después de 10 a 12 días de cultivo continuo, las células adherentes se recogieron mediante incubación en Accutase y se empobrecieron mediante selección inmunomagnética en linfocitos T (pan-T, anti-CD2, Miltenyi Biotec), monocitos (anti-CD14, Miltenyi Biotec) y linfocitos B (Pan-B, anti-CD19, Miltenyi Biotec) contaminantes. Se determinó que la viabilidad celular era > 90% mediante análisis Guava.

Generación de anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-25

Una rata CD de 12-14 semana de edad (Charles River Laboratories) recibió dos inyecciones intraperitoneales (IP) de 50 µg de IL-25 murina (R&D Systems, Minneapolis, MN) emulsionada en adyuvante Titermax los días 0 y 14. El día 68, la rata recibió un refuerzo final de 50 µg de IL-25 murina subcutánea tres días antes de la recolección esplénica para la fusión. Se aisló el bazo, se preparó una suspensión de una sola célula y se llevó a cabo la fusión en una relación 1:1 entre células de mieloma murino FO y células de bazo viables según el método de De St. Groth [25]. La fusión celular se inició con PEG 4000 y los clones se cultivaron en presencia de medio HAT [DMEM con GlutamaxTM (modificado), complementado con FBS al 20%, Origen al 5%, 25 µg/ml de gentamicina (Sigma) y HAT (hipoxantina 100 µM, aminopterina 0,4 µM y timidina 16 µM (Sigma) y se sembraron en metilcelulosa semisólida (Medium D, StemCell Technologies) en placas de Petri grandes (Genetix, Hampshire, Reino Unido). Las placas se hicieron pasar por el instrumento ClonePix^{FL} (Genetix) para la selección de una sola colonia basándose en imágenes de luz blanca. Se seleccionaron colonias individuales en medio Medium E (StemCell Technologies) para realizar ensayos adicionales. El cribado primario de todos los sobrenadantes de hibridomas sin diluir se realizó mediante un ensayo ELISA de captura para IL-25. Todas las estirpes celulares que se unieron a la IL-25 murina recombinante se subclonaron limitando la dilución y se cribaron mediante ensayos ELISA en fase sólida y de captura para IL-25. Se identificó un clon de hibridoma neutralizante de IL-25, se hizo proliferar y el anticuerpo monoclonal expresado AcMo 1923 se purificó mediante purificación discontinua en matraz.

Inmunocitoquímica

Para la inmunofluorescencia, las células se sembraron en portaobjetos de 8 pocillos a $1,5 \times 10^4$ células/pocillo y se fijaron cuando alcanzaron la semiconfluencia (día 7) en formaldehído al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron varias veces en PBS. Las células se permeabilizaron con metanol durante 10 minutos a -20°C y se lavaron en tampón de tinción, se bloquearon y se detectaron utilizando los protocolos convencionales. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo monoclonal de rata anti-CD45 de ratón (dilución 1:40; BD Biosciences, San José CA), anticuerpo policlonal de conejo anti-colágeno I de ratón (dilución 1:200; Chemicon, Temecula, CA) o anticuerpo monoclonal de rata anti-IL-25R de ratón (dilución 1:50; R&D Systems). Los controles de isotipo fueron: control de isotipo IgG_{2b} de rata (dilución 1:320; BD Biosciences) y control de isotipo IgG de conejo (dilución 1:300; Imgenex, San Diego, CA). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron cabra anti-IgG de rata Alexa Fluor® 594 (H+L) (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) o cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor® 647 (H+L) (dilución 1:200; Molecular Probes). Todos los portaobjetos se observaron en el microscopio confocal láser (disco giratorio UltraVIEW ERS; Perkin Elmer, Wellesley, MA).

Análisis de citometría de flujo

Para el análisis de citometría de flujo de los fibrocitos pulmonares y sanguíneos murinos, se añadieron a los tubos de citometría de flujo 2×10^5 células viables y se sometieron a centrifugación. Las células se resuspendieron en 50 µl de tampón de tinción (BSA al 0,2% y azida sódica al 0,02% en PBS) y 1 µl de bloqueador de Fc (BD Biosciences) y se incubaron durante 10 minutos. Se añadió anticuerpo monoclonal anti-CD45 conjugado con PE (BD Biosciences) y se incubó durante 40 minutos, después de lo cual las células se lavaron, fijaron y permeabilizaron en BD Cytofix/CytopermTM (BD Biosciences) durante 20 minutos. Las células se resuspendieron en tampón BD, y las proteínas se detectaron con el anticuerpo primario de rata anti-IL-25R de ratón (dilución 1:50; R&D systems) y anti-colágeno I conjugado con biotina (dilución 1:150; Rockland, Gilbertsville, PA) seguido de cabra anti-IgG de rata Alexa Fluor® 488 (dilución 1:200; Molecular Probes) y conjugado con estreptavidina-aloficocianina (1:150; BD Biosciences). Las células se lavaron y fijaron con paraformaldehído al 3%. Los controles de isotipo fueron

control de isotipo IgG_{2b} de rata conjugado con PE (BD Biosciences), control de isotipo IgG_{2b} de rata (R&D Systems) y fracción IgG del anti-biotina (1:1.500; Rockland).

5 Para la citometría de flujo de los fibrocitos sanguíneos humanos, se añadieron a los tubos de citometría de flujo 2×10^5 células viables y se sometieron a centrifugación. Las células se resuspendieron en 50 μ l de tampón de tinción (BSA al 0,2% y azida sódica al 0,02% en PBS) y 1 μ l de bloqueador de Fc y se incubaron durante 10 minutos. Se añadió anticuerpo monoclonal anti-CD45 conjugado con PE (clon HI30, eBiosciences, San Diego, CA) y se incubó durante 40 minutos, después de lo cual las células se lavaron, fijaron y permeabilizaron en BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences) durante 20 minutos. Las células se resuspendieron en tampón BD, y las proteínas se detectaron utilizando anticuerpo de ratón anti-IL-25R humano (dilución 1:100; R&D systems) y anticuerpo anti-colágeno I conjugado con biotina (dilución 1:150; Rockland, Gilbertsville, PA), seguido de cabra anti-IgG de ratón Alexa Fluor® 488 (dilución 1:200; Molecular Probes) y conjugado con estreptavidina-alofococianina (dilución 1:150; BD Biosciences). Las células se lavaron y fijaron con paraformaldehído al 3%. Los controles de isotipo fueron control de isotipo IgG₁ de ratón (BD Biosciences), control de isotipo IgG_{2b} de rata (dilución 1:320; BD Biosciences) y fracción IgG del anti-biotina (dilución 1:1500; Rockland).

Estudios de secreción de proteínas

20 Para el ensayo de secreción de proteínas se sembraron fibrocitos pulmonares y sanguíneos murinos y fibrocitos sanguíneos humanos recién seleccionados a 1×10^4 células viables/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Las células se incubaron en los medios de control (BSA al 10% en DMEM) durante 5 días, se privaron de suero durante 24 horas, y se incubaron durante 24 horas en DMEM sin suero en presencia de IL-25 o TNF- α en solitario o IL-25 y TNF- α en combinación. Se midieron los niveles de citocinas/quimiocinas en el medio acondicionado mediante un panel de citocinas/quimiocinas de ratón - 22 Plex (Millipore, Billerica, MA) para los fibrocitos murinos o un panel de citocinas/quimiocinas humanas - 25 Plex (Millipore) para los fibrocitos humanos, y se analizaron en el sistema Luminex. Los datos se expresan como la media \pm DE (n = 2).

Ensayo de proliferación celular

30 Para el ensayo de proliferación celular se sembraron fibrocitos pulmonares murinos o fibrocitos sanguíneos humanos recién seleccionados a $0,5 \times 10^4$ células viables/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Las células se incubaron en los medios de control (BSA al 10% en DMEM) durante la noche. Los medios se eliminaron y sustituyeron con IL-25 o PDGF-AB en solitario o IL-25 y PDGF-AB en combinación en medios sin suero (BSA e ITS al 1% en DMEM). Se utilizó AcMo 1923 a concentraciones entre 0,62 μ g/ml-50 μ g/ml, y se utilizó el híbrido IL-25RFc humano maduro recombinante (R&D systems) a concentraciones entre 1,1 μ g/ml-100 μ g/ml. El IL-25RFc o el AcMo 1923 se incubaron con IL-25 durante 40 minutos antes de añadirse a los fibrocitos. La proliferación celular se midió utilizando CellTiter-Glo® (Promega, Madison WI) e incorporación de BrdU. Los datos se expresan como la media \pm DE (n = 3).

40 Ensayo de diferenciación

45 Para el ensayo de diferenciación celular se sembraron fibrocitos pulmonares murinos o fibrocitos sanguíneos humanos recién seleccionados a $1,5 \times 10^4$ células viables/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos opaca. Las células se incubaron en los medios de control (BSA al 10% en DMEM) durante la noche. Los medios se eliminaron y sustituyeron con IL-25 o TGF- β en solitario en medios sin suero (BSA e ITS al 1% en DMEM). Se utilizó AcMo 1923 a concentraciones entre 0,62 μ g/ml-50 μ g/ml, y se incubó con IL-25 durante 40 minutos antes de añadirse a los fibrocitos. Las células se incubaron durante 96 horas a 37°C, se fijaron en metanol al 100%, se bloquearon y se tiñeron con anti-alfa actina de músculo liso (dilución 1:400; Sigma) seguido de anti-IgG de ratón conjugado con HRP (dilución 1:2.000; Sigma) durante 60 minutos a temperatura ambiente. La densidad óptica de los pocillos se analizó utilizando un lector de placas a una longitud de onda de 405 nm. Los datos se expresan como la media \pm DE (n = 3).

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Método *in vitro* de supresión de la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito mediante un inhibidor que actúa sobre IL-25 y/o el receptor de IL-25, o inhibe específicamente la interacción de IL-25 con el receptor de IL-25, que comprende inhibir la señalización de IL-25 en el fibrocito.
- 10 2. Inhibidor de la señalización de IL-25 que actúa sobre IL-25 y/o el receptor de IL-25, o inhibe específicamente la interacción de IL-25 con el receptor de IL-25 para utilizarse en un método de tratamiento de afecciones fibróticas en las cuales el tratamiento se consigue suprimiendo la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito en un sujeto con una afección relacionada con la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, en la que la inhibición de la señalización de IL-25 comprende poner en contacto los fibrocitos con un inhibidor que se une específicamente a IL-25 o al receptor de IL-25.
- 20 4. Inhibidor para utilizarse según la reivindicación 2, en la que el inhibidor se une específicamente a IL-25 o al receptor de IL-25.
- 25 5. Método según la reivindicación 3, o inhibidor para utilizarse según la reivindicación 4, en las que el inhibidor está seleccionado de un grupo que consiste en
- a) un anticuerpo;
 - b) un fragmento de anticuerpo;
 - c) un péptido;
 - d) un polipéptido;
 - e) un oligonucleótido;
 - f) una molécula pequeña; y
 - g) una combinación de los mismos.
- 30 6. Método según la reivindicación 5, en la que el inhibidor está seleccionado de un grupo que consiste en
- a) un receptor de IL-25 soluble;
 - b) un anticuerpo contra IL-25; y
 - c) un anticuerpo antagonista contra el receptor de IL-25.
- 35 7. Método según la reivindicación 3, o inhibidor para utilizarse según la reivindicación 4, en las que el receptor de IL-25 es IL17RB.
- 40 8. Método según la reivindicación 1, o inhibidor para utilizarse según la reivindicación 2, en las que los fibrocitos son fibrocitos pulmonares residentes o fibrocitos circulantes.
- 45 9. Inhibidor para utilizarse según la reivindicación 2, en la que el sujeto es un ser humano.
- 50 10. Inhibidor para utilizarse según la reivindicación 2, en la que la afección con proliferación de los fibrocitos, diferenciación de los fibrocitos o secreción de proteínas por el fibrocito es:
- a) una afección fibrótica;
 - b) un cáncer; o
 - c) la enfermedad de Crohn, la cistitis crónica, una enfermedad autoinmunitaria, la artritis reumatoide, la enfermedad de Lyme, la cicatrización postquirúrgica, la cicatrización de heridas, o las lesiones por radiación.
- 55 11. Inhibidor para utilizarse según la reivindicación, 10 en la que:
- a) la afección fibrótica es una fibrosis específica de órgano o una fibrosis sistémica; o
 - b) el cáncer es el cáncer de mama, el cáncer de piel, el cáncer de páncreas, o el cáncer de cuello uterino.
- 60 12. Inhibidor para utilizarse según la reivindicación 11, en la que:
- a) la fibrosis específica de órgano es la fibrosis pulmonar, la fibrosis hepática, la fibrosis de riñón o renal, la fibrosis cardíaca, la fibrosis pancreática, la fibrosis vascular, la fibrosis cutánea, la fibrosis ocular o la fibrosis de médula ósea; o
 - b) la fibrosis sistémica es la esclerosis sistémica, la fibrosis sistémica nefrogénica o la enfermedad de injerto contra hospedador.
- 65 13. Inhibidor para utilizarse según la reivindicación 12, en la que:

- 5 a) la fibrosis pulmonar está relacionada con la fibrosis pulmonar de origen medicamentoso, la fibrosis pulmonar idiopática, el asma, la sarcoidosis, la neumonía intersticial idiopática o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica;
- b) la fibrosis hepática está relacionada con la cirrosis, la esquistosomiasis o la colangitis;
- c) la fibrosis renal está relacionada con la glomeruloesclerosis lúpica, la glomerulonefritis proliferativa, la glomerulonefritis esclerosante, la dermatopatía fibrosante nefrogénica, o la nefropatía diabética; o
- 10 d) la fibrosis cardíaca está relacionada con el infarto de miocardio, la reestenosis coronaria, la miocardiopatía congestiva, o la insuficiencia cardíaca;
- e) la fibrosis pancreática está relacionada con la remodelación del estroma, la pancreatitis, o la fibrosis estromal;
- f) la fibrosis vascular está relacionada con la reestenosis arterial tras la angioplastia, o la aterosclerosis;
- g) la fibrosis cutánea está relacionada con la cicatrización de quemaduras, los queloides, la esclerodermia, la psoriasis, o la dermatopatía fibrosante nefrogénica;
- 15 h) la fibrosis ocular está relacionada con la fibrosis retroorbital, la post-cirugía de cataratas, la vitreorretinopatía proliferativa, la fibrosis corneal, la cicatrización corneal por cirugía, o la catarata de la cápsula anterior; o
- i) la fibrosis de médula ósea está relacionada con la mielofibrosis idiopática o la mielofibrosis de origen medicamentoso.

20 14. Inhibidor para utilizarse según la reivindicación 13, en la que:

- a) la cirrosis es la cirrosis post-hepatitis C, la cirrosis post-hepatitis B, la cirrosis inducida por alcohol, fármacos o sustancias químicas, o la cirrosis biliar primaria; o
- b) la colangitis es la colangitis esclerosante.

25 15. Método *in vitro* de identificación de moduladores de la señalización de IL-25 que suprimen la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito, que comprende:

- a) proporcionar los fibrocitos;
- b) proporcionar un modulador de ensayo;
- 30 c) poner en contacto los fibrocitos con el modulador de ensayo;
- d) determinar un efecto del modulador de ensayo sobre la señalización de IL-25;
- e) determinar el efecto del modulador de ensayo sobre la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, y la secreción de proteínas por el fibrocito; y
- 35 f) seleccionar el modulador que
- i) modula la señalización de IL-25; y
- II) modula la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito.

40 16. Método según la reivindicación 15, que selecciona adicionalmente el modulador que:

- a) inhibe la señalización de IL-25; y
- b) suprime la proliferación de los fibrocitos, la diferenciación de los fibrocitos, o la secreción de proteínas por el fibrocito.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Fig. 1

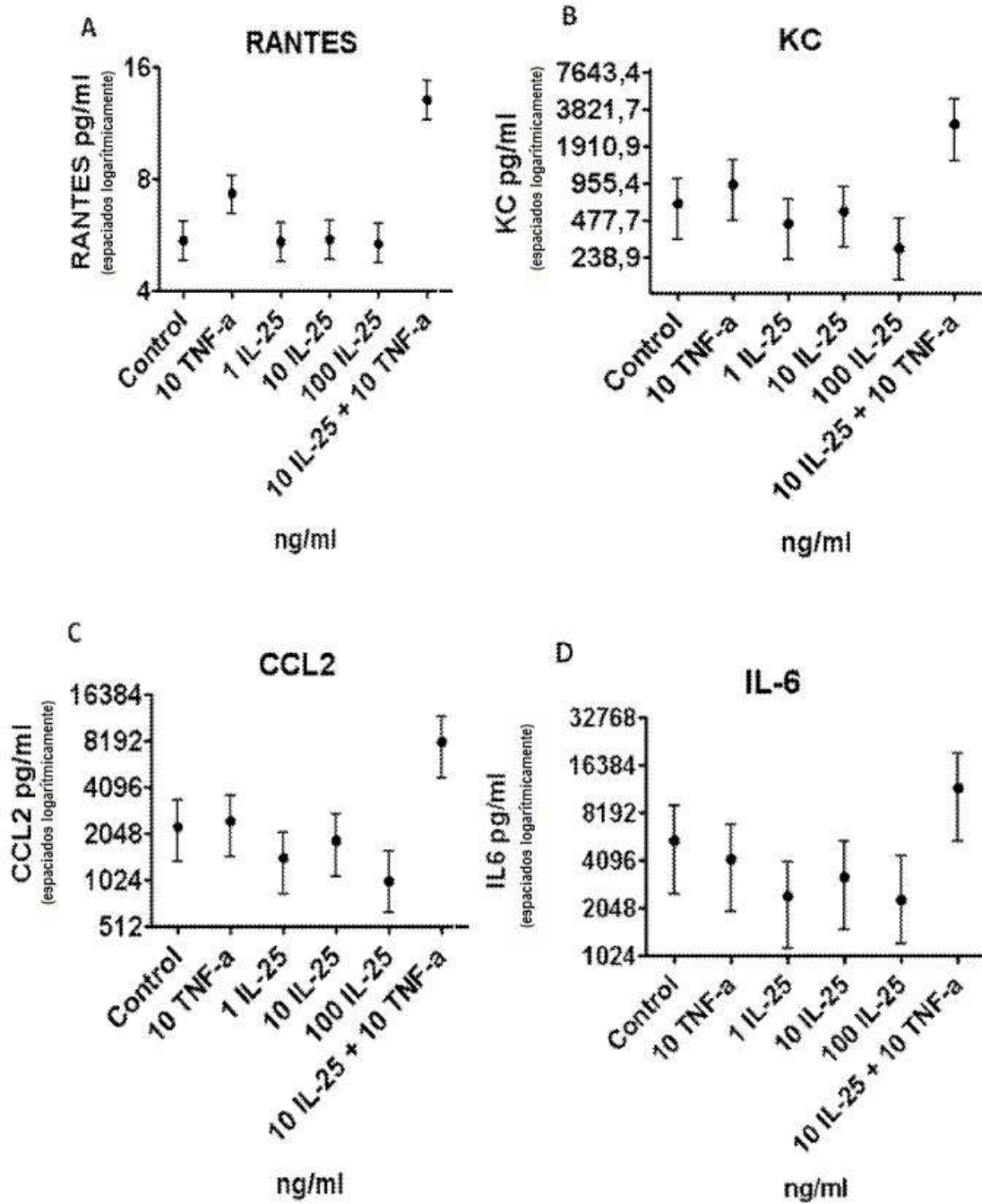


Fig. 2A

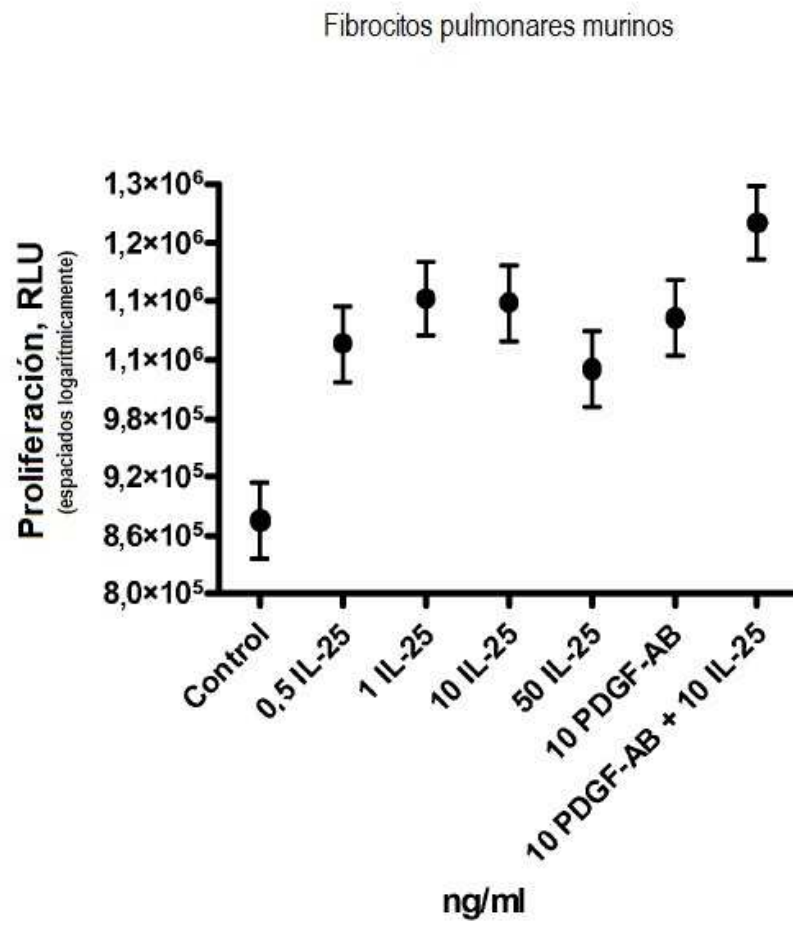


Fig. 2B

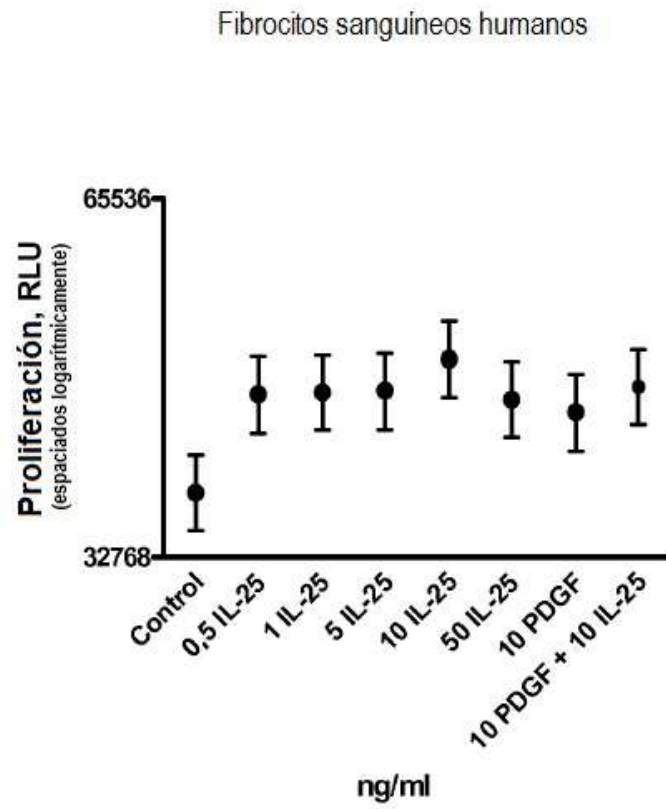


Fig. 2C

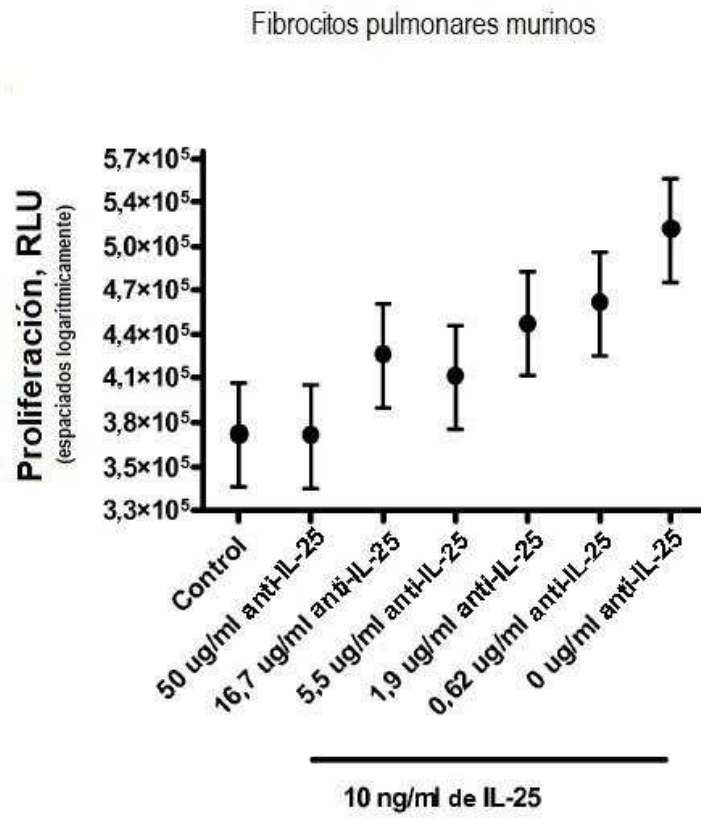


Fig. 2D

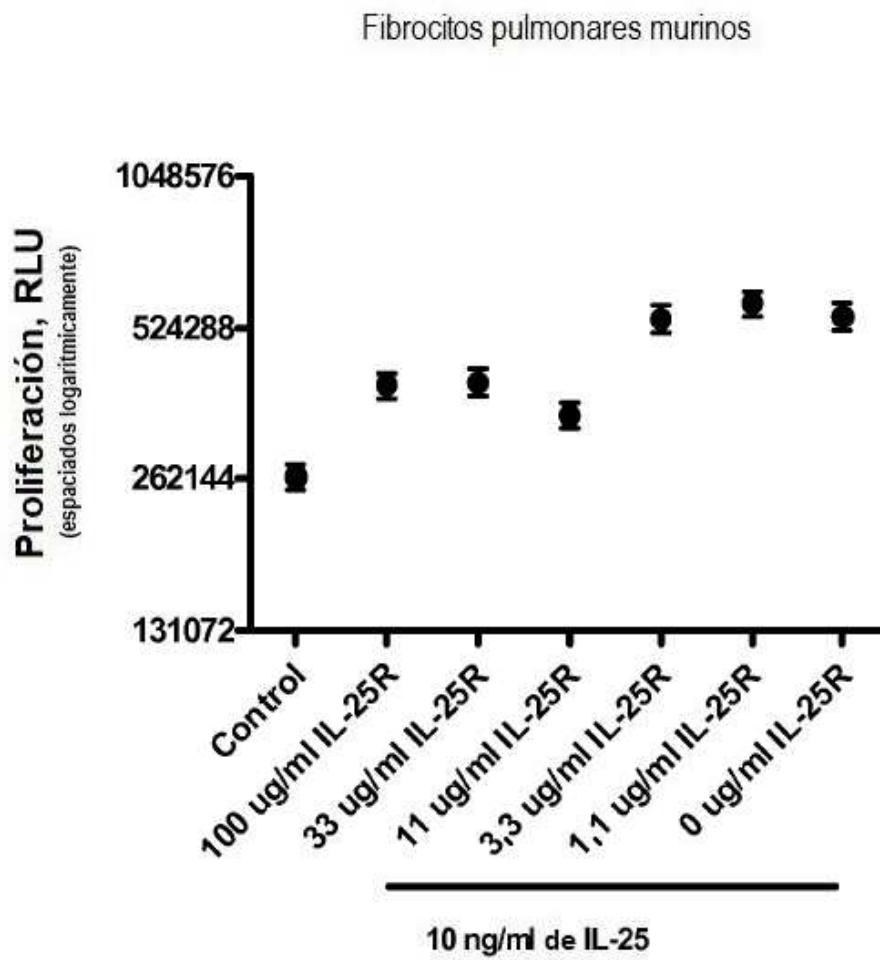


Fig 3A.

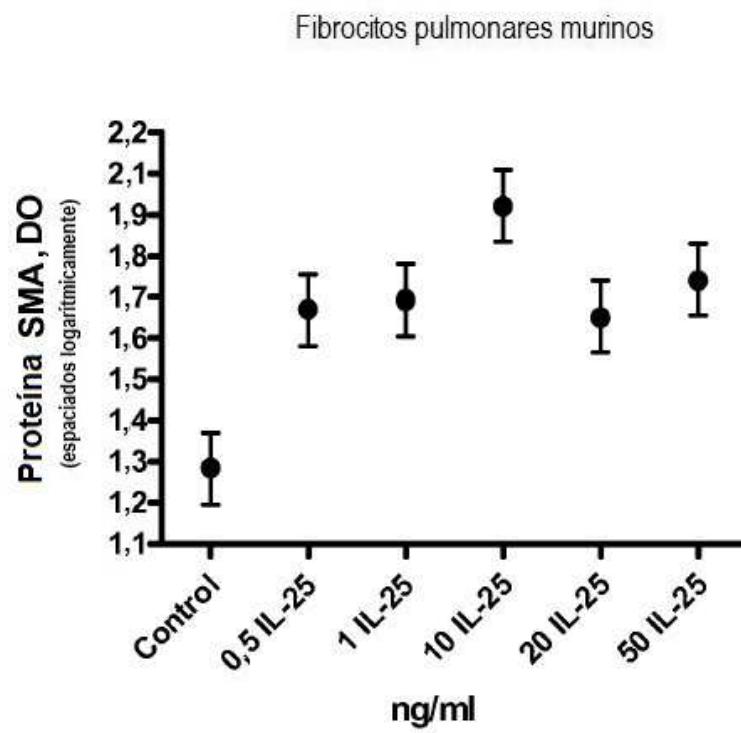


Fig. 3B

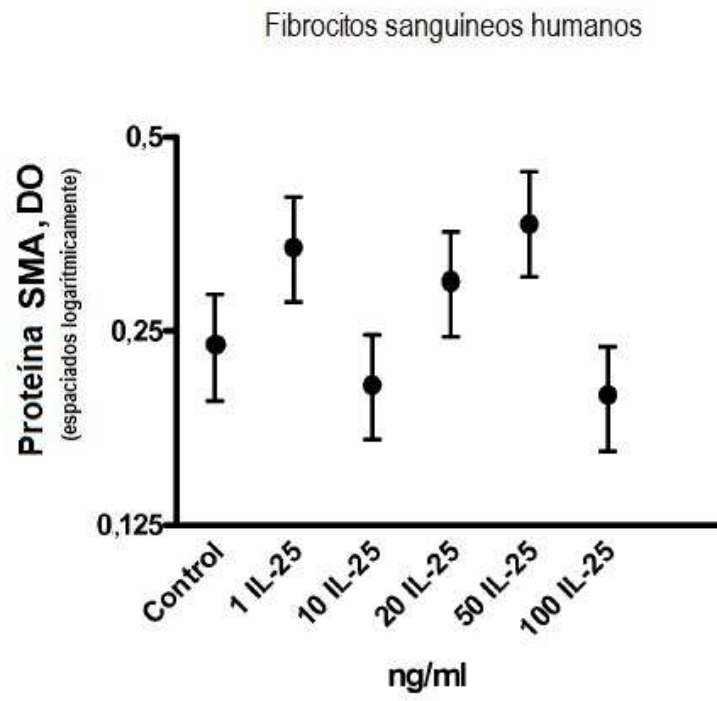


Fig. 3C

