

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 943**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2010 PCT/FI2010/050689**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2011 WO11029996**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2010 E 10815041 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2475387**

54 Título: **Inhibidores de VAP-1 para el uso en el tratamiento de afecciones fibróticas**

30 Prioridad:

08.09.2009 US 240402 P
12.04.2010 US 323032 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2018

73 Titular/es:

BIOTIE THERAPIES CORP. (50.0%)
Joukahaisenkatu 6
20520 Turku , FI y
THE UNIVERSITY OF BIRMINGHAM (50.0%)

72 Inventor/es:

WESTON, CHRISTOPHER;
CLARIDGE, LEE, CHARLES;
ADAMS, DAVID;
SMITH, DAVID;
WESTERLUND, NINA;
PIHLAVISTO, MARJO y
ÖSTERMAN, THUA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 657 943 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

Inhibidores de VAP-1 para el uso en el tratamiento de afecciones fibróticas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a inhibidores de VAP-1 para el uso como agentes anti-fibróticos.

5 Antecedentes de la invención

Las afecciones fibróticas se dan normalmente como resultado de un proceso alterado de cicatrización de heridas tras traumatismo o inflamación crónica. La patología fibrótica es especialmente prevalente en órganos que están expuestos con regularidad a agresiones químicas y biológicas, p.ej. hígado, pulmón, piel y riñón. Independientemente de si el trastorno es agudo o crónico, comparten la característica común de activación anormal de fibroblastos y acumulación de matriz extracelular (ECM), lo que conduce a una pérdida de la función del órgano, ya que el tejido normal se sustituye por tejido cicatricial. La afección es progresiva, a menudo irreversible, con mal pronóstico y mala tasa de supervivencia.

La composición de la cicatrización fibrótica es bastante similar, independientemente de la causa de la lesión. El diagnóstico y la verificación de la gravedad de la fibrosis son de suma importancia desde el punto de vista pronóstico. El proceso de toma de decisiones para el tratamiento se basa en gran medida en la evaluación de la fibrosis, su progresión y la aparición de complicaciones. En la fibrosis hepática, la biopsia hepática percutánea es el método de referencia para clasificar y estadificar la enfermedad hepática. Sin embargo, es un procedimiento invasivo con ciertos riesgos y complicaciones inevitables, asociados habitualmente a dolor y molestias. Las tasas de mortalidad, debidas a las complicaciones del procedimiento, oscilan de 1:1000 a 1:10.000 (Crockett et al., 2006).

Se ha descubierto que los niveles de actividad de monoamina oxidasa en suero están elevados en los pacientes con cirrosis, hepatitis crónica y cáncer hepático asociado a fibrosis, pero se descubrió que eran normales en los pacientes con trastornos inflamatorios del tejido conectivo, tales como artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico (McEwen y Castell 1967, J Lab Clin Med. 70:36-47; Ito et al. 1971 Digestion. 4:49-58; Ma Lin et al., 1976, Proc Soc Exp Biol Med. 151:40-3). Sin embargo, la actividad elevada de monoamina oxidasa en suero solamente se ha considerado un marcador o una respuesta a la lesión del tejido, y no se ha sabido que tenga un papel en la patogénesis de la fibrosis.

Las aproximaciones terapéuticas convencionales se han centrado en gran medida en el proceso inflamatorio de la fibrosis, mediante el uso de corticosteroides y fármacos inmunosupresores. Sin embargo, desafortunadamente estos agentes tienen poco o ningún efecto clínico, y existe una necesidad evidente de fármacos nuevos para tratar las afecciones fibróticas.

Breve descripción de la invención

Los objetivos de la presente invención se refieren a inhibidores de VAP-1 para el uso como agentes anti-fibróticos y al uso de los inhibidores de VAP-1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección fibrótica, en los que el inhibidor de VAP-1 es un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano que comprende de una a tres secuencias consenso de CDR seleccionadas de un grupo que consiste en SEQ ID N°s 1 a 3 y/o un polipéptido de la cadena ligera que comprende de una a tres secuencias consenso de CDR seleccionadas de un grupo que consiste en SEQ ID N°s 24 a 26. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo anti-VAP-1 tiene un polipéptido de la cadena pesada que comprende una primera secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 4 a 8, una segunda secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 9 a 13, y una tercera secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 14 a 18, y/o un polipéptido de la cadena ligera que comprende una primera secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 27 a 31, una segunda secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 32 a 36 y una tercera secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 37 a 41.

En ciertas realizaciones adicionales, dicho anticuerpo anti-VAP-1 tiene una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID N°s 19 a 23, y una región variable de la cadena ligera respectiva que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID N°s 42 a 46. En ciertas realizaciones adicionales, dicho anticuerpo es un anticuerpo recombinante completamente humano que comprende un polipéptido de la cadena pesada representado en SEQ ID N° 47 y un polipéptido de la cadena ligera representado en SEQ ID N° 48.

En ciertas realizaciones adicionales de los objetivos anteriores, la afección fibrótica se selecciona de un grupo que consiste en fibrosis hepática y las afecciones inflamatorias que predisponen a ella, es decir, hepatitis aguda y crónica, enfermedad biliar y lesión hepática tóxica, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, que incluye la que resulta de nefropatía diabética, mielofibrosis, fibrosis pancreática, esclerodermia, enfermedades del tejido conectivo, cicatrización, fibrosis de la piel, fibrosis cardíaca, trasplante de órganos, estenosis vascular, reestenosis, fibrosis arterial, artrofibrosis, fibrosis mamaria, fibrosis muscular, fibrosis retroperitoneal, fibrosis de tiroides, fibrosis de nódulos linfáticos, fibrosis de vejiga, fibrosis pleural y EPOC, una enfermedad en la que las paredes de las vías respiratorias son fibróticas, con la acumulación de miofibroblastos y colágeno, y, como todos los tejidos fibróticos,

están contraídas.

Se exponen otras realizaciones específicas de la invención en las reivindicaciones dependientes.

Otros objetivos, detalles y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de los siguientes dibujos, descripción detallada y ejemplos.

5 Breve descripción de los dibujos

A continuación la invención se describirá con más detalle por medio de realizaciones preferidas con referencia a los dibujos adjuntos, en los que

La Figura 1 demuestra que la administración del anticuerpo hacia VAP-1 BTT-1029 da como resultado una protección casi completa contra la fibrosis hepática inducida con CCl_4 . Tinción con rojo Sirius de hígados de ratones WT y con inactivación de VAP-1 a los que se inyectó aceite mineral (MO, grupo de control), CCl_4 o CCl_4 en paralelo con anticuerpo hacia VAP-1. Se llevó a cabo la medida cuantitativa de la cicatrización fibrótica mediante el uso del análisis del umbral con Image J. Se muestra la media \pm EEM de tres grupos. Aumento x10.

La Figura 2 demuestra que los hígados tratados con anticuerpo hacia VAP-1 y los hígados con inactivación de VAP-1 muestran una carencia prominente de hepatitis y áreas necróticas a pesar de la inducción de fibrosis con CCl_4 . Se muestra la tinción con hematoxilina y eosina a un aumento x20, que destaca hepatocitos necróticos (puntas de flecha) y hepatitis en curso (flechas).

La Figura 3 demuestra que el incremento de la expresión de colágeno IV y elastina en los tejidos fibróticos se previene mediante el anticuerpo hacia VAP-1. Se llevaron a cabo las medidas cuantitativas de la tinción de colágeno IV, elastina y laminina mediante el uso del análisis del umbral con Image J. Se muestra la media \pm EEM de tres grupos.

La Figura 4 demuestra que los niveles de mRNA indican un efecto regulador de VAP-1 sobre las células estrelladas hepáticas y los fibroblastos. Se muestra el análisis mediante RT-PCR cuantitativa de elastina, α SMA, VAP-1 y TIMP1. Los datos se expresan como media \pm EEM de tres ratones medidos tres veces. * $p < 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$ (ANOVA).

La Figura 5 demuestra que la VAP-1 soluble y la actividad de SSAO en el suero se incrementan en respuesta a la fibrosis hepática inducida con CCl_4 . La Figura 5A ilustra el efecto de la fibrosis hepática inducida con CCl_4 sobre los niveles de VAP-1 soluble en suero analizados con un ensayo DELFIA fluorimétrico de tiempo resuelto. La Figura 5B muestra que se hallaron niveles incrementados de actividad de SSAO en suero de hígados WT inducidos con CCl_4 con un ensayo radioquímico.

La Figura 6 demuestra que las lesiones glomerulares inducidas con CCl_4 se recuperan en ratones con inactivación de VAP-1 y en ratones C57BL/6 tratados con anticuerpo hacia VAP-1. Se muestra la tinción con hematoxilina y eosina a un aumento x40 destacando el glomérulo.

La Figura 7 muestra que la acumulación de colágeno, como resultado de la fibrosis glomerular inducida con CCl_4 , se reduce significativamente en los ratones con inactivación de VAP-1 y los ratones tratados con anticuerpo hacia VAP-1. Se muestra la tinción con rojo Sirius de riñones de ratones WT y con inactivación de VAP-1 a los que se inyectó aceite mineral (MO, grupo de control), CCl_4 o CCl_4 en paralelo con anticuerpo hacia VAP-1. Se llevó a cabo la medida cuantitativa de la cicatrización fibrótica mediante el uso del análisis del umbral con Image J. Se muestra la media \pm EEM de tres grupos. Aumento x40.

La Figura 8 ilustra la reducción del recuento de células totales en líquido de lavado broncoalveolar de ratones expuestos a humo de tabaco tratados con anticuerpo hacia VAP-1 (BTT-1029) en comparación con los ratones tratados con vehículo.

La Figura 9 ilustra la reducción del recuento de células totales en líquido de lavado broncoalveolar de ratones expuestos a humo de tabaco tratados con roflumilast de control en comparación con los ratones tratados con vehículo.

La Figura 10 muestra una reducción significativa en la formación de media en el grupo tratado con dexametasona y ambos grupos tratados con inhibidor de SSAO (BTT-2089) en comparación con el grupo de control tratado con NaCl al 0,9%.

La Figura 11 muestra una reducción significativa en la formación de neointima en el grupo tratado con dexametasona y ambos grupos tratados con inhibidor de SSAO (BTT-2089) en comparación con el grupo de control tratado con NaCl al 0,9%.

La Figura 12 muestra ejemplos de segmentos de vasos teñidos con hematoxilina-floxina-azafrán (HPS). El tamaño de la luz se incrementa en los grupos C y D tratados con el inhibidor de SSAO en comparación con el grupo de control A. A - grupo de NaCl al 0,9%; B - Dexametasona; C - BTT2089 10 mg/kg; D - BTT-2089 30 mg/kg.

La Figura 13 muestra tejido de hígado normal, cirrótico NASH y cirrótico ALD teñido con un anticuerpo anti-VAP-1 o un anticuerpo de control del mismo isotipo. La tinción de VAP-1 se muestra más oscura en el hígado cirrótico NASH y cirrótico ALD en comparación con el hígado normal o de control de isotipo, y refleja un incremento de la expresión de VAP-1 en las áreas de fibrosis.

- 5 La Figura 14 muestra tejido de un hígado normal y un hígado cirrótico NASH teñido con un anticuerpo anti-VAP-1, anti-CD31 y anti-colágeno IV. La tinción de VAP-1 se indica con flechas, y solamente está presente de manera predominante en el hígado cirrótico NASH, y refleja el incremento de la expresión de VAP-1 en las áreas de fibrosis.

La Figura 15 muestra tejido de un hígado cirrótico NASH teñido con un anticuerpo anti-VAP-1, anti-CD90 y anti-CD3. La tinción de VAP-1 se indica con flechas, y está presente en el hígado cirrótico NASH, y refleja el incremento de la expresión de VAP-1 en las áreas de fibrosis.

La Figura 16 muestra células estrelladas hepáticas teñidas con un anticuerpo anti-VAP-1 y anti-actina de músculo liso, y miofibroblastos hepáticos teñidos con un anticuerpo anti-VAP-1, anti-CD90 y anti-colágeno IV. La tinción de VAP-1 se indica con flechas, y está presente en las células estrelladas hepáticas y los miofibroblastos hepáticos.

La Figura 17 es una gráfica de dispersión de los niveles de sVAP-1 y el correspondiente estadio histológico de la fibrosis. Las líneas indican los valores medios.

La Figura 18 muestra curvas características operativas del receptor (ROC) para sVAP-1 usada como único biomarcador para predecir la fibrosis hepática significativa (F2-4) (Fig. 18A), fibrosis hepática avanzada (F3-4) (Fig. 18B) y cirrosis (F4) (Fig. 18C).

La Figura 19 muestra curvas características operativas del receptor (ROC) para una puntuación de fibrosis calculada a partir del nivel de sVAP-1, el estado diabético y la proporción AST/ALT ($0,837 + sVAP-1 \text{ (ng/ml)} \times 0,001 + \text{Diabetes (sí=1 no=0)} \times 0,591 + \log \text{AST/ALT} \times 0,8$) para predecir la fibrosis significativa (F2-4) (Fig. 19A), fibrosis avanzada (F3-4) (Fig. 19B) y cirrosis (F4) (Fig. 19C).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que la Proteína de Adhesión Vascul-20 ar-1 (VAP-1), también conocida como amina oxidasa sensible a semicarbazida (SSAO) y definida mediante el gen humano AOC3, desempeña un papel directo en la formación del tejido fibrótico. Hasta la fecha, se ha demostrado que VAP-1 está implicada en varias enfermedades inflamatorias actuando como mediadora en la migración de leucocitos al tejido, pero no se ha demostrado que esté implicada directamente en la patogénesis de la fibrosis propiamente dicha.

El término "fibrosis" se refiere a una formación o presencia de tejido conectivo en exceso en un órgano o tejido. Se puede dar como una respuesta de reparación o sustitución a un estímulo, tal como la lesión o inflamación del tejido.

Uno de los objetivos subyacentes de la presente invención fue investigar el papel de los inhibidores de VAP-1 para proteger diversos órganos contra la lesión fibrótica. Se han obtenido resultados excelentes, p.ej., en la lesión hepática fibrótica crónica provocada mediante tetracloruro de carbono en ratones, en un modelo en ratón inducido con humo de tabaco de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y en un modelo en ratón de remodelación vascular, estenosis vascular y engrosamiento de la neoíntima (fibrosis). Así, los inhibidores de VAP-1 pueden considerarse de hecho agentes antifibróticos.

En la presente memoria se describe un método para disminuir o tratar la fibrosis in vivo en el cuerpo humano, administrando, a un paciente humano que necesita tal tratamiento, un nivel eficaz de un inhibidor de VAP-1. Los términos "tratamiento" o "tratar" pretenden incluir la administración de inhibidores de VAP-1 a un sujeto para fines que pueden incluir la profilaxis, mejora, prevención o curación de trastornos que implican fibrosis, tales como fibrosis hepática y las afecciones inflamatorias que predisponen a ella, es decir, hepatitis aguda y crónica, enfermedad biliar y lesión hepática tóxica, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, que incluye la que resulta de nefropatía diabética, mielofibrosis, fibrosis pancreática, esclerodermia, enfermedades del tejido conectivo, cicatrización, fibrosis de la piel, fibrosis cardiaca, trasplante de órganos, estenosis vascular, reestenosis, fibrosis arterial, artrofibrosis, fibrosis mamaria, fibrosis muscular, fibrosis retroperitoneal, fibrosis de tiroides, fibrosis de nódulos linfáticos, fibrosis de vejiga, fibrosis pleural y EPOC, una enfermedad en la que las paredes de las vías respiratorias son fibróticas, con la acumulación de miofibroblastos y colágeno, y, como todos los tejidos fibróticos, están contraídas.

Un "nivel eficaz" de un inhibidor de VAP-1 quiere decir un nivel en el que los efectos perjudiciales de la fibrosis, como mínimo, mejoran. Las cantidades y regímenes para la administración de los inhibidores de VAP-1 los pueden determinar fácilmente las personas de experiencia habitual en la técnica clínica para el tratamiento de trastornos relacionados con la fibrosis. Preferiblemente, los inhibidores de VAP-1 que son anticuerpos anti-VAP-1 monoclonales se proporcionan de manera intravascular a intervalos que oscilan entre una vez a la semana y una vez cada tres meses, a dosis en el intervalo de 0,01 a 20 mg/kg, más preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 15 mg/kg, lo más preferiblemente 1,0 a 10 mg/kg. De manera alternativa, los inhibidores de VAP-1 se proporcionan de manera subcutánea a intervalos que oscilan entre una vez a la semana y una vez cada tres meses, a dosis en el intervalo de 0,1 a 20 mg/kg, más preferiblemente en el intervalo de 0,2 a 10 mg/kg, lo más preferiblemente 0,5 a 5 mg/kg.

También se describen inhibidores de SSAO, que se pueden administrar en una cantidad eficaz dentro del intervalo de dosis de alrededor de 0,1 µg/kg a alrededor de 300 mg/kg, preferiblemente entre 1,0 µg/kg y 10 mg/kg. Tales compuestos se pueden administrar en una única dosis diaria, o por kg de peso corporal, y la dosis diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día.

5 El aspecto anterior se puede formular de una manera alternativa, es decir, de forma que ciertas realizaciones de la presente invención proporcionan anticuerpos anti-VAP-1 como agentes antifibróticos para prevenir, tratar y/o aliviar una afección fibrótica, tales como fibrosis hepática y las afecciones inflamatorias que predisponen a ella, es decir, hepatitis aguda y crónica, enfermedad biliar y lesión hepática tóxica, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, que incluye la que resulta de nefropatía diabética, mielofibrosis, fibrosis pancreática, esclerodermia, enfermedades del tejido conectivo, cicatrización, fibrosis de la piel, fibrosis cardíaca, trasplante de órganos, estenosis vascular, reestenosis, fibrosis arterial, artrofibrosis, fibrosis mamaria, fibrosis muscular, fibrosis retroperitoneal, fibrosis de tiroides, fibrosis de nódulos linfáticos, fibrosis de vejiga, fibrosis pleural y EPOC, una enfermedad en la que las paredes de las vías respiratorias son fibróticas, con la acumulación de miofibroblastos y colágeno, y, como todos los tejidos fibróticos, están contraídas. Por lo tanto, se pueden usar anticuerpos anti-VAP-1 para la fabricación de un medicamento para dichas afecciones fibróticas.

La expresión "inhibidor de VAP-1" se refiere a cualquier compuesto que tiene la capacidad de bloquear la función de VAP-1 o su actividad de SSAO. Los inhibidores de VAP-1 se pueden dividir en dos categorías principales, anticuerpos bloqueantes e inhibidores de SSAO.

20 Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "anticuerpo anti-VAP-1" (Ab) o "anticuerpo anti-VAP-1 monoclonal" (MAb) pretenden incluir los anticuerpos intactos así como los fragmentos de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, que son capaces de unirse de manera específica a la proteína VAP-1.

Los anticuerpos anti-VAP-1 adecuados para el uso en los diversos aspectos de la presente invención están disponibles en la técnica, y se pueden producir anticuerpos adicionales mediante métodos conocidos para una persona experta. Por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.580.780 describe un anticuerpo monoclonal (mAb), 1B2, que reconoce VAP-1 humana y que puede bloquear la unión de linfocitos a HEV amigdalinas en un ensayo con cortes congelados. El MAb 1B2 es un anticuerpo IgM murino y es específico de VAP-1 humana. La publicación de patente internacional WO 03/093319 describe un anticuerpo monoclonal anti-VAP-1 quimérico BTT-1002, que tiene una inmunogenicidad reducida en comparación con los anticuerpos murinos correspondientes. Sin embargo, al ser un anticuerpo quimérico su aplicabilidad para la terapia humana está comprometida, debido a su inmunogenicidad y a la producción resultante de anticuerpos contra él.

La publicación de patente internacional WO 2008/129124 describe anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos con una reducida inmunogenicidad y liberación de citocinas. Los ejemplos de anticuerpos anti-VAP-1 monoclonales completamente humanos preferidos incluyen los que tienen un polipéptido de la cadena pesada que comprende de una a tres secuencias consenso de CDR seleccionadas de un grupo que consiste en SEQ ID N°s 1 a 3 y/o un polipéptido de la cadena ligera que comprende de una a tres secuencias consenso de CDR seleccionadas de un grupo que consiste en SEQ ID N°s 24 a 26. Otros anticuerpos anti-VAP-1 preferidos incluyen los que tienen un polipéptido de la cadena pesada que comprende una primera secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 4 a 8, una segunda secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 9 a 13, y una tercera secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 14 a 18, y/o un polipéptido de la cadena ligera que comprende una primera secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 27 a 31, una segunda secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 32 a 36 y una tercera secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 37 a 41.

En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano es uno indicado como 8C10, y comprende una región variable de la cadena pesada representada en SEQ ID N° 19 y una región variable de la cadena ligera representada en SEQ ID N° 42. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-VAP-1 es uno indicado como 8A4 y comprende una región variable de la cadena pesada representada en SEQ ID N° 20 y una región variable de la cadena ligera representada en SEQ ID N° 43. En las realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-VAP-1 es uno indicado como 3F10 y comprende una región variable de la cadena pesada representada en SEQ ID N° 21, y una región variable de la cadena ligera representada en SEQ ID N° 44. En las realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-VAP-1 es uno indicado como 5F12 y comprende una región variable de la cadena pesada representada en SEQ ID N° 22, y una región variable de la cadena ligera representada en SEQ ID N° 45. En las realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-VAP-1 es uno indicado como 4B3 y comprende una región variable de la cadena pesada representada en SEQ ID N° 23, y una región variable de la cadena ligera representada en SEQ ID N° 46. Estos anticuerpos también se pueden proporcionar como anticuerpos recombinantes, tales como r8C10 recombinante (BTT-1023) que comprende un polipéptido de la cadena pesada representado en SEQ ID N° 47, y un polipéptido de la cadena ligera representado en SEQ ID N° 48.

Los ejemplos de inhibidores de SSAO descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, derivados de hidrazina tales como alilhidrazinas, especialmente fenilalilhidrazinas; y derivados de hidroxilamina (es decir, aminoxi). Los ejemplos más específicos de fenilalilhidrazinas incluyen, pero sin limitación, 2-(fenil-alil)-hidrazina, N-[2-(4'-fluorofenil)-alil]-hidrazina y (E)-1-fluoro-2-fenil-3-hidrazinopropeno, mientras los ejemplos más específicos de derivados de hidroxilamina incluyen, pero sin limitación, 2-aminoxil-1-fenil-etanol, y 2-aminoxil-1-(3',4'-dimetoxi-

fenil)-etanol. Tales inhibidores de SSAO se describen en los documentos WO2006/094201 y WO2005/014530. Otros derivados de hidrazina incluyen acetohidrazidas tales como, pero sin limitación, la 2-(4-{2-[5-(4-acetilpiperazin-1-il)piridin-2-il]etil}fenil)acetohidrazida descrita en el documento WO 2009/145360; y alcoholes de hidrazina, tales como, pero sin limitación, (1R,2S)-2-(1-metilhidrazino)-1-fenil-1-propanol, (1R, 2S)-2-(1-metilhidrazino)-1,2-difeniletanol, 1-(1'-metilhidrazino)-3-(m-metoxifenoxi)-2-propanol, y (1S, 2R)-2-(1-metilhidrazino)-1,2-difeniletanol (BTT-2079) descritos en el documento WO 02/02090; e indanos de hidrazina tales como, pero sin limitación, (1S,2S)-2-(1-metilhidrazino)-1-indanol descritos en los documentos WO 03/006003 y WO2005/080319.

Los ejemplos adicionales de inhibidores de SSAO incluyen, pero sin limitación, propenil- y propargilaminas, 2-butinilaminas 4-sustituidas, haloalilaminas (especialmente 2- y 3- haloalilaminas), derivados de pirrolina, propargildiaminas, alilaminas y diaminas. Los ejemplos más específicos de los inhibidores de SSAO anteriores incluyen, pero sin limitación, 5-fenoxipenta-2,3-dienilamina, 4-(4-metoxifenil)but-3-inilamina, 4-fenilbut-3-inilamina, 2-fenil-3-fluoroalilamina, S-(E)-4-(4-amino-2-fluorobut-2-eniloxi)-N-(1-feniletil)benzamida, (E)-3-fluoro-4-(4-(metilsulfonil)fenoxi)but-2-en-1-amina, (E)-3-fluoro-4-(2-metilbenzo[d]tiazol-5-iloxi)but-2-en-1-amina, (E)-4-(4-amino-2-fluorobut-2-eniloxi)-N-(1-feniletil)benzenosulfonamida y (E)-2-(4-fluorofenil)-3-fluoroalilamina (BTT-2089, mofegelina). Tales compuestos se describen en los documentos WO 2007/005737, WO 2005/082343, WO 2009/066152, WO 2009/055002, y Palfreyman et al., *J Neural Transm.* (1994), 41, 407-414.

Los ejemplos adicionales de inhibidores de SSAO incluyen, pero sin limitación, derivados de 4,5,6,7-tetrahidroimidazo[4,5-c]piridina (descritos en el documento WO 02/38153), carboxamidas tales como N-hidroxi-2-(2-(2-metil-1H-indol-3-il)acetamido)acetamida y 5-amino-2-hidroxi-N-(2-hidroxibencil)benzamida, y sulfonamidas tales como N2-[[4-(1,1-dimetilpropil)fenil]sulfonil]-N1-hidroxiserinamida, descritas en los documentos WO2006/013209 y US2007/066646.

Además, en la presente memoria se describen derivados de tiazol y/o guanidina, especialmente derivados de 2-acilaminotiazol. Los ejemplos más específicos de tales inhibidores de SSAO incluyen, pero sin limitación, N-{4-[2-(4-{[amino(imino)metil]amino}fenil)etil]-1,3-tiazol-2-il]acetamida, N-{4-[2-(4-{[amino(imino)metil]amino}fenil)etil]-5-[4-(metilsulfonil)bencil]-1,3-tiazol-2-il]acetamida, N-{4-[2-(4-{[2-amino-1H-imidazol-4-il]metil}fenil)etil]tiazol-2-il]acetamida, 2-(4-{2-[2-(acetilamino)-1,3-tiazol-4-il]etil}fenil)-N-[amino(imino)metil]acetamida. Tales compuestos se describen en los documentos WO2004/087138, WO2004/067521, WO2006/028269, WO2006/011631, y WO2005/089755.

Además, diversos derivados de oxima son inhibidores de SSAO. Tales derivados de oxima incluyen, pero sin limitación, 5-bromo-1,3-benzodioxol-4-carbaldehído oxima, 6-etoxi-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-carbaldehído oxima, 1,3-dimetil-6-(metiltio)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetra-hidropirimidin-5-carbaldehído oxima descritas en el documento WO 2010/029379.

También se incluyen dihidrazina, arilalquilaminas, oxazolidinonas, haloalquilaminas, y benfotiamina (vitamina B1) descritas en los documentos WO 2010/015870, WO 2005/072738, Lyles G. A., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* Vol. 28 págs. 259-276 (1996), y McDonald et al., *Annual reports in Med. Chem.* Vol. 42, págs. 229-243 (2007)) como los inhibidores de SSAO descritos en la presente memoria.

Los inhibidores de SSAO adicionales incluyen los derivados de imidazopiridina descritos en el documento WO 2010/064020.

Además, los inhibidores de SSAO incluyen cualquier estereoisómero, mezcla de estereoisómeros, formas E o Z, mezcla de formas E y Z, profármaco, metabolito, forma cristalina, forma no cristalina, hidrato, solvato o sal de los mismos que tienen la capacidad de inhibir o bloquear la actividad de SSAO de VAP-1.

Se pueden cribar e identificar otros inhibidores de SSAO con los ensayos de SSAO conocidos en la técnica. Tal ensayo puede incluir el ensayo de la actividad de SSAO de VAP-1 mediante el uso de un método colorimétrico acoplado básicamente como se describió para la monoamina oxidasa y las enzimas relacionadas (Holt, A., et al., *Anal. Biochem.* 244:384-392 (1997)). La actividad de SSAO de las células endoteliales también se puede medir independientemente mediante el uso del reactivo Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina), una sonda sumamente sensible y estable para H₂O₂ (Zhou M, Panchuk-Voloshina N. *Anal Biochem.* 253(2):169-74 (1997)). Además, la actividad de amina oxidasa se puede ensayar radioquímicamente mediante el uso de hidrocloreuro de [7-¹⁴C]-bencilamina como sustrato (Jaakkola et al., *Am J Pathol*:155(6):1953-65 (1999)). Como fuente de la enzima SSAO de VAP-1, se puede usar la SSAO de VAP-1 humana recombinante expresada en líneas celulares tales como las células de ovario de hámster chino (CHO) (Smith, D.J., et al., *J. Exp. Med.* 188:17-27 (1998)). Otras fuentes de enzima SSAO de VAP-1 adecuadas pueden ser muestras de suero y tejido de diferentes especies tales como primates y roedores.

Para el uso de acuerdo con las presentes realizaciones, los anticuerpos anti-VAP-1 se pueden proporcionar en forma de una composición farmacéutica que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, un anticuerpo anti-VAP-1. La composición contiene el anticuerpo anti-VAP-1 en una cantidad suficiente para antagonizar (completamente o parcialmente) la actividad de SSAO del paciente o la unión de VAP-1 nativa a los ligandos biológicos de VAP-1 en los pacientes que necesitan tal antagonismo.

Las cantidades y regímenes para la administración de los anticuerpos anti-VAP-1 los pueden determinar fácilmente las personas de experiencia habitual en la técnica clínica para el tratamiento de trastornos relacionados con la fibrosis. En general, la dosis del tratamiento con anticuerpo anti-VAP-1 variará dependiendo de consideraciones tales como: edad, sexo y salud general del paciente a tratar; tipo de tratamiento concurrente, si existe; frecuencia del tratamiento y naturaleza del efecto deseado; grado del daño tisular; duración de los síntomas; y otras variables a ajustar por parte del médico individual. Se puede administrar una dosis deseada en una o más aplicaciones para obtener los resultados deseados. Las composiciones farmacéuticas según las presentes realizaciones se pueden proporcionar en formas farmacéuticas unitarias.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en cualquier vehículo farmacológico adecuado para la administración. Se pueden administrar en cualquier forma que lleven a cabo un efecto profiláctico, paliativo, preventivo o curativo de las condiciones fibróticas en pacientes humanos o animales.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral y tópica incluyen disolventes, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propileno glicol, polietileno glicol, aceite vegetal, aceite de pescado, y ésteres orgánicos inyectables. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones agua-alcohol, que incluyen solución salina y vehículos parenterales de medio tamponado que incluyen solución de cloruro sódico, solución de dextrosa de Ringer, dextrosa más solución de cloruro sódico, solución de Ringer que contiene lactosa, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de líquidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. Las composiciones acuosas según las realizaciones pueden comprender agentes tamponadores adecuados, tales como tampones de fosfato sódico y potásico, citrato, acetato, carbonato o glicina, dependiendo del intervalo de pH deseado. También es útil el uso de cloruro sódico como agente de ajuste de la tonicidad. Las composiciones pueden incluir otros excipientes, tales como agentes estabilizantes o conservantes. Los excipientes estabilizantes útiles incluyen tensioactivos (polisorbato 20 y 80, poloxámero 407), polímeros (polietileno glicoles, povidonas), carbohidratos (sacarosa, manitol, glucosa, lactosa), alcoholes (sorbitol, glicerol, propileno glicol, etileno glicol), proteínas adecuadas (albúmina), aminoácidos adecuados (glicina, ácido glutámico), ácidos grasos (etanolamina), antioxidantes (ácido ascórbico, cisteína, etc.), agentes quelantes (sales de EDTA, histidina, ácido aspártico) o iones metálicos (Ca, Ni, Mg, Mn). Entre los agentes conservantes útiles están alcohol bencílico, clorbutanol, cloruro de benzalconio y posiblemente parabenos.

La composición farmacéutica se puede proporcionar en forma concentrada o en forma de un polvo a reconstituir según la necesidad. En tales casos, se pueden usar las formulaciones de polvo para disolución para inyección/infusión con los excipientes mencionados anteriormente. En caso de liofilización, se prefieren ciertos crioprotectores, que incluyen polímeros (povidonas, polietileno glicol, dextrano), carbohidratos (sacarosa, glucosa, lactosa), aminoácidos (glicina, arginina, ácido glutámico) y albúmina. Si se añade una solución para reconstitución al envase, puede consistir, p.ej., en agua pura para inyección o solución de cloruro sódico, o soluciones de dextrosa o glucosa.

Los anticuerpos anti-VAP-1 terapéuticamente útiles se pueden conjugar, químicamente o mediante ingeniería genética, con otros agentes, que proporcionan el transporte de los anticuerpos a un sitio deseado de acción. De manera alternativa, se pueden conjugar otros compuestos, químicamente o mediante ingeniería genética, con los anticuerpos, para aumentar o proporcionar propiedades adicionales a los anticuerpos, especialmente propiedades que aumentan la capacidad de los anticuerpos de favorecer la mitigación de los efectos perjudiciales mediada por la unión a VAP-1.

Los anticuerpos anti-VAP-1 se pueden marcar, químicamente o mediante ingeniería genética, para proporcionar anticuerpos detectables. Tales anticuerpos marcados serán herramientas útiles para la formación de imágenes de sitios fibróticos en seres humanos, especialmente para la formación de imágenes inmunoescintigráfica in vivo de los sitios fibróticos. Para fines de formación de imágenes, puede ser preferible el uso de fragmentos de anticuerpo a la aproximación de anticuerpos completos para la terapia anti-fibrótica, y los fragmentos obtenidos de anticuerpos completamente humanos deberían ser aún más seguros que sus equivalentes quiméricos o de ratón.

Ciertos aspectos de la presente descripción se refieren al diagnóstico de afecciones fibróticas. Con respecto a la presente descripción, se ha descubierto que los niveles elevados de VAP-1 soluble (sVAP-1) en los fluidos corporales (tales como suero o plasma) y, por lo tanto, una actividad de SSAO elevada, se correlacionan con el grado de fibrosis. La presente descripción proporciona por tanto medios y métodos para diagnosticar afecciones fibróticas tales como fibrosis hepática y las afecciones inflamatorias que predisponen a ella, es decir, hepatitis aguda y crónica, enfermedad biliar y lesión hepática tóxica, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, que incluye la que resulta de nefropatía diabética, mielofibrosis, fibrosis pancreática, esclerodermia, enfermedades del tejido conectivo, cicatrización, fibrosis de la piel, fibrosis cardíaca, trasplante de órganos, estenosis vascular, reestenosis, fibrosis arterial, artrofibrosis, fibrosis mamaria, fibrosis muscular, fibrosis retroperitoneal, fibrosis de tiroides, fibrosis de nódulos linfáticos, fibrosis de vejiga, fibrosis pleural y EPOC, una enfermedad en la que las paredes de las vías respiratorias son fibróticas, con la acumulación de miofibroblastos y colágeno, y, como todos los tejidos fibróticos, están contraídas.

El diagnóstico de afecciones fibróticas basándose en los niveles elevados de sVAP-1 y/o actividad de SSAO en los fluidos corporales se puede combinar con el análisis de paneles existentes de biomarcadores predictivos para las afecciones fibróticas. Esto puede mejorar la capacidad de diagnóstico de los biomarcadores existentes. En otras palabras, se pueden usar los niveles de sVAP-1/actividad de SSAO solos o en combinación con otros marcadores clínicos y bioquímicos como nuevo ensayo no invasivo para predecir la presencia de fibrosis.

El nivel de sVAP-1 en una muestra de fluido corporal, tal como suero, se puede determinar mediante el siguiente método: El ensayo inmunofluorimétrico de una etapa de tiempo resuelto (TR-IFMA) (DELFI) para la cuantificación de VAP-1 soluble utiliza el anticuerpo de ratón anti-VAP-1 humana TK8-14 conjugado a biotina (Biotie Therapies Corp.) como agente de captura en una placa de microtitulación revestida de estreptavidina. La detección de VAP-1 soluble unido se realiza mediante el uso del anticuerpo de ratón anti-VAP-1 humana TK8-18 conjugado con europio (Biotie Therapies Corp.) como marcador. El marcador se detecta midiendo la fluorescencia de tiempo resuelto (contador Victor3 Multilabel) a 615 nm. Las cuentas de fluorescencia se correlacionan directamente con la cantidad de VAP-1 soluble presente en la muestra. Los datos de la muestra se analizan después en comparación con la curva patrón de una referencia.

En la presente descripción, la fibrosis se puede diagnosticar basándose en la actividad de SSAO en un fluido corporal obtenido de un sujeto que necesita tal diagnóstico y/o que se sospecha que padece fibrosis. Un método adecuado para este fin lo ha descrito Li et al. en *J. Chromatogr. B*, 810 (2004) 277-282. Otros medios y métodos para determinar la actividad de SSAO se conocen en la técnica.

Además, la presente descripción proporciona un kit para el uso en el diagnóstico de la fibrosis. En ciertas formas, el kit comprende uno o más reactivos para determinar la cantidad de sVAP-1, tal como un anticuerpo anti-VAP-1 específico, p.ej. uno de los anticuerpos anti-VAP-1 mencionados anteriormente. En otras formas, el kit comprende uno o más reactivos para determinar la actividad de SSAO en un fluido corporal, tal como suero o plasma. Por ejemplo, el kit puede comprender un sustrato para SSAO de VAP-1, tal como bencilamina, metilamina, aminocetona u otras monoaminas alifáticas o aromáticas, junto con un tampón de ensayo adecuado de la actividad enzimática de SSAO, y un grupo de reactivos y un método para detectar la actividad de SSAO. La actividad de SSAO se puede detectar mediante el uso de un ensayo acoplado en el que se mide la generación de peróxido de hidrógeno a partir de la acción de la actividad de SSAO sobre sustratos de monoamina, o se puede medir directamente mediante la monitorización de la conversión de una amina hidrosoluble en un aldehído soluble en un disolvente orgánico mediante el uso de un sustrato de amina marcado con ¹⁴C, tal como bencilamina.

Ejemplo 1. Efectos de los inhibidores de VAP-1 en un modelo en ratón de fibrosis hepática

El objetivo del estudio fue determinar el efecto de los inhibidores de VAP-1 sobre la lesión hepática fibrótica en ratón.

Todos los ratones se mantuvieron y albergaron en condiciones convencionales en la unidad del servicio biomédico de la Universidad de Birmingham, según las normas del Ministerio del Interior. Se albergaron cuatro ratones por jaula y se aclimataron a la situación durante una semana antes de los experimentos. Se usaron ratones C57BL/6 y VAP-1-/- hembra (ratones con inactivación del gen AOC3 que carecían de VAP-1) con una edad de 8-10 semanas en el estudio. Los ratones C57BL/6 se obtuvieron de una colonia de reserva de la unidad del servicio biomédico de la Universidad de Birmingham, mientras los ratones VAP-1-/- (inactivación del gen AOC3) se obtuvieron del criador bajo contrato Taconic, Dinamarca.

Se estableció un modelo en ratón de fibrosis hepática crónica mediante la administración i.p. de tetracloruro de carbono (CCl₄; Aldrich Chemical) a una dosis de 1 ml/kg disuelto en aceite mineral bisemanalmente durante 8 semanas, mientras el grupo de control recibió solamente aceite mineral. Los ratones tratados con un anticuerpo anti-VAP-1 de ratón BTT-1029 recibieron semanalmente inyecciones i.v. dos semanas antes y durante la administración de CCl₄. Los animales se sacrificaron 96 h tras la última dosis de CCl₄. Se extrajeron muestras de sangre mediante punción cardiaca con anestesia de isoflurano, tras lo cual los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical. Los hígados se disecaron y cortaron en 4 fragmentos para diferentes procesamientos.

Se llevó a cabo un ANOVA estadístico mediante el uso de SPSS para Windows, versión 11.0. Se usó un ANOVA unidireccional seguido de una prueba post hoc de mínima diferencia significativa de Fisher para el análisis de la significación en muestras con grupos de más de dos variables.

Las muestras de hígado se fijaron en un 4% de paraformaldehído, se incrustaron en parafina y se cortaron en cortes de 4 µm. Los cortes para el análisis histopatológico se tiñeron con rojo Sirius o H&E según los procedimientos habituales. Para la tinción de inmunofluorescencia, los hígados de ratón fijados se crioprotegieron mediante inmersión en un 30% de sacarosa, se congelaron rápidamente y se cortaron en un criostato a 7 µm. Brevemente, los cortes se lavaron con solución salina tamponada con fosfato que contenía un 0,1% de Triton X-100 (PBST) durante 10 minutos, y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con un 10% de suero de cabra en un 0,1% de PBST. Tras la incubación con los anticuerpos primarios hacia elastina, colágeno IV y laminina (Abcam) diluidos en suero-PBST, los portaobjetos se lavaron tres veces en PBST y se incubaron con anticuerpo secundario (Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Como se esperaba, CCl₄ indujo una lesión fibrótica grave en los ratones C57BL/6. A las 8 semanas, los ratones de tipo natural mostraron un incremento de ocho veces del contenido hepático de fibrillas teñidas con rojo Sirius, con necrosis de los hepatocitos y hepatitis en curso. De manera interesante, hubo una disminución significativa de la lesión fibrótica tanto en los ratones deficientes de VAP-1 como en los ratones de tipo natural tratados con BTT-1029.

5 Estos ratones exhibieron solamente cantidades bajas de fibrillas teñidas con rojo Sirius, y la histología del hígado pareció prácticamente normal, con ausencia total de áreas necróticas y solamente una hepatitis menor (Figura 1 y 2). Además, hubo un número significativamente inferior de macrófagos maduros, lo que de nuevo indica una lesión mucho menos grave en comparación con el tipo natural (datos no mostrados).

10 Los niveles de mRNA de los genes relacionados con la activación de células estrelladas hepáticas del hígado se estudiaron mediante qRT-PCR. Para este fin, se extrajo el ARN total de los hígados de ratón mediante el uso del kit Qiagen RNeasy Mini (n° 74104). El ARN se sometió a transcripción inversa hasta moldes de cADN mediante el uso de cebadores aleatorios (Promega) y Superscript III de Invitrogen. Los parámetros para la qRT-PCR fueron los siguientes: desnaturalización a 95 °C durante 10 min, amplificación a 95 °C durante 10 seg, 55 °C durante 30 seg, 72 °C durante 1 seg, 55 ciclos. La PCR cuantitativa en tiempo real se midió con un sistema Roche LightCycler480
15 mediante el uso del gen de referencia GAPDH y sondas de Roche. Los niveles de expresión se cuantificaron mediante el uso del "método E" (Roche).

20 Los datos indican un papel de VAP-1 en el desarrollo de la fibrosis hepática mediante la regulación de las células estrelladas hepáticas (HSC). Las HSC activadas se consideran la fuente principal de síntesis de los componentes de la ECM en el hígado fibrótico, que incluye elastina. Los hígados de tipo natural a los que se administró CCl₄ mostraron un incremento profundo de los niveles de mRNA de α SMA y elastina, lo que indica una acumulación de HSCs que expresaban α SMA y un depósito de elastina (Figura 4). Los niveles de mRNA de α SMA y elastina en los hígados de tipo natural y VAP-1^{-/-} tratados con BTT-1029 fueron significativamente inferiores en comparación con el hígado de tipo natural. Las diferencias de expresión de elastina y colágeno IV también se confirmaron mediante microscopía confocal, mientras los niveles de laminina permanecieron inalterados (Figura 3).

25 En conclusión, el tratamiento con BTT-1029 indujo una protección casi completa de la fibrosis hepática establecida disminuyendo la activación de las células estrelladas hepáticas, y por lo tanto restringiendo el desarrollo de fibroblastos en las lesiones fibróticas. También se demostró el mismo efecto en los ratones VAP-1^{-/-}, que mostraron una protección casi completa hacia la lesión inducida con CCl₄. Los resultados indican que VAP-1 desempeña un papel clave en el desarrollo de la fibrosis hepática a través de efectos reguladores sobre las células estrelladas hepáticas. La SSAO de VAP-1 es una amina oxidasa que contiene cobre, y por tanto es análoga a la lisil oxidasa, otra enzima amina oxidasa que contiene cobre responsable de la reticulación de las proteínas de la ECM, tales como elastina y colágeno. Sigue siendo posible que la actividad de SSAO de VAP-1 también tenga un efecto directo sobre la formación de entrecruzamientos en las proteínas de la ECM.

35 Además, las actividades de SSAO del suero y las muestras de tejido hepático se ensayaron radioquímicamente mediante el uso de hidrocloreuro de [7-¹⁴C]-bencilamina (act. espec. 57 mCi/mmol) como sustrato (Figura 5). Las preparaciones de suero (40 mg/ml de proteína) o de tejido (2 mg/ml de proteína) se preincubaron con clorgilina y pargilina 5 μ M, y con tubos de unión inespecífica también con semicarbazida 1 mM a 37 °C durante 30 min. El ensayo se llevó a cabo a 37 °C durante una hora en un volumen final de 200 μ l de tampón fosfato Na 0,2 mM (pH 7,4) que contenía [7-¹⁴C]-bencilamina como sustrato. Los ensayos de reacción de actividad enzimática catalítica se pararon y se trataron como se ha descrito antes en Jaakkola et al., 1999 (American Journal of Pathology, 155, 6). Las concentraciones de proteínas se ensayaron según Bradford et al. (Bradford, M. M., 1976, Anal. Biochem. 72, 248) mediante el uso de albúmina de suero bovino como patrón.

Los resultados demostraron que, además de prevenir la fibrosis hepática inducida con CCl₄, el tratamiento con BTT-1029 disminuyó notablemente la actividad de SSAO en dichas muestras de hígado.

45 **Ejemplo 2. Efectos renoprotectores de los inhibidores de VAP-1 en un modelo en ratón de daño renal**

La exposición elevada a tetracloruro de carbono provoca daños en el hígado y los riñones. Por lo tanto, se recogieron los riñones de los animales tratados con CCl₄ descritos en el Ejemplo 1, y se analizó el efecto de los inhibidores de VAP-1 sobre la nefropatía.

50 Los riñones se fijaron en un 4% de paraformaldehído, se incrustaron en parafina y se cortaron en cortes de 4 μ m. Se realizó el análisis histopatológico con cortes teñidos con rojo Sirius y H&E. La tinción se llevó a cabo según procedimientos habituales. Se cuantificó la cantidad de fibrillas teñidas con rojo Sirius mediante análisis del umbral con el uso del programa informático Image J.

Se llevó a cabo un ANOVA estadístico mediante el uso de SPSS para Windows, versión 11.0. Se usó un ANOVA unidireccional seguido de una prueba post hoc de mínima diferencia significativa de HSD de Tukey para el análisis de la significación en muestras con grupos de más de dos variables.

55 Los ratones a los que se administró CCl₄ mostraron cambios glomerulares focales con alteraciones segmentarias y globales. La tinción H&E mostró diversas lesiones, p.ej. hiper celularidad mesangial, adhesión y esclerosis del dominio de la punta. Sin embargo, se observó sobre todo el colapso global del ovillo glomerular, solamente con

fragmentos residuales del glomérulo (datos no mostrados). De manera interesante, los ratones con inactivación génica de VAP-1 y los ratones tratados con BTT-1029 estuvieron completamente protegidos contra las lesiones glomerulares (Figura 6).

5 Se estudió la acumulación de colágeno alrededor de los glomérulos, como indicación de fibrosis, mediante tinción con rojo Sirius. La administración de CCl₄ a ratones C57BL/6 indujo un incremento de casi el doble en la acumulación de colágeno alrededor del ovillo glomerular. De manera interesante, los ratones que carecieron de VAP-1 o los ratones a los que se administró inhibidor de VAP-1 mostraron una disminución significativa de los depósitos de colágeno similar al control (Figura 7). Los resultados demuestran claramente el papel protector de VAP-1 en la nefropatía inducida con CCl₄.

10 Ejemplo 3. Efectos de los inhibidores de VAP-1 en un modelo en ratón de EPOC

Se empleó el modelo de EPOC en ratón inducido con humo de tabaco para estudiar el efecto de los inhibidores de VAP-1 sobre el tratamiento de EPOC.

15 Se expuso a ratones C57BL/6J a humo de tabaco (TS) una vez al día durante 11 días consecutivos, lo que dio como resultado inflamación pulmonar 24 horas tras la exposición final a TS. Después de 11 días la respuesta consistió en incrementos significativos de macrófagos, células epiteliales, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos.

20 Los ratones se dividieron de manera aleatoria en grupos de estudio (n=10) y se trataron con un vehículo (5 ml/kg de PBS, pH 7,4 + 0,1% de Polisorbato 80) o anticuerpo monoclonal de ratón anti-VAP-1 (3 mg/kg o 9 mg/kg de BTT-1029 en el vehículo) de manera intravenosa en los Días -1, 3, 6, y 9, 4 h tras la exposición a TS. Otro grupo (n=10) recibió el vehículo de manera intravenosa y se expuso a aire durante un periodo de tiempo equivalente. Dos grupos adicionales de ratones (n=10) recibieron otro vehículo (0,5% de carboximetilcelulosa, sal sódica (CMC) en agua estéril) o un compuesto de referencia (5 mg/kg de Roflumilast en 0,5% de CMC) de manera oral una vez al día durante 11 días consecutivos, 1 h antes de cada exposición a TS. Un grupo final (n=10) recibió el vehículo oral (0,5% de CMC) y se expuso a aire durante un periodo de tiempo equivalente.

25 Todos los resultados se presentaron como datos individuales para cada animal, y se calculó el valor medio para cada grupo. Cuando las pruebas de normalidad fueron positivas, los datos se sometieron inicialmente a un análisis unidireccional de prueba de la varianza (ANOVA), seguido de una corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples para analizar la significación entre grupos de tratamiento. Un valor "p" de ≤ 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

30 Todos los datos se sometieron también al ensayo de Bartlett para varianzas iguales, y para la mayoría de estudios las varianzas en general fueron iguales, sin embargo, como ocurrió en este estudio, ocasionalmente ciertos grupos de tratamiento proporcionarían un resultado positivo. Por lo tanto también se usaron análisis no paramétricos. Como los datos se distribuyeron normalmente, se citaron los análisis paramétricos (ANOVA).

Las inhibiciones en porcentaje se calcularon automáticamente en las hojas de cálculo de Excel para los datos de las células mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$35 \quad \% \text{ Inhibición} = 1 - \frac{\text{Resultado del grupo de tratamiento} - \text{resultado del grupo simulado}}{\text{Resultado del grupo de vehículo TS} - \text{resultado del grupo simulado}} \times 100$$

40 BTT-1029, cuando se administró de manera intravenosa a 9 y 3 mg/kg 4 horas tras la exposición a TS en los días -1, 3, 6 y 9 del estudio, redujo significativamente los incrementos de células inducidos por TS en BAL (38% y 33% de inhibición respectivamente, p<0,001 para ambos) (Figura 8). Esto consistió en reducciones notables de macrófagos, (29% y 22% de inhibición, p<0,01 y p<0,05, respectivamente), neutrófilos (66 y 59% de inhibición, p<0,001 para ambos), linfocitos (69% y 54% de inhibición, ambos p<0,001) y eosinófilos (93% y 65% de inhibición, p<0,001 y p<0,01, respectivamente).

45 El compuesto de referencia, Roflumilast, cuando se administró una vez al día de manera oral, 1 h antes de la exposición a TS, también redujo significativamente el número total de células (41%, p<0,001) (Figura 9). Esta inhibición estuvo compuesta de reducciones de neutrófilos (63% p<0,001), células epiteliales (51% p<0,01) y linfocitos (65%, p<0,001). En este estudio, Roflumilast no redujo significativamente el número de macrófagos y eosinófilos hallados en el BAL.

Ejemplo de Referencia 4. Efectos de los inhibidores de VAP-1 sobre la fibrosis de la neointima y la media en la pared vascular

50 El engrosamiento de la neointima y la media es una etapa temprana y esencial del desarrollo de lesiones ateroscleróticas, y un componente esencial de la reestenosis. Va acompañada de cambios fibróticos en la neointima y la media de la pared vascular. Este estudio evaluó el papel del bloqueo de SSAO en la enfermedad fibrótica evaluando el efecto de la administración sistémica (mediante inyección ip diaria) de un inhibidor de SSAO de molécula pequeña (mofegilina, BTT-2089) sobre el engrosamiento de la neointima inducido por manguito

(estenosis inducida por manguito) en la arteria femoral de ratones ApoE3 Leiden que recibieron una dieta de tipo occidental moderada.

Métodos: Se alimentó a 40 ratones macho ApoE3*Leiden (edad 12 semanas) con una dieta moderadamente hipercolesterolémica durante 3 semanas antes de la colocación quirúrgica del manguito. El tratamiento fue inyecciones ip diarias con 1) vehículo; 2) dexametasona en el agua de bebida a 9 mg/l; 3) inyecciones ip diarias de BTT-2089 a 10 mg/kg; 4) BTT-2089 a 30 mg/kg, todos se iniciaron un día antes de la cirugía y continuaron durante el periodo experimental. En el día 0, se llevó a cabo la cirugía, es decir, se colocó un manguito sin constricción (2-3 mm de longitud) alrededor de ambas arterias femorales de los ratones. Se sacrificaron 10 ratones de cada grupo tras 2 semanas para el análisis histomorfométrico para cuantificar la inhibición de las lesiones ateroscleróticas aceleradas y la formación de la neointima. Se observó una reducción significativa de la formación de la media y la neointima en el grupo de control positivo tratado con dexametasona, y ambos grupos tratados con BTT-2089 en comparación con el grupo de control tratado con NaCl al 0,9% (Figura 10 y 11). Esto se reflejó en el tamaño incrementado de la luz en los ejemplos de segmentos de vasos teñidos con HPS en los grupos tratados con inhibidor de SSAO en comparación con un grupo de control (Figura 12).

Se llevó a cabo un segundo estudio, en el mismo modelo, con otro inhibidor de SSAO de una clase química diferente de BTT-2089. Este inhibidor basado en hidrazina (BTT-2079) se dosificó a un nivel de 10 mg/kg mediante inyección i.p. diaria y se comparó con BTT-2089 a 30 mg/kg. En todos los demás aspectos, el estudio se llevó a cabo de la misma manera excepto porque se omitió el grupo de control de dexametasona. La inhibición de SSAO con mofegilina (BTT-2089) a 30 mg/kg i.p. diariamente tuvo de nuevo un efecto beneficioso, y mostró una reducción significativa de la formación de neointima y del porcentaje de estenosis de la luz tras la inhibición de SSAO. El grupo tratado con el inhibidor de SSAO BTT-2079 a 10 mg/kg i.p. diariamente también dio como resultado una reducción significativa en la formación de la neointima. No se observaron cambios significativos entre todos los grupos en el diámetro de la pared de los vasos, el área de la media y la luz. Las proporciones intima-media de BTT-2079 a 10 mg/kg y BTT-2089 a 30 mg/kg fueron significativamente menores en comparación con el grupo de control, pero el porcentaje de estenosis de la luz solamente fue significativamente menor en el grupo de BTT-2089 a 30 mg/kg en comparación con el grupo de control. La integridad vascular no se vio afectada.

Estos estudios demuestran que la dosificación sistémica con inhibidores de SSAO dio como resultado menos engrosamiento de la neointima (fibrosis de la neointima) en el modelo en ratones ApoE3 Leiden con manguito en comparación con un grupo tratado de control.

Ejemplo 5. Efectos de los inhibidores de VAP-1 en un modelo en ratón de fibrosis pulmonar

La fibrosis pulmonar inducida con bleomicina es un modelo en ratón establecido y reproducible para el estudio de la fibrosis pulmonar.

Se trató a ratones macho C57BL/6J de una edad de 8 semanas de manera sistémica con bleomicina (100 mg/kg) durante 7 días mediante minibombas osmóticas Alzet para generar un daño pulmonar. La toxicidad no pulmonar se observa durante los días 7-21 tras la implantación de la bomba. A los 21 días, hay un 12-15% de fibrosis en los pulmones, tal como se determina de manera histopatológica. Esto va seguido de un daño pulmonar clínico que se puede observar por una frecuencia respiratoria incrementada, y una pérdida drástica de peso corporal, y finalmente conduce a la muerte a los 42 días (si no se sacrifican antes).

Los ratones se dividen de manera aleatoria en los grupos de estudio, y se tratan un con vehículo, inhibidor de VAP-1 o compuesto de referencia mediante inyección i.v. cada tres días desde el Día 0 hasta el Día 28. La mitad de los ratones de cada grupo de estudio se sacrifica en el Día 21, mientras la otra mitad se sacrifica en el Día 28.

En la autopsia, se fijan los pulmones (10% de formalina tamponada neutra) y se someten a procesamiento histopatológico para clasificar las lesiones fibróticas. Los cortes de tejido se tiñen con H&E y tinción tricrómica de Masson para identificar la fibrosis. Se cuantifica la proporción de área pulmonar fibrótica respecto del área pulmonar total con un análisis de imágenes asistido por ordenador para cada ratón.

Se usa un ANOVA unidireccional seguido de una prueba post hoc adecuada para el análisis de la significación en muestras con grupos de más de dos variables.

Se puede demostrar una reducción de la fibrosis pulmonar, tal como se demuestra mediante las reducciones estadísticamente significativas de la puntuación en comparación con los controles.

Ejemplo 6. Efectos renoprotectores de los inhibidores de VAP-1 en un modelo en ratón de nefropatía diabética

La diabetes puede provocar nefropatía diabética (DN) asociada a fibrosis renal progresiva, lo que finalmente reduce el funcionamiento de la masa renal. Para estudiar el efecto de los anticuerpos anti-VAP-1 y los inhibidores de SSAO de referencia sobre la fibrosis renal, se empleó un modelo de ratón diabético Db/db bien establecido para la nefropatía diabética.

Todos los aspectos de estos experimentos (albergue, experimentación y eliminación de los animales) se llevaron a cabo de acuerdo en general con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Academy Press, Washington, D.C., 1996).

5 El artículo de ensayo de referencia, el inhibidor de SSAO BTT-2079, se evaluó con respecto a un posible efecto renoprotector en un modelo en ratón de nefropatía diabética. Se administró la sustancia de ensayo y el vehículo de manera intraperitoneal (IP) una vez al día durante 42 días consecutivos a ratones db/db (BKS Cg-Lepr db/Lepr db) de una edad de 15 semanas cuando la diabetes se estableció completamente. Los ratones Db/m sirvieron como controles normales flacos. Los ratones db/db mostraron una creatinina plasmática elevada, lo que indicó una función renal alterada, así como hiperglucemia y dislipidemia (LDL, colesterol total y triglicéridos) en comparación con los ratones db/m. Los ratones diabéticos estuvieron asociados a obesidad, poliuria, albuminuria y excreción urinaria fraccionada de Na⁺ (FENa) incrementada, lo que indica una reabsorción tubular de Na⁺ alterada. El aclaramiento de creatinina endógena (CCr), una estimación de la tasa de filtración glomerular, tendió a ser inferior en los ratones diabéticos frente a los ratones db/m.

15 Los ratones db/db macho con diabetes mellitus no insulino dependiente se asignaron a los grupos de tratamiento, como se resume a continuación.

Tabla 1. Resumen del diseño experimental

Grupo	Animales	Artículo de Ensayo	Dosis (mg/kg)	Número de Animales (machos)
1	db/m	Vehículo	0	8
2	db/db	Vehículo	0	8
3	db/db	BTT-2079	5	8
4	db/db	BTT-2079	15	8

db/m: heterocigotos flacos no diabéticos
 db/db: ratones BKS Cg-Lepr db/Lepr db; diabetes mellitus no insulino dependiente.
 Toda la administración del vehículo y del artículo de ensayo fue mediante inyección intraperitoneal.

20 Al final de la fase en vida se llevaron a cabo las necropsias, que incluyeron la recogida y conservación de los tejidos. El riñón derecho de los 32 animales se fijó en un 10% de formalina tamponada neutra. Los cortes longitudinales se recortaron y se procesaron en bloques de parafina, se cortaron a 3 micras y se tiñeron con ácido peryódico-Schiff (PAS) para su evaluación mediante microscopía óptica. La expansión de la matriz mesangial se puntuó en 50 glomérulos por riñón según el esquema de puntuación semicuantitativo resumido en el protocolo siguiente.

Se puntuaron cincuenta glomérulos de cada riñón con respecto a la expansión de la matriz mesangial según el sistema siguiente.

Mínimo: grado 1, 0-25% de volumen glomerular ocupado por la matriz
Leve: grado 2, 25-50% de volumen glomerular ocupado por la matriz
Moderado: grado 3, 50-75% de volumen glomerular ocupado por la matriz
Grave: grado 4, 75-100% de volumen glomerular ocupado por la matriz

25 Se obtuvo una puntuación media de expansión de la matriz mesangial para cada grupo sumando las puntuaciones de la matriz mesangial para todos los animales de cada grupo y dividiendo la suma por el número total de animales del grupo. Las puntuaciones medias de expansión de la matriz mesangial por grupo se presentan en la siguiente tabla.

30 Tabla 2. Puntuaciones medias de expansión de la matriz mesangial por grupo

Grupo	Tratamiento	Puntuaciones Medias de Expansión de la Matriz Mesangial por Grupo
1	Vehículo	54,6
2	Vehículo	96,5
5	BTT-2079, 5 mg/kg	82,4

Grupo	Tratamiento	Puntuaciones Medias de Expansión de la Matriz Mesangial por Grupo
6	BTT-2079, 15 mg/kg	65,4

5 Se puede observar poca matriz mesangial glomerular en los animales normales, pero la expansión de la matriz mesangial es característica de una diversidad de estados patológicos tales como la diabetes mellitus. La matriz mesangial incluye la membrana basal y los proteoglicanos polianiónicos asociados y otras moléculas que se tiñen de rojo a púrpura mediante el método de ácido peryódico-Schiff (PAS). Así, la cantidad de material positivo para PAS en el glomérulo es una medida de la cantidad presente de matriz mesangial.

10 Se analizaron cincuenta glomérulos de cada animal a un aumento de 200 X, y se puntuaron con respecto a la matriz mesangial expandida mediante el uso del sistema de puntuación descrito anteriormente. Se calcularon las puntuaciones medias de expansión de la matriz mesangial por grupo sumando las puntuaciones para cada glomérulo analizado para cada animal. Después se sumaron las puntuaciones de expansión de la matriz mesangial para todos los animales del grupo y se dividieron por el número de animales por grupo para obtener la puntuación media de expansión de la matriz mesangial por grupo. Basándose en estos datos, el tratamiento con BTT-2079 a 5 y 15 mg/kg redujo la puntuación de expansión de la matriz mesangial de una manera relacionada con la dosis respecto de la puntuación media de expansión de la matriz mesangial por grupo en los ratones db/db de diabetes mellitus no insulino dependiente (Grupo 2).

15 Para estudiar el efecto de los anticuerpos anti-VAP-1 y los inhibidores de SSAO de referencia sobre otros modelos en ratón de fibrosis renal bien establecidos para la nefropatía diabética, se emplea 1) el modelo de ratón diabético inducido con estreptozotocina 2) el modelo de obstrucción ureteral unilateral de fibrosis renal.

20 1) Modelo de ratón diabético inducido con estreptozotocina. Se somete a ayuno a ratones macho de una edad de 6-7 semanas (20-25 g de peso corporal) durante 6 h antes de la inyección de estreptozotocina (STZ). Para inducir la diabetes, se inyecta STZ recién mezclada (7 mg/ml en tampón de citrato sódico) de manera intraperitoneal en cada ratón previamente sometido a ayuno a 55 mg/kg. Para completar la inducción de la enfermedad, este procedimiento se repite de forma que cada ratón reciba una inyección de STZ durante cinco días consecutivos. Una semana después de la inyección final de STZ, los ratones con una glucemia sin ayuno menor de 280 mg/dL se excluyen del experimento, ya que normalmente estos ratones no desarrollarán una diabetes suficiente para provocar una lesión renal significativa.

A todos los ratones se les administra una dosis de vehículo o sustancia de ensayo de manera intraperitoneal cada dos días durante tres semanas consecutivas en volúmenes adecuados. A todos los animales se les proporciona comida normal de laboratorio y agua a voluntad.

30 Se determinan los niveles de bioquímica sérica mediante un método enzimático (Mutarotase-GOD) a partir de muestras de sangre. La lesión renal se estudia bioquímicamente, midiendo la excreción de albúmina en orina y el aclaramiento de creatinina, y, además, histológicamente mediante la tinción tricrómica de Masson y con ácido peryódico-Schiff.

35 2) Modelo de fibrosis renal - obstrucción ureteral unilateral. Se administra a todos los ratones una dosis de vehículo o sustancia de ensayo de manera intraperitoneal cinco días antes de la cirugía y 7 días tras la cirugía. El inhibidor y el vehículo se inyectan cada dos días en una cantidad adecuada para inhibir la SSAO. A todos los animales se les proporciona comida normal de laboratorio y agua a voluntad.

40 Se anestesia a ratones macho de una edad de 6-7 semanas (20-25 g de peso corporal) con inhalación de isoflurano (2-cloro-2-(difluorometoxi)-1,1,1-trifluoro-etano) y se les inyecta de manera subcutánea 0,05-0,1 mg/kg de buprenorfina antes de la cirugía. Los ratones se someten a una obstrucción ureteral unilateral (UUO) o una operación simulada. En los ratones operados mediante UUO, se liga el uréter izquierdo con una sutura de seda 4-0 en dos puntos y se corta entre las ligaduras para prevenir la infección retrógrada del tracto urinario. Los ratones se sacrifican 7 días tras la cirugía.

45 La lesión renal se estudia bioquímicamente, midiendo la excreción de albúmina en orina y el aclaramiento de creatinina, y, además, histológicamente mediante la tinción tricrómica de Masson y con ácido peryódico-Schiff.

Se usa un ANOVA unidireccional y una prueba de Dunnett en todos los estudios para determinar las diferencias significativas entre los grupos tratados y los grupos con vehículo. Las diferencias se consideran significativas a *P<0,05.

50 Se puede demostrar una reducción de la fibrosis renal, tal como se demuestra mediante las reducciones estadísticamente significativas de la puntuación en comparación con los controles.

Ejemplo 7. Terapia anti-fibrótica para la nefropatía diabética

La nefropatía diabética es una causa habitual de nefropatía terminal y fibrosis, en particular la fibrosis intersticial es una característica patológica clave del riñón diabético. Un estudio clínico puede determinar si los inhibidores de VAP-1 pueden reducir la nefropatía en pacientes con diabetes para prolongar la función del riñón.

5 Se incorporaron a un estudio pacientes adultos con diabetes tipo 1 o 2 con una tasa de filtración glomerular (GFR) de 20-75 ml/min/1,73 m², más de 300 mg/día de proteinuria, y una tensión arterial menor o igual a 140/90 con un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) o un antagonista de receptores de angiotensina (ARA). Los pacientes reciben un inhibidor de VAP-1 a un nivel eficaz o un placebo durante 1 año con un régimen de dosificación adecuado que puede ser una vez al día, o con menos frecuencia. Los pacientes se asignan de manera aleatoria al grupo de placebo o de inhibidor de VAP-1. Durante el estudio, los pacientes se monitorizan con regularidad con respecto a parámetros tales como los niveles de glucosa en ayunas en sangre y orina, la tensión arterial y la bioquímica clínica. Se pueden extraer muestras de sangre adicionales para medir los niveles de SSAO de VAP-1 en suero, que pueden estar elevados en la diabetes y asociados a la progresión de la enfermedad. Además, se pueden determinar los niveles de metilamina en las muestras de suero. La metilamina elevada es un biomarcador de la inhibición de la actividad de SSAO de VAP-1. Se pide a los pacientes comprobar con regularidad su tensión arterial y la glucemia en sus hogares, y registrar los valores obtenidos para monitorizar su estado diabético. De esta manera, por medio de la administración de insulina en cantidades adecuadas, se puede mantener un buen control de la diabetes de los pacientes.

20 Los pacientes se mantienen con el tratamiento de referencia actual para la nefropatía diabética, que puede incluir el tratamiento con un inhibidor de ACE y/o ARA, terapia antihipertensiva con una tensión arterial objetivo menor e 130/80, y un control glucémico estricto con un objetivo ajustado de manera adecuada para HbA1C.

La función renal se estudia mediante la GFR, y el criterio de valoración primario del estudio puede ser el cambio de la función renal desde el valor inicial hasta el final del periodo de estudio. Los criterios de valoración secundarios pueden incluir el porcentaje de cambio en la excreción de albúmina urinaria a lo largo del periodo de estudio.

25 Ejemplo de Referencia 8. VAP-1 como marcador de diagnóstico para las afecciones fibróticas

En la presente memoria se demostró mediante inmunohistoquímica que la expresión de VAP-1 hepática se incrementa en la cirrosis con niveles muy elevados en los tabiques fibróticos (Figs. 13-15). La microscopía confocal multicolor reveló la expresión de VAP-1 en las células estrelladas hepáticas y los miofibroblastos hepáticos (Fig. 16). Las células estrelladas hepáticas (HSCs) humanas cultivadas se usaron para confirmar la expresión y secreción de sVAP-1 por las HSCs *in vitro*. Estos resultados sugirieron un papel potencial de VAP-1 en la fibrogenesis.

30 Los niveles de sVAP-1 en suero se midieron en una cohorte bien definida de 138 pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD) con una histología hepática coincidente y clasificada (clasificación de Kleiner). Los niveles de sVAP-1 se estudiaron con respecto a la histología hepática (esteatosis, inflamación y fibrosis), los parámetros metabólicos y los marcadores serológicos de lesión hepática (Tabla 3).

35 Tabla 3. Resumen de la demografía y los parámetros medidos en 138 pacientes con NAFLD clasificada y estadificada histológicamente

VARIABLE	N=138
Edad (años)	49,4 +/- 12,2
Sexo (M/F)	87(63%) / 51(37%)
Circunferencia de la cintura (cm)	111,4 +/- 11,5
IMC (kg/m ²)	35,0 +/- 5,4
Normal/Sobrepeso/Obeso	4(3%)/11(8%)/123(89%)
Diabetes	61 (44%)
HOMA-IR	8,6 +/- 7,5
Hipertensión	65 (47%)
Colesterol Total (mmol/l)	5,4 +/- 1,4
Colesterol HDL (mmol/l)	1,2 +/- 0,3
Col Total/Col HDL	4,7 +/- 1,6
Triglicéridos (mmol/l)	2,8 +/- 2,4
AST (U/l)	58,3 +/- 37,9

ALT (UI/l)	86,5 +/- 60,4
Proporción AST/ALT	0,80 +/- 0,47
Bilirrubina Total (mmol/l)	12,3 +/- 1,6
ALP (UI/l)	105,6 +/- 52,3
GGT (UI/l)	142,8 +/- 175,1
Albúmina (g/l)	44,2 +/- 4,8
Plaquetas (x10 ⁹ /l)	237,2 +/- 80,2
Ferritina (ng/ml)	198,1 +/- 471,7
CRP (mg/l)	6,0 +/- 21,6
Estadio de la Fibrosis 0/1/2/3/4	41/22/28/31/15
sVAP-1 (ng/ml)	945,9 +/- 457,6

IMC = Índice de masa corporal, HOMA-IR = Modelo homeostático de determinación de resistencia a insulina, AST = Aspartato transaminasa, ALT = Alanina transaminasa, ALP = Fosfatasa alcalina, GGT= Gamma-glutamil transferasa, CRP = Proteína C reactiva.

5 Los niveles de sVAP-1 estuvieron significativamente elevados en la cohorte de NAFLD (media+/-DE; 945,9+/-457,6 ng/ml) comparado con los individuos sanos (300-500 ng/ml). Los niveles más altos se observaron en aquellos que tenían fibrosis hepática significativa (estadios F2-4), y hubo una tendencia lineal evidente entre los niveles de sVAP-1 y el estadio de la fibrosis (Figura 17).

10 El análisis de correlación monofactorial confirmó una correlación significativa entre los niveles de sVAP-1 y el estadio histológico de la fibrosis ($r = 0,43$, $p = 0,0000003$) (Tabla 4), y en la regresión logística múltiple con eliminación regresiva el estadio de fibrosis fue el factor independiente más significativo que contribuyó al nivel de sVAP-1 (Tabla 5).

Tabla 4. Factores que se correlacionan significativamente con los niveles de sVAP-1 en el análisis monofactorial

VARIABLE	VALOR DE r	VALOR DE p
Estadio de la Fibrosis	0,43	0,0000003
AST/ALT	0,42	0,000002
Plaquetas	-0,40	0,000002
Albúmina	-0,35	0,00003
Diabetes	N/A	0,0001
Edad	0,31	0,0002
HOMA-IR	0,47	0,0003
Bilirrubina total	0,26	0,002
ALP	0,25	0,003
Inflamación Lobulillar	0,31	0,02
Colesterol Total	-0,21	0,02
Balonización de Hepatocitos	0,21	0,05
Grado de Esteatosis	0,18	0,05

Los valores de r indican la correlación de Pearson.

15 Tabla 5. Factores que están asociados independientemente al nivel de sVAP-1 tras regresión múltiple con eliminación regresiva

VARIABLE	COEFICIENTE BETA	VALOR DE p
Estadio de la Fibrosis	0,31	0,0005

VARIABLE	COEFICIENTE BETA	VALOR DE p
Proporción AST/ALT	0,24	0,009
ALP	0,21	0,01
Bilirrubina	0,20	0,02
Grado de Esteatosis	0,16	0,05

Tanto el análisis monofactorial como el multifactorial de los factores asociados a la fibrosis hepática significativa (estadios F2-4) indicaron que los niveles de sVAP-1 son más significativos que los marcadores bioquímicos habituales de lesión hepática, tales como las enzimas hepáticas y la proporción AST/ALT (Tablas 6 y 7).

5 Tabla 6. Factores que están asociados a una fibrosis significativa (F2-4) en un análisis monofactorial

VARIABLE	PROPORCIÓN DE PROBABILIDAD (IC 95%)	VALOR DE p
sVAP-1 (continua)	1,003 (1,001-1,004)	0,00006
Diabetes	4,607 (2,168-9,789)	0,00007
Edad (por año)	1,041 (1,010-1,072)	0,008
AST/ALT	6,144 (1,525-24,756)	0,01
Hipertensión	2,628 (1,265-5,458)	0,01
Albúmina	0,913 (0,836-0,996)	0,04

Tabla 7. Factores que están asociados independientemente a fibrosis tras regresión múltiple con eliminación regresiva

VARIABLE	COEFICIENTE BETA	VALOR DE p
sVAP-1	0,32	0,001
AST/ALT	0,23	0,009
Hipertensión	0,20	0,01
Diabetes	0,16	0,05

10 En la cohorte, si se usó el nivel de sVAP-1 como biomarcador único para predecir la presencia de una fibrosis hepática significativa (estadios F2-4), un nivel de ≥ 1000 ng/ml tuvo un valor predictivo positivo del 88,9%. La área bajo la curva característica operativa del receptor (AUROC) para predecir una fibrosis significativa (F2-4), fibrosis avanzada (F3-4) y cirrosis (F4) fue 0,71 (95% de IC 0,62-0,80), 0,68 (95% de IC 0,58-0,78) y 0,75 (95% de IC 0,58-0,92), respectivamente (Figura 18).

15 Además, los resultados indicaron que existe la posibilidad de mejorar el perfil de sensibilidad y especificidad de sVAP-1 para predecir la fibrosis hepática combinándolo con otros parámetros clínicos y bioquímicos. Una puntuación de fibrosis (calculada a partir de la ecuación de regresión) de factores asociados independientemente a la fibrosis hepática en el análisis multifactorial (sVAP-1, estado diabético y proporción AST/ALT), tuvo una AUROC para predecir la fibrosis significativa (F2-4), fibrosis avanzada (F3-4) y cirrosis (F4) de 0,79 (95% de IC 0,71-0,87), 0,80 (95% de IC 0,71-0,88) y 0,89 (95% de IC 0,74-1,02) (Figura 19).

20 La proteína VAP-1 tiene una actividad enzimática de monoamina oxidasa denominada SSAO (amina oxidasa sensible a semicarbazida). Como la actividad enzimática de SSAO es una parte esencial de la proteína VAP-1, se deduce que los niveles de sVAP-1 en los fluidos corporales también se pueden determinar midiendo la cantidad de actividad de SSAO en un fluido corporal (tal como suero o plasma). SSAO es la actividad de monoamina oxidasa principal en el suero y plasma humano, y actúa sobre sustratos de SSAO tales como bencilamina o metilamina. Así, la actividad de SSAO se puede usar como marcador equivalente de fibrosis hepática.

25

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> BioTie Therapies Corp.
- 5 <120> Método terapéutico
<130> 2091339Pc
<160> 48
- 10 <170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 5
- 15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> S, N o R
- 20 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> Y o S
- 25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(3)
<223> A, G o W
- 30 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (4)..(4)
<223> M o I
- 35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (5)..(5)
<223> H o S
- 40 <400> 1
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
45 1 5
<210> 2
<211> 17
<212> PRT
- 50 <213> Homo sapiens
<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> V, A o N
- 55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> I o L
- 60 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(3)

<223> W, G o K

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 5 <222> (4)..(4)
 <223> F, Q, V o Y

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 10 <222> (5)..(5)
 <223> D o G

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 15 <222> (7)..(7)
 <223> S, G o I

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 20 <222> (8).. (8)
 <223> N, E, Y o no amino ácido

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 25 <222> (9) .. (9)
 <223> E, K o T

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 30 <222> (10)..(10)
 <223> Y, D o N

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 35 <222> (11)..(11)
 <223> Y o H

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 40 <222> (12)..(12)
 <223> V o A

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 45 <222> (16)..(16)
 <223> K o R

<400> 2
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Val Xaa
 1 5 10 15

Gly

50 <210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> D o E

60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (2)..(2)
 <223> A, G, K, P o Y

<220>
 5 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> W, F, G o N

<220>
 10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(4)
 <223> F, G o no amino ácido

<220>
 15 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (5)..(5)
 <223> G, S o no amino ácido

<220>
 20 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (6)..(6)
 <223> G o no amino ácido

<220>
 25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (7)..(7)
 <223> T o no amino ácido

<220>
 30 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (8).. (8)
 <223> Y o no amino ácido

<220>
 35 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (9) .. (9)
 <223> E, F o no amino ácido

<220>
 40 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (10)..(10)
 <223> F, G, S, V o W

<220>
 45 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (11)..(11)
 <223> Y o G

<220>
 50 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (12)..(12)
 <223> F o I

<400> 3
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
 55 1 5 10

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Ser Tyr Ala Met His
 1 5

ES 2 657 943 T3

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 5
 Asn Tyr Trp Met Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 6
 Ser Tyr Ala Met His
 1 5
 15
 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 7
 Arg Ser Gly Ile His
 1 5
 25
 <210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 8
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5
 35
 <210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 9
 Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 10
 Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Arg
 1 5 10 15
 Gly
 50
 <210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55
 <400> 11

ES 2 657 943 T3

Val Leu Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 12
 <211> 17
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ile Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Ala Ile Gly Val Gly Gly Gly Thr Tyr His Val Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Asp Ala Trp Ser Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Asp Tyr Phe Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Phe Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Asp Gly Trp Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Glu Lys Asn Trp Gly Ile Asp Tyr
 1 5

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 657 943 T3

<400> 18
 Asp Pro Gly Phe Gly Glu Val Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 19
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 19
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Asn Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Ala Trp Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 20
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 20

ES 2 657 943 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Phe Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Phe Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 117
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Leu Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Trp Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

10
<210> 22
<211> 117

ES 2 657 943 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ile Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Lys Asn Trp Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Pro Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Val Gly Gly Gly Thr Tyr His Val Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Pro Gly Phe Gly Glu Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

15 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (5)..(5)
 <223> G o S
 10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (6)..(6)
 <223> I o V
 15
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (8)..(8)
 <223> S o R
 20
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (9)..(9)
 <223> S o no amino ácido
 25
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (10)..(10)
 <223> A, F, W o Y
 30
 <400> 24
Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Leu Ala
1 5 10
 35
 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> D o G
 45
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(4)
 <223> S o N
 50
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (5)..(5)
 <223> L o R
 55
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (6)..(6)
 <223> A, E o Q
 60
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (7)..(7)
 <223> S, T o R
 <400> 25

Xaa Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

5 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> F, Y o R

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(4)
 <223> N, G o S

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (5)..(5)
 <223> S o N

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (6)..(6)
 <223> Y, F, W o S

30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (8)..(8)
 <223> L o R

<400> 26
Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5

35 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 27
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Ala Leu Ala
1 5 10

45 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 28
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

55 <210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60 <400> 29
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 30
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 30
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 5 1 5 10

 <210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 31
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
 1 5 10

 15 <210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 20 <400> 32
 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5

 <210> 33
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 33
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5
 30
 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 34
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Arg
 1 5

 40 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 35
 45 Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser

 1 5

 <210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 36
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 55 1 5

 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens

ES 2 657 943 T3

<400> 37
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

5 <210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 38
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

15 <210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 39
Gln Gln Phe Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 40
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

35 <210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40 <400> 41
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

40 <210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

ES 2 657 943 T3

Val Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gly Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 43
<211> 107
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

10 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 44
15 <211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

ES 2 657 943 T3

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Ala
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Phe Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 45
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 45
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 46
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 46

ES 2 657 943 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 47
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 47
 Met Glu Phe Gly Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Asp
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

10

ES 2 657 943 T3

	35				40					45					
Phe	Ser	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Trp	Phe	Asp	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Tyr	Val
	65				70					75					80
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn
				85					90					95	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Thr	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105						110	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Ala	Trp	Ser	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
		115					120					125			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
	130					135						140			
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala
	145				150					155					160
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
				165					170						175
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
			180					185					190		
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
		195					200						205		
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys
	210					215					220				
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro
	225				230					235					240
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
				245					250					255	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu
		275					280					285			
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
	290					295						300			

ES 2 657 943 T3

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450 455 460

<210> 48

<211> 236

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Val Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Arg Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

10

ES 2 657 943 T3

Gly Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de VAP-1, que es
5 un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano que comprende de una a tres secuencias consenso de CDR seleccionadas de un grupo que consiste en SEQ ID N°s 1 a 3 y/o un polipéptido de la cadena ligera que comprende de una a tres secuencias consenso de CDR seleccionadas de un grupo que consiste en SEQ ID N°s 24 a 26
para el uso en el tratamiento de una afección fibrótica.
2. El inhibidor de VAP-1 para el uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo tiene un polipéptido de la cadena pesada que comprende una primera secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 4 a 8, una segunda
10 secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 9 a 13, y una tercera secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 14 a 18, y/o un polipéptido de la cadena ligera que comprende una primera secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 27 a 31, una segunda secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 32 a 36 y una tercera secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID N°s 37 a 41.
3. El inhibidor de VAP-1 para el uso según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en SEQ
15 ID N°s 19 a 23, y una región variable de la cadena ligera respectiva que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID N°s 42 a 46.
4. El inhibidor de VAP-1 para el uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo recombinante completamente humano que comprende un polipéptido de la cadena pesada representado en SEQ ID
20 N° 47 y un polipéptido de la cadena ligera representado en SEQ ID N° 48.
5. El inhibidor de VAP-1 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para el uso en el tratamiento de una afección fibrótica seleccionada del grupo que consiste en fibrosis hepática y las afecciones inflamatorias que predisponen a ella, es decir, hepatitis aguda y crónica, enfermedad biliar y lesión hepática tóxica.
6. El inhibidor de VAP-1 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el uso en el tratamiento de una afección fibrótica seleccionada del grupo que consiste en fibrosis pulmonar, fibrosis renal, que incluye la que
25 resulta de nefropatía diabética, mielofibrosis, fibrosis pancreática, esclerodermia, enfermedades del tejido conectivo, cicatrización, fibrosis de la piel, fibrosis cardiaca, trasplante de órganos, estenosis vascular, reestenosis, fibrosis arterial, artrofibrosis, fibrosis mamaria, fibrosis muscular, fibrosis retroperitoneal, fibrosis de tiroides, fibrosis de nódulos linfáticos, fibrosis de vejiga, fibrosis pleural y EPOC, una enfermedad en la que las paredes de las vías respiratorias son fibróticas, con la acumulación de miofibroblastos y colágeno, y, como todos los tejidos fibróticos, están contraídas.
7. El uso de un inhibidor de VAP-1 como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección fibrótica.
8. El uso según la reivindicación 7, en el que dicha afección fibrótica se selecciona de un grupo que consiste en
35 fibrosis hepática y las afecciones inflamatorias que predisponen a ella, es decir, hepatitis aguda y crónica, enfermedad biliar y lesión hepática tóxica.
9. El uso según la reivindicación 7, en el que dicha afección fibrótica se selecciona de un grupo que consiste en fibrosis pulmonar, fibrosis renal, que incluye la que resulta de nefropatía diabética, mielofibrosis, fibrosis pancreática, esclerodermia, enfermedades del tejido conectivo, cicatrización, fibrosis de la piel, fibrosis cardiaca, trasplante de
40 órganos, estenosis vascular, reestenosis, fibrosis arterial, artrofibrosis, fibrosis mamaria, fibrosis muscular, fibrosis retroperitoneal, fibrosis de tiroides, fibrosis de nódulos linfáticos, fibrosis de vejiga, fibrosis pleural y EPOC, una enfermedad en la que las paredes de las vías respiratorias son fibróticas, con la acumulación de miofibroblastos y colágeno, y, como todos los tejidos fibróticos, están contraídas.

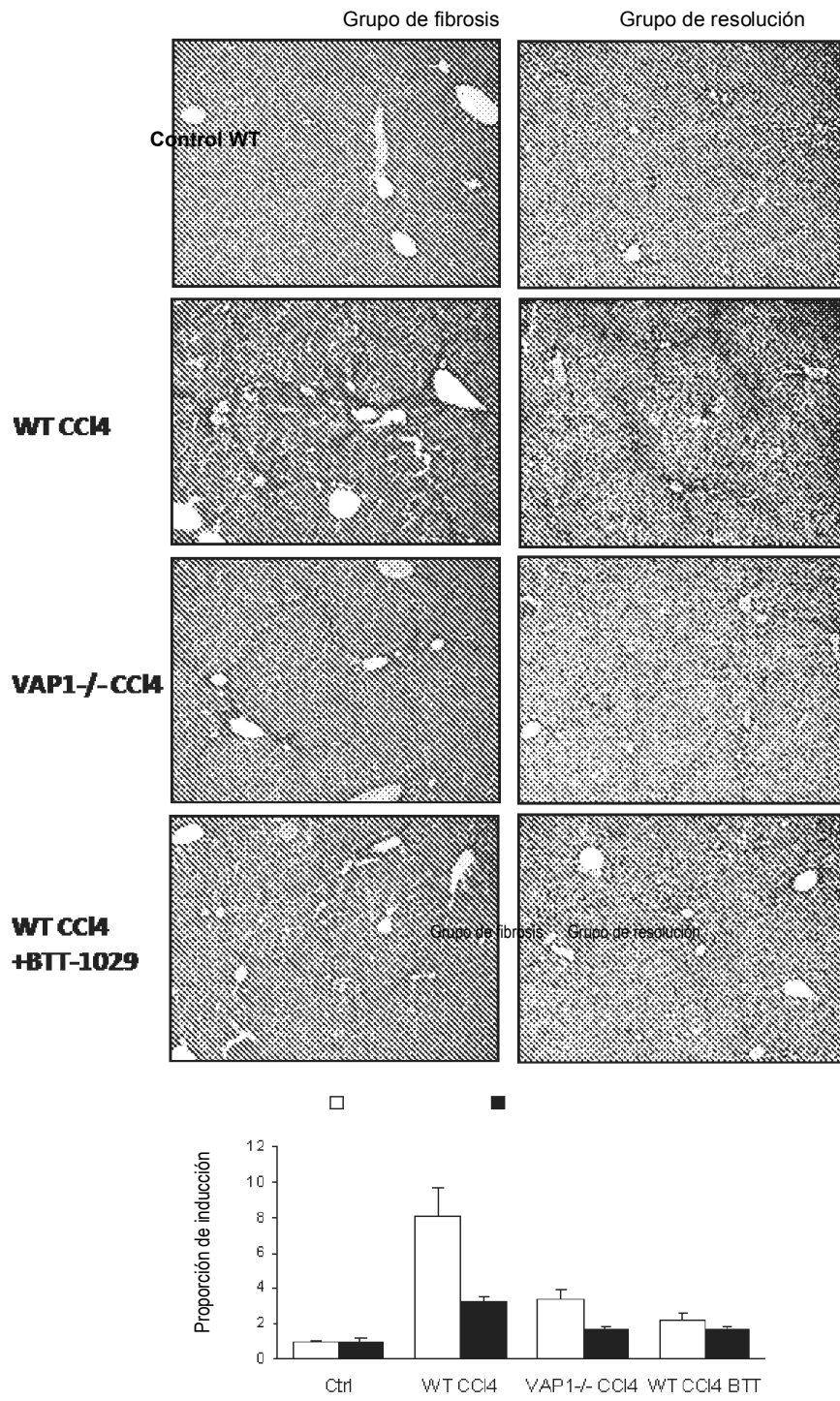


FIG. 1

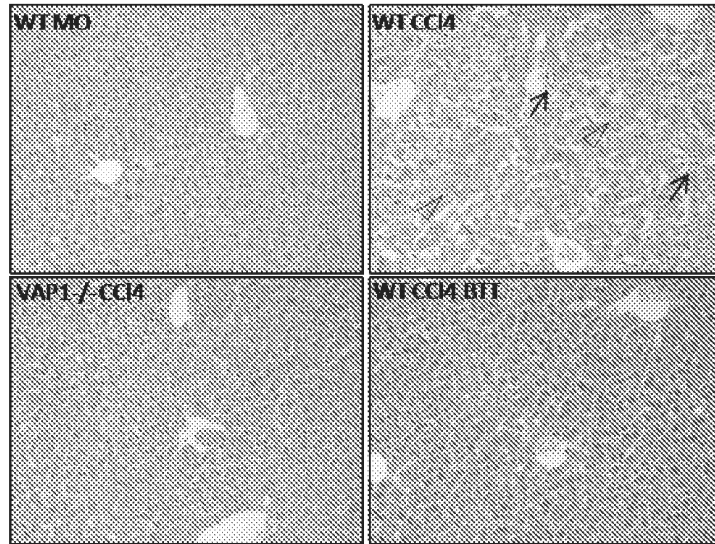


FIG. 2

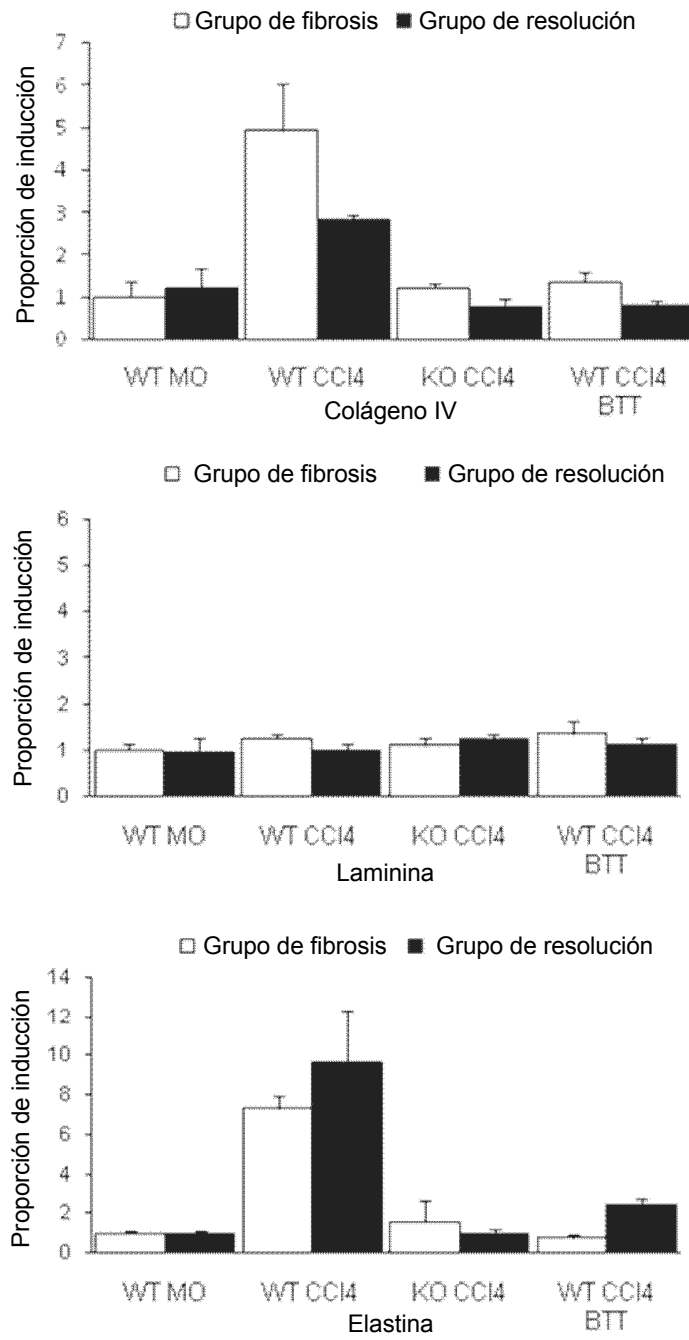


FIG. 3

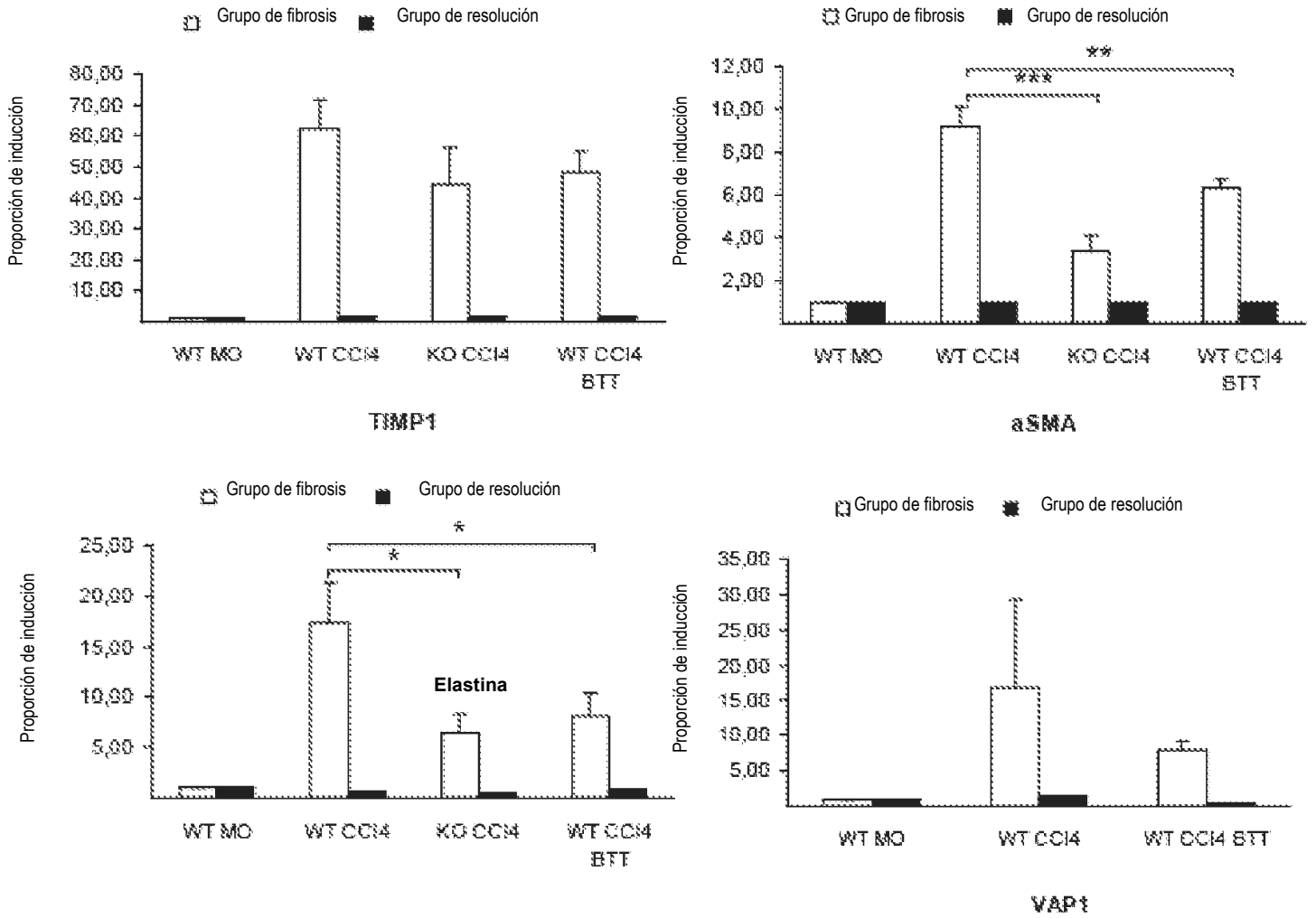


FIG. 4

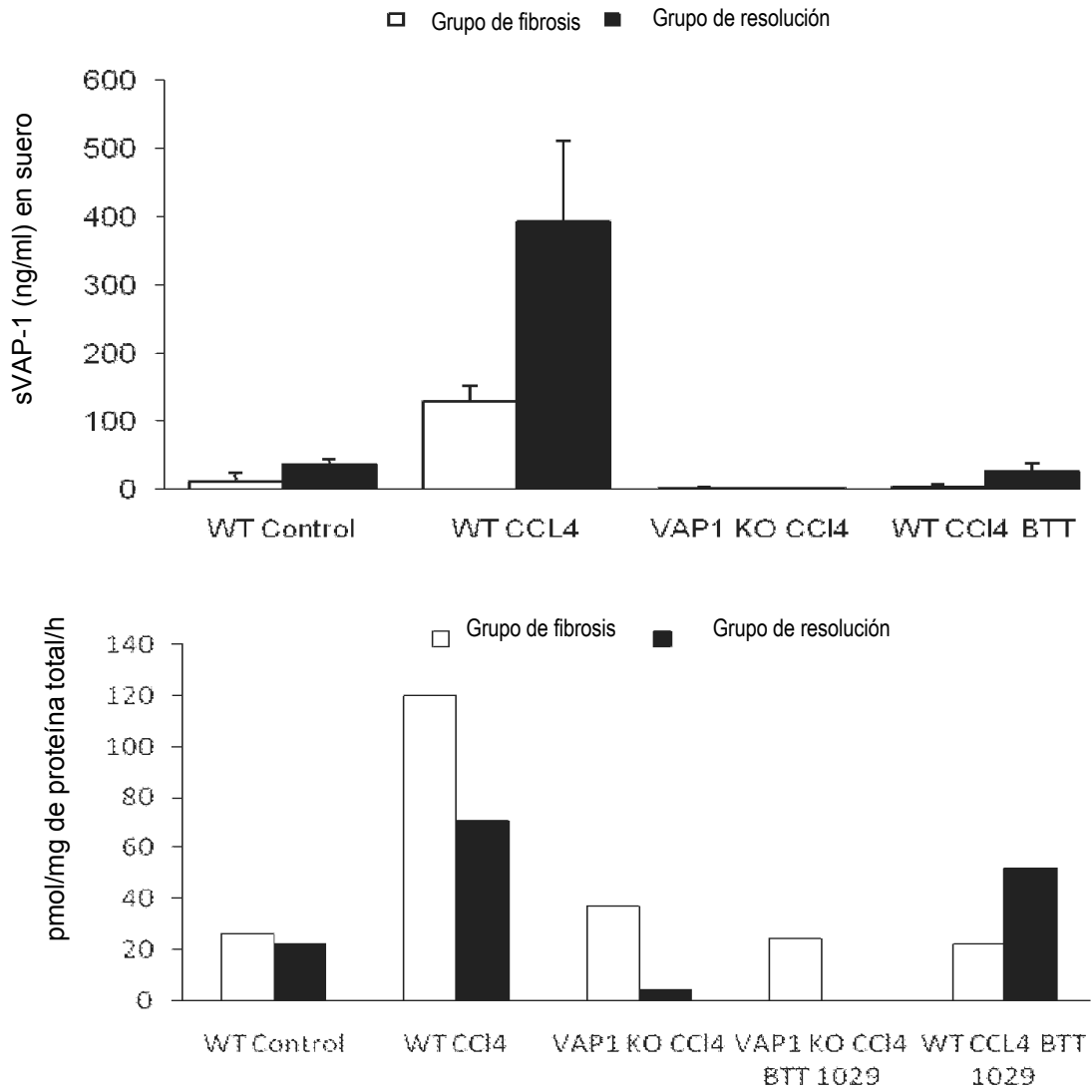


FIG. 5

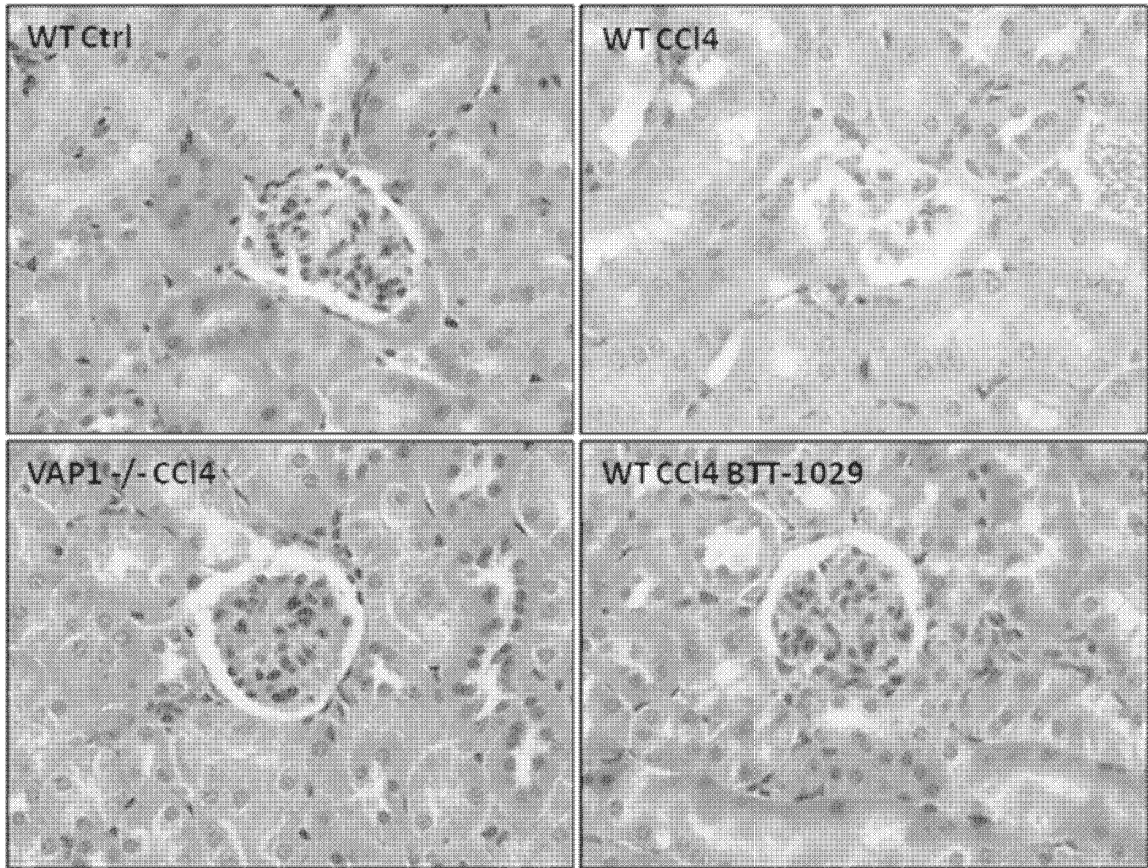


FIG. 6

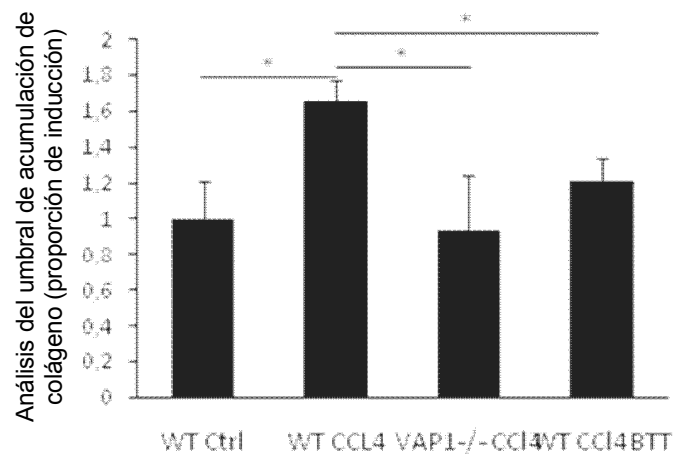
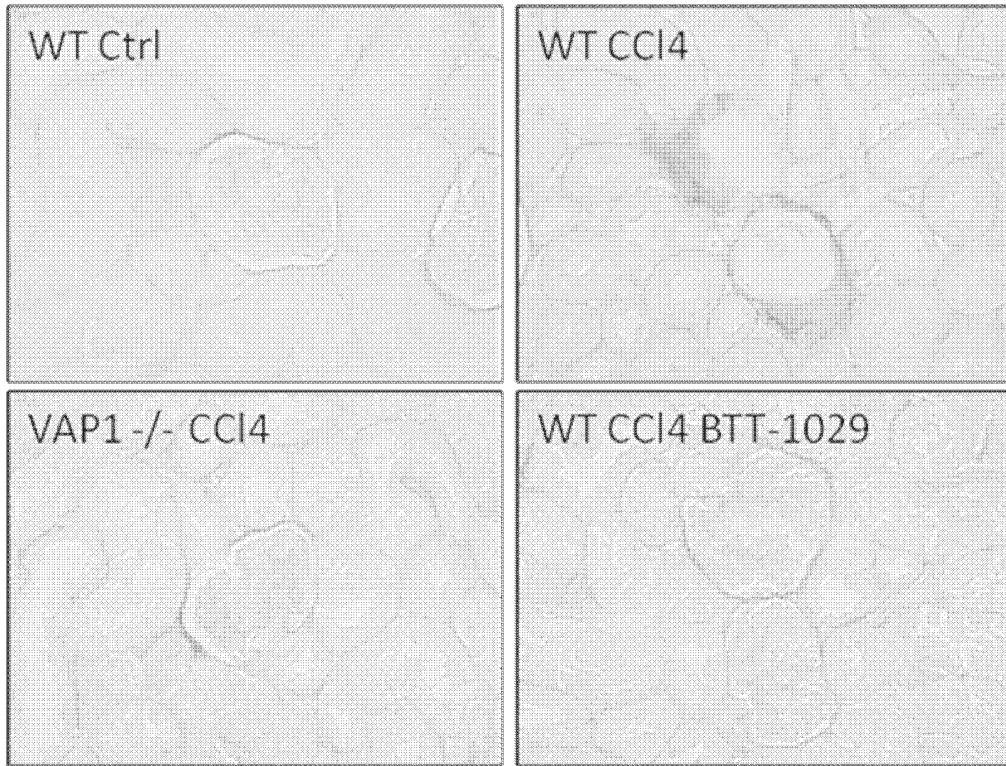


FIG. 7

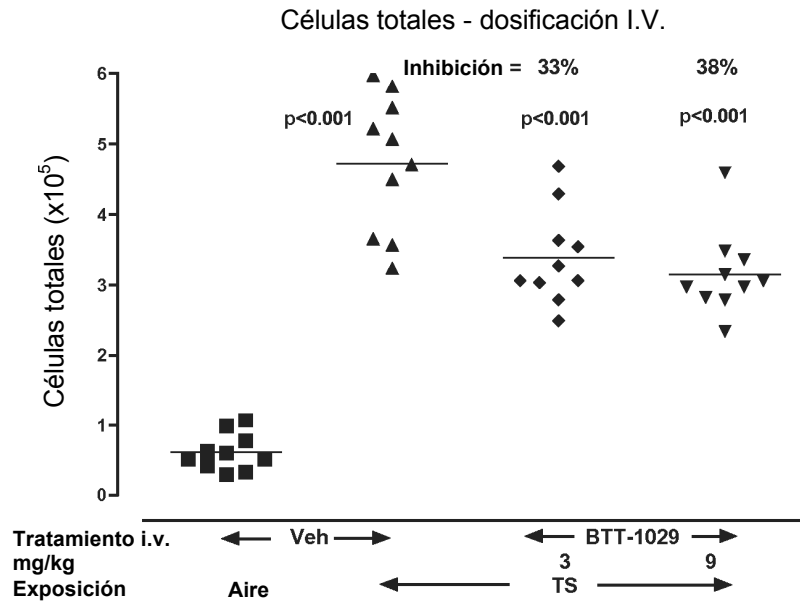


FIG. 8

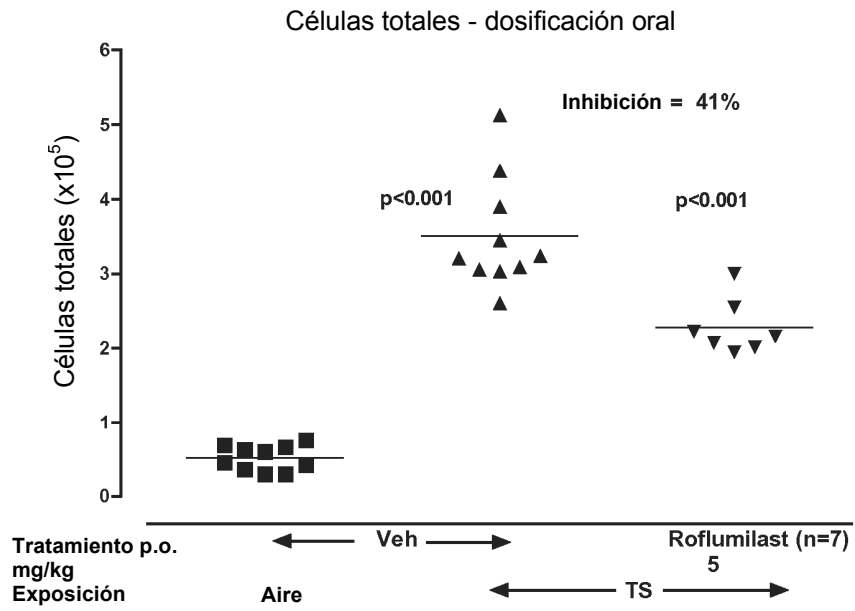


FIG. 9

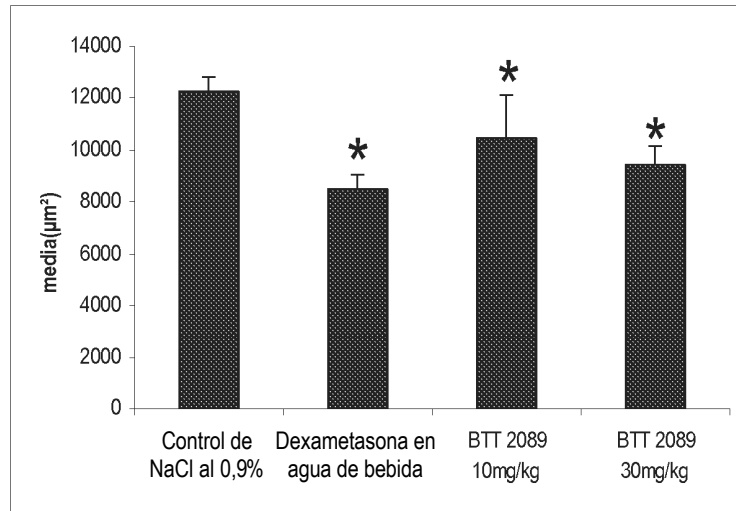


FIG. 10

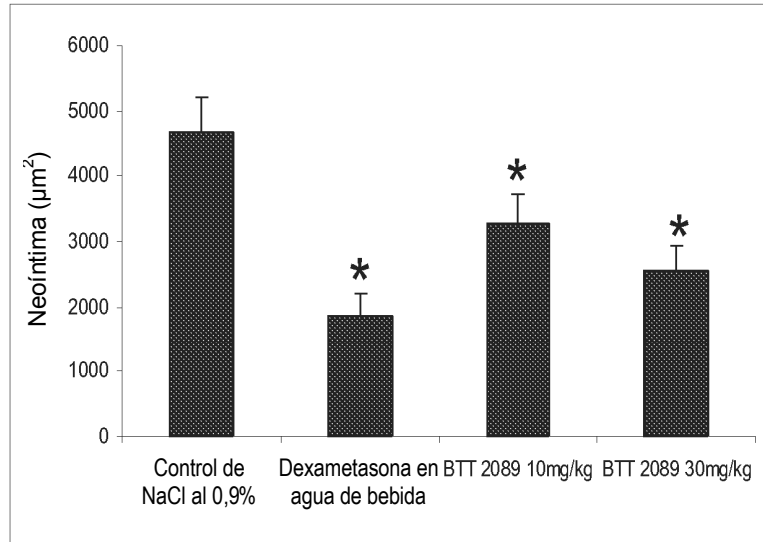


FIG. 11

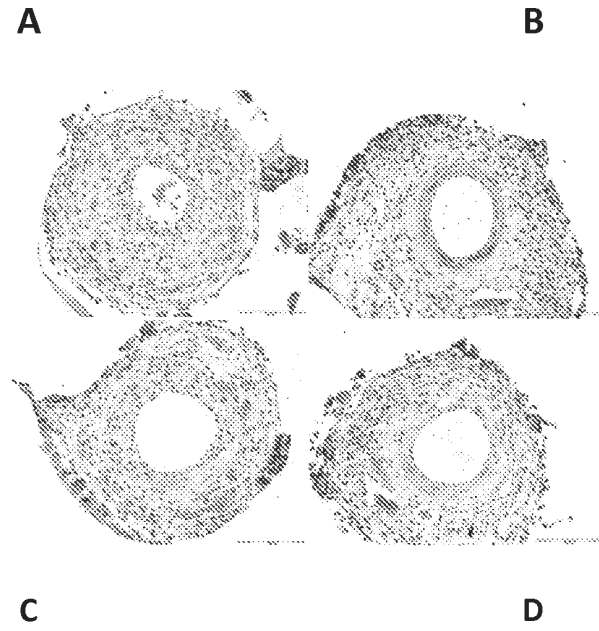
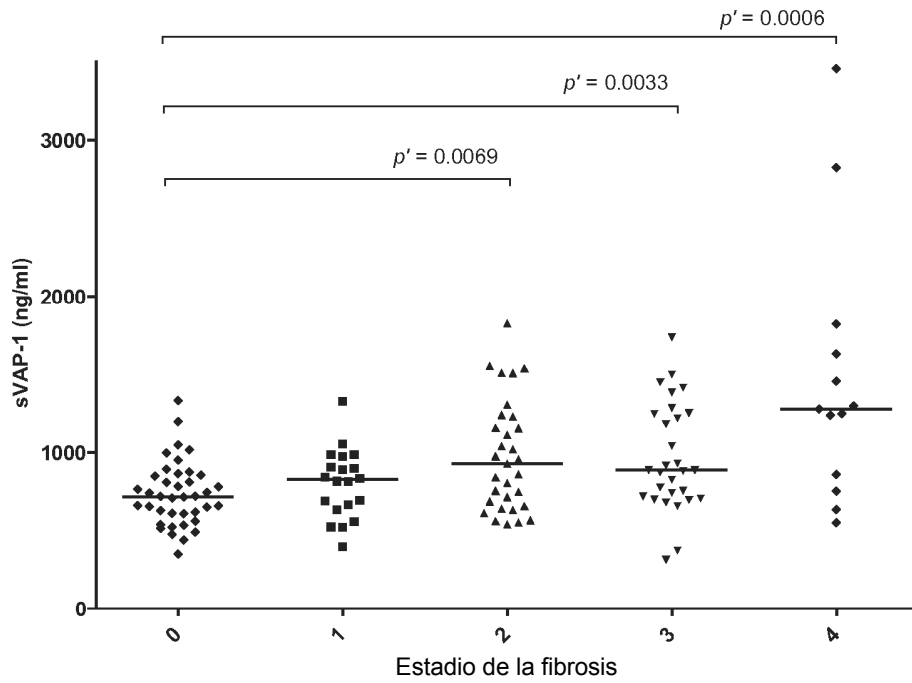


FIG. 12



Prueba de Kruskal-Wallis $p = 0,0003$
 Prueba de tendencia de Cuzick $p = <0,0001$
 Valores de p calculados mediante una prueba de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni

FIG. 13

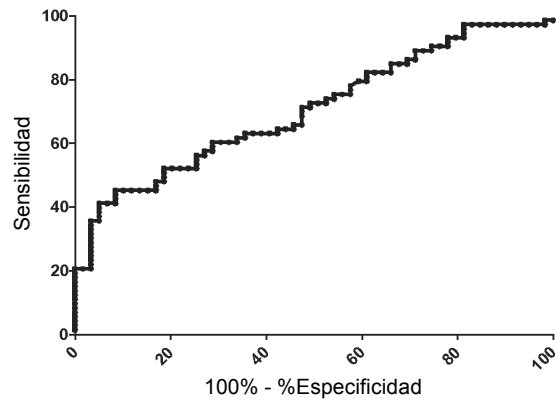


FIG. 14A

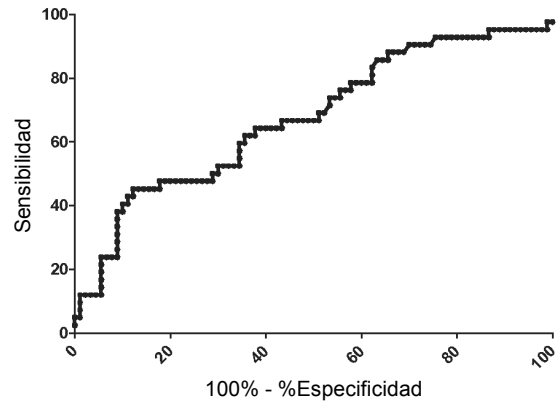


FIG. 14B

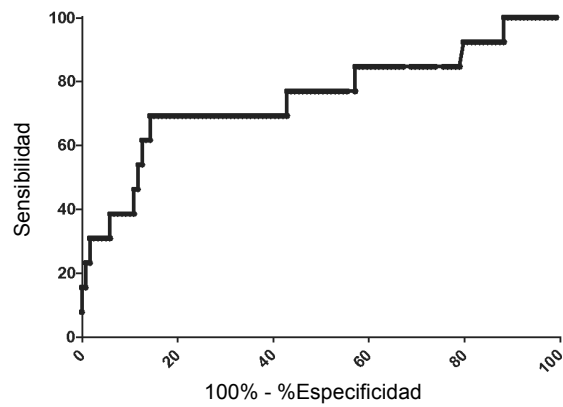


FIG. 14C

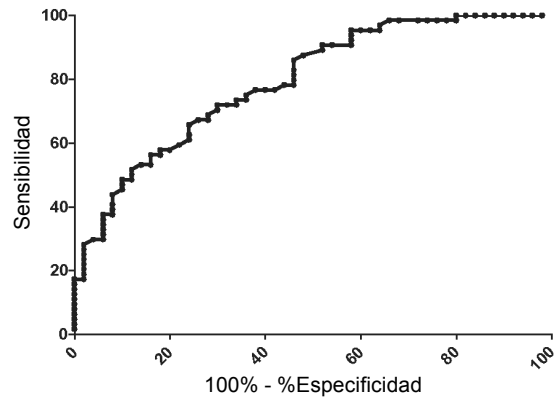


FIG. 15A

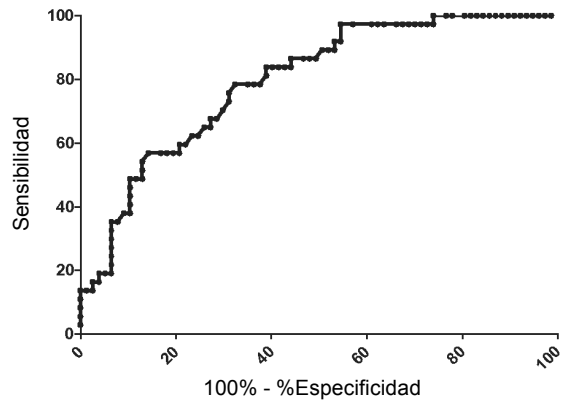


FIG. 15B

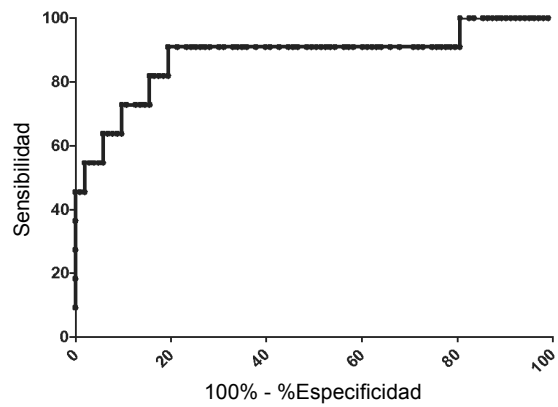


FIG. 15C

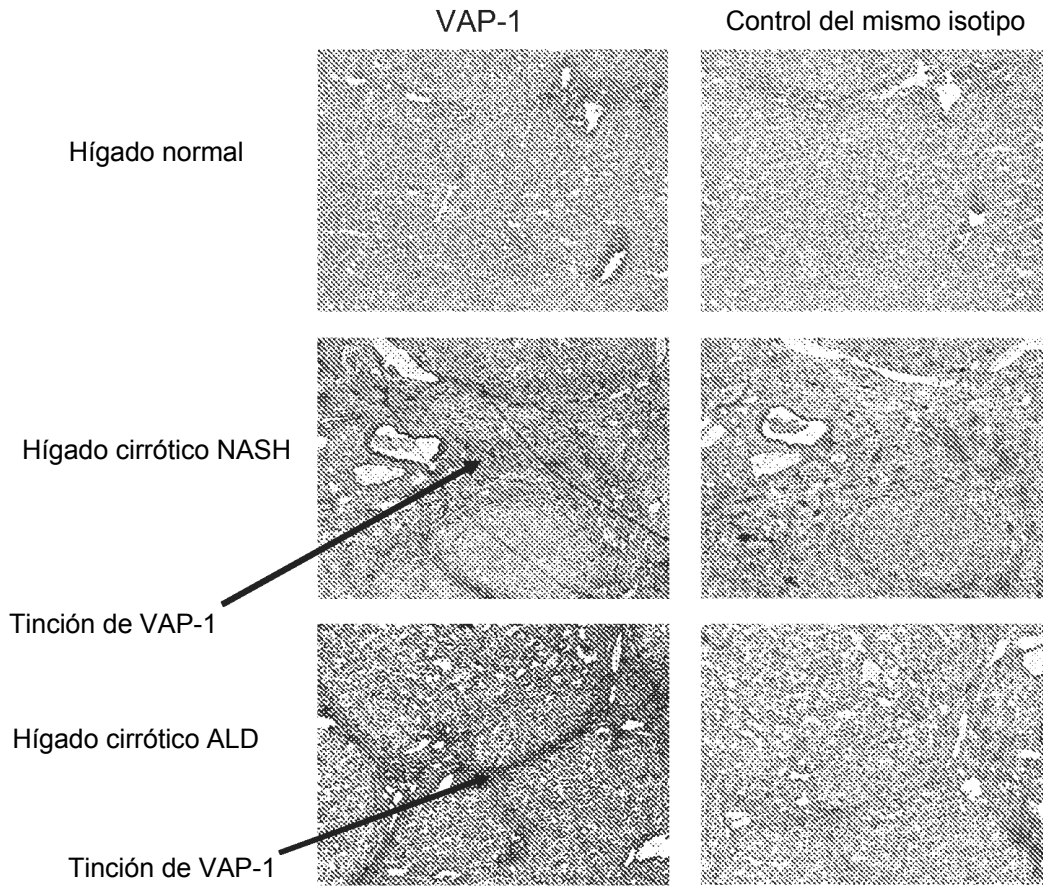
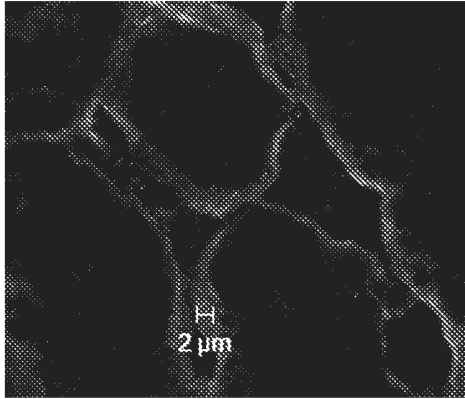
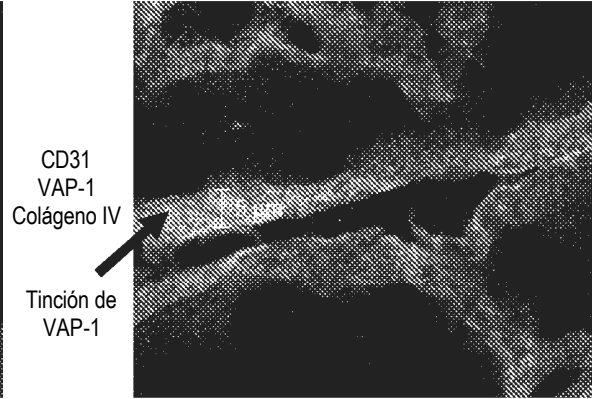


FIG. 16



Hígado normal (sinusoides) x 100



Hígado cirrótico NASH (sinusoides) x 100

FIG. 17

Hígado cirrótico NASH

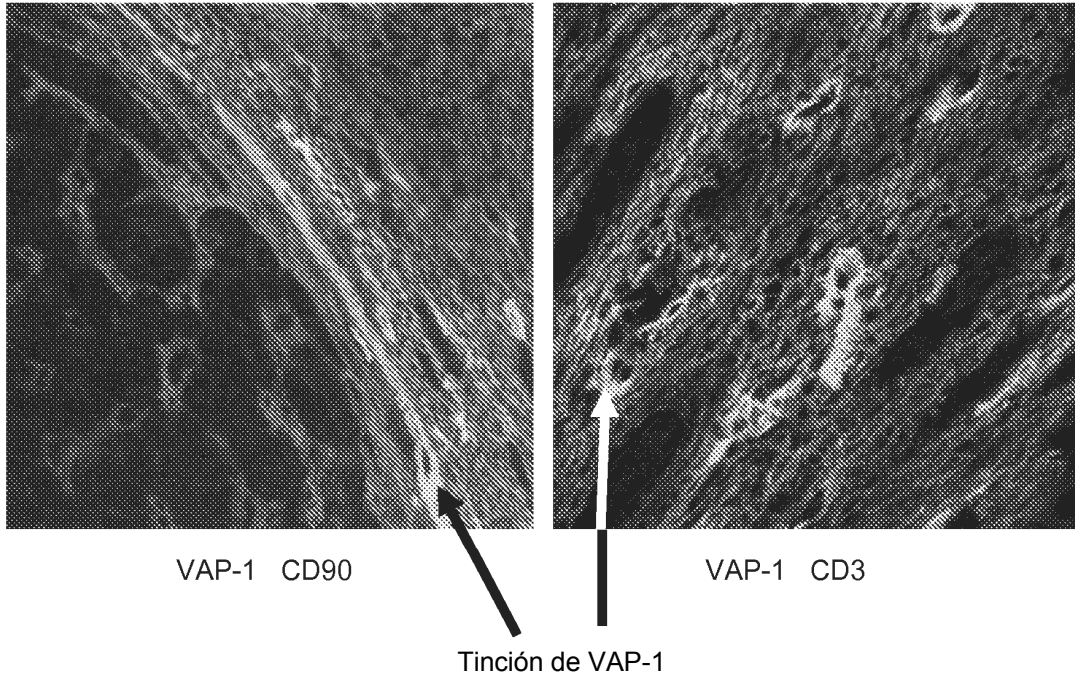


FIG. 18

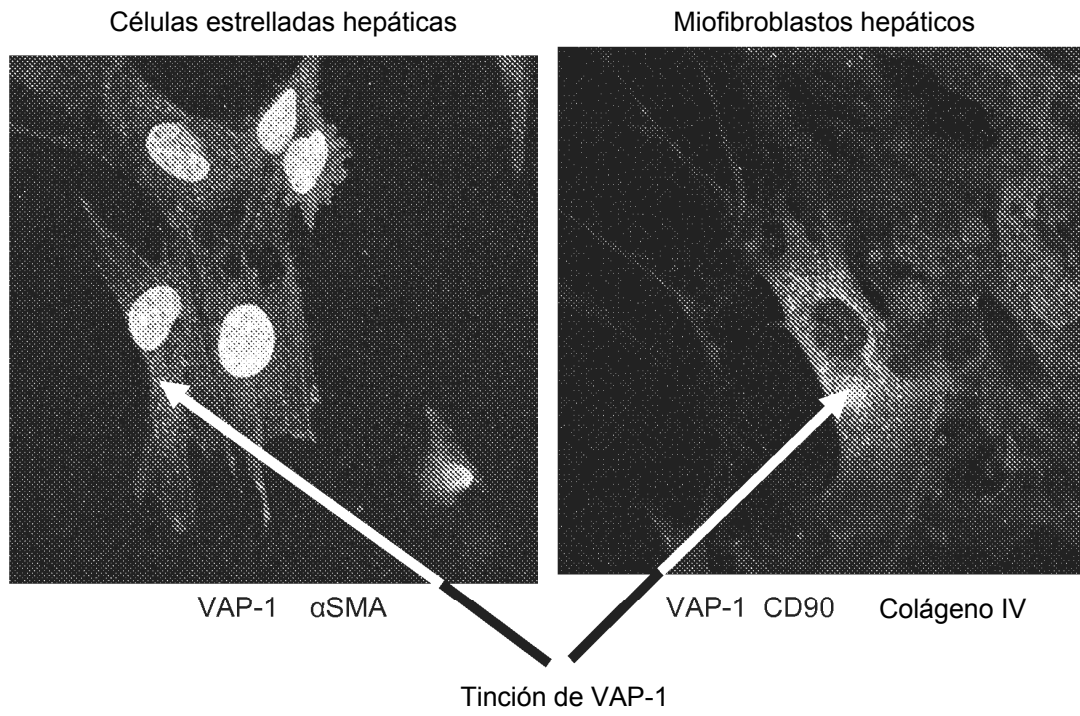


FIG. 19