

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 731**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 31/7105** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 31/713** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2008.01)  
**C12N 15/113** (2010.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2012 PCT/GB2012/052629**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13064810**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2012 E 12788239 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2773668**

54 Título: **Hipertensión pulmonar**

30 Prioridad:

**01.11.2011 GB 201118840**  
**04.11.2011 US 201161556112 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.06.2018**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF SHEFFIELD (100.0%)**  
**Firth Court, Western Bank**  
**Sheffield South, Yorkshire S10 2TN, GB**

72 Inventor/es:

**LAWRIE, ALLAN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 671 731 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

## Hipertensión pulmonar

- 5 La descripción se refiere a anticuerpos antagonistas que inhiben la actividad de la osteoprotegerina (OPG) y a su uso en el tratamiento de la hipertensión pulmonar.

**Antecedentes**

- 10 La hipertensión pulmonar [HP] cubre diversas afecciones que producen una presión arterial anómalamente alta en los pulmones. La HP puede aparecer en forma de hipertensión arterial pulmonar (HAP) que se produce en forma idiopática (HAPI) o hereditaria (HAPh) y también en asociación con otras enfermedades (HAPA) como por ejemplo enfermedad del tejido conjuntivo. La HP también puede producirse a consecuencia de enfermedad del corazón izquierdo, enfermedades pulmonares (en particular enfermedad obstructiva congestiva [EPOC] y fibrosis pulmonar),  
 15 tromboembolia, así como otras afecciones multifactoriales como hipertensión portal, drepanocitosis y VIH. El pronóstico en pacientes que padecen HP es malo y varía entre los grupos de enfermedad. El abordaje actual de la enfermedad incluye el uso de bloqueantes de los canales de calcio, diuréticos, antagonistas del receptor de la endotelina, prostaciclina, guanilato-ciclasa soluble e inhibidores de la fosfodiesterasa. Los perfiles de efectos secundarios de estos tratamientos pueden llevar a una reducción de la calidad de vida y a un control insatisfactorio  
 20 de la enfermedad. En el trasplante de pulmón es el único tratamiento curativo, pero se realiza muy raramente. Por tanto, existe una necesidad permanente de identificar nuevos tratamientos y agentes que sean efectivos para frenar la progresión y/o revertir la HP y que no tengan los problemas asociados con los tratamientos actuales.

- Lawrie y cols., 2008 (Evidence of a Role for Osteoprotegerin in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension,  
 25 The American Journal of Pathology, Vol 172, No 1) describen la intervención de varios factores en la patogénesis de la hipertensión arterial pulmonar [HAP] como IL-1, IL-6, BMP, 5-HT, SERT, RANKL, TRAIL y OPG que afectan a diversas vías biológicas. En particular se encontró que la OPG interviene en el mantenimiento de la morfogénesis de los huesos y en el control de la muerte celular. Se encontró que los niveles séricos aumentados de OPG están asociados con HAP además de otros biomarcadores.

- 30 La osteoprotegerina (OPG) es una proteína de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) y se une al menos a dos ligandos; el ligando que induce la apoptosis relacionado con TNF [TRAIL] que es una molécula de la superficie celular semejante a TNF implicada en la inducción de la apoptosis en células cancerosas y el activador del receptor del ligando NFkB [RANKL] que se expresa en los precursores de los osteoclastos, los  
 35 linfocitos T de células dendríticas y los precursores hematopoyéticos. La OPG se contempla como una de entre una serie de receptores de señuelo en TRAIL, que actúan para modular su capacidad de dirigirse a células cancerosas. Puede esperarse que la OPG fomente la supervivencia de las células cancerosas si está presente en un lugar relevante y se ha documentado su capacidad para aumentar la supervivencia de las células tumorales. RANKL interacciona con RANK en las superficies celulares para estimular la producción y la actividad de los osteoclastos,  
 40 las células principales que intervienen en la reposición de hueso. La interacción de la OPG con RANKL inhibe la capacidad de RANKL de unirse a RANK y estimular los osteoclastos y esta es la actividad de la OPG que le confiere su capacidad de reducir la pérdida ósea.

- La actividad de la OPG en el metabolismo de los huesos es bien conocida en la técnica. El documento US 6.015.938  
 45 divulga un animal no humano transgénico que expresa la OPG y su uso en el análisis de la intervención de la OPG en el metabolismo óseo. El documento US 6.284.740 divulga un procedimiento de terapia génica para aumentar la cantidad de OPG producida por un mamífero con lo que aumenta la densidad ósea. Los documentos US6.284.728 y US6.613.544 divulgan y reivindican un polipéptido de OPG y una molécula de ácidos nucleicos que codifica OPG respectivamente. El documento US6.316.408 divulga un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad ósea  
 50 mediante la administración de un factor de activación y diferenciación de osteoclastos. En el documento US 6.087.555 se describen ratones transgénicos que carecen de la expresión de OPG. En todos los casos se enseña la OPG y su intervención en el metabolismo óseo. En ninguna de las técnicas anteriores se cita la implicación de la OPG en la HP sugerida o los efectos beneficiosos del bloqueo de la actividad de la OPG y su efecto terapéutico en el desarrollo de HP.

- 55 La presente descripción se refiere al uso de antagonistas de la OPG en el tratamiento de HP. Los autores de la invención lo ilustran usando anticuerpos antagonistas dirigidos a OPG y muestran que el bloqueo de la actividad de la OPG protege a los animales que tienen predisposición a HP y la reversión de los síntomas patológicos.

- 60 **Descripción de la invención**

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo antagonista, o un fragmento de unión a antígeno activo del mismo, que se une a e inhibe la actividad de una proteína codificada por el gen OPG para el uso en el tratamiento y reversión de los síntomas patológicos de hipertensión pulmonar.

5

En una realización preferente de la invención dicho anticuerpo o fragmento de unión se une a e inhibe la actividad de un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1.

En una realización preferente de la invención dicho anticuerpo compite con un anticuerpo que se une a la secuencia de aminoácidos tal como se representa en la SEQ ID NO: 1.

10

En una realización preferente de la invención dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

En una realización preferente alternativa de la invención dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

15

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, son moléculas de proteínas que tienen especificidad para moléculas extrañas (antígenos). Las inmunoglobulinas (Ig) son una clase de proteínas relacionadas estructuralmente que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) (bajo peso molecular) ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) y un par de cadenas pesadas (H) ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ), ligadas las cuatro entre sí por enlaces de disulfuro. Las cadenas H y L tienen regiones que contribuyen a la unión de antígeno y que son altamente variables de una molécula de Ig a otra. Además, las cadenas H y L contienen regiones que son no variables o constantes. Las cadenas L consisten en dos dominios. El dominio en el extremo carboxi es esencialmente idéntico entre las cadenas L de un tipo dado y se refiere como región "constante" (C). El dominio en el extremo amino varía de una cadena L a otra cadena L y contribuye al sitio de unión del anticuerpo. Debido a su variabilidad, se refiere como región "variable"

20

(V). Las cadenas H de moléculas Ig son de varias clases,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\sigma$ ,  $\alpha$  y  $\gamma$  (de las cuales existen varias subclases). Una molécula de Ig ensamblada que consiste en una o más unidades de dos cadenas H y L idénticas toma su nombre de la cadena H que posee. Así, existen cinco isotipos Ig: IgA, IgM, IgD, IgE e IgG (con cuatro subclases basadas en las diferencias en las cadenas H, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4). Pueden encontrarse detalles adicionales relativos a la estructura de los anticuerpos y sus diversas funciones en *Using Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press.

25

En una realización preferente de la invención dicho fragmento es un fragmento de anticuerpo monocatenario.

En la técnica se conocen varios fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, Fab, Fab<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc, Fd, etc. Un fragmento Fab es una proteína multimérica que consiste en las porciones inmunológicamente activas de una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, acopladas de forma covalente entre sí y capaces de unirse específicamente a un antígeno. Los fragmentos Fab son generados mediante escisión proteolítica (por ejemplo, con papaína) de una molécula de inmunoglobulina intacta. El fragmento Fab<sub>2</sub> comprende dos fragmentos Fab unidos. Cuando estos dos fragmentos se unen por la región bisagra de inmunoglobulina, se produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub>. Un fragmento Fv es una proteína multimérica que consiste en las porciones inmunológicamente activas de una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina acopladas de forma covalente entre sí y capaces de unirse específicamente a un antígeno. Un fragmento también podría ser un polipéptido monocatenario que contiene solo una región variable de cadena ligera, o un fragmento de la misma que contiene las tres CDR de la región variable de cadena ligera, sin una región variable de cadena pesada asociada, o un fragmento de la misma que contenga las tres CDR de la región variable de cadena pesada, sin una fracción de cadena ligera asociada; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos, como se ha descrito por ejemplo en la patente de EE. UU. n° 6.248.516. Los fragmentos Fv o fragmentos (dominios) de una sola región son generados normalmente por la expresión en líneas de células hospedadoras de las regiones identificadas relevantes. Estos y otros fragmentos de inmunoglobulinas o anticuerpos están dentro del alcance de la invención y se describen en libros de texto estándar de inmunología como en Paul, *Fundamental Immunology* o en Janeway's *Immunobiology*, Murphy, K., Travers, P. & Walport P.

35

40

45

50

La biología molecular permite actualmente dirigir la síntesis (por medio de la expresión en células o de forma química) de estos fragmentos, así como la síntesis de combinaciones de los mismos. Un fragmento de un anticuerpo o inmunoglobulina puede tener también una función biespecífica tal como se describe anteriormente.

55

En una realización preferente de la invención dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

En una realización preferente alternativa de la invención dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado o humano.

60

Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos recombinantes en los que todas las regiones V de un anticuerpo de ratón o rata se combinan con regiones C de anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos híbridos recombinantes que fusionan las regiones de determinación de complementariedad de una región V de anticuerpo de roedor con las regiones marco de las regiones V de anticuerpos humanos. También se usan las regiones C del anticuerpo humano. Las regiones de determinación de complementariedad (CDR) son las regiones dentro del dominio en el extremo N de la cadena pesada y ligera del anticuerpo en donde está restringida la mayoría de la variación de la región V. Estas regiones forman bucles en la superficie de la molécula del anticuerpo. Estos bucles proporcionan la superficie de unión entre el anticuerpo y el antígeno.

Los anticuerpos de animales no humanos provocan una respuesta inmunitaria ante el anticuerpo extraño y su retirada de la circulación. Tanto los anticuerpos quiméricos como los humanizados tienen antigenicidad reducida cuando se inyectan en un sujeto humano debido a que existe una cantidad reducida de anticuerpo de roedor (es decir, extraño) en el anticuerpo híbrido recombinante, mientras que las regiones de anticuerpo humano no provocan una respuesta inmunitaria. Esto provoca una respuesta inmunitaria más débil y una disminución en el aclaramiento del anticuerpo. Este resultado es claramente deseable cuando se usan anticuerpos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades humanas. Los anticuerpos humanizados están diseñados de manera que tengan menos regiones de anticuerpos "extraños" y por tanto se piensa que son menos inmunogénicos que los anticuerpos quiméricos.

En una realización preferente de la invención dicho anticuerpo o fragmento de unión se une al dominio de unión ligando de OPG.

Cuando se administran los anticuerpos de la presente invención se administran en preparaciones farmacéuticamente aceptables. Dichas preparaciones pueden contener de forma rutinaria concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tampón, conservantes, vehículos compatibles y agentes suplementarios.

Los anticuerpos de la invención pueden administrarse por cualquier vía convencional, que incluye inyección o por infusión gradual con el tiempo. La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavitaria, subcutánea, transdérmica o transepitelial.

Los anticuerpos de la invención se administran en cantidades efectivas. Una "cantidad efectiva" es aquella cantidad de un anticuerpo que, en solitario o junto con dosis adicionales, produce la respuesta deseada. En el caso de tratamiento de la hipertensión pulmonar, la respuesta deseada inhibe la progresión de la enfermedad. Esto puede suponer solo el frenado de la progresión de la enfermedad de forma temporal, aunque más preferentemente, implica la detención de la progresión de la enfermedad permanentemente. Este resultado puede vigilarse mediante procedimientos rutinarios. Dichas cantidades dependerán, naturalmente, de la afección en concreto que se trate, la gravedad de la afección, los parámetros individuales del paciente que incluyen la edad, el estado físico, el tamaño y el peso, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si existiera), la vía específica de administración y factores semejantes dentro del conocimiento y la experiencia del profesional sanitario. Estos factores son bien conocidos para los expertos en la materia y pueden abordarse simplemente con experimentación rutinaria. En general se prefiere usar una dosis máxima de los componentes individuales o combinaciones de los mismos, es decir, la dosis de máxima seguridad de acuerdo con el criterio médico fundado. Los expertos en la materia comprenderán, sin embargo, que un paciente puede insistir en una dosis inferior o una dosis tolerable por motivos médicos, motivos psicológicos o prácticamente cualquier otro motivo.

Los anticuerpos usados en los procedimientos anteriores son preferentemente estériles y contienen una cantidad efectiva de un anticuerpo de acuerdo con la invención para producir la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un paciente.

Las dosis de anticuerpos de acuerdo con la invención administradas a un sujeto pueden elegirse de acuerdo con diferentes parámetros, en particular de acuerdo con el modo de administración usado y el estado del sujeto. Otros factores incluyen el periodo de tratamiento deseado. En el caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, pueden emplearse dosis superiores (o dosis efectivamente superiores por una vía de suministro diferente más localizada) siempre que lo permita la tolerancia del paciente. Los expertos en la materia conocerán otros protocolos para la administración de composiciones, en los que la cantidad de dosis, el calendario de inyecciones, los sitios de inyecciones, el modo de administración y similares varían con respecto a lo anterior. La administración de composiciones a mamíferos distintos de los humanos, (por ejemplo, con fines de prueba o con fines terapéuticos veterinarios), se lleva a cabo sustancialmente en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Un sujeto, tal como se usa en el presente documento, es un mamífero, preferentemente un ser humano, e incluye un

primate no humano, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o roedor.

5 Cuando se administran, las preparaciones de anticuerpo de la invención se aplican en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos. Dichas preparaciones pueden contener de forma rutinaria sales, agentes tampón, conservantes, vehículos compatibles, y opcionalmente otros agentes terapéuticos (por ejemplo, los usados normalmente en el tratamiento de la hipertensión pulmonar). Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero pueden usarse de forma conveniente sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no se excluyen del alcance de la invención. Dichas sales farmacológicamente y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Además, pueden prepararse sales farmacéuticamente aceptables como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

15 Los anticuerpos pueden combinarse, si se desea, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento significa una o más cargas sólidas o líquidas, diluyentes o sustancias encapsuladoras que son adecuados para la administración en un ser humano. El término "vehículo" en este contexto denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación, (por ejemplo, liposoma o inmunoliposoma). Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de mezclarse conjuntamente con los anticuerpos de la presente invención, y entre sí, de una manera tal que no existe una interacción que deterioraría sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

25 Las composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpos de acuerdo con la invención pueden contener agentes tampón adecuados, que incluyen: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; y ácido fosfórico en una sal. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, conservantes adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorobutanol; parabenos y timerosal.

30 Los anticuerpos pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los procedimientos incluyen la etapa de llevar el anticuerpo activo en asociación con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. Las composiciones que contienen anticuerpos de acuerdo con la invención pueden administrarse como aerosoles e inhalarse. Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa o no acuosa estéril de agente, que es preferentemente isotónico con la sangre del receptor. Esta preparación puede formularse de acuerdo con procedimientos conocidos que usan agentes dispersantes o agentes humectantes o agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, en una solución en 1,3-butanodiol. Entre los disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónico. Además, se emplean aceites fijados estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite fijado blando, que incluye monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables pueden usarse ácidos grasos como ácido oleico. La formulación de vehículos adecuada para administraciones oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc. puede encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

45 En una realización preferente de la invención dicha composición incluye una cantidad efectiva de al menos un agente efectivo adicional en el tratamiento de la hipertensión pulmonar.

50 En una realización preferente de la invención dicho agente se selecciona de entre el grupo: bloqueantes de los canales del calcio, diuréticos, antagonistas del receptor de la endotelina, prostaciclina, guanilato-ciclasa soluble e inhibidores de la fosfodiesterasa.

En una realización preferente de la invención la hipertensión pulmonar se selecciona de entre el grupo que consiste en: hipertensión arterial pulmonar y HP asociada con enfermedad pulmonar.

55 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de la presente memoria, las palabras "comprender" y "contener" y las variaciones de estas palabras, por ejemplo "que comprende" y "comprende", significa "que incluye, pero no se limita a", y no pretenden (y no lo hacen) excluir otras fracciones, aditivos, componentes, números enteros o etapas.

60 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de la presente memoria, el singular comprende el plural salvo que

el contexto indique lo contrario. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, en la memoria descriptiva debe entenderse que se contempla tanto la pluralidad como la singularidad, salvo que del contexto se desprenda lo contrario.

- 5 Debe entenderse que las propiedades, números enteros, características, compuestos, fracciones químicas o grupos descritos en conjunción con un aspecto, realización o ejemplo de la invención en particular son aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento salvo que resulte incompatible.

A continuación, se describirá una realización de la invención a modo solo de ejemplo y con referencia a las  
10 siguientes figuras:

Figura 1 A) Se aumenta significativamente el ARNm de OPG en células de músculo liso de la arteria pulmonar (CMLAP) aisladas de pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática (HAPI) en comparación con las aisladas de un pulmón de control; B) la proteína de OPG está elevada significativamente en el suero de pacientes con HAPI  
15 en comparación con controles de edad equivalente; C) la secreción de OPG a partir de CMLAP humanas es estimulada por la adición de serotonina (5-HT); D) la secreción de OPG a partir de CMLAP humanas es estimulada por la inactivación de BMP-R2 por siRNA de BMP-R2 (BMP-R2 si); E) la secreción de OPG a partir de CMLAP humanas es estimulada por la adición de IL-1 beta recombinante; F) la OPG humana recombinante (rOPG) induce la proliferación de CMLAP humanas tal como se muestra por la incorporación de timidina tritiada de una forma dependiente de la dosis; G) la rOPG induce la migración de CMLAP humanas de una forma dependiente de la dosis;  
20 H) los cambios hemodinámicos compatibles con HAP producen una elevación importante en la presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD) en ratas tratadas con monocrotalina (Mct) desde 21 días posteriores a la inyección subcutánea en comparación con ratas de control tratadas con solución salina; I) la remodelación vascular pulmonar que impulsa las alteraciones hemodinámicas en el modelo Mct de rata se hace evidente ya a los 7 días después del inicio de la enfermedad; J) los niveles séricos de OPG están significativamente elevados en el modelo Mct de rata a partir de los 14 días, antes de los aumentos significativos en la PSVD; K) la expresión del gen OPG en lisados pulmonares totales está significativamente elevada a los 21 días después del tratamiento con Mct; L) la expresión de proteína de OPG pulmonar total está significativamente elevada desde los 21 días después de la inyección de monocrotalina (Mct) en comparación con las ratas de control tratadas con solución salina; M) las ratas tratadas con un anticuerpo anti-OPG suministrado por una bomba osmótica subcutánea estuvieron protegidas del desarrollo de HAP en respuesta a la monocrotalina. Por el contrario, las ratas que recibieron IgG desarrollaron PSVD significativamente elevada; N) como M) que muestra el aumento importante en remodelación de arterias/arteriolas pulmonares pequeñas <50 µm (tal como se muestra por media/área en sección transversal (media/AST) en ratas tratadas por IgG en comparación con las tratadas con el anticuerpo anti-OPG; O) como N) que muestra el aumento  
35 importante en la muscularización de la arteria pulmonar de tamaño pequeño o medio (51-100 µm) tal como se expresa por el área medial/área en sección transversal (Media/AST) en las ratas tratadas con IgG en comparación con las tratadas con el anticuerpo anti-OPG; P) los ratones ApoE<sup>-/-</sup> y ApoE<sup>-/-</sup>/IL-1R1<sup>-/-</sup> desarrollan HAP grave en respuesta a la alimentación de la dieta tipo Paigen durante 8 semanas; Q) la expresión del gen OPG en lisados pulmonares totales está significativamente elevada en ratones ApoE<sup>-/-</sup> y ApoE<sup>-/-</sup>/IL-1R1<sup>-/-</sup> alimentados con dieta tipo Paigen con HAP grave en comparación con los compañeros de camada alimentados con pienso; R) la proteína de OPG en lisados pulmonares totales está significativamente elevada en ratones ApoE<sup>-/-</sup> y ApoE<sup>-/-</sup>/IL-1R1<sup>-/-</sup> alimentados con dieta tipo Paigen con HAP grave en comparación con compañeros de camada alimentados con pienso; S) el tratamiento de HAP establecida en el modelo ApoE<sup>-/-</sup> alimentado con Paigen con una bomba osmótica subcutánea que suministra un anticuerpo anti-OPG durante 4 semanas desde la semana 8 del procedimiento produjo una reducción de PSVD hasta niveles casi normales en comparación con los ratones tratados con IgG en los que la enfermedad siguió progresando; T) el tratamiento de HAP establecido en el modelo ApoE<sup>-/-</sup>/IL-1R1<sup>-/-</sup> alimentado con Paigen con una bomba osmótica subcutánea que suministró un anticuerpo anti-OPG durante 4 semanas desde la semana 8 del procedimiento produjo una reducción de PSVD hasta niveles casi normales en comparación con los ratones tratados con IgG, en los que la enfermedad siguió progresando.

50

## **Materiales y procedimientos**

### **ANIMALES**

#### **55 Ratas**

Para los experimentos se usaron ratas Sprague Dawley albinas macho no consanguíneas (Charles River o Harlan, R.U.) (peso de inicio aprox. 200 g). Se usó una única inyección subcutánea de monocrotalina (MCT) (véase más adelante) en el muslo izquierdo para inducir hipertensión arterial pulmonar. Los autores de la invención usaron una  
60 dosis bien establecida de 60 mg/kg que conduce al desarrollo de HAP grave y que es mortal en 5-6 semanas.

Primero se disolvieron totalmente 200 mg de monocrotalina (MCT) (#C2041-500, Sigma Aldrich, RU) en 0,6 ml de ácido clorhídrico 1 M y se agitó en vórtex durante 40 min. Se añadió agua estéril para preparar el volumen a 5 ml y se ajustó el pH a 7,0 con NaOH estéril. Se preparó una solución final a 10 ml con agua estéril.

5

### Ratones

Todos los ratones consanguíneos tenían un sustrato C57BL/6 y mostraban deficiencia en Apolipoproteína-E (ApoE-/-).

10 ApoE-/- (Jax 2052) se obtuvieron de Jackson laboratories (Bar Harbor, ME, EE. UU.). Se usaron ratones macho de edades entre 8-14 semanas para todos los experimentos *in vivo*.

### Dietas y cuidados

15 Los roedores fueron alimentados con pienso de laboratorio estándar (4,3 % de grasas, 0,02 % de colesterol y 0,28 % de sodio, Harlan, RU). Cuando se indicó, se alimentó a los ratones experimentales con una dieta aterogénica rica en grasas (referida en el presente documento como Paigen) que consistió en el 18,5 % de grasas, el 0,9 % de colesterol, el 0,5 % de colato y el 0,259 % de sodio durante 8 o 12 semanas (servicios de dieta especial, RU).

20 Todos los animales tuvieron acceso a agua potable y se alimentaron a voluntad. Se alojaron en laboratorios dedicados con temperatura y humedad controladas y un ciclo diurno-nocturno de 12 h. El cuidado de los animales y la investigación se rigieron por la declaración de política ética de la Universidad y la orientación del Ministerio del Interior del R.U. en la ejecución de la Animal Scientific Procedures Act 1986.

25 AH recibió una licencia personal del Ministerio del Interior del RU (PIL 40/9332) y funcionó con los procedimientos detallados en una licencia de proyecto H.O. concedida por AL (PPL 40/2952).

### Intervenciones

30 Los anticuerpos de isotipos de OPG antirratón de cabra policlonales (anti-OPG) o IgG de cabra de control (R&D systems, RU) se suministraron a los roedores a través de bombas osmóticas implantadas de forma subcutánea (Durect Corp., CA, EE. UU.). Las intervenciones se suministraron por medio de una microbomba Alzet® 1004 (reservorio 100 µl, 0,1 µl/hora durante 4 semanas) en ratones y por medio de una minibomba Alzet® 2002 (reservorio 200 µl, 0,5 µl/h, 85 ng/h durante 2 semanas) en ratas.

35

### Protocolo de implantación de la bomba

Cada bomba se llenó con la intervención apropiada en condiciones estériles en una campana de flujo laminar de clase II y se colocó en solución salina estéril al 0,9 % a 37 °C 24 horas antes de la implantación. Bajo anestesia con gas isoflurano (2-3 %, IsoFlo® 100 % p/p de líquido de vapor de inhalación, Abbot laboratories Ltd, Kent, RU) a través de oxígeno al 100 % (velocidad de flujo 1,5 l/min) se rasuró el pelo, se limpió la piel y se esterilizó antes de realizar una incisión cutánea de 1-1,5 cm sobre la pared torácica posterolateral izquierda, por debajo del margen costal inferior. En condiciones quirúrgicas estériles, se implantaron las bombas prellenadas en una bolsa subcutánea creada con disección roma. Posteriormente se limpió la herida y se cerró usando suturas absorbibles Vicryl 2-0

45 interrumpidas (B-Braun, Sheffield, RU). La implantación para los ratones fue idéntica con la salvedad de que las bombas se cebaron durante 48 horas, se implantaron en posición posterior a la columna cervical (línea de la nuca) y se cerraron las heridas con suturas de seda interrumpidas (Silkam®, B-Braun Sheffield, RU).

### Protocolo experimental

50

### Ratones

Se alimentó a ratones inactivados ApoE-/- (10-16 semanas de edad, n=4-7/grupo) con pienso o con Paigen durante 8 semanas antes de obtener el fenotipo de la enfermedad (véase más adelante).

55

Para determinar la eficacia de la inhibición de OPG en ratones con la enfermedad establecida, se alimentó a los ratones ApoE-/- (8-10 semanas de edad, n=6-7/grupo) con una dieta tipo Paigen durante 8 semanas y a continuación recibieron un anticuerpo anti-OPG (20 ng/h) o control de isotipo con realización del fenotipo en la semana 12.

60

**Ratas**

Durante el transcurso de los experimentos se sometió a las ratas (200-260 g, n=7/grupo/punto temporal) a estudio hemodinámico y se sacrificaron 2, 7, 14, 21 o 28 días después de la inyección con MCT (60 mg/kg) o control de solución salina.

Para investigar si se necesitaba OPG para el desarrollo de la enfermedad (estudio de prevención) se trató a las ratas (200-240 g, n=4/grupo) con un anticuerpo anti-OPG (84 ng/h) o control de isotipo suministrado durante 2 semanas por bombas osmóticas, empezando en el valor basal con inyección de MCT. Se obtuvo el fenotipo de la enfermedad una semana más tarde, es decir: 21 días después de la inyección de MCT.

**Obtención del fenotipo de la enfermedad**

Se sometió a cada roedor a ecocardiografía (cuando se indicó) antes del cateterismo cardiaco y a continuación los roedores fueron sacrificados todavía bajo los efectos de la anestesia. Se extrajo sangre por punción cardiaca para obtención de suero y aislamiento de ARN (cuando se indicó). Se seccionó la aorta abdominal y se perfundieron los pulmones con PBS por medio de una aguja en el ventrículo derecho hasta que los pulmones estuvieron visiblemente blancos. Se extrajeron el corazón y los pulmones en bloque. Se separó rápidamente el pulmón derecho antes de congelarlo inmediatamente en nitrógeno líquido para análisis bioquímicos posteriores. Se fijó por perfusión el pulmón izquierdo, a través de la tráquea con formalina al 10 % (v/v) a una presión de inflado de 20 cm H<sub>2</sub>O y a continuación se colocó con el corazón en formalina al 10 % durante toda la noche a 40 °C. El pulmón izquierdo se usó posteriormente para análisis histológicos e inmunohistoquímicos.

**Ecocardiografía de los roedores**

La ecocardiografía transtorácica se realizó con un sistema de imágenes ecográficas de alta frecuencia preclínicas (Vevo 770®, Visual Sonics, Toronto, Canadá) usando un cabezal de exploración RMV707B (ratón) o RMV710B (rata). Se anestesió a los roedores con isoflurano por medio de oxígeno antes de colocarlos en posición supina en una plataforma calentada y se cubrieron para reducir al mínimo la pérdida de calor. Se suministró isoflurano de mantenimiento (0,5-1,5 %) con oxígeno por medio de un cono nasal y se ajustó para conseguir una frecuencia cardiaca máxima (aprox. 500 lpm para ratones y 350 lpm para ratas) que se registró continuamente con la frecuencia respiratoria y la temperatura rectal. Se depiló el tórax del ratón y se aplicó gel de ecografía precalentado (Aquasonics 100 Gel, Parker Labs Inc. Nueva Jersey, EE. UU.) para posterior adquisición de imágenes.

**35 Protocolo del estudio**

Ventrículo izquierdo: se midieron los parámetros estándar del ventrículo izquierdo en la vista del eje corto en el nivel del músculo medio-papilar. Se realizó el trazado manual de las áreas diastólica y sistólica del VI para deducir el cambio del área fraccional (CAF) como índice de contractilidad primario. Se realizaron medidas en modo M para la pared y las dimensiones de la cavidad del VI (LVIDd), a partir de lo cual se determinó la fracción de eyección (FE%), el acortamiento fraccional (AF%) y la masa del VI corregida mediante análisis automatizado estándar. Se registraron manualmente las velocidades Doppler de tejido de ondas de pulso (TDI) de la cara endocárdica de la pared posterior del ventrículo izquierdo y se representó otro índice de contractilidad independiente. Se dedujo el volumen sistólico a partir de la medida de la Velocidad Tiempo integral (VTi) de flujo y de diámetro a la altura del anillo de la válvula aórtica y se multiplicó por la frecuencia cardiaca para obtener el gasto cardiaco.

Ventrículo derecho y arteria pulmonar: a partir de la vista del eje largo paraesternal derecho, se registraron las medidas de la pared libre del ventrículo derecho con función en Modo M. A partir de la vista del eje corto, se registró el flujo Doppler desde la arteria pulmonar proximal (justo después de la válvula pulmonar). A partir del trazado Doppler espectral se midieron el tiempo desde el inicio del flujo a la velocidad máxima (tiempo de aceleración PA; PAAT), la duración de la eyección (tiempo de eyección PA; PAET) y el trabajo sistólico (PA VTI).

El análisis se realizó fuera de línea usando el software de acompañamiento (Vevo 770, V3.0). Las medidas se tomaron durante la fase relevante del ciclo cardiaco que no coincidía con el artefacto de inspiración. Para reducir al mínimo la variabilidad entre observadores, toda la adquisición de imágenes y los análisis fueron realizados por un único operador experimentado (AGH) en modo ciego con respecto al estado de los sujetos del experimento.

**Cateterismo cardiaco**

Después de la ecocardiografía, se realizó cateterismo de los ventrículos derecho e izquierdo (cuando se indicó)

usando el procedimiento de tórax cerrado a través de la vena yugular externa y la arteria carótida interna derecha. Los datos se adquirieron con catéteres de micromanómetros de alta fidelidad Millar previamente remojados. (Para ratones se usaron catéteres de presión SPR-1000 1Fr/volumen presión PVR-1045 1Fr y en ratas catéteres de presión SPR-320 2Fr/volumen presión SPR-838, Millar instruments, Houston, Texas, EE. UU.). Los catéteres se conectaron a un sistema de adquisición de datos Millar MPVS 300 y PowerLab 8/30 (AD Instruments, Oxfordshire, RU) y se procedió al registro usando software Chart v6 y v7 (AD Instruments). Se registraron los trazados de presión una vez estabilizados los trazados y alcanzado un estado estacionario. Se usó la presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD) para definir la hipertensión pulmonar y es equivalente a la Presión Sistólica de la Arteria Pulmonar (PSAP) en ausencia de una obstrucción entre el ventrículo derecho y la arteria pulmonar. Cuando estuvo indicado se realizó análisis de presión-volumen usando PVAN v2.3.

#### **Protocolo para cirugía de acceso vascular**

Se anestesió a los animales con isoflurano al 3-5 % usando un vaporizador anestésico y cámara de inducción (Harvard Apparatus, RU) a través de oxígeno médico al 100 % (velocidad de flujo 2 l/min). Se siguieron los protocolos quirúrgicos de ratón y rata de acuerdo con un protocolo publicado recientemente (Pacher, Nagayama y cols. 2008).

La primera etapa en la obtención de fenotipo hemodinámica requirió el aislamiento de la vena yugular interna derecha (para cateterismo anterógrado de las cámaras cardiacas derechas) y la arteria carótida interna derecha (para cateterismo retrógrado aórtico y del ventrículo izquierdo) cuando fue necesario y se describe del modo siguiente.

#### **Medida de presiones del corazón derecho**

Se colocó a los animales en una alfombrilla calentada (#TR200 Fine Science Tools Inc). Una vez suprimido el reflejo pedio se realizó una pequeña incisión en el cuello a la derecha de la línea media. Con el uso de un microscopio de disección y una disección roma lateral se identificó la vena yugular externa derecha (VYD). Se usaron pinzas curvas para liberar la vena con disección roma. Se ató fuertemente la VYD distal con sutura de seda no absorbible 5-0 (Silkam®, B-Braun, Sheffield, RU) para interrumpir el retorno venoso al corazón. Proximal al punto de inserción de la vena subclavia derecha se aplicó una sutura de seda suelta a una pinza de mosquito con tracción en la VYD. Así quedó aproximadamente una longitud de 1 cm de vena en la que insertar el catéter. Con visualización microscópica directa se limpió la vena de posibles tejidos grasos para permitir una canulación con éxito de la luz verdadera de la vena. Usando una aguja naranja 25G 5/8" con la punta doblada en 90° y el bisel apuntando hacia debajo se pinchó la vena y se levantó hacia arriba la pared superior de la vena inmediatamente pero con suavidad para permitir la inserción y el avance simultáneos del catéter. Los catéteres habían sido remojados previamente en solución salina durante al menos 30 min.

Se hizo avanzar hacia delante el catéter apropiado y se apretó el lazo proximal para evitar el sangrado retrógrado. La visualización en tiempo real del registro de presiones ayudó a identificar los trazados característicos para las cámaras auricular y ventricular derechas. Una vez que el catéter estuvo estable dentro de cada cámara se tomaron registros para un análisis posterior. Se usó un registro de al menos 10-20 latidos cardiacos para promediar las medidas de presión.

Se registraron específicamente las derivadas máxima y mínima de presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD), ( $dp/dt$  máx y mín). La PSVD sirvió de medida sustituta de la presión de la arteria pulmonar ya que los registros de esta última no fueron posibles con estos catéteres de punta recta. La PSVD es idéntica a la PSAP en ausencia de obstrucciones a la altura de la válvula pulmonar. Una vez retirado el catéter se aseguró con fuerza la VYD proximal.

#### **50 Medida de presiones del corazón izquierdo**

Tras finalizar las medidas de PSVD se identificó la arteria carótida, en profundidad y lateral a la tráquea. Se liberó de forma similar a la vena usando pinzas curvas. Se aplicaron ataduras firmes en los segmentos distal, medio flojo y proximal (sutura de seda 5-0). La última se fijó a una pinza de mosquito y se aplicó tracción. Usando una técnica similar para la vena, se creó una arteriotomía y se hizo avanzar el catéter en la aorta y el ventrículo izquierdo. Una vez que los trazados de presión y volumen fueron estables y limpios, se tomaron los registros. Se registró el trazado de presión aórtica por retirada del catéter desde el VI antes de retirar el catéter. Se usó un registro de al menos 10-20 latidos cardiacos para promediar las medidas de presión.

#### **60 RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO**

**SANGRE**

Se dejó coagular la sangre en el banco de pruebas y posteriormente se centrifuga a 1.200 rpm durante 15 min. Se recogió el suero, se repartió en partes alícuotas, se etiquetó y se congeló a -80 °C hasta análisis posteriores. Se congelaron tubos que contenían sangre entera para ARN (PAXgene®, Qiagen/BD R.U. o Tempus®, Applied Biosystems, RU) a -20 °C hasta su posterior aislamiento de ARN.

**TEJIDO PULMONAR**

10 **Protocolo**

Después de una punción cardiaca se aplicó al roedor sobredosis de anestésicos seguida por dislocación cervical. Se realizó una incisión en la pared abdominal superior para dejar expuesto el hígado. Mientras se aplicaba tracción ascendente en la apófisis xifoides del esternón, se seccionó cuidadosamente el diafragma con tijeras finas. Se resecaron el esternón y la pared torácica. Se identificó la aorta abdominal y se seccionó (para exanguinación). Usando una aguja naranja 25G y una jeringa se identificó el ventrículo derecho y se lavó con PBS hasta que los pulmones adquirieron un tono pálido. Se identificó la tráquea y se liberó entre los bordes claviculares mediales. Mientras se aplicaba una tracción ascendente firme en la tráquea se extrajeron el corazón y los pulmones en bloque desde la pared posterior de la cavidad torácica. Se adoptaron precauciones para evitar una punción inadvertida del pulmón.

Se aseguró firmemente el pulmón derecho en el hilio usando suturas de seda 5-0 y se separó antes de congelación en nitrógeno líquido para posterior aislamiento y determinación de expresión completa de la proteína y el ARN del pulmón.

Se insertaron tubos de polietileno en la tráquea y se aseguró firmemente con una sutura. Se infló suavemente el pulmón izquierdo de forma manual con una jeringa que contenía formalina con tampón de fosfato al 10 % (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2(H<sub>2</sub>O) al 0,4 % p/v, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2(H<sub>2</sub>O) al 0,65 % p/v y formaldehído al 4 % v/v en agua) y a continuación se fijaron el corazón y el pulmón izquierdo en formalina durante 24 horas antes de transferir a PBS. A partir del estudio de prevención en rata se inflaron los pulmones usando una pinza de 20 cm H<sub>2</sub>O configurada para estandarizar el inflado. Se separó el pulmón izquierdo del corazón para histología posterior.

**Pesos del corazón e hipertrofia del ventrículo derecho (HVD)**

La HVD se definió como el peso del VD dividido por el peso del ventrículo izquierdo/tabique (VD/VI+T) tal como describieron en primer lugar Fulton y cols.

**Protocolo**

Usando un par pequeño de tijeras finas se extrajo la grasa, el tejido y los grandes vasos en torno al corazón. Se extirparon las aurículas, se limpiaron de posibles trombos y se pesaron. Se separó el ventrículo derecho del ventrículo izquierdo y el tabique mediante el uso de referencias anatómicas.

A partir del tracto de salida del ventrículo derecho (TSVD) se diseccionó el margen septal del VD para asegurarse de que no quedaban bordes de tejido. Se realizó también una incisión a partir del TSVD adyacente y alrededor del cayado aórtico hacia el anillo de la válvula tricúspide medial para separar la base del VD. Desde el anillo tricúspideo lateral se seccionó la pared libre del VD asegurándose de nuevo de que no quedaran bordes de tejido del VD. La incisión continuó hacia el vértice y retrocedió de nuevo hacia el TSVD. Finalmente se seccionó el ventrículo izquierdo y se eliminaron los posibles coágulos antes de colocar todas las cámaras en almohadillas secas y pesarlas.

**HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA DEL PULMÓN****PROCESAMIENTO E HISTOLOGÍA DE LOS TEJIDOS**

Se dividió el pulmón izquierdo en el plano sagital (ratas) o transversal (ratones). Se procesaron los pulmones deshidratándolos primero en alcoholes graduados (del 50 % al 100 %). A continuación se volvieron a colocar en xileno antes de embeberlos en cera de parafina fundida. Se cortaron secciones embebidas de parafina de 5 µm de grosor y se montaron en portaobjetos para histología, tinción inmunohistoquímica y análisis morfométricos posteriores.

Se desparafinaron todos los portaobjetos inicialmente colocándolos en xileno durante 10 min y a continuación repitiendo durante 2 min. A continuación se rehidrataron los portaobjetos en alcoholes graduados (1 min en cada uno al 100 %, 100 %, 90 %, 70 %, 50 % y finalmente en agua). Después de cualquier tinción como etapa común final, se rehidrataron todos los portaobjetos en orden idéntico pero inverso y se montaron en DPX (ftalato de dibutilo xileno) y se dejó secar durante toda la noche.

#### **Elástica de azul alcíán de Van Gieson (ABEVG)**

10 Los portaobjetos desparafinados y rehidratados se oxidaron en permanganato de potasio al 0,25 % durante 3 min y se enjuagaron en agua destilada antes de blanquearlos con ácido oxálico al 1 % durante 3 min. Después del enjuagado, se tiñeron los portaobjetos con hematoxilina de Carazzi durante 2 min y se diferenciaron en alcohol ácido (HCl al 1 % v/v en IMS al 70 %) durante unos segundos antes de sumergirlos en agua caliente del frigo durante 5 min. A continuación se tiñeron los portaobjetos con azul alcíán (1 % p/v en ácido acético acuoso al 3 %, pH 2,5) durante 5 min. Se enjuagaron de nuevo los portaobjetos con agua y se remojaron rápidamente en IMS al 95 % antes de dejarlos caer por goteo en tinción de elastina de Miller durante 30 min. A continuación se enjuagaron los portaobjetos, se colocaron en IMS al 95 % durante unos segundos y se volvieron a enjuagar con agua. A continuación se tiñeron con reactivo de Van Gieson modificado de Curtis durante 6 min. A continuación se deshidrataron los portaobjetos en orden idéntico pero inverso al de la rehidratación precedente antes de montarlos en DPX.

#### **INMUNOHISTOQUÍMICA**

Se sometieron secciones de pulmón de 5 µm embebidas en parafina a α-SMA de tinción inmunohistoquímica para células de músculo liso vascular, vWF para localizar células endoteliales y PCNA para células proliferantes. Se realizó inmunotinción para OPG con el fin de identificar cualquier expresión en las lesiones vasculares pulmonares. Se determinaron los niveles de apoptosis con un ensayo colorimétrico para detectar la fragmentación de ADN (FRAGEL®, Calbiochem, RU) tal como se especifica en las instrucciones del fabricante. Se generó un control positivo con tratamiento con ADNasa de un portaobjetos de control.

30

#### **Protocolo**

Después de desparafinado y rehidratación del portaobjetos, se bloquearon las peroxididas tisulares endógenas incubando los portaobjetos en peróxido de hidrógeno al 3 % (v/v) durante 10 min antes de enjuagar con agua del grifo. Se realizó la recuperación del antígeno (permeabilización del portaobjetos) incubando el portaobjetos en uno de los siguientes:

a) tampón de citrato, pH 6,0 precalentado a 95 °C durante 20 min antes de enfriar durante 20 min a t.a. A continuación se permeabilizó el tejido por incubación en Triton X100 al 0,5 % (v/v) durante 10 min a t.a. (IHC para OPG)

b) tripsina/TBS al 0,1 % (p/v), pH 7,8, precalentado a 37 °C durante 10 minutos antes de detener la reacción sumergiendo en agua (IHC para vWF)

c) para la tinción con SMA no se llevó a cabo la etapa de recuperación del antígeno

45 A continuación se bloquearon los portaobjetos (para prevenir la unión no específica de anticuerpo secundario) en leche desnatada/PBS al 1 % (p/v) durante 30 min a t.a. Se separó la leche y se eliminó el exceso. Se añadió el anticuerpo primario de interés diluido en PBS y se incubó del modo siguiente:

a) αSMA anti-humano de ratón monoclonal 1:150, (#m081, Dako) durante 1 hora a t.a.

50 b) vWF anti-humano de conejo policlonal 1:300 (#A0082, Dako) durante 1 hora a t.a.

c) OPG anti-humana de conejo policlonal 1:100 (#ab73400, Abcam) durante toda la noche a 4 °C

Se lavaron los portaobjetos en PBS tres veces durante 5 min antes de añadir un anticuerpo secundario biotinilado específico de la especie (dilución 1:200 en PBS) durante 30 minutos a t.a. Se lavaron de nuevo los portaobjetos en PBS tres veces durante 5 min y se añadió un complejo enzimático biotinilado de avidina (Vectastain ABC Kit, Vector laboratories Inc. CA, EE. UU.). Después de una etapa de lavado adicional con PBS, se añadió sustrato de diaminobencidina (DAB) durante 5-10 min. Después del desarrollo óptimo se detuvo la reacción de color lavando los portaobjetos en agua del grifo. A continuación se aplicó contratinción a los portaobjetos con hematoxilina de Carazzi durante 1 minuto antes de un lavado final en agua. Se deshidrataron los portaobjetos según se ha descrito y se montaron con DPX. Se dejó secar los portaobjetos durante toda la noche antes de examinarlos con microscopio

60

óptico.

### **Análisis de imagen y pulmón morfométricos**

- 5 El grado de remodelación vascular pulmonar se cuantificó en las arteriolas por dos procedimientos y se clasificó de acuerdo con el tamaño del vaso (20-50  $\mu\text{m}$ , 50-100  $\mu\text{m}$  y  $>100 \mu\text{m}$ ) (Schermy, Dony y cols. 2005). Los vasos se valoraron en modo ciego en cuanto al estado experimental de los roedores.

### **Proporción área medial/en sección transversal (Media/AST) ratio**

10

El área medial/AST representó la proporción del área del vaso total adquirida por muscularización de la capa medial, determinado a partir de los portaobjetos teñidos con  $\alpha$ -SMA. Se analizaron seis vasos de cada grupo de tamaño en un objetivo de 40X (18 vasos/sección y 1 sección/roedor). El área en sección transversal fue el área total definida por la circunferencia exterior del vaso con la media definida como el área entre la lámina elástica interna y externa del vaso.

15

### **Porcentaje de vasos engrosados**

- 20 Se determinó el porcentaje de vasos engrosados usando portaobjetos teñidos con ABEVG. Para cada portaobjetos se tomaron muestras de 3-4 campos de visión aleatorios usando un objetivo de 10x (aumento 100x). Se contó el número de vasos que se ocluyeron totalmente, se ocluyeron parcialmente y no experimentaron engrosamiento por grupo de tamaño y se expresó como un porcentaje del número total de vasos en cada vista.

### **Cuantificación de proliferación vascular y niveles de apoptosis**

25

Para determinar los niveles de proliferación en los vasos remodelados, se contó el número de núcleos teñidos positivos para PCNA y se expresó como un porcentaje de los núcleos totales dentro del vaso. Cuando fue relevante, se contaron también los núcleos en el área adventicia o perivascular cuando estaban en extensión directa desde el vaso de interés. Se valoraron seis vasos de cada tamaño de cada sección (una sección/animal) en un objetivo de 40X.

30

De una manera idéntica se cuantificó el porcentaje de núcleos positivos para apoptosis (determinado a partir de un ensayo colorimétrico para los niveles de fragmentación de ADN) para seis vasos de cada tamaño por sección de pulmón (una sección/animal)

35

Se visualizaron los portaobjetos con un microscopio óptico (Nikon eclipse E600) conectado con una cámara digital (Nikon digital site DSR1) y el software NIS basic elements (Nikon Inc.)

### **Estudio de la expresión de ARN y proteína de los tejidos pulmonares de los roedores**

40

#### **Aislamiento y purificación de proteína y ARN del tejido pulmonar**

- 45 Los segmentos de pulmón congelados en nitrógeno líquido se pulverizaron usando un mortero que contenía nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se pesaron. Se tomaron precauciones para minimizar la contaminación por ARNasa. Se aislaron proteína total y ARN usando un kit comercial de purificación de ARN/proteínas (#23000, Norgen Biotek, Ontario, Canadá) de acuerdo con el protocolo suministrado por el fabricante. El kit de purificación empleó una técnica de cromatografía en columna de centrifugado y permitió la elución de proteínas y ARN a partir de la misma muestra en 30 minutos.

50 **Nota: KITS QIAGEN para intervenciones MURINAS/EN RATAS**

#### **Protocolo.**

- 55 Brevemente se añadió solución de lisis al tejido pulmonar y a continuación se añadió etanol. Esto se cargó en una columna de centrifugado. Después de centrifugado a 14.000 rpm, todos los ácidos nucleicos en la solución se unieron mediante una resina mientras se retiraban las proteínas en el flujo transversal. Se lavó el ARN ligado, se volvió a centrifugar y a continuación se eluyó el ARN purificado. Se determinó la concentración de ARN en la elución usando un espectrofotómetro (NanaDrop®, Thermo Scientific) y se congeló a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

60 Después del ajuste de pH se recargó el flujo de proteínas transversal en la columna de centrifugado original, se

centrifugó, se lavó y se eluyó.

Finalmente se determinaron las concentraciones de proteínas usando un ensayo comercial (ensayo de proteínas DCTM #500-0116, BioRAD Life Sciences, RU) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante.

- 5 Brevemente se trata de un ensayo colorimétrico que usa una reacción entre la proteína y una solución de tartrato de cobre alcalina. A continuación se realiza una etapa de reducción usando reactivo de Folin. Se leyó la absorbancia a 750 nm. Se determinó la cantidad de proteína a partir de los datos de absorbancia generados de una curva estándar de proteínas (Albumin, BSA #23209, Pierce, Thermo Scientific Fisher, RU.) Las muestras de proteínas se almacenaron a -80 °C.

10

### **Inmunotransferencia Western**

#### **Protocolo**

- 15 Se separaron las proteínas por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida usando un kit de electroforesis comercial (NuPAGE® Kit, Invitrogen). Todos los tampones y reactivos formaban parte del intervalo NuPAGE a menos que se indique lo contrario. Se calentó un volumen que contenía 35 µg de proteína purificada a partir de los pulmones de ratas desde el experimento de curso temporal, el tampón de muestra y un agente reductor preparado hasta un volumen final de 30 µl (en agua desionizada) a 70 °C durante 10 min. A continuación se cargaron las muestras y una
- 20 escala de marcadores teñidos previamente en geles de SDS-poliacrilamida premoldeados de 10 pocillos (geles NuPAGE® al 4-12 % Bis-Tris Mini, Invitrogen). Además se cargó también una muestra de tejido pulmonar experimental mixto en cada gel como un control adicional para permitir un análisis cuantitativo posterior.

- Inmediatamente antes de colocar los geles cargados en una célula de electroforesis (XCell SureLock® Mini cell, Invitrogen) que ya contenía tampón corriente de SDS, se añadieron 500 µl de antioxidante. Se hizo funcionar el gel a 200 V durante 35 min.

- Se transfirieron los geles en una membrana de nitrocelulosa (la membrana y los papeles de inmunotransferencia habían sido remojados previamente en el tampón de transferencia y se eliminaron las burbujas de aire) en tampón
- 30 de transferencia (que contiene antioxidante y metanol al 10 % v/v) y se mantuvo en funcionamiento a 30 V durante 60 min. Se usó tinción S de Ponceau para confirmar una transferencia adecuada.

- A continuación se bloquearon las membranas durante 1 h en 10 ml de PBS con leche al 5 % (p/v) y Tween-20 al 0,1 % (v/v) en una plataforma de agitación. Se enjuagaron los blots en PBS/Tween-20 al 0,1 % tres veces antes de
- 35 añadir el anticuerpo primario de interés en leche al 5 %/PBS/ Tween-20 al 0,1 % en una plataforma de agitación durante toda la noche a 4 °C. (TRAIL antihumano de ratón 1:50, Novo Castro Laboratories, Co Durham, RU y actina beta antirratón 1:2.000, #c56 Santa Cruz, CA, EE. UU.).

- Se enjuagaron los blots tres veces durante 10 min antes de añadir un anticuerpo secundario marcado con
- 40 peroxidasa específico de la especie diluido en PBS (inmunoglobulina antirratón de cabra policlonal/HRP 1:2.000, #p0447, Dako, Ely, RU). Después de una etapa adicional de enjuagado tal como se ha descrito se realizó quimioluminiscencia mejorada añadiendo 1 ml de un ensayo comercial en los blots durante 5 min en la oscuridad (#34075 West Dura Super Signal, Thermo scientific Fisher). Se revelaron los blots en una sala oscura usando película de autorradiografía (#28906836, HiperFilmTM GE Amersham, RU) y soluciones de revelador/fijador.

45

Se limpiaron los blots (#2502, Reblot Plus Mild Chemicon Solution, Millipore) y se volvieron a usar como sonda para actina tal como se describe anteriormente.

- Se secaron los blots revelados y se marcaron en la escala. Se determinó la cantidad de TRAIL en las bandas
- 50 normalizando para muestras de actina y control usando la función de densitometría en software comercial (Syngene SNAP software, Chemigenius2 bioimaging system, SynGene).

### **Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa**

- 55 **Transcripción inversa de ARN para síntesis de primera cadena**

(nota; PARA pulmones de CURSO TEMPORAL DE MCT, la dieta murina y la sangre PAXGENE usaron reactivos de Invitrogen)

- 60 Esta etapa se realizó usando componentes proporcionados en un sistema de síntesis de primera cadena

SuperScript™ III (#18080-051 y #18080-044, Invitrogen™ Life technologies, RU). Se preparó un volumen que contenía 3 µg de ARN total aislado de los pulmones (y sangre entera usando tubos PAX-gene) de roedores experimentales hasta 10 µl usando agua de calidad molecular. A esto se le añadió 1 µl de cebadores de hexámeros aleatorios (50 ng) y 1 µl de dNTP 10 mM y se calentó a 65 °C durante 5 minutos como etapa de desnaturalización.

- 5 Se pusieron las muestras en hielo hasta que se añadieron a esta solución 10 µl de una mezcla de síntesis de ADNc [que contenía tampón 10x RT (2 µl), MgCl<sub>2</sub> 25 mM (4 µl), DTT 0,1 M (2 µl), RNaseOUT™ (1 µl) y transcriptasa inversa SuperScript™ III (1 µl)] y se mezcló. Se calentaron las muestras en un ciclador térmico (G Storm GS1, GRI Ltd, Essex, RU) con parámetros establecidos del modo siguiente i) 25 °C durante 10 min (etapa de hibridación), ii) 50 °C durante 50 min (síntesis de ADNc) y finalmente iii) 85 °C durante 5 min antes de mantener a 4 °C (para  
10 terminar la reacción). Se añadió 1 µl de ARNasaH a cada tubo antes de una etapa de incubación final a 370 °C durante 20 min.

- Alternativamente (para todas las intervenciones en ratones y ratas) se sometieron a transcripción inversa 2 µg de ARN usando un kit comercial de alta capacidad de ARN a ADNc (Applied Biosystems). Brevemente se añadió ARN a  
15 tubos de PCR que contenían 10 µl de 2x tampón RT y 1 µl de una mezcla enzimática RT. Se calentaron las muestras en un ciclador térmico (G Storm GS1, GRI Ltd, Essex, RU) con parámetros establecidos del modo siguiente i) 37 °C durante 60 min ii) 95 °C durante 5 min y a continuación se mantuvo a 4 °C para terminar la reacción.

## 20 PCR cuantitativa en tiempo real necesaria para obtener números para ratón

- A continuación se llevó a cabo la amplificación del ADNc de pulmón objetivo obtenido de la etapa RT anterior. Se diluyó un volumen que contenía 50 ng de cada ADNc hasta un volumen de 4,5 µl usando agua estéril. Se añadieron  
25 5 µl de una mezcla principal de expresión génica TaqMan® 2X (#4369016, Applied Biosystems™ Life Technologies, RU) junto con 0,5 µl de los cebadores de genes objetivo relevantes (10X) al ADNc en el pocillo relevante de una placa de 384 pocillos. Se sometieron a ensayo los genes objetivo enumerados en la tabla 1 (todos de Applied Biosystems™) 18s y se seleccionó ATP5B como genes de control endógenos que habían sido determinados en una prueba anterior (ensayo GeNORM). Se cargaron muestras (en duplicado) para cada gen en la misma placa. Se centrifugó la placa a 1.000 rpm durante 1 min y se realizó la reacción en un sistema de PCR en  
30 tiempo real rápido 7900HT (Applied Biosystems™) con los siguientes ajustes: se cuantificó la expresión relativa para cada gen comparando el gen de prueba con el gen de control de mantenimiento y comparando esta proporción entre un sujeto experimental y de control (delta, procedimiento CT delta) para cada gen usando el software SDS (v2.2.1, Applied Biosystems™).

Gen	Cebadores en ratas	Cebadores en ratones
ATP5B	Rn01756316	Mm00443967-g1
18s	Hs03003631-m1	Hs03003631-m1
TRAIL	Rn00595556-m1	Mm00437174-m1
OPG	Rn00563499-m1	Mm00435452-m1
BMPR2	Rn01437210-m1	Mm03023976-m1
CCL5	Rn00579590-m1	Mm1302428-m1
IL1R1	Rn00565482-m1	Mm00434237-m1
IL1R2	Rn00588589_m1	Mm00439622-m1

35

### Análisis estadístico

- Los datos se representaron gráficamente y se analizaron usando el software Prism® v5.0 (Graphpad, EE. UU.). Los datos se expresan como la Media [error estándar] salvo que se indique lo contrario. Se compararon dos grupos con  
40 la prueba t de Student no emparejada y tres o más grupos por ANOVA con prueba de comparación posterior de Bonferroni (cuando se indicó). La significación estadística se definió por un valor p de ≤0,05.

### Ejemplo 1

- 45 *La expresión de OPG se incrementa en HAP:*

- Usando ARNm aislado a partir de células de músculo liso de la arteria pulmonar (CMLAP) explantados y cultivados *in vitro* a partir de pulmones trasplantados de pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática, los autores de la invención han demostrado que la expresión del gen OPG (figura 1A) y los niveles séricos de proteína (figura 1B)  
50 aumentan en comparación con los aislados a partir de muestras de control.

**Ejemplo 2**

*Las vías múltiples asociadas con la patogénesis de HAP aumentan la secreción de OPG desde las CMLAP:*

- 5 La adición de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) (Sigma) (A), la inactivación de receptor de proteína morfogenética ósea tipo 2 (BMP-R2 siRNA, Dharmacon) (B) o la adición de interleucina-1 beta (IL-1b, R&D Systems) (C) en CMLAP humanas producen un aumento importante en la secreción de OPG.

**Ejemplo 3**

10

*La OPG induce la proliferación y la migración de CMLAP:*

La adición de OPG humana recombinante (R&D Systems) a CMLAP humana produce aumentos dependientes de la dosis en la proliferación (figura 1F) y la migración (figura 1G).

15

**Ejemplo 4**

*La expresión de OPG aumenta con la progresión de la enfermedad en el modelo de HAP de monocrotalina en ratas:*

- 20 En 7 ratas por grupo, por punto temporal se inyectaron 60 mg/ml de monocrotalina o solución salina como control. Las ratas se sometieron a cateterismo cardíaco antes de ser sacrificadas y a recogida de tejido cardíaco y pulmonar a los 2, 7, 14, 21 y 28 días después del inicio de la enfermedad. En cuanto a los datos publicados previamente se observaron aumentos hemodinámicos compatibles con el proceso de enfermedad desde el día 14 con aumentos importantes observados en los días 21 y 28 (figura 1H y Figura 1I). La técnica ELISA realizada en suero de rata  
 25 reveló que se detectaron elevaciones importantes en OPG ya desde el día 7 y antes de las alteraciones hemodinámicas en las ratas tratadas con Mct (figura 1J). El análisis de PCR TaqMan de ARN pulmonar entero reveló un aumento importante en la expresión del gen OPG desde el día 21 en las ratas tratadas con Mct (figura 1K). El análisis Western de la proteína pulmonar completa aislada de las ratas se sondeó con un anticuerpo anti-OPG. Los blots se analizaron semicuantitativamente en cuanto a expresión de OPG, normalizados a beta-actina. Se  
 30 detectaron aumentos importantes en la proteína OPG desde el día 21 en las ratas tratadas con monocrotalina en comparación con los controles de solución salina (figura 1L).

**Ejemplo 5**

- 35 *El tratamiento con anticuerpo anti-OPG previene el desarrollo de HAP en el modelo de rata de monocrotalina:*

En 4 ratas por grupo se implantó una minibomba osmótica para suministrar un anticuerpo anti-OPG o IgG como control, al mismo tiempo que recibieron una dosis de 60 mg/kg de monocrotalina. Después de 21 días las ratas se sometieron a cateterismo cardíaco antes de ser sacrificadas y se recogió el tejido cardíaco y pulmonar como antes.

- 40 Las ratas que recibieron el anticuerpo anti-OPG mostraron una reducción importante en PSVD en comparación con las ratas que recibieron IgG (figura 1M). La reducción en PSVD se asoció también con una reducción importante en la remodelación vascular pulmonar (media/AST) de las pequeñas arterias/arteriolas pulmonares (<50 µm, figura 1N) y las arterias pulmonares de tamaño pequeño o medio (51-100 µm, figura 1O).

**Ejemplo 6**

*La expresión de OPG aumenta en el modelo de ratón ApoE<sup>-/-</sup> alimentado con dieta tipo Paigen:*

- Los ratones ApoE<sup>-/-</sup> o ApoE<sup>-/-</sup>/IL-1R1<sup>-/-</sup> alimentados con la dieta tipo Paigen durante 8 semanas desarrollaron  
 50 aumentos importantes en PSVD (figura 1P). El análisis PCR TaqMan de ARN pulmonar entero reveló un aumento importante en la expresión del gen OPG en los ratones alimentados con Paigen (figura 1Q). El análisis Western de la proteína pulmonar entera aislada de los ratones se sondeó con un anticuerpo anti-OPG. Los blots se analizaron semicuantitativamente en cuanto a expresión de OPG, normalizada a beta-actina. Se detectaron aumentos  
 55 importantes en la proteína de OPG en los ratones alimentados con Paigen (figura 1R).

**Ejemplo 7**

*El tratamiento de HAP establecida con un anticuerpo anti-OG induce la reversión de la enfermedad:*

- 60 En los ratones ApoE<sup>-/-</sup> (figura S) o ApoE<sup>-/-</sup>/IL-1R1<sup>-/-</sup> (figura T) después de 8 semanas de alimentarse con la dieta tipo

Paigen se implantaron bombas osmóticas que suministraron anticuerpo anti-OPG de IgG durante 4 semanas. Los ratones que recibieron el anticuerpo anti-OPG mostraron una reducción importante en PSVD en comparación con los ratones tratados con IgG, hasta niveles casi normales.

5 Listado de secuencias

- <110> Universidad de Sheffield
- <120> Hipertensión pulmonar
- <130> 4243P/GB
- 10 <150>GB1118840.6
- <151> 2011-11-01
- <150>US61556112
- <151> 2011-11-04
- <160> 2
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 401
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 20 <400> 1

```

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile
 1          5          10          15

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
          20          25          30

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr
          35          40          45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro
 50          55          60

Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
 65          70          75          80

Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu
          85          90          95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr
          100          105          110

Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe
          115          120          125

Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
          130          135          140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
 145          150          155          160
    
```

ES 2 671 731 T3

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys  
 165 170 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr  
 180 185 190

Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg  
 195 200 205

Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val  
 210 215 220

Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile  
 225 230 235 240

Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu  
 245 250 255

Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln  
 260 265 270

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala  
 275 280 285

Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly  
 290 295 300

Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys  
 305 310 315 320

Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn  
 325 330 335

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser  
 340 345 350

Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr  
 355 360 365

Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu  
 370 375 380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys  
 385 390 395 400

Leu

<210> 2

<211> 1206

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

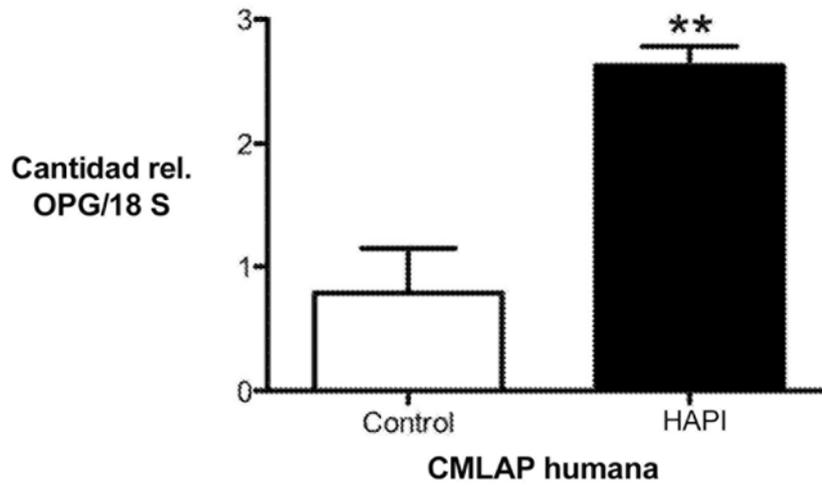
ES 2 671 731 T3

<400> 2  
atgaacaact tgetgtgctg cgcgctcgtg tttctggaca tctccattaa gtggaccacc 60  
caggaaacgt ttctccaaa gtaccttcat tatgacgaag aaacctctca tcagctgttg 120  
tgtgacaaat gtcctcctgg tacctacctt aaacaacact gtacagcaaa gtggaagacc 180  
gtgtgcgccc cttgccctga cactactac acagacagct ggcacaccag tgacgagtgt 240  
ctatactgca gccctcctgg caaggagctg cagtacgtca agcaggagtg caatcgcacc 300  
cacaaccgcg tgtgcgaatg caaggaaggc cgctaccttg agatagagtt ctgcttgaaa 360  
cataggagct gccctcctgg atttggagtg gtgcaagctg gaaccccaaga gcgaaatata 420  
gtttgcaaaa gatgtccaga tgggttcttc tcaaatgaga cgtcatctaa agcacctctg 480  
agaaaacaca caaattgcag tgtctttggt ctctcgtctaa ctcaaaaagg aatgcaaca 540  
cacgacaaca tatgttccgg aaacagttaa tcaactcaaa aatgtggaat agatgttacc 600  
ctgtgtgagg aggcattctt caggtttctt gttcctacaa agtttacgcc taactggctt 660  
agtgtcttgg tagacaattt gcctggcacc aaagtaaacc cagagagtgt agagaggata 720  
aaacggcaac acagctcaca agaacagact ttccagctgc tgaagttatg gaaacatcaa 780  
aacaagacc aagatatagt caagaagatc atccaagata ttgacctctg tgaaaacagc 840  
gtgcagcggc acattggaca tgctaacctc accttcgagc agcttcgtag cttgatggaa 900  
agcttaccgg gaaagaaagt gggagcagaa gacattgaaa aaacaataaa ggcatgcaaa 960  
cccagtgacc agatcctgaa gctgctcagt ttgtggcgaa taaaaaatgg cgaccaagac 1020  
accttgaagg gcctaattgca cgcactaaag cactcaaaga cgtaccactt tcccaaaact 1080  
gtcactcaga gtctaaagaa gaccatcagg ttcttcaca gcttcacaat gtacaaattg 1140  
tatcagaagt tattttttaga aatgataggt aaccaggctc aatcagtaaa aataagctgc 1200  
ttataa 1206

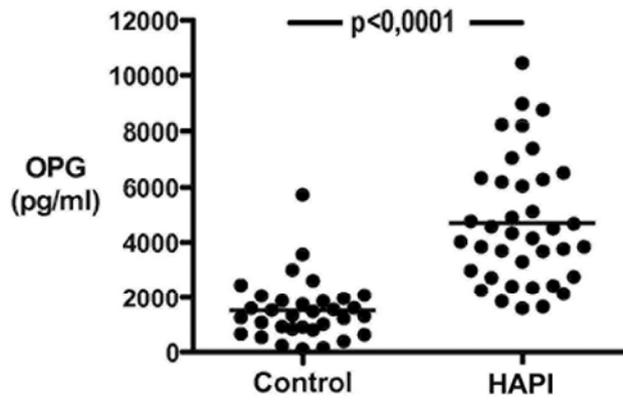
**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo antagonista, o fragmento de unión a antígeno activo del mismo, que se une a e inhibe la actividad de una proteína codificada por el gen de la osteoprotegerina (OPG) para el uso en el tratamiento y la reversión de los síntomas patológicos de hipertensión pulmonar.
2. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno activo se une a e inhibe la actividad de un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1.
3. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 2 donde dicho anticuerpo compite con un anticuerpo que se une a la secuencia de aminoácidos tal como se representa en la SEQ ID NO: 1.
4. El anticuerpo para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
5. El anticuerpo para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
6. El anticuerpo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde dicho fragmento de unión se selecciona de entre el grupo que consiste en: Fab, Fab<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc, Fd, fragmento de anticuerpo monocatenario.
7. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
8. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado o humano.
9. El anticuerpo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende una cantidad efectiva de al menos un agente efectivo adicional en el tratamiento de la hipertensión pulmonar.
10. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 9 donde dicho agente se selecciona de entre el grupo: bloqueantes de los canales de calcio, diuréticos, antagonistas del receptor de la endotelina, prostaciclina, guanilato-ciclasa soluble e inhibidores de la fosfodiesterasa.
11. El anticuerpo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde la hipertensión pulmonar es hipertensión arterial pulmonar o hipertensión pulmonar asociada con enfermedad pulmonar.

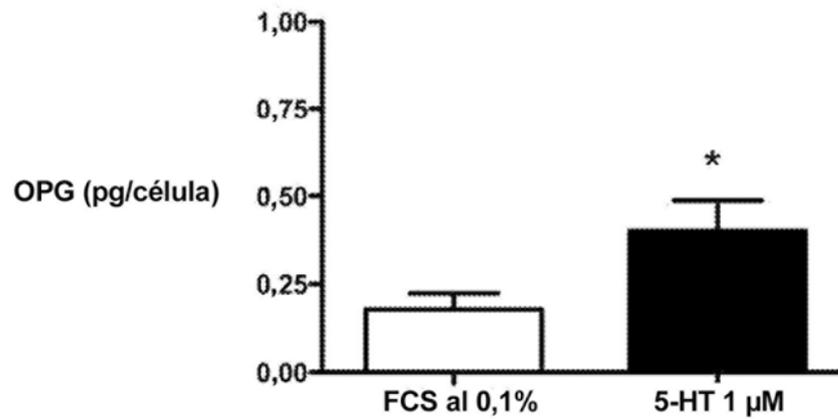
A



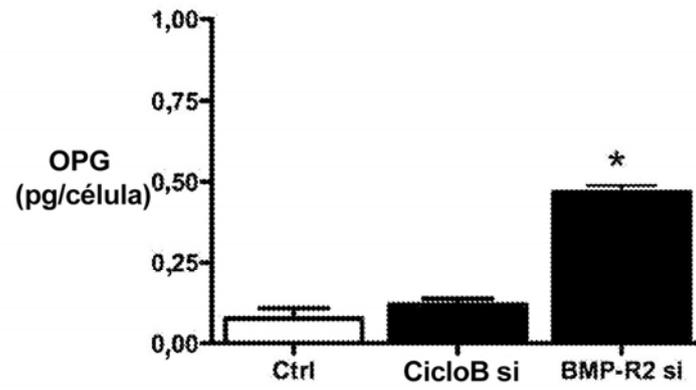
B



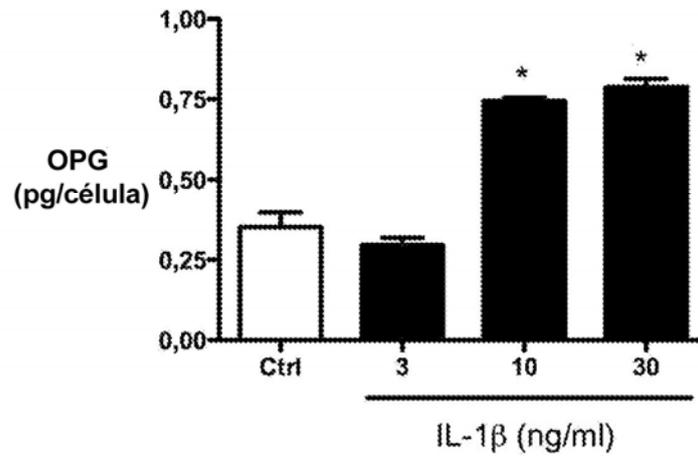
C



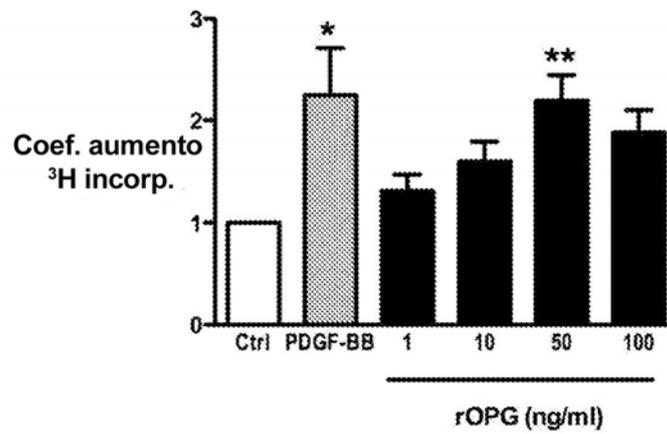
D



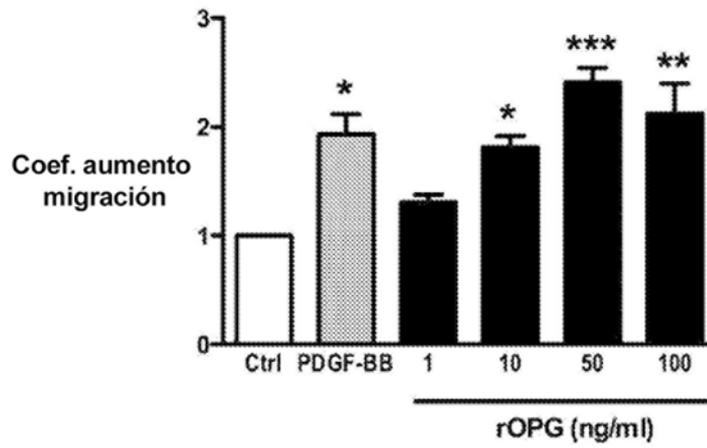
E



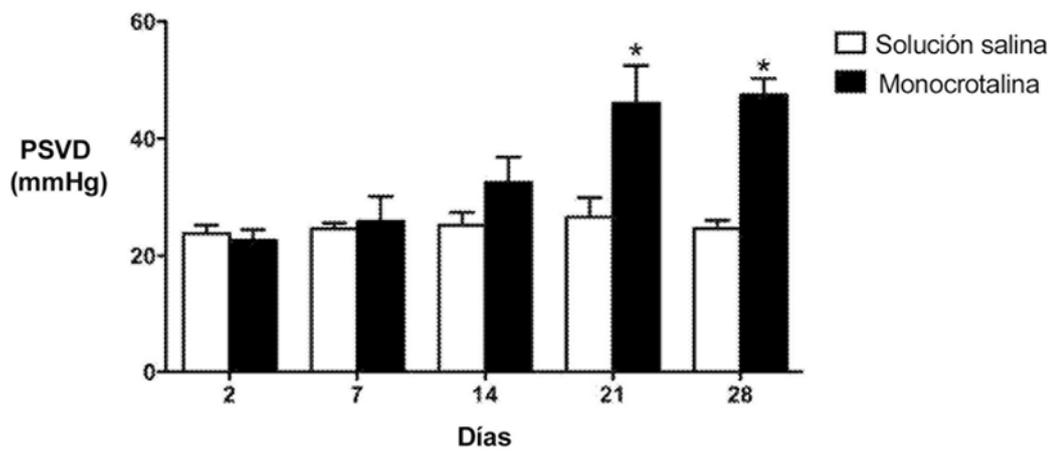
F



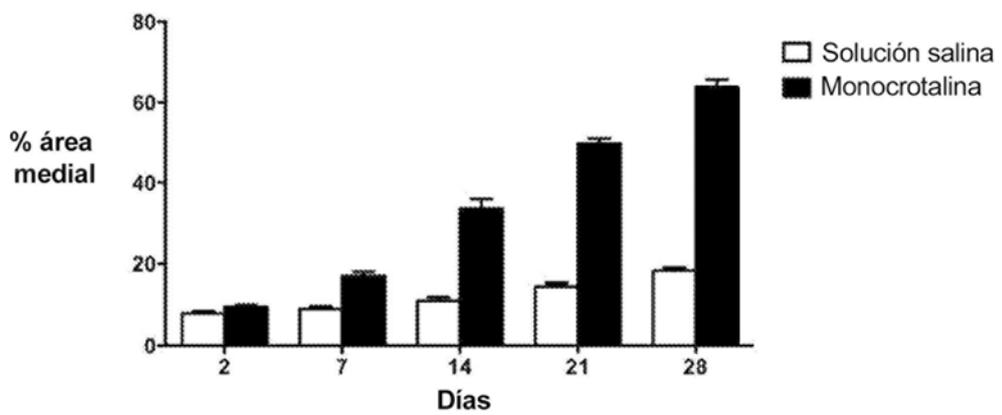
G



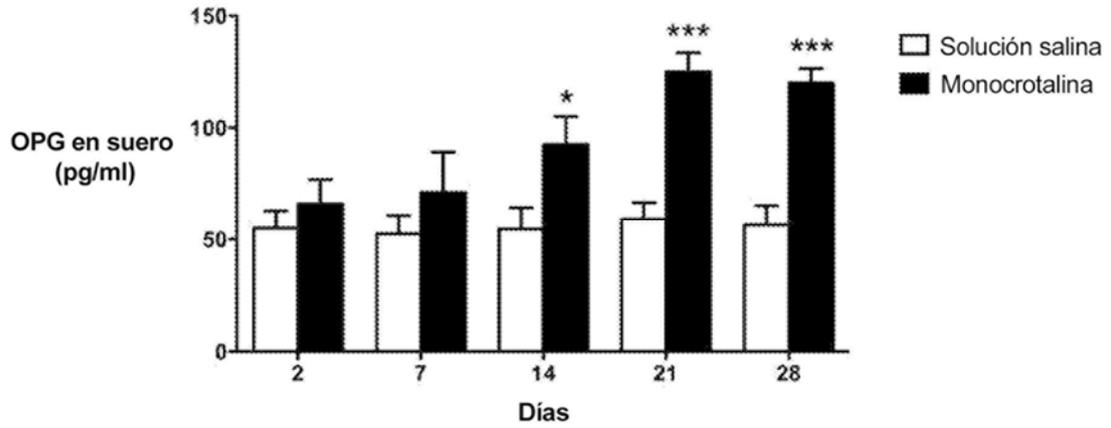
H



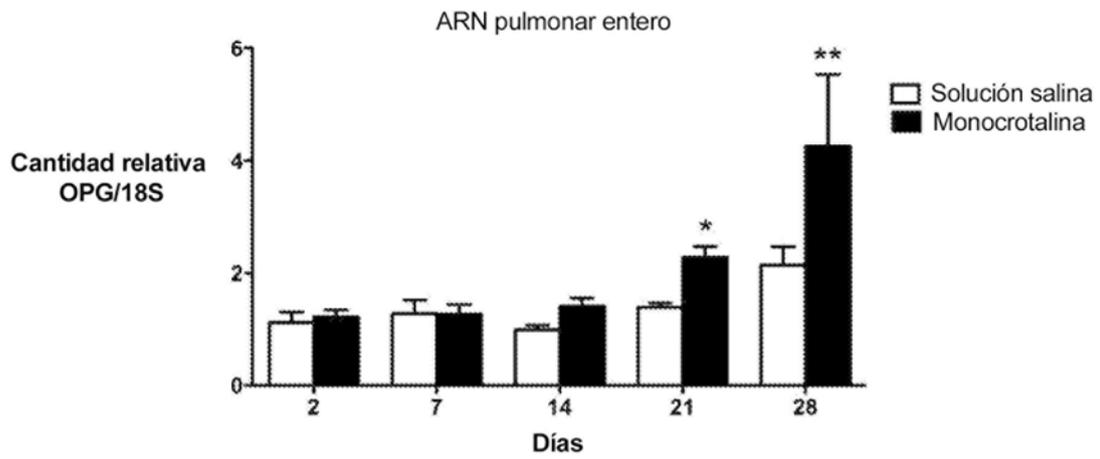
I



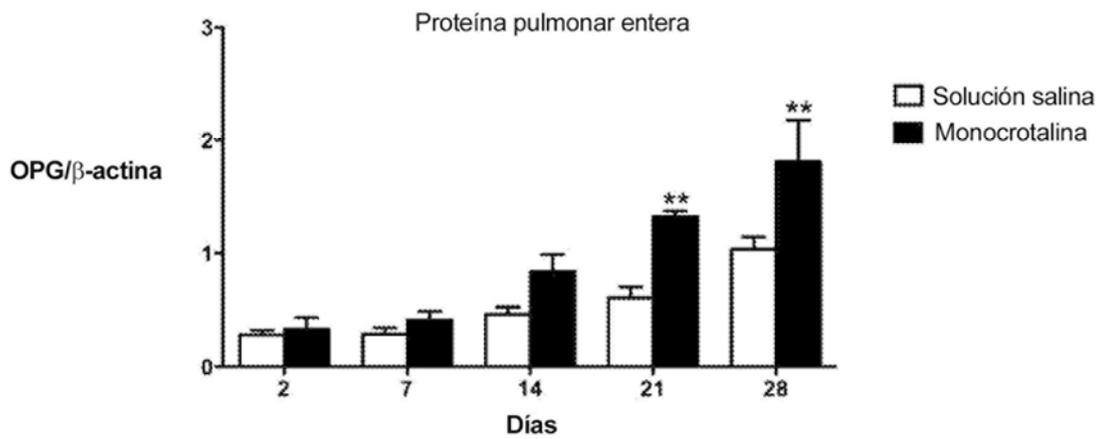
J



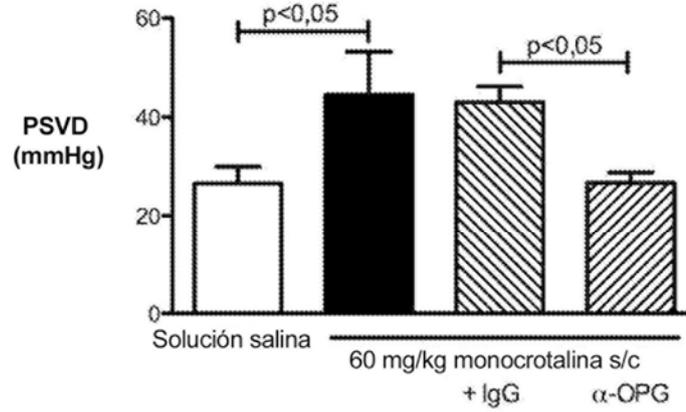
K



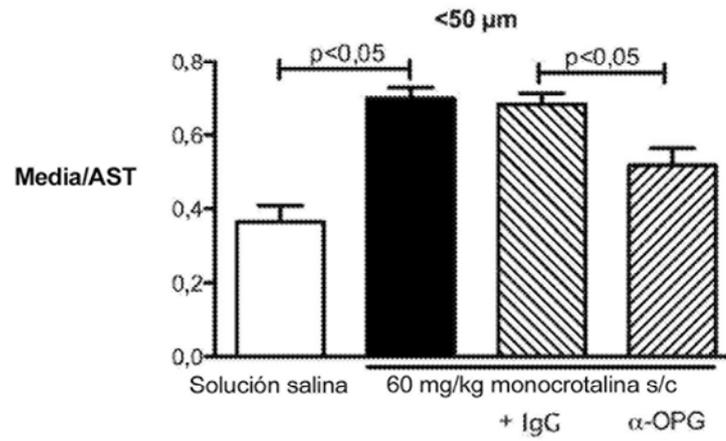
L



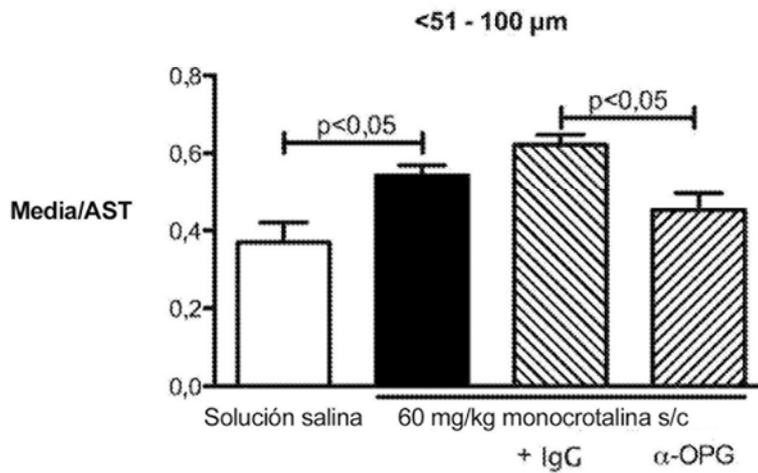
M



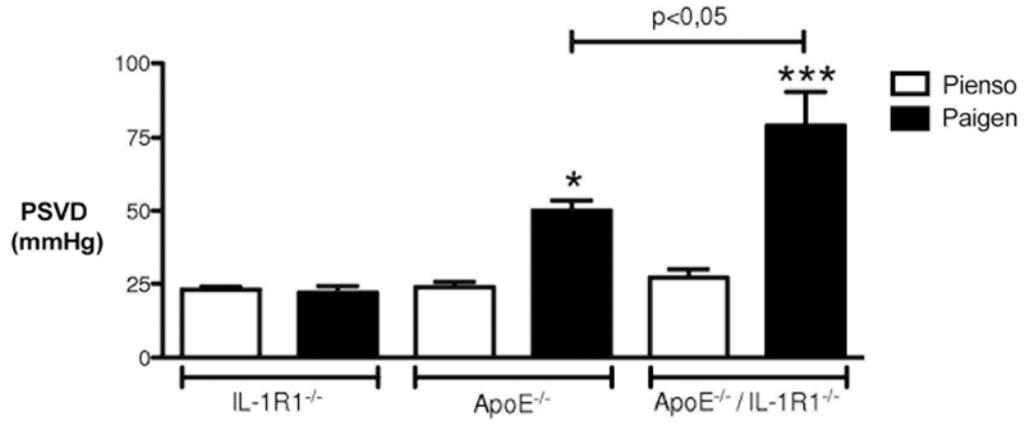
N



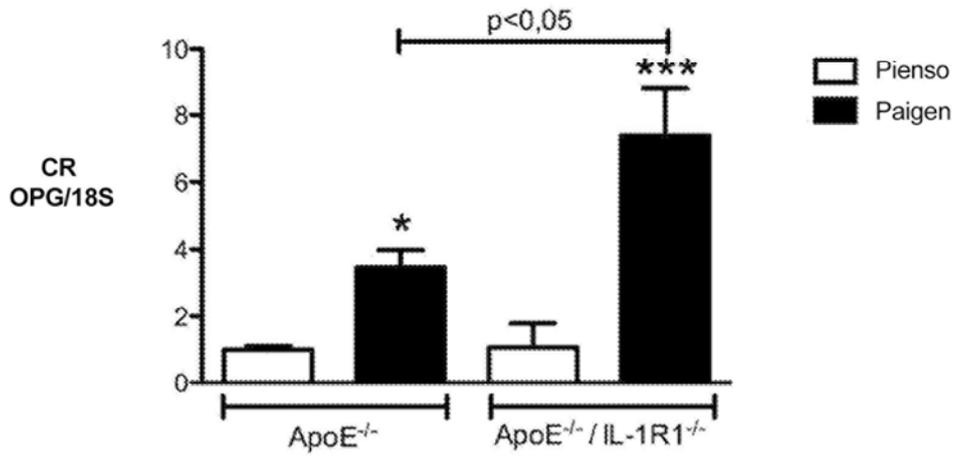
O



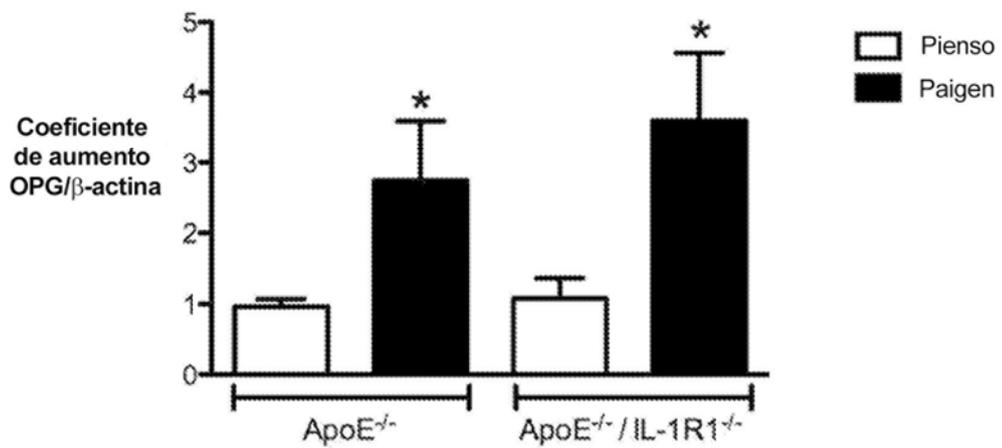
P



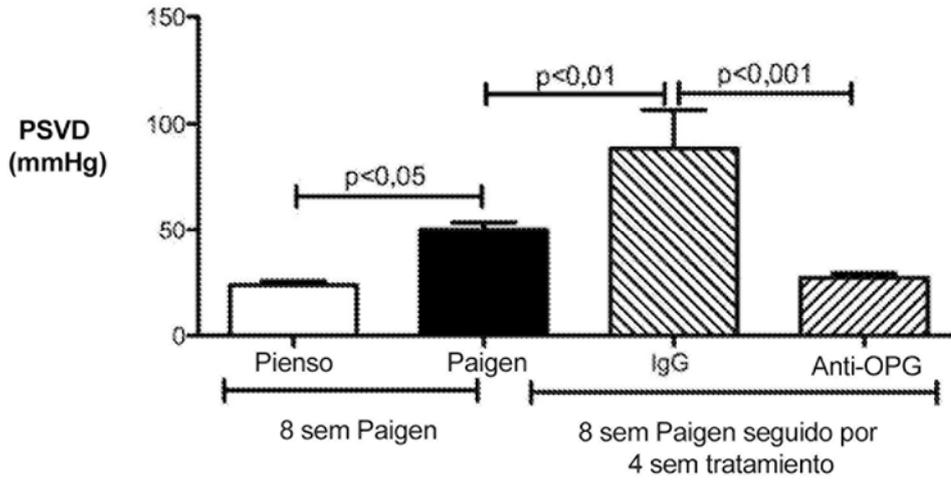
Q



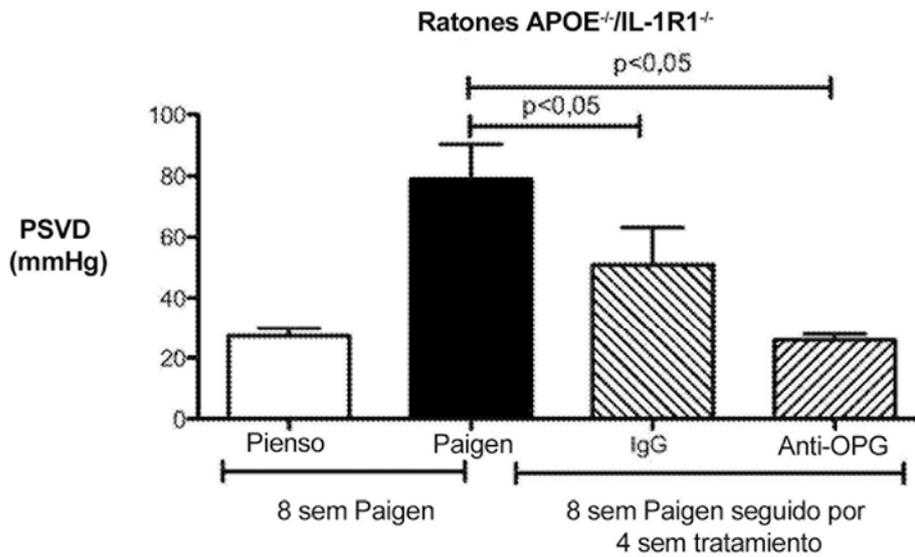
R



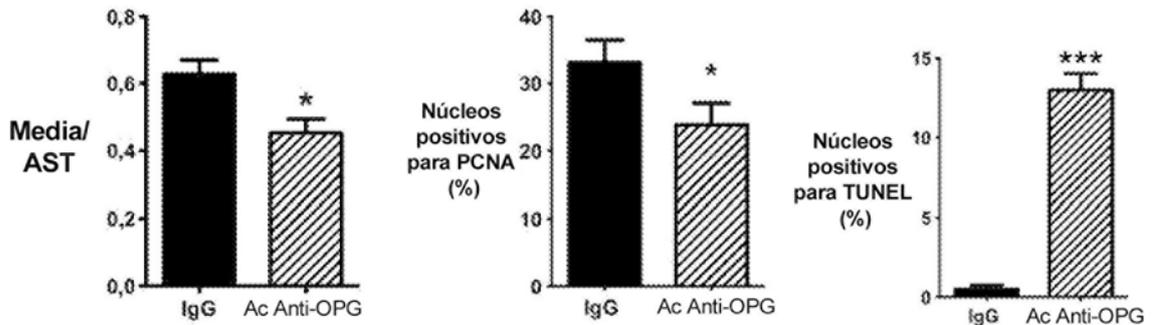
S



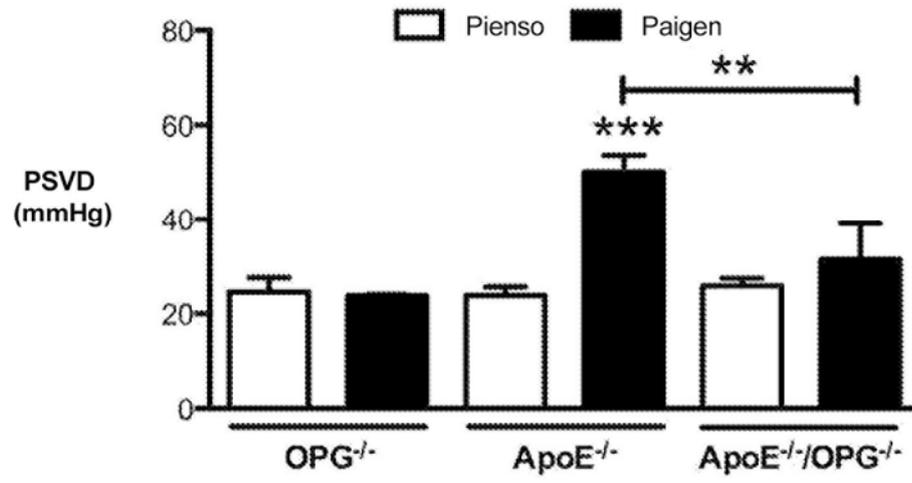
T



U



V



ES 2 671 731 T3

SEQ ID NO: 1

MNNLLCCALVFLDISIKWTTQETFPKYLHYDEETSHQLLCDKCPPGTYLKQHCTAKWKT  
VCAPCPDHYYTDSWHTSDECLYCSVPCKELQYVKQECNRTHNRVCECKEGRYLEIEFCLK  
HRSCPPGFGVVQAGTPERN TVCKRCPDGFSSNETSSKAPCRKHTNCSVFGLLLTQKGNAT  
HDNICSGNSESTQKCGIDVTLCEEAFFRFAVPTKFTPNWLSVLVDNLPGTKVNAESVERI  
KRQHSSQEQTFLKLLKWKHQNKDQDIVKKIIQDIDLCE NSVQRHIGHANLTFEQLRSLME  
SLPGKKVGAEDIEKTIKACKPSDQILKLLSLWRINKGDQDTLKGMLHALKHSKTYHFPKT  
VTQSLKKTIRFLHSFTMYKLYQKLFLEMIGNQVQSVKISCL

SEQ ID NO: 2

**ATGAACAACCTGCTGTGCTGCGCGCTCGTGTTCCTGGACATCTCCATTAAGTGGACCACC**

**CAGGAAACG**TTTCCTCCAAAGTACCTTCATTATGACGAAGAAACCTCTCATCAGCTGTTG

TGTGACAAATGTCTCCTGGTACCTACCTAAAACAACACTGTACAGCAAAGTGGAAAGACC

GTGTGCGCCCCTTGCCCTGACCACTACTACACAGACAGCTGGCACACCAGTGACGAGTGT

CTATACTGCAGCCCCGTGTGCAAGGAGCTGCAGTACGTCAAGCAGGAGTGCAATCGCACC

CACAACCGCGTGTGCGAATGCAAGGAAGGGCGCTACCTTGAGATAGAGTTCTGCTTGAAA

CATAGGAGCTGCCCTCCTGGATTTGGAGTGGTCAAGCTGGAACCCAGAGCGAAATACA

GTTTGCAAAAGATGTCCAGATGGGTTCTTCTCAAATGAGACGTCATCTAAAGCACCTGT

AGAAAACACACAAATTCAGTGTCTTTGGTCTCCTGCTAACTCAGAAAGGAAATGCAACA

CACGACAACATATGTTCCGGAAACAGTGAATCAACTCAAAAATGTGGAATAGATGTTACC

CTGTGTGAGGAGGCATTCTTCAGGTTTGTGTTCTTACAAAAGTTTACGCCTAACTGGCTT

AGTGTCTTGGTAGACAATTTGCCTGGCACCAAAGTAAACGCAGAGAGTGTAGAGAGGATA

AAACGGCAACACAGCTCACAAGAACAGACTTTCCAGCTGCTGAAGTTATGGAAACATCAA

AACAAAGACCAAGATATAGTCAAGAAGATCATCCAAGATATTGACCTCTGTGAAAACAGC

GTGCAGCGGCACATTGGACATGCTAACCTCACCTTCGAGCAGCTTCGTAGCTTGATGGAA

AGCTTACCGGAAAGAAAGTGGGAGCAGAAGACATTGAAAAACAATAAAGGCATGCAAAA

CCCAGTGACCAGATCCTGAAGCTGCTCAGTTTGTGGCGAATAAAAAATGGCGACCAAGAC

ACCTTGAAGGGCCTAATGCACGCACTAAAGCACTCAAAGACGTACCCTTCCAAAACCT

GTCACCTCAGAGTCTAAAGAAGACCATCAGGTTCTTCACAGCTTCACAATGTACAAATTG

TATCAGAAGTTATTTTTAGAAATGATAGGTAACCAGGTCCAATCAGTAAAAATAAGCTGC

TTATAA