

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 670**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2012 PCT/US2012/033368**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12142320**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2012 E 12771584 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2696888**

54 Título: **Composiciones y métodos para la prevención o tratamiento de la fibrosis pulmonar**

30 Prioridad:

12.04.2011 US 201161474370 P

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

06.05.2019

73 Titular/es:

**MOERAE MATRIX, INC. (100.0%)
55 Madison Avenue, Suite 400
Morristown NJ 07960, US**

72 Inventor/es:

**LANDER, CYNTHIA y
BROPHY, COLLEEN**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 711 670 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

Composiciones y métodos para la prevención o tratamiento de la fibrosis pulmonar

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se encuentra comprendida en los campos de la biología celular y molecular, polipéptidos y métodos terapéuticos de utilización.

10 **ANTECEDENTES****1. Mecanismos de cicatrización de heridas y fibrosis**

15 La expresión "cicatrización de heridas" se refiere al proceso por el que el cuerpo repara los traumatismos de cualquiera de sus tejidos, especialmente los causados por medios físicos y con interrupción de continuidad.

Una respuesta de cicatrización de heridas con frecuencia se describe como presentando tres etapas diferentes: lesión, inflamación y reparación. En términos generales, el cuerpo responde a la lesión con una respuesta inflamatoria, que resulta crucial para mantener la salud e integridad de un organismo. Sin embargo, si se desequilibra, puede resultar en la destrucción de tejidos.

Etapas I: lesión

25 La lesión causada por factores entre los que se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, las reacciones autoinmunitarias o alérgicas, las partículas ambientales, la infección o daño mecánico, con frecuencia resulta en la alteración de la arquitectura normal de los tejidos, iniciando una respuesta de cicatrización. Las células epiteliales y endoteliales dañadas deben sustituirse para mantener la función de barrera y la integridad y evitar la pérdida de sangre, respectivamente. El daño agudo a las células endoteliales conduce a la liberación de mediadores inflamatorios y al inicio de una cascada de coagulación antifibrinolítica, taponando temporalmente el vaso dañado con un coágulo rico en plaquetas y fibrina. Por ejemplo, los homogenados pulmonares, las células epiteliales o el líquido de lavado broncoalveolar procedente de pacientes de fibrosis pulmonar idiopática (FPI) contienen niveles más elevados del factor de diferenciación de plaquetas, proteína-1 de unión a X-box, en comparación con los pacientes de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y de control, sugiriendo que las respuestas de formación de coágulo se activan continuamente. Además, la trombina (una serina proteasa necesaria para convertir el fibrinógeno en fibrina) también se detecta fácilmente dentro del pulmón y en los espacios intraalveolares en varias condiciones fibróticas pulmonares, confirmando adicionalmente la activación de la ruta de coagulación. La trombina también puede activar directamente los fibroblastos, incrementando la proliferación y estimulando la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos productores de colágeno. El daño al epitelio de las vías respiratorias, específicamente a los neumocitos alveolares, puede inducir una cascada antifibrinolítica similar y conduce a edema intersticial, zonas de inflamación aguda y separación del epitelio respecto de la membrana basal.

45 La captación de plaquetas, degranulación y formación del coágulo rápidamente avanzan hacia una fase de vasoconstricción con permeabilidad incrementada, permitiendo la extravasación (movimiento de glóbulos blancos de los capilares hacia los tejidos circundantes) y la atracción de los leucocitos hacia el sitio del daño. La membrana basal, que forma la matriz extracelular subyacente al epitelio y endotelio de tejido parenquimatoso, impide el acceso directo al tejido dañado. Para romper esta barrera física, las endopeptidasas dependientes de cinc, también denominadas metaloproteinasas de matriz (MMP, por sus siglas en inglés), cortan uno o más constituyentes de la matriz extracelular, permitiendo la extravasación de células hacia el interior y exterior de los sitios de daño. Específicamente, MMP-2 (gelatinasa A, colagenasa de tipo N) y MMP-9 (gelatinasa B, colagenasa de tipo IV) cortan los colágenos de tipo N y la gelatina, dos constituyentes importantes de la membrana basal. Estudios recientes han encontrado que MMP-2 y MMP-9 se encuentran regulados positivamente, subrayando que los procesos destructores de tejido y regenerativos son habituales en las condiciones fibróticas. Las actividades de las MMP están controladas por varios mecanismos, entre ellos la regulación transcripcional, la regulación proenzimática y los inhibidores tisulares específicos de las MMP. El equilibrio entre las MMP y los diversos mecanismos de inhibición puede regular la inflamación y determinar la cantidad neta de colágeno depositada durante la respuesta de cicatrización.

60 Estudios anteriores que han utilizado un modelo de inflamación alérgica y remodelado de las vías respiratorias en ratones MMP-2^{-/-}, MMP-9^{-/-} y con doble desactivación MMP-2^{-/-} MMP-9^{-/-} demuestran que MMP-2 y MMP-9 resultan necesarias para la salida y eliminación con éxito de las células inflamatorias respecto del tejido inflamado y hacia el interior de los espacios aéreos. En ausencia de estas MMP, las células resultaban atrapadas dentro del parénquima del pulmón y no eran capaces de entrar en los espacios aéreos, resultando en asfixia fatal.

Etapas II: inflamación

65 Una vez se ha conseguido acceder al sitio de daño tisular, los gradientes de quimioquinas atraen a las células

inflamatorias. Se observan neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y macrófagos en los sitios de daño agudo, con eliminación de los residuos celulares y zonas de necrosis por los fagocitos.

5 La atracción temprana de eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y macrófagos que proporcionan citoquinas y quimioquinas inflamatorias puede contribuir a la acumulación local de TGF- β e IL-13. Tras el insulto y onda de células inflamatorias iniciales, una atracción de estadio tardío de células inflamatorias puede ayudar en la fagocitosis, en la eliminación de residuos celulares y en el control de la proliferación celular excesiva, que juntos podrían contribuir a la cicatrización normal. La inflamación de estadio tardío puede presentar un papel antifibrótico y puede resultar necesaria para la resolución con éxito de las respuestas de cicatrización de herida. Por ejemplo, un perfil inflamatorio de etapa tardía
10 rico en macrófagos fagocíticos, que ayudan en la eliminación de fibroblastos, además de células T reguladoras secretoras de IL-10, que suprimen la producción local de quimioquinas y TGF- β , puede evitar la activación excesiva de los fibroblastos.

15 La naturaleza del insulto o agente causal con frecuencia gobierna el carácter de la respuesta inflamatoria subsiguiente. Por ejemplo, los estímulos exógenos, tales como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) son reconocidos por receptores de reconocimiento de patógenos, tales como los receptores tipo Toll y los receptores tipo NOD (proteínas citoplasmáticas que presentan una diversidad de funciones en la regulación de las respuestas inflamatorias y apoptóticas) e influyen sobre la respuesta de las células innatas a los patógenos invasores. Las señales de peligro endógenas también pueden influir sobre las células innata locales y organizar la
20 cascada inflamatoria.

La naturaleza de la respuesta inflamatoria influye drásticamente sobre las células de los tejidos residentes y las células inflamatorias generadas. Las células inflamatorias mismas también propagan una inflamación adicional mediante la secreción de quimioquinas, citoquinas y factores de crecimiento. Muchas citoquinas participan durante toda la
25 respuesta de cicatrización de heridas y fibrótica, con la activación de grupos específicos de genes en las diversas condiciones. Por ejemplo, la enfermedad alérgica crónica de las vías respiratorias en asmáticos está asociada habitualmente a perfiles elevados de citoquinas relacionadas con células T ayudantes de tipo 2 (Th2) (incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, la interleuquina-4 (IL-4), la interleuquina-5 (IL-5), la interleuquina-6 (IL-6), la interleuquina-13 (IL-13) y la interleuquina-9 (IL-9)), mientras que los pacientes de enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad pulmonar fibrótica (tal como la fibrosis pulmonar idiopática) más frecuentemente presentan perfiles de
30 citoquinas proinflamatorias (incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, la interleuquina-1 alfa (IL-1 α), la interleuquina-1 beta (IL-1 β), la interleuquina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor beta de crecimiento transformante (TGF- β) y los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF)). Cada una de dichas citoquinas se ha demostrado que muestra una actividad profibrótica significativa, actuando mediante la atracción, activación y
35 proliferación de fibroblastos, macrófagos y miofibroblastos.

Etapa III: reparación y contracción tisular

40 La etapa de cierre de la cicatrización de heridas consiste en una reorganización celular organizada guiada por la formación de andamiaje rico en fibrina (una proteína fibrosa que se polimeriza para formar una "malla" que forma un coágulo sobre un sitio de herida), contracción de la herida, cierre y reepitelización. La gran mayoría de estudios que dilucidan los procesos que participan en esta etapa de la reparación de heridas proceden de estudios sobre heridas dérmicas y sistemas in vitro.

45 Los colágenos derivados de miofibroblastos y actina de músculo liso (α -SMA, por sus siglas en inglés) forman la matriz extracelular provisional, en la que los macrófagos, plaquetas y fibronectina derivada de fibroblastos forman un andamiaje de fibrina. Colectivamente, estas estructuras se denominan comúnmente tejidos de granulación. Los fibroblastos primarios o macrófagos alveolares aislados a partir de pacientes de fibrosis pulmonar idiopática producen significativamente más fibronectina y α -SMA que los fibroblastos de control, indicativos de un estado de activación
50 incrementada de los fibroblastos. Se ha informado de que los pacientes de FPI sometidos a tratamiento de esteroides presentaban niveles elevados de fibronectina derivada de macrófagos similares a los de pacientes de FPI sin tratamiento. De esta manera, de manera similar a la diferenciación de miofibroblastos mediada por IL-13 resistente a esteroides, la liberación de fibronectina derivada de macrófagos aparentemente también es resistente al tratamiento de esteroides, proporcionando otro motivo de que el tratamiento de esteroides pueda resultar ineficaz. A partir de
55 modelos animales, la fibronectina aparentemente resulta necesaria para el desarrollo de la fibrosis pulmonar, ya que los ratones con una delección específica de un dominio de tipo III adicional de la fibronectina (EDA, por sus siglas en inglés) desarrollaron significativamente menos fibrosis tras la administración de bleomicina que sus contrapartidas de tipo salvaje.

60 Además de la fibronectina, la matriz extracelular provisional consiste en glucoproteínas (tales como PDGF), glucosaminoglicanos (tales como ácido hialurónico), proteoglicanos y elastina. Los fibroblastos activados por factor de crecimiento y TGF- β migran a lo largo de la red de la matriz extracelular y reparan la herida. Dentro de las heridas en la piel, TGF- β también induce una respuesta de contracción, regulando la orientación de las fibras de colágeno. La diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, tal como se ha comentado anteriormente, también crea fibras de
65 estrés y la neoexpresión de α -SMA, los cuales confieren ambos la elevada actividad contráctil dentro de los miofibroblastos. La unión de miofibroblastos a la matriz extracelular en sitios especializados denominados "fibrónexus"

o "adhesiones focales supermaduras" tiran uniendo la herida, reduciendo el tamaño de la lesión durante la etapa de contracción. La extensión del establecimiento de matriz extracelular y la cantidad de miofibroblastos activados determina la cantidad de deposición de colágeno. Con este fin, el equilibrio de metaloproteinasas matriciales (MMP) a inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP, por sus siglas en inglés) y de colágenos a colagenasas varía durante la respuesta, desplazándose de prosíntesis y depósito incrementado de colágeno a un equilibrio controlado, sin incremento neto de colágeno. Para una cicatrización de herida exitosa, dicho equilibrio con frecuencia se alcanza cuando los fibroblastos experimentan apoptosis, la inflamación empieza a ceder y retrocede el tejido de granulación, dejando una lesión rica en colágeno. La eliminación de las células inflamatorias, y especialmente de los miofibroblastos positivos para α -SMA, resulta esencial para terminar el depósito de colágeno. Resulta interesante que en los pacientes de fibrosis pulmonar idiopática, puede retrasarse la eliminación de los fibroblastos, con células resistentes a las señales apoptóticas, a pesar de la observación de niveles elevados de moléculas proapoptóticas y señalización de FAS. Esta resistencia relativa a la apoptosis potencialmente podría subyacer a dicha enfermedad fibrótica. Sin embargo, varios estudios también han observado tasas incrementadas de apoptosis de fibroblastos secretores de colágeno y de células epiteliales en la fibrosis pulmonar idiopática, sugiriendo que todavía otro equilibrio requiere la monitorización de la apoptosis de los fibroblastos y de la proliferación de los fibroblastos. A partir de estudios de la piel se conoce que la reepitelización de los sitios de herida reestablece la función de barrera y permite la reorganización celular encapsulada. Varios modelos in vitro e in vivo que utilizan células epiteliales humanas o de rata cultivadas sobre una matriz de colágeno, o heridas traqueales in vivo, se han utilizado para identificar estadios significativos de la migración y proliferación celular y de la propagación celular. En las horas siguientes a la herida inicial se produce una motilidad y proliferación rápidas y dinámicas, con restitución epitelial desde los bordes de la zona denudada. Además, láminas deslizantes de células epiteliales pueden migrar sobre la zona dañada, ayudando a cubrir la herida. Se ha demostrado que varios factores regulan la reepitelización, entre ellos el factor alfa de crecimiento transformante derivado de suero (TGF- α) y la metaloproteinasa de matriz 7 (MMP-7) (ella misma regulada por TIMP-1).

Colectivamente, el grado de inflamación, angiogénesis y la cantidad de depósito de matriz extracelular contribuyen todos al desarrollo en última instancia de una lesión fibrótica. De esta manera, la intervención terapéutica que interfiere con la activación fibroblástica, la proliferación o la apoptosis requieren una comprensión y apreciación profundas de todas las etapas de la reparación de heridas. Aunque dichas tres etapas con frecuencia se presentan secuencialmente, durante la lesión crónica o repetida, estos procesos funcionan en paralelo, imponiendo una demanda significativa a los mecanismos reguladores (Wilson y Wynn, *Mucosal Immunol.*, 2009, 3(2):103-121).

2. Fibrosis como patología

La fibrosis representa la formación o desarrollo de tejido conectivo fibroso en exceso en un órgano o tejido, que se forma como consecuencia de la respuesta normal o anormal/reactiva de cicatrización de heridas que conduce a una cicatriz. La fibrosis se caracteriza por, por ejemplo, aunque sin limitación, un depósito aberrante de una proteína de la matriz extracelular, una estimulación aberrante de la proliferación fibroblástica, una inducción aberrante de la diferenciación de una población de fibroblastos en una población de miofibroblastos, una estimulación aberrante de la unión de los miofibroblastos a la matriz extracelular, o una combinación de los mismos.

Mediadores proinflamatorios

La creciente evidencia sugiere que mediadores polipeptídicos conocidos como citoquinas, incluyendo diversas linfoquinas, interleuquinas y quimioquinas, son importantes estímulos del depósito de colágeno en la fibrosis. Las citoquinas, las cuales son liberadas por células de tejido residente y por células inflamatorias producidas, se cree que estimulan la proliferación de fibroblastos e incrementan la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, incluyendo el colágeno. Por ejemplo, una característica temprana en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática es la lesión celular epitelial y/o capilar alveolar. Lo anterior estimula la atracción al interior del pulmón de células inmunológicas circulantes, tales como monocitos, neutrófilos, linfocitos y eosinófilos. Estas células efectoras, junto con células pulmonares residentes, tales como macrófagos, células epiteliales y endoteliales alveolares, liberan citoquinas, que estimulan las células diana, típicamente los fibroblastos, a que se repliquen y sinteticen cantidades incrementadas de colágeno. La degradación de las proteínas de la matriz extracelular también puede resultar inhibida, contribuyendo de esta manera al proceso fibrótico (Coker y Laurent, *Eur Respir J*, 1998; 11:1218-1221).

Numerosas citoquinas han sido implicadas en la patogénesis de la fibrosis, entre ellas, aunque sin limitación, el factor β de crecimiento transformante (TGF- β), el factor α de necrosis tumoral (TNF- α), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor-1 de crecimiento similar a insulina (IGF-1), la endotelina-1 (ET-1) y las interleuquinas, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8) e interleuquina-17 (IL-17). Las quimioquinas quimioatrayentes de leucocitos, incluyendo el factor regulado con la activación en células T normales, expresadas y secretadas (RANTES, por sus siglas en inglés), se cree que también desempeñan un papel importante. Los niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, tales como la interleuquina-8 (IL-8), así como moléculas de adhesión celular (CAM, por sus siglas en inglés) posteriores, tales como la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1, por sus siglas en inglés) y la molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), metaloproteinasas de matriz, tales como la metaloproteinasa-7 de matriz (MMP-7) y moléculas de señalización, tales como la proteína A12 de unión al calcio S100 (S100A12, también conocida como calgranulina C), en sangre periférica, se ha encontrado que están asociados a

mortalidad, supervivencia sin trasplante de pulmón y progresión de enfermedad en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (Richards et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2012, 185: 67-76).

5 La familia TGF- β de proteína presenta un potente efecto estimulante de la deposición de la matriz extracelular y, de hecho, se ha utilizado en la construcción de modelos animales inducidos de fibrosis mediante transferencia génica. Los estudios in vitro demuestran que TGF- β 1, secretado en forma de un precursor latente, estimula la expresión génica y síntesis de proteína de procolágeno en fibroblastos. Los datos sugieren que las otras isoformas de mamífero, TGF- β 2 y TGF- β 3, también estimulan la síntesis de colágeno en fibroblastos pulmonares humanos y reducen la degradación in vitro. En modelos animales de fibrosis pulmonar, la expresión potenciada de gen TGF- β 1 está relacionada temporal y espacialmente con la expresión génica incrementada de colágeno y la deposición de proteína. Los anticuerpos de TGF- β 1 reducen la deposición de colágeno en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina murina y el tejido pulmonar fibrótico humano muestra una expresión de gen y proteína TGF- β 1 potenciados.

15 TNF- α puede estimular la replicación de los fibroblastos y la síntesis de colágeno in vitro y la expresión pulmonar del gen de TNF- α se incrementa tras la administración de bleomicina en ratones. Los receptores solubles de TNF- α reducen la fibrosis pulmonar en modelos murinos y la sobreexpresión pulmonar de TNF- α en ratones transgénicos se caracteriza por fibrosis pulmonar. En pacientes con FPI o asbestosis (una condición médica inflamatoria crónica y fibrótica que afecta al tejido parenquimatoso de los pulmones causada por la inhalación y retención de fibras de amianto), la liberación de macrófagos derivados de líquido de lavado broncoalveolar incrementó la cantidad de TNF- α en comparación con los controles.

25 La endotelina (ET-1) también satisface los criterios para una citoquina profibrótica. Esta molécula estimula la proliferación y quimiotaxis de los fibroblastos y estimula la producción de procolágeno. Se encuentra presente en los pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar y un informe reciente sugiere que el antagonista del receptor de ET-1 bosentán mejora la fibrosis pulmonar al administrarlo en animales experimentales.

Proliferación/activación de miofibroblastos no controlada y formación de focos fibróticos

30 La diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos se cree desde hace mucho tiempo que es un suceso importante en muchas condiciones, incluyendo la reparación de heridas y la fibrosis. Por ejemplo, se ha informado de que los miofibroblastos aparecen en zonas de fibrosis activa y son responsables de la producción y deposición de proteínas de la matriz extracelular (MEC) en la fibrosis pulmonar (Liu, T. et al., *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37:507-517).

35 Una hipótesis para la causación de fibrosis pulmonar idiopática sugiere que un estímulo todavía no identificado produce episodios repetidos de lesión pulmonar aguda. La cicatrización de heridas en estos sitios de lesión conduce en última instancia a fibrosis, con pérdida de función pulmonar. Los focos de fibroblastos, las lesiones características de la fibrosis pulmonar idiopática, muestran una replicación vigorosa de células mesenquimales y una deposición exuberante de matriz extracelular nueva. Tales focos son típicos de lesión de las células epiteliales alveolares, con exudación plasmática endoluminal y colapso del espacio aéreo distal. Los mediadores asociados normalmente a la cicatrización de heridas, tales como el factor β 1 de crecimiento transformante (TGF- β 1) y el factor de crecimiento de tejido conectivo, también se expresan en estos sitios. Se desconoce cuál es la fuerza que impulsa esta lesión pulmonar aguda focal y la reparación de heridas.

3. Enfermedad o condiciones en las que la fibrosis desempeña un papel

45 Se ha implicado la fibrosis en varias enfermedades o condiciones heterogéneas, entre ellas, aunque sin limitación, la enfermedad pulmonar intersticial, tal como la fibrosis pulmonar idiopática, la lesión pulmonar aguda (LPA), la fibrosis inducida por radiación y el rechazo del trasplante.

50 3.1. Fibrosis pulmonar idiopática (FPI)

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI, también conocida como alveolitis fibrosante criptogénica, AFC, o neumonía intersticial fibrosante idiopática) se define como una forma específica de neumonía intersticial fibrosante progresiva crónica de etiología indeterminada que aparece principalmente en adultos mayores, está limitada a los pulmones y se asocia al patrón radiológico e histológico de la neumonía intersticial usual (NIU) (Raghu G. et al., *Am J Respir Crit Care Med.*, 183(6):788-824, 2011; Thannickal, V. et al., *Proc Am Thorac Soc.*, 3(4):350-356, 2006). Puede caracterizarse por una deposición anormal y excesiva de tejido fibrótico en el intersticio pulmonar. En las imágenes de tomografía computarizada de alta resolución (HRCT, por sus siglas en inglés), la NIU se caracteriza por la presencia de opacidades reticulares asociadas con frecuencia con las bronquiectasias de tracción. A medida que avanza la FPI, el patrón en panal de abeja se vuelve más prominente (Neininger A. et al., *J Biol Chem.*, 277(5):3065-8, 2002). Los ensayos de función pulmonar con frecuencia revelan alteraciones restrictivas y una capacidad difusiva reducida del monóxido de carbono (Thomas, T. et al., *J Neurochem.*, 105(5): 2039-52, 2008). Los estudios han informado de incrementos significativos de la liberación de TNF- α e IL-6 en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) (Zhang, Y. et al. *J. Immunol.* 150(9):4188-4196, 1993), que se ha atribuido al nivel de expresión de IL-1 β (Kolb, M., et al. *J. Clin. Invest.*, 107(12):1529-1536, 2001). La aparición de síntomas de FPI, falta de aliento y tos, habitualmente son insidiosos pero progresan gradualmente, produciéndose la muerte en 70% de los pacientes dentro de los cinco años posteriores

al diagnóstico. Este mal pronóstico es similar al número de muertes anuales atribuibles al cáncer de mama (Raghu G. et al., *Am J Respir Crit Care Med.*, 183(6):788-824, 2011).

5 La FPI afecta a prácticamente 130.000 pacientes en los Estados Unidos, con aproximadamente 50.000 pacientes nuevos cada año y prácticamente 40.000 muertes cada año en todo el mundo (Raghu G. et al., *Am J Respir Crit Care Med.*, 183(6):788-824, 2011). Aunque estos datos son notables, un estudio reciente informa de que la FPI puede ser 5 a 10 veces más prevalente de lo que se creía, quizá debido a la creciente prevalencia o a las mejores capacidades diagnósticas (Thannickal, V. et al., *Proc Am Thorac Soc.*, 3(4):350-356, 2006). El trasplante de pulmón se considera una terapia definitiva para la FPI pero la supervivencia a cinco años tras el trasplante de pulmón es inferior al 50%.
10 Por consiguiente, ni siquiera el trasplante de pulmón puede considerarse una "cura" para la FPI. Además, de la carga física y emocional para el paciente, la FPI presenta un tratamiento y atención extremadamente caros, con costes de la atención sanitaria pública del orden de 2.800 millones de dólares cada 100.000 pacientes cada año.

15 Además, los estudios anteriores sugieren que los insultos ambientales añadidos podrían ser importantes durante la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática. En la mayoría de series de casos informados, hasta el 75 por ciento de los pacientes índice con fibrosis pulmonar idiopática son fumadores actuales o anteriores. En estudios epidemiológicos grandes se ha encontrado una asociación fuerte entre tabaquismo de cigarrillos y fibrosis pulmonar idiopática. Además, muchas de las características inflamatorias de la fibrosis pulmonar idiopática están más fuertemente asociadas al estado de tabaquismo que a la enfermedad pulmonar subyacente. De esta manera, el tabaquismo de cigarrillos podría ser un factor de riesgo independiente de fibrosis pulmonar idiopática. Las infecciones víricas latentes, especialmente las de la familia del virus herpes, también se ha informado de que están asociadas a la fibrosis pulmonar idiopática.

25 Debido a que no existe ningún tratamiento eficaz conocido para la FPI, incluyendo el trasplante de pulmón, sigue existiendo una necesidad crítica de desarrollo de nuevos terapéuticos. Actualmente se está investigando una diversidad de enfoques terapéuticos, incluyendo terapias antifibróticas que pueden retrasar o inhibir la capacidad del cuerpo de producir tejido cicatricial o fibrótico, y vasodilatadores pulmonares para incrementar la superficie de tejido para el intercambio gaseoso en el pulmón. Aparte del trasplante de pulmón, entre los tratamientos potenciales de la FPI se incluyen los corticoesteroides, la azatioprina, la ciclofosfamida, los anticoagulantes y la N-acetilcisteína (Raghu G. et al., *Am J Respir Crit Care Med.*, 183(6):788-824, 2011). Además, rutinariamente se utilizan terapias de apoyo, tales como la terapia de oxígeno y la rehabilitación pulmonar. Sin embargo, ninguna de ellas ha impactado definitivamente en la supervivencia a largo plazo de los pacientes de FPI, lo que subraya todavía más la necesidad médica no satisfecha de opciones de tratamiento en la FPI. A modo de ejemplo, a pesar de los resultados contradictorios de los programas clínicos, la molécula pequeña oral de InterMune Esbriet® (pirfenadona) ha recibido autorizaciones europea y japonesa para los pacientes con FPI. De esta manera, Esbriet® se ha convertido en la primera medicación específicamente indicada para el tratamiento de la FPI; debido a los resultados ambiguos de los ensayos y los efectos secundarios del fármaco, la utilidad del fármaco se percibe con escepticismo en los Estados Unidos y no ha recibido la autorización de la FDA basándose en los datos presentados en su momento. De acuerdo con lo anterior, se está realizando un gran ensayo clínico de fase 3 para determinar su eficacia para apoyar una Solicitud de nuevo fármaco en los Estados Unidos.

40 Histopatológicamente, la FPI puede describirse como la acumulación de miofibroblastos (o células mesenquimales) en focos fibroblásticos (Thannickal, V. et al., *Proc Am Thorac Soc.*, 3(4):350-356, 2006). La apoptosis alterada de miofibroblastos puede resultar en un proceso de reparación persistente y desregulado que culmina en la fibrosis tisular. Probablemente la inflamación también desempeña un papel crítico en la FPI, quizá mediante la estimulación aguda cíclica de los fibroblastos. Estos resultados apuntan a potenciales dianas para la intervención terapéutica.

3.1.1. Patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI)

50 Aunque no se entienden por completo los mecanismos patogénicos, el paradigma actualmente aceptado propone que a la lesión del epitelio alveolar sigue un estallido de mediadores proinflamatorios y fibroproliferativos que inducen respuestas asociadas a la reparación normal de los tejidos. Por motivos que no están claros, estos procesos de reparación nunca se resuelven y sigue la fibrosis progresiva (Selman M, et al., *Ann Intern Med*, 134(2):136-151, 2001; Noble, P. y Homer R., *Clin Chest Med*, 25(4):749-58, 2004; Strieter, R., *Chest*, 128 (5 supl. 1):526S-532S, 2005).

55 3.1.2. Modelo en ratón de bleomicina en la fibrosis pulmonar

Aunque existen varios modelos animales y pueden resultar útiles (p.ej., el modelo de transducción adenovírica de TGF- β o el modelo de fibrosis inducida por radiación), el modelo de bleomicina está bien documentado y es el modelo murino mejor caracterizado en uso actualmente para demostrar la eficacia de un fármaco o inhibidor de proteína quinasa actual en los estadios postinflamatorios/prefibróticos/fibropreventivos (Vittal, R. et al., *J Pharmacol Exp Ther.*, 321(1):35-44, 2007; Vittal, R. et al., *Am J Pathol.*, 166(2):367-75, 2005; Hecker L. et al., *Nat Med.*, 15(9):1077-81, 2009).

65 El antibiótico bleomicina fue aislado originariamente de *Streptomyces verticillatus* (Umezawa, H. et al., *Cancer* 20: 891-895, 1967). Posteriormente se encontró que este antibiótico resultaba eficaz contra los carcinomas de células escamosas y tumores cutáneos (Umezawa, H., *Fed Proc*, 33: 2296-2302, 1974); sin embargo, su utilidad como agente

antineoplásico estaba limitada por la toxicidad pulmonar dependiente de dosis que resultaba en fibrosis (Muggia, F. et al., *Cancer Treat Rev*, 10: 221-243, 1983). La administración de bleomicina por vía intratraqueal (generalmente 1,25 a 4 U/kg, según el origen) presenta la ventaja de que una única inyección del fármaco produce lesión pulmonar y fibrosis resultante en roedores (Phan, S. et al., *Am Rev Respir Dis* 121: 501-506, 1980; Snider, G. et al., *Am Rev Respir Dis*. 117: 289-297, 1978; Thrall, R. et al., *Am J Pathol*, 95: 117-130, 1979). La administración intratraqueal del fármaco en roedores resulta en daños directos inicialmente en las células epiteliales alveolares. Tras este suceso se desarrolla una pan-alveolitis neutrofílica y linfocítica dentro de la primera semana (Janick-Buckner, D. et al., *Toxicol Appl Pharmacol.*, 100(3):465-73, 1989). Posteriormente, se eliminan las células inflamatorias alveolares, se observa proliferación de fibroblastos y se sintetiza matriz extracelular (Schrier D. et al., *Am Rev Respir Dis.*, 127(1):63-6,1983) El desarrollo de fibrosis en este modelo puede observarse bioquímica e histológicamente alcanzado el día 14, observando generalmente respuestas máximas en torno a los días 21-28 (Izbicki G. et al., *Int J Exp Pathol.*, 83(3):111-9, 2002; Phan, S. et al., *Chest.*, 83(5 supl.):44S-45S, 1983). Sin embargo, más allá de los 28 días la respuesta a la bleomicina es más variable. Los informes originales sugieren que la bleomicina administrada por vía intratraqueal podría inducir fibrosis que progresa o persiste durante 60 a 90 días (Thrall R. et al., *Am J Pathol.*, 95(1): 117-30, 1979; Goldstein R., et al., *Am Rev Respir Dis.*, 120(1):67-73, 1979; Starcher B. et al., *Am Rev Respir Dis.*, 117(2):299-305, 1978); sin embargo, otros informes demuestran una respuesta autolimitada que empieza a resolverse después de este periodo (Thrall R. et al., *Am J Pathol.*, 95(1): 117-30, 1979; Phan, S. et al., *Chest*, 83(5 Suppl): 44S-45S, 1983; Lawson W. et al., *Am J Pathol.* 2005;167(5):1267-1277). Aunque la naturaleza de resolución en este modelo no imita la enfermedad humana, este aspecto del modelo ofrece la oportunidad de estudiar la resolución fibrótica en estos puntos temporales posteriores.

3.2. Lesión pulmonar aguda (LPA)

La lesión pulmonar aguda (LPA) y su forma más severa, el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), son síndromes de insuficiencia respiratoria aguda que resulta del edema y la inflamación pulmonar aguda. LPA/SDRA es una causa de insuficiencia respiratoria aguda que se desarrolla en pacientes de todas las edades a partir de una diversidad de trastornos clínicos, incluyendo sepsis (pulmonar y no pulmonar), neumonía (bacteriana, vírica y fúngica), aspiración del contenido gástrico y orofaríngeo, traumatismo mayor y algunos otros trastornos clínicos, incluyendo pancreatitis aguda severa, sobredosis de fármaco y productos sanguíneos (Ware, L. y Matthay, M., *N Engl J Med*, 342:1334-1349, 2000). La mayoría de pacientes requieren ventilación asistida con presión positiva. Las anomalías fisiológicas primarias son la hipoxemia arterial severa, así como un incremento marcado en ventilación minuto secundaria a un fuerte incremento de la fracción de espacio muerto pulmonar. Los pacientes con LPA/SDRA desarrollan edema pulmonar rico en proteínas que resulta de la exudación de líquidos hacia los compartimientos intersticial y de espacio aéreo del pulmón secundario a una permeabilidad incrementada de la barrera. Los cambios patológicos adicionales indican que los mecanismos implicados en el edema pulmonar son complejos y que el edema es sólo uno de los sucesos fisiopatológicos en LPA/SDRA. Una consecuencia fisiológica es una reducción significativa de la flexibilidad pulmonar que resulta en un trabajo respiratorio incrementado (Nuckton T. et al., *N Engl J Med*, 346:1281-1286, 2002), uno de los motivos de que resulte necesaria la ventilación asistida para el apoyo de la mayoría de pacientes.

Se ha sugerido que la ventilación mecánica (VM), un pilar del tratamiento de la LPA, contribuye potencialmente y empeora la permeabilidad al ejercer estrés mecánico sobre los diversos componentes del sistema respiratorio, causando lesión pulmonar asociada al ventilador (LPIVM) (Fan, E. et al., *JAMA*, 294:2889-2896, 2005; MacIntyre N., *Chest*, 128:561S+567, 2005). Un ensayo reciente ha demostrado una mejora significativa de la supervivencia de los pacientes ventilados con un volumen de ventilación bajo (LV_T) en comparación con volúmenes de ventilación altos (HV_T) (The Acute Respiratory Distress Syndrome N. Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*; 342:1301-1308, 2000). Aparte de la ventilación con volúmenes bajos, que presumiblemente transmite un estrés mecánico más bajo, la comprensión mecanística de la fisiopatología es incompleta y no existen terapias dirigidas para la LPIVM.

Se ha sugerido que la ventilación mecánica (VM) con volúmenes de ventilación altos (HVT) resulta en la fosforilación de la MAP quinasa p38, la activación de MK2 y la fosforilación de HSPB1, un proceso que provoca que la actina se disocie de HSPB1 y se polimerice, formando fibras de estrés, que en última instancia conducen a huecos paracelulares e incrementan la permeabilidad vascular. Además, se ha demostrado que la inhibición de la MAP quinasa p38 o su efecto posterior sobre MK2 evita la fosforilación de HSPB1 y protege de la permeabilidad vascular mediante la anulación de la formación de fibras de estrés de actina y la reorganización citoesquelética, sugiriendo que la inhibición dirigida de MK2 podría ser una potencial estrategia terapéutica para el tratamiento de la lesión pulmonar aguda (Damarla, M. et al., *PLoS ONE*, 4(2): E4600, 2009).

Además, estudios han sugerido que la fibrosis pulmonar también puede resultar de la LPA. La LPA puede resolverse por completo o continuar a alveolitis fibrosante acompañada de niveles bajos persistentes de oxígeno en sangre (hipoxemia) y a una capacidad reducida del pulmón de expandirse con cada inspiración (flexibilidad reducida del pulmón). Se ha sugerido que, aunque la etiología de la fibrosis pulmonar inducida por lesión es diferente de la fibrosis pulmonar idiopática, ambas enfermedades comparten un mecanismo patológico común, es decir, la infiltración de fibroblastos en los espacios aéreos del pulmón (Tager et al., *Nat. Med.* 14: 45-54, 2008; Ley, K. y Zarbock, A., *Nat. Med.* 14: 20-21; 2008).

3.3. Fibrosis inducida por radiación

5 La fibrosis es una secuela común tanto del tratamiento del cáncer mediante radioterapia como de la irradiación accidental. Las lesiones fibróticas secundarias a radioterapia se han descrito en muchos tejidos, incluyendo la piel (Bentzen, S. et al., *Radiother. Oncol.* 15: 261-214, 1989; Brocheriou, C., et al., *Br. J. Radiol. suppl.* 19: 101-108, 1986), el pulmón (Lopez Cardozo, B. et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 11: 907-914, 1985), el corazón (Fajardo, L. y Stewart, J., *Lab. Invest.*, 29: 244-257, 1973), y el hígado (Ingold, J. et al., *Am. J. Roentgenol.*, 93: 200-208, 1965).

10 En el pulmón (tejido de respuesta tardía), pueden producirse dos síndromes de toxicidad de la radiación: la neumonitis por radiación y la fibrosis pulmonar. La neumonitis se manifiesta 2 a 3 meses después de completarse la radioterapia. Patológicamente, la neumonitis se caracteriza por edema intersticial, presencia de células inflamatorias intersticiales y alveolares, y un incremento del número de neumocitos de tipo II (Gross, N. et al., *Radiat. Res.*, III: 143-50, 1981; Guerry-Force, M. et al., *Radiat. Res.* 114: 138-53, 1988). En la neumonitis, el daño principal al tejido está causado con
15 toda probabilidad por la reducción del número de células parenquimatosas (Hendry, J., *Radiat. Oncol. vol.* 4,2: 123-132, 1994; Rosiello, R. et al., *Am. Rev. Respir. Dis.*, 148: 1671-1676, 1993; Travis, E. y Terry, N., *Front. Radiat. Ther. Oncol.*, 23: 41-59, 1989).

20 La reacción fibrótica se tipifica por una deposición incrementada de colágeno intersticial, el engrosamiento de las paredes vasculares y oclusiones vasculares (Vergava, J. et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2: 723-732, 1987). Los exámenes histológicos de las lesiones fibróticas han revelado que el tejido fibrótico contiene células inflamatorias infiltrantes, fibroblastos y cantidades mayores de diversos componentes de la matriz extracelular. En los tejidos fibróticos, se ha descrito una síntesis y deposición potenciadas de los colágenos intersticiales, fibronectina y proteoglicanos (Maasiha, P. et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 20: 973-980, 1991), y ello se ha interpretado como
25 el resultado de la modulación inducida por la radiación del sistema de células fibroblásticas (Remy, J. et al., *Radiat. Res.* 125: 14-19, 1991).

La fibrosis inducida por radiación, especialmente del pulmón, se ha sugerido que se debe a una interacción de sucesos
30 celulares y moleculares entre varios sistemas celulares comprometidos en una reacción fibrótica. La irradiación por sí sola es capaz de inducir un proceso de diferenciación terminal prematura del sistema de fibroblastos/células fibrocíticas, resultando en una mayor acumulación de fibrocitos postmitóticos, los cuales se caracterizan por un incremento de varias veces en la síntesis de colágenos intersticiales. Concomitantemente, la irradiación de los tipos celulares parenquimatosos acompañantes, tales como los macrófagos alveolares y los neumocitos de tipo II alveolares, induce la síntesis intermedia de citoquinas específicas, como TGF- β 1, que seguidamente alteran la
35 interacción entre células parenquimatosas y el sistema celular fibroblástico. TGF- β 1, como una de las citoquinas principales responsables de la reacción fibrótica, induce la proliferación fibroblástica mediante una expansión de los tipos celulares fibroblásticos progenitores, así como una diferenciación terminal prematura de los fibroblastos progenitores en fibrocitos postmitóticos. Esto conduce a una acumulación de fibrocitos postmitóticos debido a una perturbación del equilibrio correcto de proporciones de tipos celulares, de fibroblastos progenitores y fibrocitos postmitóticos. Se ha propuesto que la respuesta tisular fisiopatológica tras la irradiación está causada por una
40 interacción alterada mediada por citoquinas y factores de crecimiento de sistemas multicelulares que resulta en una perturbación del equilibrio correcto de proporciones de tipos celulares del sistema de fibroblastos intersticiales/células fibrocíticas (Rodemann, H. y Bamberg, M., *Radiotherapy and Oncology*, 35, 83-90, 1995).

45 3.4. Rechazo del trasplante

El trasplante es el acto de transferir células, tejidos u órganos de un sitio a otro. El mal funcionamiento de un sistema orgánico puede corregirse con el trasplante de un órgano (p.ej., riñón, hígado, corazón, pulmón o páncreas) de un donante. Sin embargo, el sistema inmunológico sigue siendo la barrera más grande al trasplante como tratamiento
50 médico rutinario, y el rechazo de tales órganos con frecuencia corresponde a un fenotipo fibrótico en el órgano injertado. El sistema inmunológico ha desarrollado mecanismos complejos y eficaces para combatir los agentes foráneos. Estos mecanismos también participan en el rechazo del órgano trasplantado, que es reconocido como foráneo por el sistema inmunológico del huésped.

55 El grado de respuesta inmunológica a un injerto depende en parte del grado de disparidad genética entre órgano injertado y huésped. Los xenoinjertos, que son injertos entre miembros de diferentes especies, presentan la máxima disparidad e inducen la máxima respuesta inmunológica, experimentando un rápido rechazo. Los autoinjertos, que son injertos de una parte del cuerpo en otra (p.ej., injertos de piel), no son tejido foráneo y, por lo tanto, no inducen rechazo. Los isoinjertos, que son injertos entre individuos genéticamente idénticos (p.ej., gemelos monocigóticos)
60 también experimentan rechazo.

Los aloinjertos son injertos entre miembros de la misma especie que difieren genéticamente. Ésta es la forma más común de trasplante. El grado en que los aloinjertos experimentan rechazo depende en parte del grado de similitud o histocompatibilidad entre donante y huésped.

65 El grado y tipo de respuesta también varía con el tipo de trasplante. Algunos sitios, tales como el ojo y el cerebro, son

inmunológicamente privilegiados (es decir, presentan una cantidad mínima o nula de células del sistema inmunológico y pueden tolerar incluso injertos desiguales). Los injertos de piel inicialmente no están vascularizados y por lo tanto no manifiestan rechazo hasta que se desarrolla el riego sanguíneo. Los pulmones, corazón, riñones e hígado son órganos altamente vascularizados y con frecuencia conducen a una vigorosa respuesta mediada por células en el huésped, que requiere terapias inmunosupresoras.

La bronquiolitis constrictiva (BC), también denominada en pacientes de trasplante de pulmón, bronquiolitis obliterante, es inflamación y fibrosis que se produce predominantemente en las paredes y tejidos contiguos de bronquiolos membranosos y respiratorios, con un estrechamiento resultante de sus luces. La BC se observa en una diversidad de contextos, con frecuencia como una complicación del trasplante de pulmón y de corazón-pulmón (que afecta a 34% a 39% de los pacientes, habitualmente en los primeros 2 años del trasplante) y del trasplante de médula ósea, aunque también en la artritis reumatoide, tras la inhalación de agentes tóxicos tales como el dióxido de nitrógeno, tras la ingestión de determinados fármacos, tales como la penicilamina y la ingestión de la verdura del este asiático *Sauropus androgynous*, y como una complicación rara de las infecciones por adenovirus, influenza de tipo A, sarampión y por *Mycoplasma pneumoniae* en niños. En trasplantes de pulmón, la BC es el principal factor que conduce a muerte. En un estudio, la tasa global de mortalidad era del 25%. Sin embargo, simultáneamente, el 87% de los pacientes que eran asintomáticos y diagnosticados únicamente mediante biopsia transbronquial experimentaron resolución o estabilización de la enfermedad. Las reducciones de VEF₁ respecto a la línea base pueden utilizarse para apoyar clínicamente la BC en pacientes de trasplante; la expresión "síndrome de bronquiolitis obliterante" se utiliza para referirse a esta disfunción clínica y se ha establecido un sistema de gradación para el mismo que actualmente se utiliza ampliamente en la literatura. Entre los factores de riesgo significativos de desarrollo de BC en los trasplantes de pulmón se incluyen mecanismos dependientes e independientes de aloantígenos. En el primer grupo se encuentran el rechazo agudo tardío y las incompatibilidades de HLA en los loci A; en el último se encuentran las lesiones por isquemia/reperfusión de las vías respiratorias que resultan de la cirugía de trasplante y la infección por citomegalovirus (Schlesinger C. et al, Curr Opin Pulm. Med., 4(5): 288-93, 1998).

Mecanismos de rechazo

La respuesta inmunológica a un órgano trasplantado consiste en mecanismos tanto celulares (mediados por linfocitos) como humorales (mediados por anticuerpos). Aunque también participan otros tipos celulares, las células T son cruciales en el rechazo de los injertos. La reacción de rechazo consiste en una etapa de sensibilización y una etapa efectora.

Etapa de sensibilización

En esta etapa, las células T CD4 y CD8, mediante sus receptores de célula T, reconocen los aloantígenos expresados sobre las células del injerto foráneo. Se requieren dos señales para el reconocimiento de un antígeno: el primero lo proporciona la interacción entre el receptor de células T y el antígeno presentado por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH); el segundo, una interacción coestimuladora de receptor/ligando sobre la superficie de las células T/células presentadoras de antígeno (CPA). De las numerosas rutas coestimuladoras, las más estudiadas son la interacción de CD28 sobre la superficie de las células T con sus ligandos de superficie de CPA, B7-1 o B7-2 (conocidos comúnmente como CD80 y CD86, respectivamente) (Clarkson, M. y Sayegh, M., Transplantation; 80(5): 555-563, 2005). Además, el antígeno-4 asociado a linfocito T citotóxico (CTLA4, por sus siglas en inglés) también se une a estos ligandos y proporciona una señal de inhibición. Entre otras moléculas coestimuladoras se incluyen CD40 y su ligando CD40L (CD154). Típicamente, las hélices de las moléculas del CMH forman el surco de unión a péptidos y están ocupadas por péptidos derivados de proteínas celulares normales. Los mecanismos tímicos o de tolerancia central (delección clonal) y los mecanismos de tolerancia periférica (p.ej., anergia) garantizan que estos complejos CMH autopeptídicos no resulten reconocidos por las células T, evitando de esta manera las respuestas autoinmunitarias.

Etapa efectora

Los factores dependientes e independientes de aloantígenos contribuyen a los mecanismos efectoros. Inicialmente, las "respuestas a lesiones" no inmunológicas (isquemia) inducen una respuesta inflamatoria no específica. Debido a ello, la presentación de antígenos a las células T se incrementa al regularse positivamente la expresión de las moléculas de adhesión, los CMH de clase II, las quimioquinas y las citoquinas. También estimula el desprendimiento de moléculas de CMH solubles intactas que pueden activar la ruta indirecta de reconocimiento. Tras la activación, las células T positivas para CD4 inician las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) mediadas por macrófagos y proporcionan ayuda a las células B para la producción de anticuerpos.

Diversas células T y citoquinas derivadas de células T, tales como IL-2 e IFN- γ , se encuentran reguladas positivamente poco después del trasplante. Posteriormente, las quimioquinas β como RANTES (quimioquina de regulación por activación expresada y secretada por linfocitos T normales), IP-10 y MCP-1, se expresan, y ello estimula una intensa infiltración de macrófagos en el aloinjerto. IL-6, TNF- α , óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés) inducible y factores de crecimiento, también desempeñan un papel en este proceso. Los factores de crecimiento, incluyendo TGF- β y endotelina, causan la proliferación del músculo liso, el engrosamiento intimal, la fibrosis intersticial y, en el caso del riñón, glomeruloesclerosis.

Las células endoteliales activadas por citoquinas derivadas de células T y los macrófagos expresan moléculas de adhesión al CMH de clase II, y moléculas coestimuladoras. Estas pueden presentar antígenos y de esta manera atraer más células T, amplificando el proceso de rechazo. Las células T positivas para CD8 median en las reacciones de citotoxicidad mediadas por células, mediante la administración de un "golpe letal" o, alternativamente, mediante la inducción de apoptosis.

Además, nuevos estudios sugieren la implicación de procesos fibróticos en el rechazo crónico del trasplante de un órgano trasplantado. Por ejemplo, se ha demostrado que el rechazo crónico del aloinjerto pulmonar está mediado por una deficiencia relativa de HIF-1 α derivado de células endoteliales del aloinjerto, conduciendo a un remodelado fibrótico del órgano trasplantado (Wilkes, D., J Clin Invest., 121(6): 2155-2157, 2011; Jiang, X. et al., J Clin Invest., 121(6): 2336-2349, 2011).

3.5. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una descripción colectiva de enfermedades pulmonares representadas por una disfunción crónica y relativamente irreversible del flujo de aire espiratorio debido a alguna combinación de bronquitis crónica obstructiva, enfisema y/o asma crónica. La EPOC está causada por un abanico de factores de riesgo ambientales y genéticos, incluyendo el tabaquismo, que contribuyen a la enfermedad.

La prevalencia de EPOC está creciendo en todo el mundo y la EPOC se ha convertido en la cuarta causa principal de muerte en los Estados Unidos. En los Estados Unidos, a pesar de la reducción del tabaquismo de cigarrillos en las últimas décadas, tanto la prevalencia como la mortalidad asociadas a EPOC se han incrementado y se prevé que continúen incrementándose todavía durante algunos años. Además, la EPOC resulta costosa y las exacerbaciones agudas, que se producen aproximadamente una vez al año en pacientes con EPOC de severidad moderada o de grado mayor, constituyen el componente más costoso.

En la EPOC, la obstrucción de las vías respiratorias puede producirse basada en dos procesos fisiopatológicos muy diferentes en el pulmón: 1) inflamación del parénquima que resulta en proteólisis del parénquima pulmonar y pérdida de elasticidad pulmonar (enfisema), y 2) inflamación, cicatrización y estrechamiento de las vías respiratorias pequeñas ("enfermedad de las vías respiratorias pequeñas"). En un paciente individual, uno de estos procesos, que puede estar controlado por diferentes factores genéticos, puede predominar, aunque habitualmente ambos coexisten. En última instancia, ambos procesos producen patrones similares de deterioro funcional: flujo espiratorio reducido, hiperinflado y anomalías en el intercambio de gases.

En un estadio temprano de la EPOC, se observan los síntomas siguientes en los pulmones de los pacientes de EPOC: 1) ruptura del epitelio de las vías respiratorias por aerosoles dañinos, 2) acumulación de exudados mucosos inflamatorios, 3) infiltración de la pared de las vías respiratorias por células inmunológicas inflamatorias, 4) remodelado/engrosamiento de las vías respiratorias de la pared de las mismas e intromisión en el espacio luminal, y 5) resistencia incrementada al flujo de aire. Durante este estadio temprano, la contracción del músculo liso y la hiperrespuesta también incrementan la resistencia, pero la mayor resistencia se alivia con broncodilatadores.

En un estadio avanzado, los pacientes de EPOC desarrollan típicamente depósitos de tejido conectivo fibroso en los compartimientos subepitelial y adventicial circundantes a las paredes de las vías respiratorias. Tal fibrosis peribronquiolar contribuye a una obstrucción fija de las vías respiratorias mediante restricción del agrandamiento del calibre de las vías respiratorias que se produce durante el inflado de los pulmones.

3.5.1. Bronquitis crónica

La bronquitis crónica se define como la presencia crónica de tos y producción de esputo durante por lo menos tres meses en dos años consecutivos en ausencia de otras enfermedades que se reconoce que causan producción de esputo. En la bronquitis crónica, epidemiológicamente el epitelio bronquial se inflama crónicamente con hipertrofia de las glándulas mucosas y un número incrementado de células caliciformes. Los cilios también resultan destruidos y se deteriora mucho la eficiencia del escalador mucociliar. Se incrementa la viscosidad del moco y la producción de moco, llevando a una dificultad para expectorar. La agregación del moco conduce a una mayor susceptibilidad a infecciones.

Microscópicamente se observa infiltración de las paredes de las vías respiratorias por células inflamatorias. Tras la inflamación sigue cicatrización y remodelado que engrosa las paredes y también resulta en un estrechamiento de las vías respiratorias. A medida que progresa la bronquitis crónica, se produce metaplasia escamosa (un cambio anormal del tejido que reviste el interior de las vías respiratorias) y fibrosis (engrosamiento y cicatrización adicionales de las paredes de las vías respiratorias). La consecuencia de estos cambios es la limitación al flujo de aire. Las infecciones e inflamación repetidas durante el tiempo conducen a un daño estructural irreversible en las paredes de las vías respiratorias y a cicatrización, con estrechamiento y distorsión de las vías respiratorias periféricas, más pequeñas.

3.5.2. Enfisema

El enfisema se define en términos de sus características patológicas, caracterizado por una dilatación anormal de los espacios aéreos terminales, distales respecto a los bronquiolos terminales, con destrucción de su pared y pérdida de la elasticidad pulmonar. Pueden desarrollarse bullas (ampollas de más de 1 cm de anchura) como resultado de la distensión excesiva si las zonas de enfisema presentan un diámetro superior a 1 cm. La distribución de los espacios aéreos anormales permite la clasificación de dos patrones principales de enfisema: enfisema panacinar (panlobular), que resulta en distensión y destrucción de todo el acino, en particular en la mitad inferior de los pulmones. El enfisema centriacinar (centrilobular) implica daño en torno a los bronquiolos respiratorios, afectando a los lóbulos superiores y partes superiores de los lóbulos inferiores del pulmón. Es conocido que determinadas formas de enfisema además se presentan asociadas a fibrosis.

El proceso destructivo del enfisema se asocia predominantemente al tabaquismo de cigarrillos. El humo de cigarrillo es un irritante y resulta en inflamación de grado bajo de las vías respiratorias y alveolos. Es conocido que los cigarrillos contienen más de 4.000 compuestos químicos tóxicos, que afectan al equilibrio entre las antiproteasas y proteasas de los pulmones, causando daños permanentes. Las células inflamatorias (macrófagos y neutrófilos) producen un enzima proteolítico conocido como elastasa, que destruye la elastina, un componente importante del tejido pulmonar.

Los alveolos o sacos aéreos del pulmón contienen tejido elástico, que apoya y mantiene la potencia de las vías respiratorias intrapulmonares. La destrucción de las paredes alveolares permite el estrechamiento de las vías respiratorias pequeñas aflojan las cuerdas tensoras que ayudan a mantener abiertas las vías respiratorias. Durante la inspiración normal, el diafragma se mueve hacia abajo, mientras que la caja torácica se mueve hacia afuera y se aspira aire hacia el interior de los pulmones por la presión negativa que se crea. Con la espiración, a medida que se relajan la caja torácica y el diafragma, el retroceso elástico del parénquima pulmonar empuja el aire hacia arriba y hacia afuera. Con la destrucción del parénquima pulmonar, que resulta en pulmones flácidos y la pérdida de las cuerdas tensoras alveolares, las vías respiratorias pequeñas se colapsan y se produce el atrapado de aire, conduciendo al hiperinflado de los pulmones. El hiperinflado aplana el diafragma, resultando en una contracción menos eficaz y reduciendo la eficiencia alveolar, que a su vez conduce a más atrapado de aire. Con el tiempo, el mecanismo descrito conduce a una obstrucción severa del flujo de aire, resultando en una espiración insuficiente para permitir que los pulmones se desinflen por completo antes de la siguiente inspiración.

3.5.3. Asma crónico

El asma se define como una condición inflamatoria crónica de las vías respiratorias que conduce a una obstrucción generalizada y variable de las vías respiratorias que es reversible espontáneamente o con el tratamiento. En algunos pacientes con asma crónico, la enfermedad progresa, conduciendo a una obstrucción irreversible de las vías respiratorias, en particular si el asma se deja sin tratar, debido a que no ha sido diagnosticada o por un mal control, o en el caso de que sea particularmente severa. Los niños con asma presentan una probabilidad de uno a diez de desarrollar asma irreversible, mientras que el riesgo para los asmáticos de aparición en la adultez es de uno a cuatro. Algunos estudios también han encontrado que tanto en niños como adultos el asma puede conducir a un deterioro irreversible de la función pulmonar si su asma no ha sido tratado adecuadamente, en particular con terapia de corticoesteroides.

La inflamación de las vías respiratorias en el asma con el tiempo puede conducir a un remodelado de las vías respiratorias mediante el incremento del músculo liso, la alteración del epitelio superficial, la deposición incrementada de colágeno y el engrosamiento de la membrana basal.

3.6 Otros tipos de fibrosis

Entre los demás tipos de fibrosis se incluye, aunque sin limitarse a ellos, la fibrosis quística del páncreas y los pulmones, la fibrosis por inyección, la fibrosis endomiocárdica, la fibrosis mediastinal, la mielofibrosis, la fibrosis retroperitoneal y la fibrosis sistémica nefrogénica.

La fibrosis quística (FQ, mucovidos, mucovisidosis) es un trastorno recesivo autosómico hereditario. Es uno de los trastornos genéticos fatales más comunes en los Estados Unidos, afectando a aproximadamente 30.000 personas y es más prevalente en la población caucásica, apareciendo en uno de cada 3.300 nacimientos vivos. El gen implicado en la fibrosis quística, que fue identificado en 1989, codifica una proteína denominada regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR, por sus siglas en inglés). La CFTR normalmente se expresa mediante los epitelios exocritos en todo el cuerpo y regula el movimiento de los iones cloro, iones bicarbonato y glutatión hacia el interior y exterior de las células. En los pacientes de fibrosis quística, las mutaciones en el gen de CFTR conducen a alteraciones o la pérdida total de la función de la proteína CFTR, resultando en efectos en la osmolaridad, pH y propiedades redox de las secreciones exocricas. En los pulmones, la FQ se manifiesta por la presencia de una secreción mucosa espesa que obstruye las vías respiratorias. En otros órganos exocricos, tales como las glándulas sudoríparas, la FQ puede no manifestarse por un fenotipo obstructivo, sino en una composición salina anormal de las secreciones (de aquí el ensayo clínico de osmolaridad del sudor para detectar los pacientes de FQ). La causa predominante de enfermedad y muerte en pacientes de fibrosis quística es la enfermedad pulmonar progresiva. El

espesor del moco de la FQ, que bloquea el paso de las vías respiratorias, se cree que nace de anomalías en la osmolaridad de las secreciones, así como de la presencia de cantidades masivas de ADN, actina, proteasas y enzimas prooxidativas originados en un subgrupo de células inflamatorias denominadas neutrófilos. En efecto, la enfermedad pulmonar de la FQ se caracteriza por reacciones inflamatorias tempranas mediadas por neutrófilos hiperactivos frente a patógenos tanto víricos como bacterianos. El síndrome hiperinflamatorio de los pulmones de FQ presenta varias bases, de entre las cuales se informa que desempeña un papel importante el desequilibrio entre las quimioquinas proinflamatorias, principalmente IL-8, y las citoquinas antiinflamatorias, principalmente IL-10. Ver Chmiel et al., Clin Rev Allergy Immunol. 3(1):5-27, 2002. Algunos estudios han informado de que los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-1 β son más altos en el líquido de lavado broncoalveolar de los pacientes de fibrosis quística que en líquido de lavado broncoalveolar de control sano (Bondfield, T. L., et al. Am. J. Resp. Crit. Care Med. 152(1):2111-2118, 1995).

La fibrosis por inyección (FI) es una complicación de la inyección intramuscular que con frecuencia se produce en el cuádriceps, tríceps y músculos glúteos de bebés y niños, en la que los sujetos no pueden flexionar por completo el músculo afectado. Típicamente es indolora, pero progresiva. Algunos estudios han informado de que la glucoproteína osteopontina (OPN) desempeña un papel en el remodelado de los tejidos (Liaw L. et al., J. Clin. Invest. 101(7):1469-1478, 1998) y de que este mediador proinflamatorio induce la regulación positiva de IL-1 β en monocitos humanos, acompañada de una producción incrementada de TNF- α e IL-6 (Naldini, A., et al. J. Immunol. 177:4267-4270, 2006; Weber, G. F., y Cantor, H. Cytokine Growth Factor Reviews. 7(3):241-248, 1996).

La enfermedad endomiocárdica (síndrome hipereosinofílico (SH)) es un proceso patológico caracterizado por un recuento de eosinófilos persistentemente elevado (1.500 eosinófilos/mm³) en sangre. El SH afecta simultáneamente a muchos órganos. Algunos estudios han informado de que IL-1 β , IL-6 y TNF- α se expresan a niveles elevados en pacientes de miocarditis inducida víricamente (Satoh, M., et al. Virchows Archiv. 427(5):503-509, 1996). Entre los síntomas puede incluirse cardiomiopatía, lesiones en la piel, enfermedad tromboembólica, enfermedad pulmonar, neuropatía, hepatoesplenomegalia (agrandamiento concurrente de hígado y bazo) y tamaño ventricular reducido. El tratamiento puede incluir la utilización de corticoesteroides para reducir los niveles de eosinófilos.

La fibrosis mediastinal (FM) se caracteriza por una fibrosis calcificada invasiva centrada en ganglios linfáticos que bloquea los vasos y vías respiratorias principales. La FM es una complicación tardía de la histoplasmosis. Los estudios en modelos murinos de fibrosis han informado de que IL-10 y TNF- α se elevan significativamente (Ebrahimi B. et al., Am. J. Pathol. 158:2117-2125, 2001).

La mielofibrosis (metaplasia mieloide, mielofibrosis idiopática crónica, mielofibrosis primaria) es un trastorno de la médula ósea en el que la médula experimenta fibrosis. La mielofibrosis conduce a la insuficiencia progresiva de la médula ósea. La supervivencia media es de cinco años y entre las causas de muerte se incluyen la infección, sangrado, fallo orgánico, hipertensión portal y transformación leucémica. Se ha informado de que los niveles de TNF- α e IL-6 se encuentran elevados en modelos animales de mielofibrosis inducida víricamente (Bousse-Kerdiles M. et al. Ann. Hematol. 78:434-444, 1999).

La fibrosis retroperitoneal (enfermedad de Ormond) es una enfermedad que se manifiesta en la proliferación de tejido fibrosis en el retroperitoneo. El retroperitoneo es el compartimiento corporal que contiene los riñones, aorta, tracto renal y otras estructuras. Se ha informado de que IL-1, IL-6 y TNF- α presentan funciones clave en la patogénesis de la fibrosis retroperitoneal (Demko T. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 8:684-688, 1997). Entre los síntomas de la fibrosis retroperitoneal pueden incluirse, aunque sin limitarse a ellos, dolor lumbar, insuficiencia renal, hipertensión y trombosis venosa profunda.

La fibrosis sistémica nefrogénica (FSN, dermatopatía fibrosante nefrogénica) implica la fibrosis de la piel, articulaciones, ojos y órganos internos. La FSN puede estar asociada a la exposición al gadolinio. Los pacientes desarrollan grandes zonas de piel endurecida con nódulos fibróticos y placas. También pueden producirse contracturas de flexión con limitación acompañante del rango de movilidad. La FSN se manifiesta en una proliferación de fibroblastos dérmicos y células dendríticas, haces de colágeno engrosados, incremento de fibras elásticas y depósitos de mucina. Algunos informes sugieren que un estado proinflamatorio proporciona un factor de predisposición a la fibrosis sistémica nefrogénica (Saxena S. et al., Int. Urol. Nephrol. 40:715-724, 2008), y que el nivel de TNF- α se encuentra incrementado en modelos animales de fibrosis sistémica nefrogénica (Steger-Hartmann, T., et al. Exper. Tox. Pathol. 61(6): 537-552, 2009).

4. Factores de riesgo

4.1. Factores de riesgo primario

4.1.1. Tabaquismo de cigarrillos

Aunque se han identificado varios factores de riesgo de enfermedades fibróticas de las vías respiratorias (algunos de los cuales podría desempeñar un papel en su causación), el tabaquismo de cigarrillos sigue siendo la causa principal y más importante de EPOC. Cuanto mayor es el número de cigarrillos consumido, mayor es el riesgo de desarrollar enfermedades fibróticas de las vías respiratorias. Una gran mayoría de las personas que desarrollan enfermedades

fibróticas de las vías respiratorias son fumadores y su función pulmonar se reduce más rápidamente que la de los no fumadores.

5 La intervención más eficaz es dejar de fumar, preferentemente en un estadio temprano. Los fumadores que dejan de fumar no recuperarán la función pulmonar perdida pero la tasa de declive puede revertirse a la de un no fumador. Dejar de fumar en un estadio temprano mejora el pronóstico con independencia de cuántos intentos se necesiten para dejar de fumar. La susceptibilidad individual a desarrollar enfermedades fibróticas de las vías respiratorias en relación al tabaquismo de cigarrillos es variable. Aproximadamente el 15% de los fumadores desarrollarán EPOC clínicamente significativa, mientras que aproximadamente el 50% nunca desarrollará ningún síntoma. La reducción de la función pulmonar es gradual y la enfermedad habitualmente se diagnostica tardíamente debido a que los pacientes pueden adaptarse a los síntomas de falta de aliento o pueden no advertir los síntomas. Los estudios han demostrado que según el número de cigarrillos fumados al día, el 24% a 47% de los fumadores desarrolla obstrucción del flujo aéreo. La exposición al tabaquismo pasivo incrementa la susceptibilidad a la enfermedad.

15 **4.1.2. Deficiencia de antitripsina alfa-1**

Esta rara condición hereditaria resulta en la ausencia completa de uno de los sistemas de protección antiproteasa clave en el pulmón. Es un trastorno recesivo que afecta a 1:4.000 de la población. Los pacientes con deficiencia de antitripsina alfa-1 están en riesgo de desarrollar enfisema a una edad temprana (entre los 20 y 40 años de edad) y con frecuencia presentan un fuerte historial familiar de la enfermedad. Los pacientes con la deficiencia y enfisema heredan un gen anormal de cada progenitor; es decir, los progenitores son portadores del gen. Tales progenitores presentarán niveles la mitad de los normales de antripsina en sangre, lo que puede resultar suficiente para protegerles de desarrollar enfisema. De manera similar, todos los hijos de un paciente deficiente en antitripsina alfa-1 portarán un gen anormal pero no resultarán afectados. Las dos formas habituales de deficiencia de antitripsina alfa-1 resultan de mutaciones puntuales en el gen que codifica para la antitripsina alfa-1.

4.2. Factores de riesgo asociados

30 **4.2.1. Contaminación ambiental**

Existe evidencia fuerte de que las enfermedades fibróticas de las vías respiratorias pueden resultar agravadas por la contaminación atmosférica, aunque el papel de la contaminación en la etiología de las enfermedades fibróticas de las vías respiratorias es pequeño en comparación con el del tabaquismo de cigarrillos. La contaminación atmosférica por material particulado pesado, carbono y dióxido de azufre, los cuales son producidos por la quema de carbón y combustibles fósiles derivados del petróleo, son causas importantes o cofactores en el desarrollo de las enfermedades fibróticas de las vías respiratorias. Estos se originan principalmente de emisiones de escape de los vehículos y son responsables los contaminantes fotoquímicos, tales como el ozono, en particular. La contaminación del aire en lugares cerrados por la quema de combustible de biomasa para cocinar y calentar en hogares mal ventilados podría ser un importante factor de riesgo de enfermedades fibróticas de las vías respiratorias, tales como EPOC, en los países en desarrollo, en particular para mujeres.

4.2.2. Factores ocupacionales

45 Algunas ocupaciones en las que los trabajadores se exponen a carbón, sílice y cationes, tales como mineros, trabajadores textiles y trabajadores del cemento, están asociadas a un riesgo incrementado de enfermedades fibróticas de las vías respiratorias. La exposición a cadmio, un metal pesado, y humos de soldadura se ha identificado como una causa de enfisema desde los años 1950.

50 Muchas ocupaciones polvorientas son más peligrosas que la exposición a gases o humos y están asociadas al desarrollo de bronquitis crónica y diversas formas de enfermedad obstructiva de las vías respiratorias. Es bien conocido que los soldadores y calafateadores de astillero presentan un riesgo incrementado de desarrollar enfermedades fibróticas de las vías respiratorias, así como los trabajadores de las industrias de la construcción que están expuestos al polvo de cemento.

55 **4.2.3. Infecciones respiratorias en la infancia**

60 Las infecciones torácicas en el primer año de vida, tales como la neumonía y la bronquiolitis, pueden predisponer al desarrollo de EPOC posteriormente en la vida. Ello puede ser como resultado o desarrollo incompleto del sistema respiratorio al nacer hasta que finaliza el crecimiento pulmonar en la adultez temprana. Si los pulmones en desarrollo resultan dañados, no se alcanzará la función pulmonar potencial máxima, produciendo síntomas de EPOC en una edad temprana.

4.3. Otros factores de riesgo

65 Entre otros factores de riesgo que pueden desempeñar un papel en la causación y/o servir como síntomas tempranos de enfermedades fibróticas de las vías respiratorias, tales como las fibrosis pulmonares, se incluyen la neumonitis por

hipersensibilidad (con frecuencia resultante de inhalar polvo contaminado con productos bacterianos, fúngicos o animales), algunas enfermedades típicas del tejido conectivo (tales como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico (LES) y el escleroderma), otras enfermedades que implican el tejido conectivo (tales como la sarcoidosis y la granulomatosis de Wegener), infecciones, determinadas medicaciones (p.ej., amiodarona, bleomicina, busulfán, metotrexato y nitrofurantoína) y la terapia de radiación en el tórax.

5. Enfoques terapéuticos actuales y emergentes para el tratamiento de enfermedades o condiciones fibróticas

Los agentes terapéuticos actualmente utilizados para tratar las enfermedades fibróticas se dan a conocer en Datta et al., *British Journal of Pharmacology*, 163: 141-172, 2011; incorporada como referencia en la presente memoria). Entre los ejemplos no limitativos de tales agentes terapéuticos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, colágenos de tipo V bovinos purificados (p.ej., IW-001; ImmuneWorks; United Therapeutics), antagonistas de receptores de IL-13 (p.ej., QAX576; Novartis), inhibidores de proteína tirosina quinasa (p.ej., imatinib (Gleevec®); Craig Daniels/Novartis), antagonistas de receptores endoteliales (p.ej., ACT-064992 (macitentan); Actelion), antagonistas de receptores duales de endotelina (p.ej., bosentan (Tracleer®); Actelion), análogos de prostaciclina (iloprost inhalado (p.ej., Ventavis®); Actelion), anticuerpos monoclonales anti-CTGF (p.ej., FG-3019), antagonistas de receptores de endotelina (A-selectivo) (p.ej., ambrisentan (Letairis®), Gilead), AB0024 (Arresto), anticuerpos monoclonales de proteína 2 similar a lisil oxidasa (LOXL2) (p.ej., GS-6624 (anteriormente AB0024); Gilead), inhibidores de quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) (p.ej., CC-930; Celgene), Pirfenidona (p.ej., Esbriet® (InterMune), Pirespa® (Shionogi)), IFN- γ 1b (p.ej., Actimmune®; InterMune), anticuerpos humanos IgG4 pan-neutralizadores contra las tres isoformas de TGF- β (p.ej., GC1008; Genzyme), inhibidores de activación de TGF- β (p.ej., Stromedix (STX-100)) proteína Pentraxin-2 humana recombinante (rhPTX-2) (p.ej., PRM151; Promedior), anticuerpos biespecíficos de IL4/IL13 (p.ej., SAR156597; Sanofi), anticuerpos monoclonales humanizados con diana en la integrina $\alpha\beta$ 6 (BIBF 1120; Boehringer Ingelheim), N-acetilcisteína (Zambon SpA), Sildenafil (Viagra®), antagonistas de TNF (p.ej., etanercept (Enbrel®); Pfizer), glucocorticoides (p.ej., prednisona, budesónida, furoato de mometasona, propionato de fluticasona y furoato de fluticasona), broncodilatadores (p.ej., modificadores de leucotrieno (p.ej., Montelukast (SINGUAIR®)), broncodilatadores anticolinérgicos (p.ej., bromuro de ipratropio y yiotropio), agonistas de β 2 de acción corta (p.ej., mesilato de isoetarina (Bronkometer®), adrenalina, salbutamol/albuterol y terbutalina), agonistas β 2 de acción prolongada (p.ej., salmeterol, formoterol, indecaterol (Onbrez®) y broncodilatadores de combinación, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, SYMBICORT® (que contiene tanto budesónido como formoterol), corticosteroides (p.ej., prednisona, budesónida, furoato de mometasona), xantina metilada y sus derivados (p.ej., cafeína, aminofilina, IBMX, paraxantina, pentoxifilina, teobromina y teofilina), inhibidores de elastasa de neutrófilo (p.ej., ONO-5046, MR-889, L-694,458, CE-1037, GW-311616 y TEI-8362, e inhibidores de estado de transición, tales como ONO-6818, AE-3763, FK-706, ICI-200,880, ZD-0892 y ZD-8321), inhibidores de fosfodiesterasa (p.ej., roflumilast (DAXAS®; Daliresp®) y cilomilast (Ariflo®, SB-207499)).

5.1. Quinasas y fosforilación

Las quinasas son un grupo ubicuo de enzimas que catalizan la reacción de transferencia de fosforilos a partir de un donante de fosfatos (habitualmente adenosín-5'-trifosfato (ATP)) a un sustrato receptor. Aunque todas las quinasas catalizan esencialmente la misma reacción de transferencia de fosforilos, muestran una diversidad notable en su especificidad de sustrato, estructura y las rutas en las que participan. Una reciente clasificación de todas las secuencias de quinasas disponibles (aproximadamente 60.000 secuencias) indica que las quinasas pueden agruparse en 25 familias de proteínas homólogas (es decir, derivadas de un ancestro común). Estas familias de quinasas se ensamblan en 12 grupos de plegamiento basados en la similitud del plegamiento estructural. Además, 22 de las 25 familias (aproximadamente 98,8% de todas las secuencias) pertenecen a 10 grupos de plegamiento del que se conoce el plegamiento estructural. De las otras 3 familias, la polifosfato quinasa forma un grupo de plegamiento diferente, y las 2 familias restantes son ambas quinasas de membrana integrales y comprenden el grupo de plegamiento final. Estos grupos de plegamiento no sólo incluyen algunos de los plegamientos de proteínas más ampliamente distribuidos, tales como el plegamiento de tipo Rossmann (tres o más cadenas β paralelas unidas mediante dos hélices α en el orden topológico β - α - β - α - β), plegamiento de tipo ferredoxina (un plegamiento de proteína α + β habitual con una estructura secundaria característica $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ a lo largo de su esqueleto), plegamiento de tipo barril TIM (referido a un plegamiento de proteína conservado que consiste en ocho hélices α y ocho cadenas β paralelas que alternan a lo largo del esqueleto peptídico) y plegamiento de barril β antiparalelo (un barril beta es una hoja beta grande que se retuerce y enrolla para formar una estructura cerrada en la que la primera cadena está unida mediante hidrógenos hasta el final), sino también todas las clases principales (todo α , todo β , α + β , α/β) de estructuras de proteína. Dentro de un grupo de plegamiento, el núcleo del dominio de unión a nucleótidos de cada familia presenta la misma arquitectura y la topología del núcleo de la proteína es idéntica o relacionada por permutación circular. La homología entre las familias dentro de un grupo de plegamiento no está implícita.

Las quinasas de grupo I (23.124 secuencias) incorporan la proteína S/T-Y quinasa, la proteína quinasa atípica, la lípido quinasa y los enzimas ATP-grasp y comprenden además la proteína S/T-Y quinasa, y la familia de proteína quinasas atípicas (22.074 secuencias). Entre estas quinasas se incluyen: colina quinasa (EC 2.7.1.32); proteína quinasa (EC 2.7.1.37); fosforilasa quinasa (EC 2.7.1.38); homoserina quinasa (EC 2.7.1.39); I-fosfatidilinositol 4-quinasa (EC 2.7.1.67); estreptomycin 6-quinasa (EC 2.7.1.72); etanolamina quinasa (EC 2.7.1.82); estreptomycin 3'-quinasa (EC 2.7.1.87); canamicina quinasa (EC 2.7.1.95); 5-metilioribosa quinasa (EC 2.7.1.100); viomicina quinasa (EC

2.7.1.103); [hidroximetilglutaril-CoA reductasa (NADPH₂)] quinasa (EC 2.7.1.109); proteína-tirosina quinasa (EC 2.7.1.112); [isocitrato deshidrogenasa (NADP⁺)] quinasa (EC 2.7.1.116); [cadena ligera de miosina] quinasa (EC 2.7.1.117); higromicina-B quinasa (EC 2.7.1.119); proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina (EC 2.7.1.123); rodopsina quinasa (EC 2.7.1.125); [receptor beta-adrenérgico] quinasa (EC 2.7.1.126); [cadena pesada de miosina] quinasa (EC 2.7.1.129); [proteína Tau] quinasa (EC 2.7.1.135); macrólido 2'-quinasa (EC 2.7.1.136); I-fosfatidilinositol 3-quinasa (EC 2.7.1.137); subunidad-[ARN-polimerasa] quinasa (EC 2.7.1.141); fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (EC 2.7.1.153) y fosfatidilinositol-4-fosfato 3-quinasa (EC 2.7.1.154). El grupo I comprende además la familia de lípido quinasa (321 secuencias). Entre estas quinasa se incluyen: I-fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa (EC 2.7.1.68); I D-mio-inositol-trifosfato 3-quinasa (EC 2.7.1.127); inositol-tetracisfosfato 5-quinasa (EC 2.7.1.140); I-fosfatidilinositol-5-fosfato 4-quinasa (EC 2.7.1.149); I-fosfatidilinositol-3-fosfato 5-quinasa (EC 2.7.1.150); inositol-polfosfato multiquinasa (EC 2.7.1.151) e inositol-hexacisfosfato quinasa (EC 2.7.4.21). El grupo I comprende además las quinasa ATP-grasp (729 secuencias) que incluye inositol-tetracisfosfato I-quinasa (EC 2.7.1.134), piruvato; fosfato diquinasa (EC 2.7.9.1) y piruvato, agua diquinasa (EC 2.7.9.2).

15 Las quinasa de grupo II (17.071 secuencias) incorporan las quinasa de tipo Rossman. El grupo II comprende la familia de la quinasa bucle-P (7.732 secuencias). Entre ellas se incluyen gluconoquinasa (EC 2.7.1.12); fosforibuloquinasa (EC 2.7.1.19); timidina quinasa (EC 2.7.1.21); ribosilnicotinamida quinasa (EC 2.7.1.22); defosfo-CoA quinasa (EC 2.7.1.24); adenililsulfato quinasa (EC 2.7.1.25); pantotenato quinasa (EC 2.7.1.33); proteína quinasa (bacteriana) (EC 2.7.1.37); uridina quinasa (EC 2.7.1.48); shikimato quinasa (EC 2.7.1.71); desoxicitidina quinasa (EC 2.7.1.74); desoxiadenosina quinasa (EC 2.7.1.76); polinucleótido 5'-hidroxil-quinasa (EC 2.7.1.78); 6-fosfofructo-2-quinasa (EC 2.7.1.105); desoxiguanosina quinasa (EC 2.7.1.113); tetraacildisacárido 4'-quinasa (EC 2.7.1.130); desoxinucleósido quinasa (EC 2.7.1.145); adenosilcobinamida quinasa (EC 2.7.1.156); polifosfato quinasa (EC 2.7.4.1); fosfomevalonato quinasa (EC 2.7.4.2); adenilato quinasa (EC 2.7.4.3); nucleósido-fosfato quinasa (EC 2.7.4.4); guanilato quinasa (EC 2.7.4.8); timidilato quinasa (EC 2.7.4.9); nucleósido-trifosfato-adenilato quinasa (EC 2.7.4.10); (desoxi)nucleósido-fosfato quinasa (EC 2.7.4.13); citidilato quinasa (EC 2.7.4.14) y uridilato quinasa (EC 2.7.4.22). El grupo II comprende además la familia de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (815 secuencias). Entre estas enzimas se incluyen proteína quinasa (HPr quinasa/fosfatasa) (EC 2.7.1.37); fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (GTP) (EC 4.1.1.32) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (ATP) (EC 4.1.1.49). El grupo II comprende además la familia de la fosfoglicerato quinasa (1.351 secuencias). Entre estas enzimas se incluye la fosfoglicerato quinasa (EC 2.7.2.3) y la fosfoglicerato quinasa (GTP) (EC 2.7.2.10). El grupo II comprende además la familia de la aspartoquinasa (2.171 secuencias). Entre estas enzimas se incluye carbamato quinasa (EC 2.7.2.2), aspartato quinasa (EC 2.7.2.4), acetilglutamato quinasa (EC 2.7.2.8.1), glutamato 5-quinasa (EC 2.7.2.1) y uridilato quinasa (EC 2.7.4). El grupo II comprende además la familia de las quinasa de tipo fosfofructoquinasa (1.998 secuencias). Entre estas enzimas se incluyen 6-fosfofructoquinasa (EC 2.7.1.1.1); NAD (+) quinasa (EC 2.7.1.23); I-fosfofructoquinasa (EC 2.7.1.56); difosfato-fructosa-6-fosfato I-fosfotransferasa (EC 2.7.1.90); esfingalina quinasa (EC 2.7.1.91); diacilglicerol quinasa (EC 2.7.1.107) y ceramida quinasa (EC 2.7.1.138). El grupo II comprende además la familia de las quinasa de tipo riboquinasa (2.722 secuencias). Entre estas enzimas se incluye glucoquinasa (EC 2.7.1.2), quetohexoquinasa (EC 2.7.1.3), fructoquinasa (EC 2.7.1.4), 6-fosfofructoquinasa (EC 2.7.1.11); riboquinasa (EC 2.7.1.15); adenosina quinasa (EC 2.7.1.20); piridoxal quinasa (EC 2.7.1.35); 2-dehidro-3-desoxigluconoquinasa (EC 2.7.1.45); hidroximetilpirimidina quinasa (EC 2.7.1.49); hidroxietiltiazol quinasa (EC 2.7.1.50); I-fosfofructoquinasa (EC 2.7.1.56); inosina quinasa (EC 2.7.1.73); 5-dehidro-2-desoxigluconoquinasa (EC 2.7.1.92); tagatosa-6-fosfato quinasa (EC 2.7.1.144); fosfofructoquinasa dependiente de ADP (EC 2.7.1.146); glucoquinasa dependiente de ADP (EC 2.7.1.147) y fosfometilpirimidina quinasa (EC 2.7.4.7). El grupo II comprende además la familia de la tiamina pirofosfoquinasa (175 secuencias), que incluye la tiamina pirofosfoquinasa (EC 2.7.6.2). El grupo II comprende además la familia de la glicerato quinasa (107 secuencias), que incluye la glicerato quinasa (EC 2.7.1.31).

Las quinasa del grupo III (10.973 secuencias) comprenden las quinasa de plegamiento de tipo ferredoxina. El grupo II comprende además la familia de las quinasa de tipo fosfofructoquinasa (923 secuencias). Entre estas enzimas se incluye la nucleósido-difosfato quinasa (EC 2.7.4.6). El grupo III comprende además la familia de la HPPK quinasa (609 secuencias). Entre estas enzimas se incluye la 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetildihidropteridina pirofosfoquinasa (EC 2.7.6.3). El grupo III comprende además la familia de la guanido quinasa (324 secuencias). Entre estas enzimas se incluye la guanidoacetato quinasa (EC 2.7.3.1), la creatina quinasa (EC 2.7.3.2), arginina quinasa (EC 2.7.3.3) y lombricina quinasa (EC 2.7.3.5). El grupo III comprende además la familia de la histidina quinasa (9.117 secuencias). Entre estas enzimas se incluye la proteína quinasa (histidina quinasa) (EC 2.7.1.37) [piruvato deshidrogenasa (lipoamida)] quinasa (EC 2.7.1.99) y la [3-metil-2-oxibutanoato deshidrogenasa (lipoamida)] quinasa (EC 2.7.1.115).

Las quinasa de grupo IV (2.768 secuencias) incorporan las quinasa de tipo ribonucleasa H. Entre estas enzimas se incluye hexoquinasa (EC 2.7.1.1); glucoquinasa (EC 2.7.1.2); fructoquinasa (EC 2.7.1.4); ramnuloquinasa (EC 2.7.1.5); manoquinasa (EC 2.7.1.7); gluconoquinasa (EC 2.7.1.12); L-ribuloquinasa (EC 2.7.1.16); xiluloquinasa (EC 2.7.1.17); eritritol quinasa (EC 2.7.1.27); glicerol quinasa (EC 2.7.1.30); pantotenato quinasa (EC 2.7.1.33); D-ribuloquinasa (EC 2.7.1.47); L-fuculoquinasa (EC 2.7.1.51); L-xiluloquinasa (EC 2.7.1.53); alosa quinasa (EC 2.7.1.55); 2-deshidro-3-desoxigalactonoquinasa (EC 2.7.1.58); N-acetilglucosamina quinasa (EC 2.7.1.59); N-acilmanosamina quinasa (EC 2.7.1.60); polifosfato-glucosa fosfotransferasa (EC 2.7.1.63); beta-glucósido quinasa (EC 2.7.1.85); acetato quinasa (EC 2.7.2.1); butirato quinasa (EC 2.7.2.7); ácido graso de cadena ramificada quinasa (EC 2.7.2.14) y propionato quinasa (EC 2.7.2.15).

Las quinasas de grupo V (1.119 secuencias) incorporan quinasas de barril- β TIM. Entre estos enzimas se incluye la piruvato quinasa (EC 2.7.1.40).

5 Las quinasas de grupo VI (885 secuencias) incorporan GHMP quinasas. Entre estos enzimas se incluyen galactoquinasa (EC 2.7.1.6), mevalonato quinasa (EC 2.7.1.36), homoserina quinasa (EC 2.7.1.39), L-arabinoquinasa (EC 2.7.1.46), fucoquinasa (EC 2.7.1.52), shikimato quinasa (EC 2.7.1.71), 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol quinasa (EC 2.7.1.148) y fosfomevalonato quinasa (EC 2.7.4.2).

10 Las quinasas de grupo VII (1.843 secuencias) incorporan quinasas de tipo AIR sintetasa. Entre estos enzimas se incluyen tiamina-fosfato quinasa (EC 2.7.4.16) y selénido, agua diquinasa (EC 2.7.9.3).

Las quinasas de grupo VIII (565 secuencias) incorporan riboflavina quinasas (565 secuencias). Entre estos enzimas se incluye riboflavina quinasa (EC 2.7.1.26).

15 Las quinasas de grupo IX (197 secuencias) incorporan dihidroxiacetona quinasas. Entre estos enzimas se incluye glicerol quinasa (EC 2.7.1.29).

20 Las quinasas del grupo X (148 secuencias) incorporan glicerato quinasas putativas. Entre estos enzimas se incluye glicerato quinasa (EC 2.7.1.31).

Las quinasas de grupo XI (446 secuencias) incorporan polifosfato quinasas. Entre estos enzimas se incluye polifosfato quinasa (EC 2.7.4.1).

25 Las quinasas de grupo XII (263 secuencias) incorporan quinasas integrales de membrana. El grupo XII comprende la familia de la dolicol quinasa. Entre estos enzimas se incluyen las dolicol quinasas (EC 2.7.1.108). El grupo XII comprende además la familia de la undecaprenol quinasa. Entre estos enzimas se incluyen las undecaprenol quinasas (EC 2.7.1.66).

30 Las quinasas desempeñan papeles indispensables en numerosas rutas celulares metabólicas y de señalización y son de los enzimas mejor estudiados a nivel estructural, bioquímico y celular. A pesar del hecho de que todas las quinasas utilizan el mismo donante de fosfatos (en la mayoría de casos, ATP) y cataliza aparentemente la misma reacción de transferencia de fosforilos, muestran una notable diversidad en sus plegamientos estructurales y mecanismos de reconocimiento de sustrato. Ello probablemente se debe en gran parte de la extraordinariamente diversa naturaleza de las estructuras y propiedades de sus sustratos.

35

5.1.1 Proteína quinasas activadas por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2 y MK3)

40 Se han definido diferentes grupos de proteína quinasas activadas por MAPK (MAP-KAPK) posteriores a proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés). Estos enzimas transducen señales a proteínas diana que no son sustratos directos de los MAPK y, por lo tanto, sirve para transmitir la señalización dependiente de fosforilación con cascadas de MAPK a diversas funciones celulares. Uno de estos grupos está formado por las tres MAPKAPK: MK2, MK3 (también conocida como 3pK) y MK5 (también denominada PRAK). La proteína quinasa 2 activadas por proteína quinasa activada por mitógeno (también denominada "MAPKAPK2", "MAPKAP-K2", o "MK2")

45 es una quinasa de la familia de las serina/treonina (Ser/Thr) proteína quinasas. MK2 es altamente homólogo de MK3 (identidad de aminoácidos de aproximadamente 75%). Los dominios de quinasa de MK2 y MK3 son los más similares (identidad de aproximadamente 35% a 40%) respecto a la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK), la fosforilasa b quinasa y el dominio quinasa C-terminal (CTKD) de las isoformas de quinasa S6 ribosómica (RSK). El gen mk2 codifica dos transcritos alternativamente procesados de 370 aminoácidos (MK2A) y 400

50 aminoácidos (MK2B). El gen MK3 codifica un transcrito de 382 aminoácidos. Las proteínas Mk2 Y mk3 son altamente homólogas, aunque MK2A posee una región C-terminal más corta. El extremo C-terminal de MK2B contiene una secuencia de localización nuclear (SLN) bipartita funcional (Lys-Lys-Xaa₁₀-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys; SEC ID n° 23) que no se encuentra presente en la isoforma MK2A, más corta, indicando que el procesamiento alternativo determina la localización celular de las isoformas de MK2. MK3 posee una secuencia de localización nuclear similar. La secuencia

55 de localización nuclear observada tanto en MK2B como en MK3 comprende un dominio D (Leu-Leu-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys; SEC ID n° 24) que se ha demostrado en estudios que media en la interacción específica de MK2B y MK3 con p38 α y p38 β . MK2B y MK3 posee además una señal de exportación nuclear (SEN) funcional situado N-terminalmente respecto al SLN y el dominio D. El SEN en MK2B resulta suficiente para inducir la exportación nuclear tras la estimulación, un proceso que puede ser inhibido por la leptomicina B. La secuencia N-terminal respecto al dominio catalítico en MK2 y MK3 es rico en prolinas y contiene uno (MK3) o dos (MK2) sitios de unión putativos a dominio de

60 homología de Src 3 (SH3), donde los estudios han demostrado, para MK2, que median en la unión al dominio SH3 de c-Abl in vitro. Estudios recientes sugieren que este dominio participa en la migración celular mediada por MK2.

65 MK2B y MK3 se localizan predominantemente en el núcleo de células quiescentes, mientras que MK2A se encuentra presente en el citoplasma. Tanto MK2B como MK3 son rápidamente exportados al citoplasma mediante un mecanismo dependiente de proteína de mantenimiento de región cromosómica (CRM1) tras la estimulación de estrés. La

exportación nuclear de MK2B aparentemente está mediada por la activación de quinasa, ya que la mutación fosfomimética de Thr334 dentro del bucle de activación de la quinasa potencia la localización citoplasmática de MK2B. Sin respaldo teórico, se cree que MK2B y MK3 podrían contener un SLN constitutivamente activo y un Sen regulados por fosforilación.

5 MK2 y MK3 aparentemente se expresan ubicuamente, con expresión predominante en el corazón, en músculo esquelético y en tejidos renales.

10 5.1.2. Activación

Diversos activadores de p38 α y p38 β estimulan potentemente la actividad de MK2 y MK3. P38 media en la fosforilación in vitro e in vivo de MK2 en cuatro sitios dirigidos por prolina: Thr25, Thr222, Ser272 y Thr334. De estos sitios, sólo Thr25 no se encuentra conservado en MK3. Sin respaldo teórico, aunque la función de Thr25 fosforilado es desconocida, su localización entre dos sitios de unión a dominio SH3 sugiere que podría regular interacciones de 15 proteína-proteína. Thr222 en MK2 (Thr201 en MK3) se encuentra localizado en el bucle de activación del dominio de quinasa y se ha demostrado que resulta esencial para la actividad de las quinasas MK2 y MK3. Thr334 en MK2 (Thr313 en MK3) se encuentra situado C-terminalmente respecto al dominio catalítico y resulta esencial para la actividad de quinasa. La estructura cristalina de MK2 se ha resuelto y, sin respaldo teórico, sugiere que la fosforilación de Thr334 20 podría servir de interruptor para la importación y exportación nuclear de MK2. La fosforilación de Thr334 también puede debilitar o interrumpir la unión del extremo C-terminal de MK2 al dominio catalítico, exponiendo el SEN y estimulando la exportación nuclear.

Estudios han demostrado que, aunque p38 es capaz de activar MK2 y MK3 en el núcleo, la evidencia experimental sugiere que la activación y exportación nuclear de MK2 y MK3 están acopladas mediante un interruptor conformacional 25 dependiente de fosforilación que también dicta la estabilización y localización de p38, y la localización celular de p38 misma está controlada por MK2 y posiblemente MK3. Estudios adicionales han demostrado que p38 nuclear es exportado al citoplasma en un complejo con MK2 tras la fosforilación y activación de MK2. La interacción entre p38 y MK2 podría resultar importante para la estabilización de p38, ya que estudios indican que los niveles de p38 son bajos en las células deficientes en MK2 y la expresión de una proteína MK2 catalíticamente inactiva restaura los niveles de 30 p38.

5.1.3. Sustratos y funciones

Estudios adicionales han demostrado que la proteína de choque térmico pequeña HSPB1 (también conocida como 35 proteína de choque térmico 27 o Hsp27), proteína específica de linfocitos LSP-1 y vimentina son fosforiladas por MK2. HSPB1 resulta de interés particular debido a que forma oligómeros grandes, que pueden actuar como chaperones moleculares y proteger las células del choque térmico y el estrés oxidativo. Tras la fosforilación, HSPB1 pierde su capacidad de formar oligómeros grandes y es incapaz de bloquear la polimerización de la actina, sugiriendo que la fosforilación mediada por MK2 de HSPB1 sirve a una función homeostática destinada a regular la dinámica de la 40 actina, que de otro modo resultaría desestabilizada durante el estrés.

MK3 también ha demostrado fosforilar HSPB1 in vitro e in vivo, aunque su papel durante las condiciones de estrés todavía no ha sido aclarada. MK2 comparte muchos sustratos con MK3. Ambos enzimas presentan preferentes de 45 sustrato comparables y fosforilan sustratos peptídicos con constantes cinéticas similares. La secuencia mínima requerida para la fosforilación eficiente por MK2 se encontró que era Hyd-Xaa-Arg-Xaa-Xaa-pSer/Thr (SEC ID nº 25), en la que Hyd es un residuo hidrofóbico voluminoso.

La evidencia experimental apoya un papel de p38 en la regulación de la biosíntesis de citoquinas y la migración celular. La delección dirigida del gen *mk2* en ratones sugiere que, aunque p38 media en la activación de muchas quinasas 50 similares, MK2 aparentemente es la quinasa clave responsable de estos procesos biológicos dependientes de p38. La pérdida de MK2 conduce a: (i) un defecto en la síntesis de citoquinas inducida por lipopolisacárido (LPS), tal como el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina-6 (IL-6) e interferón gamma (IFN- γ), e (ii) cambios en la migración de los fibroblastos embrionarios de ratón, células de músculo liso y neutrófilos.

55 En coherencia con su papel para MK2 en respuestas inflamatorias, los ratones deficientes en MK2 mostraron una susceptibilidad incrementada a la infección por *Listeria monocytogenes* y una muerte neuronal mediada por inflamación reducida tras isquemia focal. Debido a que los niveles de proteína p38 también están reducidos significativamente en células deficientes en MK2, resultó necesario distinguir si estos fenotipos se debían únicamente a la pérdida de MK2. Para conseguirlo, los mutantes de MK2 se expresaron en células deficientes en MK2 y los 60 resultados indican que la actividad catalítica de MK2 no era necesaria para restaurar los niveles de p38 pero resultaba necesaria para regular la biosíntesis de citoquinas.

Los estudios de desactivación o inactivación parcial de MK2 proporcionaron fuerte apoyo a la idea de que MK2 activado potencia la estabilidad del ARNm de IL-6 mediante fosforilación de las proteínas que interactúan con la región 3' no 65 traducida rica en AU del ARNm de IL-6. En particular, se ha demostrado que MK2 es principalmente responsable de la fosforilación de hnRNPA0, una proteína de unión a ARNm que estabiliza el ARN de IL-6. Además, varios estudios

adicionales que investigan diversas enfermedades inflamatorias han encontrado que los niveles de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-8, están incrementados en esputo inducido de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) estable o de macrófagos alveolares de fumadores de cigarrillos (Keatings V. et al, Am J Resp Crit Care Med, 1996, 153:530-534; Lim, S. et al., J Respir Crit Care Med, 2000, 162:1355-1360). Los niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, tales como la interleuquina-8 (IL-6), así como moléculas de adhesión celular (CAM) posteriores, tales como la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y la molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), metaloproteinasas de matriz, tales como la metaloproteinasa-7 de matriz (MMP-7) y moléculas de señalización, tales como la proteína A12 de unión al calcio S100 (S100A12, también conocida como calgranulina C), en sangre periférica, se ha encontrado que están asociados a mortalidad, supervivencia sin trasplante de pulmón y progresión de enfermedad en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (Richards et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2012, 185: 67-76; Richards, T. et al., Am J Respir Crit Care Med, 181: A1120, 2010; Moodley, Y. et al., Am J Respir Cell Mol Biol., 29(4): 490-498, 2003). Juntos, estos estudios sugieren que los niveles elevados de citoquinas inflamatorias inducidas por la activación de MK2 podrían estar implicados en la patogénesis de las enfermedades de las vías respiratorias o del tejido pulmonar, y sugieren una potencial terapia anticitoquina para el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias o del tejido pulmonar, tales como la fibrosis pulmonar idiopática y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Chung K., Eur. Respir. J. 2001, 18: supl. 34: 50-59).

5.1.4. Regulación de la traducción del ARNm

Los estudios anteriores con ratones de desactivación de MK2 o células deficientes en MK2 han demostrado que MK2 incrementa la producción de citoquinas inflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-1, e IL-6, mediante el incremento de la tasa de traducción de su ARNm. No pudieron detectarse reducciones significativas en la transcripción, procesamiento y liberación de TNF- α en ratones deficientes en MK2. La ruta de p38 es conocido que desempeña un papel importante en la regulación de la estabilidad de ARNm y MK2 representa una diana probable mediante la que p38 media en su función. Los estudios con ratones deficientes en MK2 indican que la actividad catalítica de MK2 resulta necesaria para sus efectos sobre la producción de citoquinas y la migración, sugiriendo que, sin respaldo teórico, MK2 fosforila las dianas que participan en la estabilidad del ARNm. En coherencia con lo anterior, se ha demostrado que MK2 se une y/o fosforila la ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP, por sus siglas en inglés) A0, tristetraprolina, la proteína de unión a poli(A) PABP1 y HuR, un miembro de expresión ubicua de la familia de elav (embrionario-letal anormal visual en *Drosophila melanogaster*) de proteínas de unión a ARN. Estos sustratos es conocido que se unen o copurifican con los ARNm que contienen elementos ricos en AU en la región 3' no traducida, sugiriendo que MK2 podría regular la estabilidad de los ARNm ricos en AU, tales como TNF- α . Actualmente no se conoce si MK3 desempeña funciones similares, aunque el tratamiento con LPS de fibroblastos deficientes en MK2 anula por completo la fosforilación del hnRNP A0, sugiriendo que MK3 no es capaz de compensar la pérdida de MK2.

MK3 participa con MK2 en la fosforilación de la quinasa del factor de elongación eucariótico 2 (eEF2). La quinasa eEF2 fosforila e inactiva eEF2. La actividad de eEF2 resulta crítica para la elongación del ARNm durante la traducción y la fosforilación por eEF2 de Thr56 resulta en la terminación de la traducción de ARNm. La fosforilación con MK2 y MK3 de la quinasa eEF2 de Ser377 sugiere que estas enzimas podrían modular la actividad de la quinasa eEF2 y regulan de esta manera la elongación de la traducción de ARNm.

5.1.5. Regulación transcripcional por MK2 y MK3

La MK2 nuclear, de manera similar a muchas MK, contribuye a la fosforilación del factor de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB, por sus siglas en inglés), del factor de respuesta en suero (SRF, por sus siglas en inglés) y el factor transcripcional ER81. La comparación entre las células de tipo salvaje y las deficientes en MK2 revela que MK2 es la quinasa SRF principal inducida por estrés, sugiriendo un papel para MK2 en la respuesta inmediata-temprana mediada por estrés. Tanto MK2 como MK3 interactúan con el factor de transcripción hélice-bucle-hélice básico E47 in vivo y fosforilan E47 in vitro. La fosforilación de E47 mediada por MK2 se ha encontrado que reprime la actividad transcripcional de E47 y, de esta manera, inhibe la expresión génica dependiente de E47, sugiriendo que MK2 y MK3 podrían regular la expresión génica específica de tejidos y la diferenciación celular.

5.1.6. Otras dianas de MK2 y MK3

También se han identificado varios otros sustratos de MK2 y MK3, que reflejan las diversas funciones de MK2 y MK3 en varios procesos biológicos. La proteína de andamiaje 14-3-3 ζ es un sustrato de MK2 fisiológico. Estudios indican que 14-3-3 ζ interactúan con varios componentes de las rutas de señalización celular, incluyendo las proteínas quinasas, las fosfatasa y los factores de transcripción. Estudios adicionales han demostrado que la fosforilación mediada por MK2 por 14-3-3 ζ de Ser58 compromete su actividad de unión, sugiriendo que MK2 podría afectar a la regulación de varias moléculas de señalización normalmente reguladas por 14-3-3 ζ .

Estudios adicionales han demostrado que MK2 también interactúa y fosforila la subunidad p16 del complejo de siete elementos Arp2 y Arp3 (p16-Arc) en Ser77. p16-Arc presenta funciones en la regulación del citoesqueleto de actina, sugiriendo que MK2 podría participar en este proceso.

MK2 y MK3 también podrían fosforilar la 5-lipooxigenasa. La 5-lipooxigenasa cataliza las etapas iniciales en la

formación de los leucotrienos mediadores inflamatorios. La tirosina hidroxilasa, la glucógeno sintasa y Akt también se ha demostrado que resultan fosforilados por MK2. Finalmente, la MK2 fosforila la proteína supresora tumoral tuberina en Ser1210, creando un sitio de enlace para 14-3-3ζ. La tuberina y hamartina normalmente forman un complejo funcional que regula negativamente el crecimiento celular mediante el antagonismo de la señalización dependiente de mTOR, sugiriendo que la activación mediada por p38 de MK2 podría regular el crecimiento celular mediante el incremento de la unión de 14-3-3ζ a la tuberina.

5.2. Inhibición de quinasas

Las proteínas quinasas eucarióticas constituyen una de las superfamilias más grandes de proteínas homólogas que están relacionadas en virtud de sus dominios catalíticos. Las proteínas quinasas más relacionadas son específicas de la fosforilación de serina/treonina o de tirosina. Las proteínas quinasas desempeñan un papel integral en la respuesta celular a los estímulos extracelulares. De esta manera, la estimulación de las proteínas quinasas se considera que es uno de los mecanismos de activación más comunes en los sistemas de transducción de señales. Se conocen muchos sustratos que experimentan fosforilación por múltiples proteínas quinasas y se ha publicado una cantidad considerable de información sobre la secuencia primaria de los dominios catalíticos de diversas proteínas quinasas. Estas secuencias comparten un gran número de residuos que participan en la unión del ATP, la catálisis y el mantenimiento de la integridad estructural. La mayoría de proteínas quinasas posee un dominio catalítico de 30-32 kDa bien conservado.

Estudios han intentado identificar y utilizar elementos reguladores de las proteínas quinasas. Entre estos elementos reguladores se incluyen inhibidores, anticuerpos y péptidos de bloqueo.

5.2.1. Inhibidores

Los inhibidores enzimáticos son moléculas que se unen a enzimas, reduciendo de esta manera la actividad enzimática. La unión de un inhibidor puede detener la entrada de un sustrato en el sitio activo del enzima y/o dificultar la catálisis de la reacción por parte del enzima. La unión del inhibidor es reversible o irreversible. Los inhibidores irreversibles habitualmente reaccionan con el enzima y lo modifican químicamente (p.ej., mediante la modificación de residuos aminoácidos clave necesarios para la actividad enzimática), de manera que ya no son capaces de catalizar su reacción. En contraste, los inhibidores reversibles se unen no covalentemente y se producen diferentes tipos de inhibición dependiendo de si estos inhibidores se unen al enzima, al complejo de enzima-sustrato o a ambos.

Los inhibidores enzimáticos con frecuencia se evalúan para su especificidad y potencia. El término "especificidad" tal como se utiliza en el presente contexto se refiere a la unión selectiva de un inhibidor o a su falta de unión a otras proteínas. El término "potencia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la constante de disociación de un inhibidor, que indica la concentración de inhibidor necesaria para inhibir un enzima.

Los inhibidores de las proteínas quinasas han sido estudiadas para la utilización como una herramienta en la regulación de la actividad de las proteínas quinasas. Se han estudiado inhibidores para la utilización con, por ejemplo, quinasa dependiente de ciclina (Cdk), MAP quinasa, serina/treonina quinasa, proteína tirosina quinasa de la familia de Src, tirosina quinasa, calmodulina (CaM) quinasa, caseína quinasa, quinasa de punto de comprobación (Chk1), glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), quinasa N-terminal de c-Jun (JNK), proteína quinasa 1 activada por mitógeno (MEK), quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK), proteína quinasa A, Akt (proteína quinasa B), proteína quinasa C, proteína quinasa G, proteína tirosina quinasa, Raf quinasa y Rho quinasa.

5.2.2. Péptidos de bloqueo

Un péptido es un compuesto químico que está compuesto de una cadena de dos o más aminoácidos, en donde el grupo carboxilo de un aminoácido en la cadena se une al grupo amino del otro mediante un enlace peptídico. Los péptidos se han utilizado, entre otros, para el estudio de la estructura y función de las proteínas. Pueden utilizarse péptidos sintéticos, entre otros, como sondas para identificar dónde se producen interacciones proteína-péptido. Los péptidos inhibidores pueden utilizarse, entre otros, en investigación clínica para examinar los efectos de los péptidos sobre la inhibición de las proteínas quinasas, las proteínas del cáncer y otros trastornos.

Se ha estudiado la utilización de varios péptidos de bloqueo. Por ejemplo, la quinasa regulada por señal extracelular (ERK), una proteína quinasa MAPK, resulta esencial para la proliferación y diferenciación celular. La activación de MAPK requiere un mecanismo de cascada en el que MAPK es fosforilado por un MAPKK cadena arriba (MEK) que después, a su vez, es fosforilado por una tercera quinasa MAPKKK (MEKK). El péptido inhibidor ERK funciona como un señuelo de MEK mediante la unión a ERK.

Entre otros péptidos de bloqueo se incluyen el péptido inhibidor relacionado con autocalmitide-2 (AIP). Este péptido sintético es un inhibidor altamente específico y potente de la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII). AIP es un análogo no fosforilable de autocalmitide-2, un sustrato peptídico altamente selectivo de CaMKII. AIP inhibe CaMKII con una IC_{50} de 100 nM (IC_{50} es la concentración de inhibidor requerida para alcanzar una inhibición de 50%). La inhibición de AIP es no competitiva con respecto a syntide-2 (sustrato peptídico de CaMKII) y ATP aunque competitiva con respecto a autocalmitide-2. La inhibición no resulta afectada por la presencia o ausencia de

Ca²⁺/calmodulina. La actividad de CaMKII resulta inhibida por completo por AIP (1 μM) mientras que PKA, PKC y CaMKIV no resultan afectadas.

Entre otros péptidos de bloqueo se incluyen el péptido inhibidor (CIP) de la proteína quinasa 5 de la división celular (Cdk5) Cdk5 fosforila la proteína tau de los microtúbulos en fosfoepítotos específicos de la enfermedad de Alzheimer cuando se asocia con p25. La proteína p25 es un activador truncado, que es producido a partir del activador de Cdk5 fisiológico p35 tras la exposición a péptidos β amiloides. Tras las infecciones neuronales con CIP, las CIP inhiben selectivamente la actividad de p25/Cdk5 y suprimen la fosforilación aberrante de tau en las neuronas corticales. Los motivos para la especificidad demostrada por CIP no se entienden del todo.

Se han estudiado péptidos de bloqueo adicionales para la quinasa 2 regulada extracelularmente (ERK2), p38/HOG1, proteína quinasa C, caseína quinasa II, Ca²⁺/calmodulina quinasa IV, caseína quinasa II, Cdk4, Cdk5, proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK), serina/treonina-proteína quinasa PAK3, fosfoinositida (PI)-3 quinasa, quinasa PI-5, PSTAIRE (la secuencia altamente conservada de cdk), quinasa S6 ribosómica, GSK-4, quinasa central germinal (GCK), SAPK (proteína quinasa activada por estrés), SEK1 (quinasa de señalización de estrés) y quinasa de adhesión focal (FAK).

5.3. Péptidos penetrantes de células (CPP, por sus siglas en inglés)

Los péptidos penetrantes de células (CPP) son una clase de péptidos capaces de penetrar en la membrana plasmática de células de mamífero y de transportar compuestos de muchos tipos y pesos moleculares a través de la membrana. Entre estos compuestos se incluyen moléculas efectoras, tales como proteínas, péptidos conjugados con ADN, oligonucleótidos y partículas pequeñas, tales como liposomas. En el caso de que los CPP se unan o fusionen químicamente con otras proteínas, las proteínas de fusión resultantes todavía son capaces de entrar en las células. Aunque no se conoce cuál es el mecanismo exacto de transducción, no se cree que la internalización de estas proteínas esté mediada por receptores o por transportadores. Los CPP generalmente presentan una longitud de 10 a 16 aminoácidos y pueden agruparse según su composición, tales como, por ejemplo, péptidos ricos en arginina y/o lisina.

La utilización de CPP capaces de transportar moléculas efectoras al interior de las células se ha vuelto crecientemente atractiva en el diseño de fármacos, ya que estimulan la incorporación celular de moléculas de carga. Estos péptidos penetrantes de células, generalmente clasificados como anfipáticos (es decir, que presentan tanto un extremo polar como un extremo no polar) o catiónicos (referido o relacionado a que contienen átomos de carga positiva neta). Los CPP con frecuencia se denominan "péptidos troyanos", "secuencias de traslocación de membrana", "dominios de transducción de proteínas (PTD, por sus siglas en inglés)" o "proteínas permeables celulares (CPP)". Los CPP también pueden utilizarse para ayudar a nuevos inhibidores de quinasa HSPB1 a penetrar en las membranas celulares (Ver la solicitud de patente US nº de serie 11/972.459, titulada "Polypeptide Inhibitors of HSPB1 Kinase and Uses Therefor", presentada el 10 de enero de 2008, y nº de serie 12/188.109, titulada "Kinase Inhibitors and Uses Thereof", presentada el 7 de agosto de 2008, el contenido de cada solicitud se incorpora en su totalidad en la presente memoria).

5.3.1. Proteínas que contienen CPP víricos

Las primeras proteínas que se ha descrito que presentan propiedades de transducción eran de origen vírico. Estas proteínas todavía son los modelos más comúnmente aceptados de acción de los CPP. Entre los péptidos penetrantes de células, los péptidos penetrantes de células ricos en arginina, incluyendo, aunque sin limitación, el péptido TAT, han sido los más ampliamente estudiados (El-Sayed A. et al., AAPSJ. 11, 13-22, 2009; Wender, P. et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 60, 452-472, 2008).

TAT (producto del gen transactivador de VIH-1) es un polipéptido de 86 aminoácidos que actúa como un potente factor de transcripción del genoma de VIH-1 integrado. TAT actúa sobre el genoma vírico estimulando la replicación vírica en células infectadas latentemente. Las propiedades de traslocación de la proteína TAT permiten que active células infectadas quiescentes y podría participar en la sensibilización de células no infectadas para la infección posterior mediante la regulación de muchos genes celulares, incluyendo las citoquinas. El CPP mínimo de TAT es la secuencia proteica de 9 aminoácidos RKKRRQRRR (TAT 49-57, SEC ID nº 20). Estudios que utilizan un fragmento más largo de TAT demuestran la transducción con éxito de proteínas de fusión de hasta 120 kDa. La adición de múltiples TAT-CPP, así como de derivados de TAT sintéticos, se ha demostrado que media en la traslocación de membrana. Las proteínas de fusión que contienen TAT CPP se han utilizado como fracciones terapéuticas en experimentos que implican cáncer, transportando una proteína de muerte al interior de la célula y modelos de enfermedad de trastornos neurodegenerativos.

VP22 es la proteína del tegumento de VHS-1, una parte estructural del virión del VHS. VP22 es capaz de la traslocación independiente de receptor y se acumula en el núcleo. Esta propiedad de VP22 clasifica la proteína como péptido que contiene CPP. Las proteínas de fusión que comprenden VP22 de longitud completa se han traslocado eficientemente a través de la membrana plasmática.

5.3.2. Homeoproteínas con propiedades de traslocación intercelular

Las homeoproteínas son factores de transcripción transactivadores altamente conservados que participan en procesos morfológicos. Se unen al ADN mediante una secuencia específica de 60 aminoácidos. El homeodominio de unión a ADN es la secuencia más altamente conservada de la homeoproteína. Se han descrito varias homeoproteínas que muestran actividad de tipo CPP; son capaces de traslocación eficiente a través de las membranas celulares de una manera independiente de energía y de endocitosis sin especificidad de tipo celular.

La proteína Antennapedia (Antp) es un factor transactivador capaz de traslocación a través de las membranas celulares; la secuencia mínima capaz de traslocación es un péptido de 16 aminoácidos correspondiente a la tercera hélice del homeodominio de la proteína (HD). La internalización de esta proteína se produce a 4°C, sugiriendo que este proceso no es dependiente de endocitosis. Los péptidos de hasta 100 aminoácidos producidos como proteínas de fusión con AntpHD penetran en las membranas celulares.

Entre otros homeodominios capaces de traslocación se incluyen el homeodominio Fushi tarazu (Ftz) y Engrailed (En). Muchos homeodominios comparten una tercera hélice altamente conservada.

5.3.3. CPP humanos

Los CPP humanos pueden evitar potenciales problemas de inmunogenicidad al introducirlos en un paciente humano. Entre los péptidos con secuencias de CPP se incluyen: Hoxa-5, Hox-A4, Hox-B5, Hox-B6, Hox-B7, HOX-D3, GAX, MOX-2 y FtzCPP. Todas estas proteínas comparten la secuencia observada en los AntpCPP. Entre otros CPP se incluyen Islote-1, interleuquina-1, factor de necrosis tumoral y la secuencia hidrofóbica del factor de crecimiento fibroblástico de Kaposi o péptido de señal de FGF-4, que es capaz de traslocación independiente de energía, receptor y endocitosis. Entre los CPP no confirmados se incluyen la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF).

6. Inhibidores de MK2 y tratamiento de las enfermedades o condiciones fibróticas

La proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MAPKAPK2 o MK2), un sustrato de serina/treonina quinasa posterior a p38MAPK, se ha implicado en muchas enfermedades inflamatorias complicadas por cicatrización y fibrosis (Lopes, L. et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 382(3):535-9, 2009). Entre ellas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, cáncer, hiperplasia intimal, fibrosis orgánica, adhesiones abdominales, enfermedad intestinal inflamatoria y artritis reumatoide. Además de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), entre otros trastornos que implican inflamación y fibrosis y que impactan en el pulmón se incluyen la lesión pulmonar aguda (LPA), el rechazo del trasplante de órgano (con el trasplante de pulmón, también un tratamiento de estadio más tardío para la FPI), la insuficiencia de órgano secundaria a sepsis, la insuficiencia pulmonar aguda, las enfermedades autoinmunitarias, tales como escleroderma y enfermedad obstructiva pulmonar crónica (EPOC).

El desarrollo de fibrosis es conocido que requiere inflamación, proliferación y producción de fibroblastos que resulta en células de fenotipo miofibroblástico (Horowitz J. et al., *Semin Respir Crit Care Med.*, 27(6):600-612, 2006). Se ha demostrado que MK2 controla la expresión génica a los niveles transcripcional y post-transcripcional (Neininger A. et al., *J Biol Chem.* 2002;277(5):3065-8, Thomas T. et al., *J Neurochem.*, 105(5): 2039-52, 2008; Johansen C. et al., *J Immunol.*, 176(3):1431-8, 2006; Rousseau S. et al., *EMBO J.* 21(23):6505-14, 2002) así como la arquitectura citoesquelética (Lopes, L. et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 382(3):535-9, 2009). Además, se ha demostrado que MK2 activado incrementa la traducción y estabilidad de los ARNm de citoquina inflamatoria y causa la reorganización de la actina, y que la inhibición de MK2 está asociada a menor inflamación (Ward, B. et al., *J Surg Res.*, 169(1):e27-36, 2011) and myofibroblast differentiation (Lopes, L. et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 382(3):535-9, 2009).

Juntos, estos datos sugieren que la inhibición de MK2 podría proporcionar beneficios terapéuticos a pacientes con trastornos o condiciones fibróticas, por ejemplo la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la lesión pulmonar aguda (LPA) y el rechazo del trasplante. A este respecto, la invención descrita ofrece un enfoque para la intervención en el proceso de inflamación y fibrosis utilizando inhibidores de MK2 de base peptídica penetrantes de la célula.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

Según un aspecto, la invención descrita proporciona una composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento según las reivindicaciones adjuntas.

Según una realización, la etapa de administración se realiza por vía intratraqueal (incluyendo mediante inhalación pulmonar), parenteral, intravenosa o intraperitoneal. Según otra realización, la etapa de administración se realiza por vía intratraqueal (incluyendo mediante inhalación pulmonar). Según otra realización, la etapa de administración se realiza de una vez como una dosis única. Según otra realización, la etapa de administración se realiza como una pluralidad de dosis durante un periodo de tiempo. Según otra realización, el periodo de tiempo es un día, una semana, un mes, un año o múltiplos de los mismos. Según otra realización, la etapa de administración se realiza por lo menos una vez al mes, por lo menos una vez a la semana o por lo menos una vez al día. Según otra realización, la composición farmacéutica comprende además por lo menos un agente terapéutico adicional. Según otra realización,

el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un colágeno de tipo V bovino purificado, un antagonista de receptor de IL-13, un inhibidor de proteína tirosina quinasa, un antagonista de receptor endotelial, un antagonista dual de receptor de endotelina, un análogo de prostaciclina, un anticuerpo monoclonal anti-CTGF, un antagonista de receptor de endotelina (A-selectivo), AB0024, un anticuerpo monoclonal de tipo lisil oxidasa 2 (LOXL2), un inhibidor de quinasa N-terminal de c-Jun (JNK), pirfenidona, IFN- γ 1b, un anticuerpo humano IgG4 pan-neutralizador contra la totalidad de las tres isoformas de TGF- β , un inhibidor de activación de TGF- β , una proteína pentraxina-2 humana recombinante (rhPTX-2), un anticuerpo biespecífico de IL-4/IL-13, un anticuerpo monoclonal humanizado con diana en la integrina α v β 6, N-acetilcisteína, sildenafilo, un antagonista de factor de necrosis tumoral (TNF) (etanercept) y una combinación de los mismos. Según otra realización, el agente terapéutico adicional es un glucocorticoide seleccionado del grupo que consiste en prednisona, budesónido, furoato de mometasona, propionato de fluticasona, furoato de fluticasona y una combinación de los mismos. Según otra realización, el agente terapéutico adicional es un broncodilatador seleccionado del grupo que consiste en un modificador de leucotrieno, un broncodilatador anticolinérgico, un agonista β 2 de acción corta y un agonista β 2 de acción prolongada y una combinación de los mismos. Según otra realización, el agente terapéutico adicional es un agente analgésico. Según otra realización, el agente terapéutico adicional es un agente antiinfeccioso.

Según otra realización, el portador se selecciona del grupo que consiste en un portador de liberación controlada, un portador de liberación retardada, un portador de liberación sostenida y un portador de liberación a largo plazo. Según otra realización, la composición farmacéutica se encuentra en una forma de polvos secos. Según otra realización, los polvos secos comprenden micropartículas con un diámetro aerodinámico de la mediana de la masa (DAMM) de entre 1 y 5 micrómetros. Según otra realización, la cantidad terapéutica de la composición farmacéutica se administra mediante un dispositivo de inhalación. Según otra realización, el dispositivo de inhalación es un nebulizador. Según otra realización, el dispositivo de inhalación es un inhalador de dosis medida (IDM). Según otra realización, el dispositivo de inhalación es un inhalador de polvos secos (IPS). Según otra realización, el dispositivo de inhalación es un nebulizador de polvos secos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra el rendimiento de administración de insulina seca mediante pulverización pura.

La figura 2 muestra la distribución de los tamaños de partícula de la insulina secada mediante pulverización, determinada mediante un impactador de cascada Anderson (ICA).

La figura 3 muestra la comparación de eficiencia y caudal del inhalador de polvos secos (IPS) MicroDose vs. dos inhaladores de polvos secos (IPS) pasivos.

La figura 4 muestra la independencia respecto del caudal del péptido puro secado por pulverización.

La figura 5 muestra una micrografía representativa de un péptido secado por pulverización (no insulina).

La figura 6 muestra la distribución de los tamaños de partícula de un péptido secado por pulverización (no insulina).

La figura 7 muestra la distribución de los tamaños de partícula de una combinación de lactosa micronizada, que se determina mediante un impactador de próxima generación (IPG).

La figura 8 muestra el rendimiento de administración de una molécula pequeña micronizada (mezcla de agentes muscarínicos de acción prolongada (AMAP)/lactosa)

La figura 9 muestra el análisis inmunohistoquímico de pulmones humanos con fibrosis pulmonar idiopática, FPI incluidos en parafina, que muestra la localización nuclear de MK2 activado (es decir, Phospho-Thr³³⁴-MAPKAPK2) en el foco fibroblástico. Pulmones normales (panel izquierdo); sección de biopsia de tejido pulmonar con FPI (panel derecho). El gráfico insertado muestra la disrupción del revestimiento epitelial en los focos con células teñidas positivas (gris oscuro) para MK2 activado. Las abreviaturas mostradas en la figura 9 son las siguientes: PN (arquitectura de pulmón normal con sacos alveolares); VR (vías respiratorias); FF (focos fibroblásticos de un explante de tejido pulmonar con FPI).

La figura 10 muestra un diagrama esquemático para someter a ensayo la capacidad de un compuesto de inhibir el desarrollo de fibrosis en el modelo en ratón de bleomicina para fibrosis pulmonar (modelo de prevención de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI)). Solución salina tamponada con fosfato (PBS) o MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID n° 1)) administrada diariamente, mediante nebulización o por vía intraperitoneal, desde el día 7 después de la administración de bleomicina tras ceder la inflamación y activarse los mecanismos fibróticos, hasta el día 21 después de la administración de bleomicina, cuando se observa fibrosis significativa.

La figura 11 muestra que la terapia de inhalación y la administración sistémica de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID n° 1) protegen frente a la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones. Panel superior: tinción de hematoxilina y eosina (H+E) de tejidos pulmonares de ratón representativos el día 21. Panel inferior: la tinción tricrómica de azul de Masson de los mismos campos reveló amplia deposición de colágeno (flechas) con lesión por bleomicina. Abreviaturas: VR: vías respiratorias; PN: arquitectura de pulmón normal; FF: focos fibróticos; V: vena.

La figura 12 muestra que MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID n° 1) evita la deposición significativa de colágeno debido a la lesión por bleomicina. Los valores representan medias \pm SEM. n = 5 animales en cada grupo. * p <0,05; *** p <0,01; **** p <0,001. Índice de colágeno = factor constante para colágeno 7,5 x concentraciones de hidroxiprolina.

La figura 13 muestra que MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID n° 1) evita la fibrosis debida a la lesión por bleomicina de una manera dependiente de la dosis. La tinción de tricromía de azul de Masson de

secciones de pulmón de ratones con bleomicina. (A) MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1); (B) MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEC ID nº 19).

La figura 14 muestra que MMI-0100 administrado sistemáticamente (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) anula la activación de células T sistémicas debido a la lesión por bleomicina. Los valores representan medias \pm SEM. Valor 'p' <0,01. n = 4 animales /grupo. Las abreviaturas mostradas en la figura 14 son las siguientes: (i) ratones de tipo salvaje tratados con PBS (PBS); (ii) los ratones con bleomicina tratados con PBS (BLEO); (iii) los ratones con bleomicina tratados con MMI-0100 nebulizado (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1)) (BLEO + MMI-0100 (NEB)); e (iv) los ratones con bleomicina tratados con MMI-0100 intraperitoneal (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1)) (BLEO + MMI-0100 (IP)).

La figura 15 muestra un diagrama esquemático para someter a ensayo la capacidad de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) de anular la progresión de la fibrosis en el modelo con bleomicina de fibrosis pulmonar idiopática (modelo de tratamiento de la FPI). PBS o MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1)) se administró mediante nebulización o por vía intraperitoneal a dosis de 50 μ g/kg diarios desde el día 14 posterior a la administración de bleomicina hasta el día 28 posterior a la administración de bleomicina.

La figura 16 muestra que la administración sistémica (IP) o nebulizada (NEB) de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) mejora la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones. Panel superior: Tinción de hematoxilina y eosina (H+E); panel inferior: Tinción tricrómica de azul de Masson de los mismos campos. Las abreviaturas mostradas en la figura 16 son las siguientes: PBS (ratones de tipo salvaje tratados con PBS); BLEO (ratones con bleomicina tratados con PBS); MMI-0100 (NEB) (ratones con bleomicina tratados con MMI-0100 nebulizado (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1))); MMI-0100 (IP) (ratones con bleomicina tratados con MMI-0100 intraperitoneal (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1))); NL (arquitectura de pulmón normal con sacos alveolares); VR (vías respiratorias); FF (focos fibroblásticos de un explante de tejido pulmonar con FPI).

La figura 17 muestra que MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1)) detiene la deposición significativa de colágeno debido a la lesión por bleomicina. Las abreviaturas mostradas en la figura 17 son las siguientes: PBS (ratones de tipo salvaje tratados con PBS); BLEO (ratones con bleomicina tratados con PBS); BLEO+MMI-0100 (NEB) (ratones con bleomicina tratados con MMI-0100 nebulizado (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1))); BLEO+MMI-0100 (IP) (ratones con bleomicina tratados con MMI-0100 intraperitoneal (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1))). Los valores representan medias \pm SEM. n = 5 animales en cada grupo. Índice de colágeno = factor constante para colágeno 7,5 x concentraciones de hidroxiprolina.

La figura 18 muestra una micrografía representativa de tinciones anti-phospho-Thr³³⁴-MAPKAPK2 (una forma activada de MK2) de secciones pulmonares (el día 28 posterior a la lesión con bleomicina) d (i) ratones de tipo salvaje tratados con PBS (PBS), (ii) ratones con bleomicina tratados con PBS (BLEO), (iii) ratones con bleomicina tratados con MMI-0100 nebulizado (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1)) (BLEO + MMI-0100 (NEB)); e (iv) los ratones con bleomicina tratados con MMI-0100 intraperitoneal (YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1)) (BLEO + MMI-0100 (IP)). Se sometieron ratones C57-BL/6 a lesión con bleomicina el día 0. El día 14, en ratones se administraron 50 μ g/kg de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) diariamente mediante inyección intraperitoneal (IP) o nebulizador (NEB) hasta el día 28 posterior a la lesión con bleomicina. Magnificaciones originales: 20X.

La figura 19 muestra moléculas de señalización clave implicadas en las rutas inflamatorias y fibróticas mediadas por TGF- β .

La figura 20 muestra que, 24 horas después de la administración final, MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) regula negativamente los niveles de citoquinas inflamatorias circulantes en el modelo de ratón con bleomicina de fibrosis pulmonar idiopática (modelo de tratamiento).

La figura 21 muestra que MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) inhibe la activación de la alfa-actina de músculo liso de miofibroblasto (α -SMA) en el modelo de tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática. Se sometieron ratones C57-BL/6 a lesión con bleomicina el día 0. Del día 14 al día 28, en ratones se administraron 50 μ g/kg/día de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) mediante inyección intraperitoneal (IP) o nebulizador (NEB). Se inmunotñieron contra α -SMA secciones de tejido pulmonar fijado en formalina. La tinción de control fue con anticuerpo IgG secundario biotinilado. Se utilizó peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina con 3,3'-diaminobencideno como sustrato y se contratiñeron los núcleos con hematoxilina. Magnificaciones originales: 20X

La figura 22 muestra la modulación de la activación de los miofibroblastos inducida por TGF- β mediante inhibidores del péptido MK2 en fibroblastos de pulmón fetal humano normal (IMR-90). Se pretrataron células IMR-90 con MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) o MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEC ID nº 19) a las dosis indicadas durante 1 h y después se cultivaron en presencia o ausencia de TGF- β 1 (2 ng/ml) durante 48 h. Los lisados celulares se inmunotransfirieron contra anticuerpos para α -SMA (un marcador de activación de miofibroblastos) y GAPDH (control de carga).

La figura 23 muestra la modulación de la expresión de fibronectina mediada por TGF- β en fibroblastos pulmonares de feto humano (IMR-90). Se pretrataron células IMR90 con MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) o MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEC ID nº 19) a las dosis indicadas durante 1 h y después se cultivaron en presencia o ausencia de TGF- β 1 (2 ng/ml) durante 72 h. Se midió la fibronectina como fragmentos secretados en el medio acondicionado. Se cargaron en cada carril cantidades iguales (14 μ g) de proteínas totales del medio acondicionado.

La figura 24 muestra las moléculas de señalización clave implicadas en la regulación de la migración de las células madre mesenquimales por fibronectina mediante activación mediada por integrina $\alpha 5 \beta 1$ de PDGFR- β (Veevers-Lowe J et al., J Cell Sci, 124: 1288-1300, 2011).

- 5 La figura 25 muestra los incrementos del nivel de una forma activada de quinasa MK2 en pacientes de FPI. (A) Análisis cuantitativo de los niveles de fosfo-Thr³³⁴ en tejidos normales y de FPI; (C) Correlación entre la función pulmonar y la activación de MK2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 10 La invención descrita proporciona una composición y método para tratar una fibrosis pulmonar en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método la administración de una cantidad terapéutica de una composición que comprende un polipéptido con la secuencia de aminoácidos YARAAARQARAKALARQLGVAA (MMI-0100; SEC ID nº 1) o un equivalente funcional del mismo.

15 Glosario

La expresión "vías respiratorias" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a las vías a través de las cuales entra y sale aire del cuerpo. Las vías respiratorias pulmonares comprenden aquellas partes del tracto respiratorio a través de las que pasa el aire durante la respiración.

- 20 La expresión "obstrucción de las vías respiratorias" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier reducción anormal del flujo de aire. La resistencia al flujo de aire puede producirse en cualquier sitio en las vías respiratorias desde las vías respiratorias superiores a los bronquios terminales.

- 25 La expresión "enfermedad de las vías respiratorias" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una enfermedad que afecta a los tubos (vías respiratorias) que transportan oxígeno y otros gases de entrada y salida de los pulmones. Entre las enfermedades de las vías respiratorias se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), incluyendo asma, enfisema y bronquitis crónica.

- 30 La expresión "enfermedad de los tejidos pulmonares" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una enfermedad que afecta a la estructura del tejido pulmonar, p.ej., el intersticio pulmonar. La cicatrización o inflamación del tejido pulmonar impide que los pulmones se expandan por completo ("enfermedad pulmonar restrictiva"). También provoca que los pulmones sean menos capaces de incorporar oxígeno (oxigenación) y de liberar dióxido de carbono. Entre los ejemplos de enfermedades del tejido pulmonar se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la lesión pulmonar aguda (LPA), la fibrosis pulmonar inducida por radiación y una condición fibrótica asociada al trasplante pulmonar. La sarcoidosis es una enfermedad en la que se produce hinchazón (inflamación) de los ganglios linfáticos, pulmones, hígado, ojos, piel u otros tejidos.

- 40 La expresión "intersticio del pulmón" o "intersticio pulmonar" se utilizan intercambiamente en la presente memoria para referirse a una zona situada entre el epitelio del espacio aéreo y el mesotelio pleural en el pulmón. Las fibras de las proteínas matriciales, el colágeno y la elastina, son los componentes principales del intersticio pulmonar. La función primaria de estas fibras es formar un andamiaje mecánico que mantiene la integridad estructural durante la ventilación.

- 45 La expresión "zona de superficie accesible" o "ZSA" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una zona superficial de una biomolécula que está expuesta a solvente. La expresión "superficie accesible por solvente" o "SAS" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un porcentaje de la superficie de un residuo dado que es accesible al solvente. Se calcula como la proporción entre ZSA de un residuo en la estructura tridimensional y la SAS máxima de su conformación peptídica extendida.

- 50 Las expresiones "residuo aminoácido" o "aminoácido" o "residuo" se utilizan intercambiamente para referirse a un aminoácido que se incorpora en una proteína, un polipéptido o un péptido, incluyendo, aunque sin limitación, un aminoácido natural y análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a la de los aminoácidos naturales. Los aminoácidos pueden ser L-aminoácidos o D-aminoácidos. Un aminoácido puede ser sustituido por un aminoácido sintético, que se altera para incrementar la semivida del péptido, para incrementar la potencial del péptido o para incrementar la biodisponibilidad del péptido.

En la presente memoria predominantemente se utiliza la denominación de una sola letra de los aminoácidos. Tal como es bien conocido por el experto en la materia, tales denominaciones de una sola letra son las siguientes:

- 60 A es alanina; C es cisteína; D es ácido aspártico; E es ácido glutámico; F es fenilalanina; G es glicina; H es histidina; I es isoleucina; K es leucina; L es leucina; M es metionina; N es asparagina; P es prolina; Q es glutamina; R es arginina; S es serina; T es treonina; V es valina; W es triptófano e Y es tirosina.

- 65 Lo siguiente representa grupos de aminoácidos que son sustituciones conservadoras de uno respecto a otro: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4)

Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

5 Tal como se utilizan en la presente memoria, las formas singulares "un", "una", "el" o "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a un "polipéptido" es a uno o más polipéptidos.

10 El término "adición" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la inserción de una o más bases, o de uno o más amonácidos, en una secuencia.

15 El término "administrar" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a dispensar, suministrar, aplicar, proporcionar, repartir o contribuir. Los términos "administrar" o "administración" se utilizan intercambiamente e incluyen la administración in vivo, además de la administración directamente en tejido ex vivo. Generalmente, las composiciones pueden administrarse sistémicamente por vía oral, bucal, parenteral, tópica, mediante inhalación o insuflado (es decir, por la boca o la nariz), o rectalmente en formulaciones de dosis unitaria que contienen los portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales según se desee, o pueden administrarse localmente por medios tales como, aunque sin limitación, inyección, implantación, injertación, aplicación tópica o por vía parenteral. La administración adicional puede llevarse a cabo, por ejemplo, por vía intravenosa, pericárdica, oral, mediante implante, por vía transmucosal, transdérmica, tópica, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, intralinfática, intralesional o epidural. La administración puede llevarse a cabo, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces, y/o durante uno o más periodos prolongados.

25 La expresión "reacción alérgica" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una reacción de hipersensibilidad del sistema inmunológico. Las reacciones alérgicas se producen frente a sustancias ambientales normalmente inocuas conocidas como alérgenos; estas reacciones son adquiridas, predecibles y rápidas. La reacción alérgica se caracteriza por la activación excesiva de determinados glóbulos blancos denominados mastocitos y basófilos por un tipo de anticuerpo conocido como IgE, que resultan en una respuesta inflamatoria extrema. Entre las reacciones alérgicas comunes se incluyen eccema, urticaria, rinitis alérgica, ataques de asma, alergias alimentarias y reacciones al veneno de insectos picadores, tales como avispas y abejas.

30 La expresión "α-actina de músculo liso" o "α-SMA" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una proteína actina, alfa-actina-2 (ACTA2, también conocida como actina o actina de músculo liso aórtica) aislada por primera vez en las células de músculo liso vasculares. Las actinas son proteínas altamente conservadas que se expresan en todas las células eucarióticas. Los filamentos de actina forman parte del citoesqueleto y desempeñan funciones esenciales en la regulación de la forma y movimiento celulares. Se han identificado seis isotipos de actina diferentes en las células de mamífero. Cada una está codificada por un gen separado y se expresa de una manera regulada en el desarrollo y específica del tejido. Las actinas citoplasmáticas alfa y beta se expresan en una amplia diversidad de células, mientras que la expresión de las actinas alfa esquelética, alfa cardíaca, alfa vascular y gamma entérica está más restringida a tipos especializados de células musculares. El gen de la actina alfa de músculo liso es uno de los pocos genes cuya expresión está relativamente restringida a las células de músculo liso vascular aunque actualmente se utiliza más comúnmente como marcador de la formación de miofibroblastos. La expresión de actina alfa de músculo liso está regulada por hormonas y la proliferación celular y resulta alterada por condiciones patológicas, incluyendo la transformación oncogénica y la aterosclerosis.

45 El término "alveolo" o "alveolos" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una estructura anatómica que presenta la forma de una cavidad hueca. Los alveolos pulmonares, presentes en el pulmón, son salientes esféricos de los sitios respiratorios de intercambio gaseoso con la sangre. Los alveolos contienen algunas fibras de colágeno y elásticas. Las fibras elásticas permiten que los alveolos se estiren al llenarse de aire al inspirar. A continuación, recuperan su forma durante la espiración a fin de expulsar el aire rico en dióxido de carbono.

50 El término "bleomicina" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un antibiótico glucopéptido producido por la bacteria *Streptomyces verticillus*. Funciona induciendo roturas en la cadena de ADN e inhibiendo la incorporación de timidina en la cadena de ADN. La complicación más grave de la bleomicina es la fibrosis pulmonar y el deterioro de la función pulmonar.

55 La expresión "lavado broncoalveolar" o "LBA" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un procedimiento médico en el que se pasa un broncoscopio por la boca o nariz hacia el interior de los pulmones y se arroja un chorro de líquido en una zona pequeña del pulmón y seguidamente se recolecta para su examen. El LBA típicamente se lleva a cabo para diagnosticar enfermedades pulmonares. Comúnmente se utiliza el LBA para diagnosticar infecciones en personas con problemas del sistema inmunológico, neumonía en personas bajo ventilación mecánica, algunos tipos de cáncer pulmonar y cicatrización del pulmón (enfermedad pulmonar intersticial). LBA es la manera más común de muestrear los componentes del líquido de revestimiento epitelial (LRE) y para determinar la composición de proteínas de las vías respiratorias pulmonares y con frecuencia se utiliza en investigación inmunológica como medio de muestreo de células o niveles de patógeno en el pulmón.

65 El término "portador" y la expresión "portador farmacéutico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un

agente o vehículo inerte farmacéuticamente aceptable para administrar uno o más agentes activos en un sujeto y con frecuencia se denomina "excipiente". El portador (farmacéutico) debe ser de pureza suficientemente elevada y de toxicidad suficientemente baja para que resulte adecuado para la administración en el sujeto bajo tratamiento. El portador (farmacéutico) además debe mantener la estabilidad y biodisponibilidad del agente activo, p.ej. un polipéptido de la invención descrita. El portador (farmacéutico) puede ser líquido o sólido y se selecciona, considerando la manera planificada de administración, para proporcionar el volumen, consistencia, etc. deseados en combinación con un agente activo y otros componentes de una composición dada. El portador (farmacéutico) puede ser, aunque sin limitación, un agente de unión (p.ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil-metilcelulosa, etc.), un agente de carga (p.ej., lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos, hidrogenofosfato de calcio, etc.), un lubricante (p.ej., estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato sódico, acetato sódico, etc.), un desintegrante (p.ej., almidón, glicolado de almidón sódico, etc.) o un agente humectante (p.ej., laurilsulfato sódico, etc.). Entre otros portadores (farmacéuticos) adecuados para las composiciones de la invención descrita se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatinas, amilosas, estearatos de magnesio, talcos, ácidos silícicos, parafinas viscosas, hidroximetilcelulosas, polivinilpirrolidonas y similares. Las composiciones destinadas a la administración parenteral de un polipéptido de la invención descrita pueden incluir portadores (farmacéuticos), tales como soluciones acuosas estériles, soluciones no acuosas en solventes comunes, tales como alcoholes, o soluciones del polipéptido en una base aceite líquida.

El término "colágeno" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo de proteínas naturales presentes en músculo y tejidos conectivos de los mamíferos. Es el componente principal del tejido conectivo y es la proteína más abundante en los mamíferos, constituyendo aproximadamente 25% a 35% del contenido de proteínas del cuerpo completo. El colágeno, en forma de fibrillas alargadas, se encuentra mayoritariamente en tejidos fibrosos, tales como tendón, ligamento y piel, y también es abundante en córnea, cartílago, hueso, vasos sanguíneos, tracto digestivo y discos intervertebrales. Hasta hoy, se han identificado 29 tipos de colágeno y más de 90% del colágeno corporal es de tipo I (piel, tendones, vascular, ligamentos, órganos, hueso), de tipo II (cartílago), de tipo III (reticulado (componente principal de las fibras reticulares) y de tipo IV (que forma las bases de la membrana basal celular).

El término "condición" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una diversidad de estados de salud y pretende incluir trastornos o enfermedades causados por cualquier mecanismo, trastorno o lesión subyacente.

El término "citoquina", que se refiere a sustancias proteicas solubles pequeñas secretadas por células que pueden presentar una diversidad de efectos sobre otras células, se utiliza genéricamente para referirse a muchas moléculas de señalización, incluyendo, aunque sin limitación, linfoquinas, interleuquinas y quimioquinas. Las citoquinas median en muchas funciones fisiológicas importantes, incluyendo el crecimiento, el desarrollo, la cicatrización de heridas y la respuesta inmunológica. Actúan mediante unión a sus receptores específicos celulares situados en la membrana celular que permiten que se inicie una clara cascada de transducción de señales en la célula, que eventualmente conducirá a cambios bioquímicos y fenotípicos en las células diana. Generalmente, las citoquinas actúan localmente, aunque se ha encontrado que algunas presentan efectos inmunomoduladores sistémicos, con efectos pleiotrópicos autocrinos, paracrinos y endocrinos similares a los de las hormonas. Entre ellas se incluyen las citoquinas de tipo I, que comprenden muchas de las interleuquinas, así como varios factores de crecimiento hematopoyético; citoquinas de tipo II, incluyendo los interferones y la interleuquina-10; las moléculas relacionadas con el factor de necrosis tumoral ("TNF"), incluyendo TNF- α y linfotóxina; elementos de la superfamilia de inmunoglobulinas, incluyendo la interleuquina-1 ("IL-1" y las quimioquinas, una familia de moléculas que desempeñan un papel crucial en una amplia diversidad de funciones inmunológicas e inflamatorias. La misma citoquina puede presentar efectos diferentes sobre una célula dependiendo del estado de la célula. Las citoquinas con frecuencia regulan la expresión e inducen cascadas de otras citoquinas.

Los términos "enfermedad" y "trastorno", tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a un deterioro de la salud o una condición de funcionamiento anormal, con independencia de la causa (sea hereditaria, ambiental, dietética, infecciosa, debida a traumatismo o de otro tipo). Entre los trastornos puede incluirse, por ejemplo, aunque sin limitarse a ellos, enfermedades inflamatorias y fibróticas, fibrosis, lesión pulmonar aguda, fibrosis inducida por radiación, rechazo del trasplante, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), choque endotóxico, enfermedad inflamatoria localizada, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad de Alzheimer, enfermedades oncológicas, isquemia neural, enfermedades autoinmunitarias del tejido conectivo y sistémicas, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren, escleroderma, vasculitis, hiperplasia intimal, estenosis, restenosis, aterosclerosis, tumores y metástasis de células de músculo liso, espasmo de músculo liso, angina, angina de Prinzmetal, isquemia, ictus, bradicardia, hipertensión, hipertrofia cardíaca, insuficiencia renal, ictus, hipertensión pulmonar, asma, toxemia del embarazo, trabajo de parto prematuro, preeclampsia, eclampsia, enfermedad o fenómeno de Raynaud, uremia hemolítica, fisura anal, acalasia, impotencia, migraña, lesión muscular isquémica asociada a espasmo de músculo liso, vasculopatía, bradiarritmia, insuficiencia cardíaca congestiva, miocardio aturdido, hipertensión pulmonar, disfunción diastólica, gliosis (proliferación de astrocitos, y puede incluir la deposición de matriz extracelular (MEC), la deposición en zonas dañadas del sistema nervioso central), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (es decir, enfermedades del tracto respiratorio caracterizadas por la obstrucción o limitación de las vías respiratorias; incluye, aunque sin limitarse a ellas, bronquitis

crónica, enfisema y asma crónico), osteopenia, disfunción endotelial, inflamación, artritis degenerativa, espondilitis anquilosante, enfermedad de Guillain-Barré, enfermedad infecciosa, sepsis, choque endotoxémico, soriasis, enteritis por radiación, cirrosis, fibrosis intersticial, fibrosis pulmonar (incluyendo la fibrosis pulmonar idiopática), colitis, apendicitis, gastritis, laringitis, meningitis, pancreatitis, otitis, daño por reperfusión, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, neuropatía periférica, esclerosis múltiple, alergia, enfermedades cardiometabólicas, obesidad, diabetes mellitus de tipo II, diabetes mellitus de tipo I y NASH/cirrosis.

El término "dominio" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una región de una proteína con una estructura y función terciaria características y a cualquiera de las subunidades tridimensionales de una proteína que juntas constituyen su estructura terciaria formada mediante plegamiento de su cadena peptídica lineal.

La expresión "dominio terapéutico" (también denominado "DT") tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un péptido, segmento o variante de péptido, o derivado del mismo, con identidad sustancial respecto al péptido KALARQLGVAA (SEC ID nº 2) o segmento del mismo. Los dominios terapéuticos por sí mismos generalmente no son capaces de penetrar en la membrana plasmática de las células de mamífero. Una vez dentro de la célula, los dominios terapéuticos pueden inhibir la actividad de quinasa de un grupo específico de quinasas.

La expresión "péptido penetrante de la célula" (también denominado "PPC", "dominio de transducción de proteína", "DTP", "péptido troyano", "secuencia de translocación membranar" y "proteína permeable celular") tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una clase de péptidos generalmente capaces de penetrar en la membrana plasmática de las células de mamífero. Se refiere además a un péptido, segmento de péptido, o variante o derivado del mismo, con identidad sustancial respecto al péptido YARAAARQARA (SEC ID nº 11), o un segmento funcional del mismo, y a un péptido, segmento de péptido o variante o derivado del mismo, que es funcionalmente equivalente a SEC ID nº 11. Los PPC generalmente presentan una longitud de 10 a 16 aminoácidos y son capaces de transportar compuestos de muchos tipos y pesos moleculares a través de las células de mamífero. Tales compuestos incluyen, aunque sin limitarse a ellos, moléculas efectoras, tales como proteínas, ADN, péptidos conjugados, oligonucleótidos y partículas pequeñas, tales como liposomas. Los PPC unidos o fusionados químicamente a otras proteínas ("proteínas de fusión") todavía son capaces de penetrar en la membrana plasmática y entrar en las células.

La expresión "matriz extracelular" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un andamiaje en el medio externo de una célula con la que interactúa la célula mediante receptores de superficie celular específicos. La matriz extracelular está compuesta de una malla entrelazada de proteínas fibrosas y glucosaminoglucanos (GAG). Entre los ejemplos de proteínas fibrosas observados en la matriz extracelular se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, colágeno, elastina, fibronectina y laminina. Entre los ejemplos de GAG observados en la matriz extracelular se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, proteoglicanos (p.ej., sulfato de heparina), sulfato de condroitina, sulfato de queratina y polisacárido no proteoglicano (p.ej., ácido hialurónico). El término "proteoglicano" se refiere a un grupo de glucoproteínas que contienen una proteína nuclear a la que se unen uno o más glucosaminoglucanos. La matriz extracelular sirve a muchas funciones, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, proporcionar soporte y anclaje a las células, segregar un tejido de otro tejido y regular la comunicación intracelular.

Las expresiones "equivalente funcional" o "funcionalmente equivalente" se utilizan intercambiamente en la presente memoria para referirse a sustancias, moléculas, polinucleótidos, proteínas, péptidos o polipéptidos que presentan efectos o usos similares o idénticos. Un polipéptido funcionalmente equivalente al polipéptido YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1), por ejemplo, puede presentar una actividad biológica, p.ej., una actividad inhibidora, parámetros cinéticos, inhibición salina, actividad dependiente de un cofactor y/o un tamaño unitario funcional que es sustancialmente similar o idéntico al del polipéptido expresado de SEC ID nº 1.

Entre los ejemplos de polipéptidos funcionalmente equivalentes a YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1) se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, un polipéptido de secuencia de aminoácidos FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEC ID nº 3), un polipéptido de secuencia de aminoácidos KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEC ID nº 4), un polipéptido de secuencia de aminoácidos YARAAARQARAKALARQLAVA (SEC ID nº 5), un polipéptido de secuencia de aminoácidos YARAAARQARAKALARQLGVA (SEC ID nº 6), y un polipéptido de secuencia de aminoácidos HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEC ID nº 7).

El péptido MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) de secuencia de aminoácidos YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1) descrito en la presente invención comprende una proteína de fusión en la que un péptido penetrante de la célula (PPC: YARAAARQARA, SEC ID nº 11) se encuentra operablemente unido a un dominio terapéutico (KALARQLGVAA, SEC ID nº 2) con el fin de potenciar la eficacia terapéutica.

Entre los ejemplos de polipéptidos funcionalmente equivalentes al dominio terapéutico (DT: KALARQLGVAA, SEC ID nº 2) del polipéptido YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1) se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, un polipéptido de secuencia de aminoácidos KALARQLAVA (SEC ID nº 8), un polipéptido de secuencia de aminoácidos KALARQLGVA (SEC ID nº 9), y un polipéptido de secuencia de aminoácidos KALARQLGVAA (SEC ID nº 10).

Entre los ejemplos de polipéptidos funcionalmente equivalentes al péptido penetrante de la célula (PPC: YARAAARQARA, SEC ID nº 11) del polipéptido YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1) se incluyen, aunque

sin limitarse a ellos, un polipéptido de secuencia de aminoácidos WLRRIKAWLRRRIKA (SEC ID nº 12), un polipéptido de secuencia de aminoácidos WLRRRIKA (SEC ID nº 13), un polipéptido de secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR (SEC ID nº 14), un polipéptido de secuencia de aminoácidos WLRRIKAWLRRRI (SEC ID nº 15), un polipéptido de secuencia de aminoácidos FAKLAARLYR (SEC ID nº 16), un polipéptido de secuencia de aminoácidos KAFAKLAARLYR (SEC ID nº 17), y un polipéptido de secuencia de aminoácidos HRRIKAWLKKI (SEC ID nº 18).

El término "endógeno" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que crece o se origina en el interior o se deriva internamente.

El término "endotelio" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una delgada capa de células que reviste la superficie interior de los vasos sanguíneos, formando una interfaz entre la sangre circulante en el lumen y el resto de la pared vascular. Las células endoteliales que revisten todo el sistema circulatorio, desde el corazón hasta el capilar más pequeño. Estas células reducen la turbulencia del flujo de sangre permitiendo que el líquido sea bombeado más lejos.

El término "eosinófilos" o "granulocitos eosinófilos" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a glóbulos blancos responsables de combatir los parásitos multicelulares y determinadas infecciones en los vertebrados. Son granulocitos que se desarrollan durante la hematopoyesis en la médula ósea antes de migrar hacia la sangre. Junto con los mastocitos, también controlan mecanismos asociados a alergia y asma. Tras la activación, los eosinófilos ejercen diversas funciones, incluyendo: (1) producción de proteínas de gránulos catiónicos y su liberación mediante degranulación, (2) producción de especies de oxígeno reactivo, tales como, superóxido, peróxido e hipobromito (ácido hipobromoso, que es producida preferentemente por la peroxidasa de los eosinófilos), (3) producción de mediadores lipídicos, tales como eicosanoides de las familias de leucotrienos y prostaglandinas, (4) producción de factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento transformante (TGF- β), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y (5) producción de citoquinas, tales como IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 y TNF- α .

El término "epitelio" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un tejido compuesto de células que revisten las cavidades y superficies de estructuras en todo el cuerpo. La superficie basal del epitelio se encuentra orientada hacia el tejido conectivo subyacente y las dos capas están separadas por una membrana basal.

El término "extravasación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al movimiento de componentes celulares de la sangre desde los capilares a los tejidos que los circundan (diapedesis). En el caso de la metástasis maligna del cáncer, se refiere a células de cáncer que salen de los capilares y entran en órganos.

El término "exudación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un proceso por el que un líquido del sistema circulatorio pasa a través de las paredes de los vasos sanguíneos al interior de lesiones o zonas de inflamación. Los exudados sanguíneos contienen algunas o todas las proteínas plasmáticas, glóbulos blancos, plaquetas y glóbulos rojos.

El término "fibrina" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una proteína fibrosa que participa en la coagulación de la sangre. Es una proteína fibrilar que se polimeriza para formar una "malla" que forma un tapón hemostático o coágulo (junto con las plaquetas) sobre un sitio de herida. La fibrina participa en la transducción de señales, la coagulación de la sangre, la activación de las plaquetas y la polimerización de las proteínas.

El término "fibroblasto" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una célula del tejido conectivo que produce y secreta las proteínas de la matriz extracelular, incluyendo, aunque sin limitación, el colágeno. Los fibroblastos, el tipo celular más común presente en los tejidos conectivos, desempeña un papel importante en la cicatrización de heridas. Al igual que otras células del tejido conectivo, los fibroblastos se derivan del mesénquima primitivo (un tipo de tejido conectivo laxo derivado de las tres capas germinales y situado en los embriones). En determinadas situaciones, las células epiteliales pueden dar lugar a fibroblastos, un proceso denominado transición epitelial-mesenquimatosa. Los fibroblastos y fibrocitos son dos estados de las mismas células, siendo las primeras el estado activado, y el segundo, el estado menos activo, implicado en el mantenimiento y metabolismo de los tejidos, donde ocasionalmente se utilizan ambos términos intercambiamente.

El término "miofibroblastos" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a fibroblastos en zonas de lesión que presentan algunas características de músculo liso, tales como las propiedades contráctiles y fibras, y se cree que producen, temporalmente, colágeno de tipo III. Aunque existen muchas maneras posibles de desarrollo de los miofibroblastos, los miofibroblastos son células que presentan una diferenciación intermedia entre fibroblastos y células de músculo liso. En muchos órganos, como el hígado, el pulmón y el riñón, se encuentran implicadas principalmente en la fibrosis. En los tejidos de la lesión, están implicados en el fortalecimiento de la lesión (mediante deposición de fibras extracelulares de colágeno) y después en la contracción de la herida (mediante contracción intracelular y alineación concomitante de las fibras de colágeno mediante tracción mediada por integrina de los haces de colágeno).

El término "fibronectina" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una glucoproteína de matriz extracelular

- de elevado peso molecular (~440 kDa) que se une a proteínas receptores de matriz de superficie celular transmembranales ("integrinas") y a componentes de la matriz extracelular, tales como colágeno, fibrina y proteoglicanos de sulfato de heparán (p.ej., sindecanos). La fibronectina existe en forma de un dímero, que consiste en dos monómeros prácticamente idénticos unidos mediante una pareja de enlaces disulfuro. Existen múltiples isoformas de la fibronectina. La fibronectina plasmática es soluble y circula en la sangre y otros líquidos corporales, donde se cree que potencia la coagulación sanguínea, la cicatrización de heridas y la fagocitosis. Las demás isoformas se ensamblan sobre la superficie de las células y son depositadas en la matriz extracelular como fibrillas de fibronectina altamente insolubles. Las fibrillas de fibronectina que se forman sobre o próximas a la superficie de los fibroblastos habitualmente se alinean con fibras de estrés de actina intracelular contiguas, las cuales estimulan el ensamblaje de las moléculas de fibronectina secretadas, formando fibrillas, e influyen sobre la orientación de las fibrillas. La fibronectina desempeña un papel importante en la adhesión celular, crecimiento celular, migración celular y diferenciación celular y resulta importante para procesos tales como la cicatrización de heridas y el desarrollo embrionario.
- 15 El término "fibrosis" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la formación o desarrollo de tejido conectivo fibroso en exceso en un órgano o tejido como resultado de la lesión o inflamación de una parte o de la interferencia con su suministro sanguíneo. Puede ser una consecuencia de la respuesta de cicatrización normal que conduce a una cicatriz, un proceso reactivo anormal o sin causación conocida o entendida.
- 20 El término "inhalación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al acto de aspirar hacia el interior con la respiración un vapor medicado.
- El término "insuflado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al acto de administrar aire, un gas o unos polvos bajo presión en una cavidad o cámara del cuerpo. Por ejemplo, el insuflado nasal se refiere al acto de administrar aire, un gas o unos polvos bajo presión por la nariz.
- 25 La expresión "dispositivo de administración por inhalación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una máquina/aparato o componente que produce gotas pequeñas o un aerosol a partir de una formulación de aerosol líquida o de polvos secos y que se utiliza para la administración por la boca con el fin de conseguir la administración pulmonar de un fármaco, p.ej., en solución, polvos y similares. Entre los ejemplos de dispositivo de administración por inhalación se incluye, aunque sin limitarse a ellos, un nebulizador, un inhalador de dosis medida y un inhalador de polvos secos (IPS)
- 30 El término "nebulizador" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un dispositivo utilizado para administrar medicación líquida en forma de una niebla inhalada en los pulmones.
- 35 La expresión "inhalador de dosis medida", "IDM" o "inhalador" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un dispositivo manual presurizado que utiliza propelentes para administrar una cantidad específica de medicina ("dosis medida") en los pulmones de un paciente. El término "propelente" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un material que se utiliza para expulsar una sustancia, habitualmente mediante presión de un gas, a través de una boquilla convergente, divergente. La presión puede ser de un gas comprimido, o de un gas producido mediante una reacción química. El material de expulsión puede ser un gas, líquido, plasma o, antes de la reacción química, un sólido, líquido o gel. Los propelentes utilizados en los inhaladores de dosis medida presurizados son gases licuados, tradicionalmente clorofluorocarburos (CFC) y crecientemente, hidrofluoroalcanos (HFA). Entre los propelentes adecuados se incluyen, por ejemplo, un clorofluorocarburo (CFC), tal como triclorofluorometano (también denominado propelente 11), diclorodifluorometano (también denominado propelente 12) y 1,2-dicloro-1,1,2,2-tetrafluoroetano (también denominado propelente 114), un hidroclorofluorocarburo, un hidrofluorocarburo (HFC), tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (también denominado propelente 134a, HFC-134a o HFA-134a) y 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (también denominado propelente 227, HFC-227 o HFA-227), dióxido de carbono, éter dimetílico, butano, propano o mezclas de los mismos. En otras realizaciones, el propelente incluye un clorofluorocarburo, un hidroclorofluorocarburo, un hidrofluorocarburo o mezclas de los mismos. En otras realizaciones, se utiliza un hidrofluorocarburo como el propelente. En otras realizaciones, se utiliza HFC-227 y/o HFC-134a como propelente.
- 40 La expresión "inhalador de polvos secos" o "IPS" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un dispositivo similar a un inhalador de dosis medida, pero en el que el fármaco se encuentra en forma de polvos. El paciente exhala profundamente, se aplica la boquilla en la boca y seguidamente aspira rápidamente los polvos. Los inhaladores de polvos secos no requieren la temporización y coordinación que son necesarios con las MID.
- 45 El término "partículas" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un constituyente extremadamente pequeño (p.ej., nanopartículas, micropartículas o, en algunos casos, más grandes) dentro de los cuales, o sobre los cuales, se encuentra la composición tal como se describe en la presente memoria.
- 50 Las expresiones "fibrosis pulmonar", "fibrosis pulmonar idiopática" y "alveolitis fibrosante criptogénica" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a un componente mayor de la enfermedad pulmonar intersticial caracterizada por la proliferación anormal de los fibroblastos y la deposición de proteínas de la matriz extracelular que remodelan la estructura normal del tejido pulmonar y comprometen su función. Las lesiones características de la
- 55
- 60
- 65

fibrosis pulmonar idiopática son los focos de fibroblastos. Estos sitios muestran una replicación vigorosa de las células mesenquimatosas y una deposición exuberante de matriz extracelular nueva.

5 Las expresiones "loci fibróticos" o "focos fibróticos" tal como se utilizan en la presente memoria intercambiamente se refieren a una localización específica en un tejido formado o desarrollado por tejido fibroso excesivo.

10 La expresión "proteína de fusión" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una proteína o polipéptido construido mediante la combinación de múltiples dominios de proteína o polipéptidos con el fin de crear un único polipéptido o proteína con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas o polipéptidos originales. La creación de una proteína de fusión puede llevarse a cabo ligando o enlazando operativamente dos secuencias de nucleótidos diferentes que codifican cada dominio de proteína o polipéptido mediante tecnología de ADN recombinante, creando de esta manera una nueva secuencia polinucleótida que codifica la proteína de fusión deseada. Alternativamente, puede crearse una proteína de fusión mediante la unión química de los dominios de proteína deseados.

15 El término "idiopático" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que aparece espontáneamente o que procede de una causa oscura o desconocida.

20 El término "inflamación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al proceso fisiológico por el que los tejidos vascularizados responden a la lesión. Ver, p.ej., FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 4a ed., William E. Paul, ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1999), en 1051-1053, incorporada en la presente memoria como referencia. Durante el proceso inflamatorio, las células participantes en la destoxicación y reparación son movilizadas al sitio de compromiso por mediadores inflamatorios. La inflamación con frecuencia se caracteriza por una fuerte infiltración de leucocitos en el sitio de inflamación, en particular neutrófilos (células polimorfonucleares). Estas células fomentan el

25 daño en los tejidos mediante la liberación de sustancias tóxicas en la pared vascular o en tejido no lesionado. Tradicionalmente, la inflamación se ha dividido en respuestas agudas y respuestas crónicas.

30 La expresión "inflamación aguda" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la respuesta relativamente uniforme rápida, corta (minutos a días) frente a la lesión aguda, caracterizada por acumulaciones de líquido, proteínas plasmáticas y leucocitos neutrófilos. Entre los ejemplos de agentes perjudiciales que causan inflamación aguda se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, patógenos (p.ej., bacterias, virus, parásitos), cuerpos foráneos de origen exógeno (p.ej., amianto) o endógeno (p.ej., cristales de urato, complejos inmunológicos) y agentes físicos (p.ej., quemaduras) o químicos (p.ej., cáusticos).

35 La expresión "inflamación crónica" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la inflamación de duración más larga y que presenta un final vago e indefinido. La inflamación crónica empieza dominar cuando persiste la inflamación aguda, mediante la eliminación completa del agente inflamatorio inicial (p.ej., el tabaquismo de cigarrillos) o como consecuencia de múltiples sucesos agudos que se producen en el mismo sitio. La inflamación crónica, que incluye el flujo de entrada de linfocitos y macrófagos y el crecimiento de fibroblastos, puede resultar en tejido cicatricial

40 en sitios de actividad inflamatoria prolongada o repetida.

45 La expresión "mediadores inflamatorios" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los mediadores moleculares de los procesos inflamatorio e inmunológico. Estas moléculas difundibles solubles actúan tanto localmente en el sitio del daño e infección del tejido como en sitios más distantes. Algunos mediadores inflamatorios resultan activados por el proceso inflamatorio, mientras que otros son sintetizados y/o liberados a partir de fuentes celulares en respuesta a la inflamación aguda o por otros mediadores inflamatorios solubles; todavía otros muestran propiedades antiinflamatorias. Entre los ejemplos de mediadores inflamatorios de la respuesta inflamatoria se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, proteasas plasmáticas, complemento, quininas, proteínas de coagulación y fibrinolíticas, mediadores lipídicos, prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de plaquetas (FAP), péptidos, hormonas

50 (incluyendo hormonas esteroideas, tales como glucocorticoides) y aminoras, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, histamina, serotonina y neuropéptidos, y citoquinas proinflamatorias, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, interleuquina-1-beta (IL-1 β), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8), factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), interferón-gamma (IF- γ), interleuquina-12 (IL-12) e interleuquina-17 (IL-17).

55 Entre los mediadores proinflamatorios, es conocido que IL-1, IL-6 y TNF- α activan hepatocitos en una respuesta de etapa aguda, sintetizando proteínas de etapa aguda que activan el complemento. El complemento es un sistema de proteínas plasmáticas que interactúan con patógenos para marcarlos para la destrucción por fagocitos. Las proteínas del complemento pueden ser activadas directamente por patógenos o indirectamente por anticuerpos unidos a patógenos, conduciendo a una cascada de reacciones que se producen sobre la superficie de los patógenos y generan componentes activos con diversas funciones efectoras. IL-1, IL-6 y TNF- α también activan el endotelio de la médula ósea, movilizándolo, y funcionan como pirógenos endógenos, elevando la temperatura corporal, que ayuda a eliminar infecciones del cuerpo. Un ejemplo mayor de las citoquinas es la acción sobre el hipotálamo, alterando la regulación de la temperatura corporal, y sobre las células musculares y adiposas, estimulando el catabolismo de las

60 células musculares y adiposas para elevar la temperatura corporal. A temperaturas elevadas, se reduce la replicación bacteriana y vírica, mientras que el sistema inmunológico adaptativo funciona más eficientemente.

65

La expresión "factor de necrosis tumoral" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una citoquina producida por glóbulos blancos en respuesta a un antígeno o infección, que induce necrosis (muerte) de células tumorales y posee un amplio abanico de acciones proinflamatorias. El factor de necrosis tumoral también es una citoquina multifuncional con efectos sobre el metabolismo de los lípidos, la coagulación, la resistencia a la insulina y la función de las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos.

El término "interleuquina (IL)" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una citoquina de una clase de proteínas relacionadas homológamente que se observó por primera vez que eran secretadas por leucocitos y actuaban sobre los mismos. Desde entonces se ha encontrado que las interleuquinas son producidas por una amplia diversidad de células corporales. Las interleuquinas regulan el crecimiento, diferenciación y motilidad celular, y estimulan respuestas inmunológicas, tales como la inflamación. Entre los ejemplos de interleuquinas se incluyen interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-1 β (IL-1 β), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8), interleuquina-12 (IL-12) e interleuquina-17 (IL-17).

Los términos "inhibiendo", "inhibir" o "inhibición" se utilizan en la presente memoria para referirse a reducir la cantidad o tasa de un proceso, a detener el proceso por completo, o a reducir, limitar o bloquear la acción o función del mismo. La inhibición puede incluir una reducción o decremento de la cantidad, tasa, acción, función o proceso de una sustancia en por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%.

El término "inhibidor" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una segunda molécula que se une a una primera molécula, reduciendo de esta manera la actividad de la primera molécula. Los inhibidores enzimáticos son moléculas que se unen a enzimas, reduciendo de esta manera la actividad enzimática. La unión de un inhibidor puede detener la entrada de un sustrato en el sitio activo del enzima y/o dificultar la catálisis de la reacción por parte del enzima. La unión del inhibidor es reversible o irreversible. Los inhibidores irreversibles habitualmente reaccionan con el enzima y lo modifican químicamente, por ejemplo mediante la modificación de residuos aminoácidos clave necesarios para la actividad enzimática. En contraste, los inhibidores reversibles se unen no covalentemente y producen diferentes tipos de inhibición dependiendo de si estos inhibidores se unen al enzima, al complejo de enzima-sustrato o a ambos. Los inhibidores enzimáticos con frecuencia se evalúan para su especificidad y potencia.

El término "lesión" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un daño o perjuicio a una estructura o función del cuerpo causado por un agente o fuerza externo, que puede ser físico o químico.

El término "aislado" se utiliza en la presente memoria para referirse a un material, tal como, aunque sin limitación, un ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína, que: (1) se encuentra sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con el mismo tal como se encuentra en su medio natural. Las expresiones "sustancialmente libre" o "esencialmente libre" se utilizan en la presente memoria para referirse a considerable o significativamente libre de, o más de aproximadamente 95% libre de, o más de aproximadamente 99% libre de tales componentes. El material aislado opcionalmente comprende material que no se observa junto con el material en su medio natural, o (2) en el caso de que el material se encuentre en su medio natural, material que ha sido alterado sintéticamente (no naturalmente) mediante intervención humana deliberada para formar una composición y/o que ha sido introducido en una localización en la célula (p.ej., genoma u orgánulo subcelular) no nativo para un material observado en ese medio. La alteración para rendir el material sintético puede llevarse a cabo en el material en su estado natural o extraído de su estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico natural se convierte en un ácido nucleico aislado en el caso de que sea alterado o de que se transcriba a partir de ADN que ha sido alterado, mediante intervención humana realizada dentro de la célula a partir de la que se origina. Ver, por ejemplo, Compounds and Methods for Site Directed Mutagenesis in Eukaryotic Cells, Kmiec, patente US n° 5.565.350; In Vivo Homologous Sequence Targeting in Eukaryotic Cells; Zarlino et al., PCT/US93/03868, cada una incorporada en la presente memoria como referencia en su totalidad. De manera similar, un ácido nucleico natural (por ejemplo, un promotor) se convierte en aislado en el caso de que se introduzca por medios no naturales en un locus del genoma no nativo a dicho ácido nucleico. Los ácidos nucleicos que son "aislados" tal como se define en la presente memoria también se denominan ácidos nucleicos "heterólogos".

El término "quinasa" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un tipo de enzima que transfiere grupos fosfato desde moléculas donantes de alta energía a moléculas o sustratos diana específicos. Entre los grupos donantes de alta energía pueden incluirse, aunque sin limitación, ATP.

El término "leucocito" o "glóbulo blanco (GB)" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un tipo de célula inmunológica. La mayoría de leucocitos se generan en la médula ósea y se encuentran en la sangre y tejido linfático. Los leucocitos ayudan al cuerpo a combatir infecciones y otras enfermedades. Los granulocitos, monocitos y linfocitos son leucocitos.

El término "linfocitos" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a glóbulos blancos (leucocitos) pequeños

que desempeñan un gran papel en la defensa del cuerpo frente a enfermedades. Existen dos tipos principales de linfocito: células B y células T. Las células B generan anticuerpos que atacan las bacterias y toxinas, mientras que las células T mismas atacan células corporales que han sido dominadas por virus o que se han vuelto cancerosas. Los linfocitos secretan productos (linfoquinas) que modulan las actividades funcionales de muchos otros tipos de células y con frecuencia se encuentran presentes en sitios de inflamación crónica.

El término "macrófago" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un tipo de glóbulo blanco que circunda y mata microorganismos, elimina células muertas y estimula la acción de otras células del sistema inmunológico. Tras digerir un patógeno, un macrófago presenta un antígeno (una molécula, con más frecuencia una proteína observada sobre la superficie del patógeno, utilizada por el sistema inmunológico para la identificación) del patógeno a la célula T ayudante correspondiente. La presentación se lleva a cabo mediante su integración en la membrana celular y mostrándola unida a una molécula del CMH de clase II, indicando a otros glóbulos blancos que el macrófago no es un patógeno, a pesar de presentar antígenos sobre su superficie. Eventualmente, la presentación de antígeno resulta en la producción de anticuerpos que se unen a los antígenos de los patógenos, facilitando la adhesión de los macrófagos a su membrana celular y la fagocitosis.

La expresión "célula mesenquimatososa" o "mesénquima" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una célula derivada de las tres capas germinales, que puede desarrollarse en tejido conectivo, hueso, cartilago, el sistema linfático y el sistema circulatorio.

La expresión "quinasa MK2" o "MK2" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (también denominada "MAPKAPK2", "MAPKAP-K2" o "MK2"), que es un miembro de la familia de serina/proteasa (Ser/Thr) proteína quinasas.

La expresión "diámetro aerodinámico de la mediana de la masa" o "DAMM" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la mediana de la distribución de masas de partícula en suspensión en el aire con respecto al diámetro aerodinámico. Las DAMM habitualmente se acompañan de la desviación estándar geométrica (g o sigma-g), que caracteriza la variabilidad de la distribución de tamaños de partícula.

El término "modular" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a regular, alterar, adaptar o ajustar a una determina medida o proporción.

El término "monocito" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un tipo de célula inmunológica que se produce en la médula ósea y que viaja por la sangre a los tejidos en el cuerpo, en donde se convierte en un macrófago. Un monocito es un tipo de glóbulo blanco y un tipo de fagocito.

El término "neutrófilos" o "neutrófilos polimorfonucleares (PMN)" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al tipo más abundante de glóbulo blanco en los mamíferos, que forma una parte esencial del sistema inmunológico innato. Forman parte de la familia de células polimorfonucleares (PMN) junto con los basófilos y eosinófilos. Los neutrófilos normalmente se encuentran en el torrente sanguíneo. Durante la etapa inicial (aguda) de la inflamación, en particular como resultado de la infección bacteriana y algunos cánceres, los neutrófilos son uno de los primeros respondedores de entre las células inflamatorias, migrando hacia el sitio de la inflamación. Migran por los vasos sanguíneos, y después por el tejido intersticial, siguiendo señales químicas tales como la interleuquina-8 (IL-8) y C5a en un proceso denominado quimiotaxis, el movimiento dirigido de una célula o parte móvil a lo largo de un gradiente de concentración química hacia condiciones ambientales que considera atractivas y/o alejándose de medios que encuentra repelentes.

La expresión "sujeto de control sano normal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un sujeto que no manifiesta síntomas u otra evidencia clínica de enfermedad de las vías respiratorias o tejidos pulmonares.

La expresión "ácido nucleico" se utiliza en la presente memoria para referirse a un polímero desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma de cadena sencilla o de doble cadena, y a menos que se encuentre limitado de otro modo, comprende análogos conocidos con la naturaleza esencial de los nucleótidos naturales en el aspecto de que se hibridan con ácidos nucleicos de cadena sencilla de una manera similar a los nucleótidos naturales (p.ej., los ácidos péptido-nucleicos).

El término "nucleótido" se utiliza en la presente memoria para referirse a un compuesto químico que consiste en una base heterocíclica, un azúcar y uno o más grupos fosfato. En los nucleótidos más comunes, la base es un derivado de purina o pirimidina, y el azúcar es la pentosa desoxirribosa o ribosa. Los nucleótidos son los monómeros de los ácidos nucleicos, uniéndose tres o más entre sí con el fin de formar un ácido nucleico. Los nucleótidos son las unidades estructurales del ARN, ADN y varios cofactores, incluyendo, aunque sin limitación, CoA, FAD, DMN, NAD y NADP. Entre las purinas se incluyen adenina (A) y guanina (G); entre las pirimidinas se incluyen citosina (C), timidina (T) y uracilo (U).

Las expresiones siguientes se utilizan en la presente memoria para describir las relaciones de secuencia entre dos o

más ácidos nucleicos o polinucleótidos: (a) "secuencia de referencia", (b) "ventana de comparación", (c) "identidad de secuencia", (d) "porcentaje de identidad de secuencia", y (e) "identidad sustancial".

(a) La expresión "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia utilizada como base para la comparación entre secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subgrupo o la totalidad de una secuencia especificada, por ejemplo, como segmento de un ADNc de longitud completa o secuencia génica, o el ADNc o secuencia génica completa.

(b) La expresión "ventana de comparación" se refiere a un segmento contiguo y especificado de una secuencia polinucleótida, en la que la secuencia polinucleótida puede compararse con una secuencia de referencia y en la que la parte de la secuencia polinucleótida en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. Generalmente, la ventana de comparación presenta una longitud de por lo menos 20 nucleótidos contiguos y opcionalmente puede presentar una longitud de por lo menos 30 nucleótidos contiguos, de por lo menos 40 nucleótidos contiguos, de por lo menos 50 nucleótidos contiguos, de por lo menos 100 nucleótidos contiguos, o más largo. El experto en la materia entenderá que para evitar una similitud elevada a una secuencia de referencia debido a la inclusión de huecos en la secuencia polinucleótida, típicamente se introduce una penalización de hueco y se resta del número de emparejamientos.

Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos de la técnica. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de homologías locales de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981); mediante el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444 (1988); mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos, incluyendo, aunque sin limitación: CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, Calif.; GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis., USA; el programa CLUSTAL está bien descrito en Higgins y Sharp, *Gene* 73:237-244 (1988); Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989); Corpet, et al., *Nucleic Acids Research* 16:10881-90 (1988); Huang, et al., *Computer Applications in the Biosciences*, 8:155-65 (1992), and Pearson, et al., *Methods in Molecular Biology*, 24:307-331 (1994). La familia BLAST de programas, que puede utilizarse para búsquedas de similitud de secuencias, incluye: BLASTN para secuencias de nucleótidos problema en base de datos de secuencias de nucleótidos; BLASTX para secuencias de nucleótidos problema en base de datos de secuencias de proteínas; BLASTP para secuencias de proteína problema en base de datos de secuencias de proteína; TBLASTN para secuencias de proteína problema en base de datos de secuencias de nucleótidos, y TBLASTX para secuencias de nucleótidos problema en base de datos de secuencias de nucleótidos. Ver *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo 19, Ausubel, et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995).

A menos que se indique lo contrario, los valores de identidad/similitud de secuencias proporcionados en la presente memoria se refieren al valor obtenido utilizando el paquete BLAST 2.0 de programas utilizando parámetros por defecto. Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997). El software para llevar a cabo los análisis de BLAST se encuentra disponible públicamente, p.ej. a través de la información del National for Biotechnology Este algoritmo implica identificar en primer lugar las parejas de secuencias de alta puntuación (PAP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de pregunta que corresponden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo estando alineadas con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al., supra). Estos resultados iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas de PAP más largas que las contengan. A continuación, los resultados de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda incrementarse la puntuación acumulada de alineación. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de premio para una pareja de residuos correspondientes, siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no correspondientes, siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de resultados de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación acumulada de alineación cae en una cantidad X respecto al valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada va a cero o menos debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuaciones negativas, o se alcanza el final de cualquiera de las dos secuencias. Los parámetros W , T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, un valor esperado (E) de 100, $M=5$, $N=-4$ y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 3, un valor esperado (E) de 10, y la matriz de puntuaciones BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencias, el algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, p.ej., Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad de que una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se produzca por azar. Las búsquedas de BLAST suponen que las proteínas pueden modelarse como secuencias aleatorias. Sin embargo, muchas proteínas reales comprenden regiones de secuencias no aleatorias que pueden ser tramos homopoliméricos, repeticiones de periodo corto, o regiones enriquecidas en uno

o más aminoácidos. Tales regiones de baja complejidad pueden alinearse entre proteínas no relacionadas, aunque otras regiones de las proteínas sean totalmente diferentes. Pueden utilizarse varios programas de filtración de baja complejidad para reducir tales alineaciones de baja complejidad. Por ejemplo, los filtros de baja complejidad SEG (Wooten y Federhen, *Comput. Chem.*, 17:149-163 (1993)) y XNU (Claverie and States, *Comput. Chem.*, 17:191-201 (1993)) pueden utilizarse solos o en combinación.

(c) La expresión "identidad de secuencias" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o polipeptídicas se utiliza en la presente memoria para referirse a los residuos en las dos secuencias que son iguales al alinearse para correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación específica. En el caso de que se utilice el porcentaje de identidad de secuencias en referencia a proteínas, se reconoce que las posiciones de residuos que no son idénticas con frecuencia difieren en sustituciones de aminoácidos conservadoras, es decir, donde se sustituyen residuos aminoácidos por otros residuos aminoácidos con propiedades químicas similares (p.ej., carga o hidrofobicidad) y, por lo tanto, no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Donde las secuencias difieran en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencias puede ajustarse a mayor para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Las secuencias que difieren por tales sustituciones conservadoras se afirma que presentan "similitud de secuencias" o "similitud". Los métodos para llevar a cabo dicho ajuste son bien conocidos por el experto en la materia. Típicamente ello implica puntuar una sustitución conservadora como parcial y no como una no correspondencia completa, incrementando de esta manera el porcentaje de identidad de secuencias. De esta manera, por ejemplo, donde un aminoácido idéntico reciba una puntuación de 1 y una sustitución no conservadora reciba una puntuación de cero, una sustitución conservadora recibe una puntuación de entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservadoras se calcula, p.ej., según el algoritmo de Meyers y Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.*, 4:11-17 (1988) p.ej. tal como se implementa en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, Calif., USA).

(d) La expresión "porcentaje de identidad de secuencias" se utiliza en la presente memoria para referirse al valor determinado mediante la comparación de dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en la que la parte de la secuencia polinucleótida en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se observa una base de ácidos nucleicos o residuo aminoácido idéntico en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el número por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencias.

(e) La expresión "identidad sustancial" de secuencias polinucleótidas se refiere a que un polinucleótido comprende una secuencia que presenta una identidad de secuencias de por lo menos 70%, de por lo menos 80%, de por lo menos 90% y de por lo menos 95% en comparación con una secuencia de referencia utilizando uno de los programas de alineación descrito utilizando parámetros estándares. El experto en la materia reconocerá que estos valores pueden ajustarse apropiadamente para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos considerando la degeneración de los codones, la similitud de los aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura y similares. La identidad sustancial de las secuencias de aminoácidos con estos fines normalmente se refiere a una identidad de secuencia de por lo menos 60%, o de por lo menos 70%, de por lo menos 80%, de por lo menos 90% o de por lo menos 95%. Otra indicación de que las secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí bajo condiciones restrictivas. Sin embargo, los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí bajo condiciones restrictivas todavía son sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Ello puede ocurrir, p.ej., al crear una copia de un ácido nucleico utilizando la degeneración de codones máxima permitida por el código genético. Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido que codifica el primer ácido nucleico presenta reactividad inmunológica cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico.

La expresión "operativamente ligado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al ligamiento en el que dos o más dominios de proteína o polipéptidos están ligados o combinados mediante tecnología de ADN recombinante o reacción química de manera que cada dominio de proteína o polipéptido de la proteína de fusión resultante conserva su función original. Por ejemplo, la SEC ID nº 1 está construido ligando operativamente un péptido penetrante de células (SEC ID nº 11) con un dominio terapéutico (SEC ID nº 2), creando de esta manera un péptido de fusión que posee tanto la función penetrante de células de la SEC ID nº 11 como la función inhibidora de quinasa de la SEC ID nº 2.

El término "parénquima" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un tejido animal que constituye la parte esencial de un órgano en contraposición a tejido conectivo o vasos sanguíneos. El término "parenquimatoso" se refiere a relativo al parénquima de un órgano.

El término "parenteral" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la introducción en el cuerpo mediante una inyección (es decir, administración mediante inyección), incluyendo, por ejemplo, por vía subcutánea (es decir, una inyección bajo la piel), intramuscular (es decir, una inyección en un músculo), intravenosa (es decir, una inyección en una vena), intratecal (es decir, una inyección en el espacio en torno a la médula espinal o bajo la membrana aracnoide del cerebro), inyección intrasternal o técnicas de infusión, e incluyendo la inyección intraperitoneal o la

infusión en la cavidad corporal (p.ej., el peritoneo). Una composición administrada por vía parenteral se administra utilizando una aguja, p.ej., una aguja quirúrgica, u otro dispositivo de acceso corporal. La expresión "aguja quirúrgica", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier dispositivo de acceso adaptado para la administración de composiciones líquidas (es decir, capaces de fluir) en una estructura anatómica seleccionada. Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse según la técnica conocida, utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados.

El término "particulado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a partículas finas de materia sólida o líquida suspendidas en un gas o líquido.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier portador sustancialmente no tóxico utilizable convencionalmente para la administración de fármacos en los que el polipéptido aislado de la presente invención se mantiene estable y biodisponible. El portador farmacéuticamente aceptable debe ser de pureza suficientemente elevada y de toxicidad suficientemente baja para que resulte adecuado para la administración en el mamífero bajo tratamiento. Debe mantener además la estabilidad y biodisponibilidad del agente activo. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser líquido o sólido y se selecciona, considerando la manera planificada de administración, para proporcionar el volumen, consistencia, etc. deseados en combinación con un agente activo y otros componentes de una composición dada.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que, dentro del alcance del criterio médico razonable, resultan adecuadas para la utilización en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares excesivos, y acordes con una proporción de beneficio/riesgo razonable.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan intercambiamente en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos aminoácidos son análogos químicos artificiales de un aminoácido natural correspondiente, así como polímeros de aminoácidos naturales. La naturaleza esencial de tales análogos de aminoácidos naturales es que, al incorporarlos en una proteína, dicha proteína es específicamente reactiva con anticuerpos inducidos contra la misma proteína pero consistentes completamente de aminoácidos naturales.

Los términos "polipéptido" y "proteína" también se utilizan en la presente memoria en su sentido más amplio para referirse a una secuencia de subunidades aminoácidos, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades se unen mediante enlaces peptídicos, excepto en donde se indique lo contrario. Los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden sintetizarse químicamente o expresarse recombinantemente. Los polipéptidos de la invención descrita también pueden sintetizarse químicamente. Los polipéptidos, preparados utilizando técnicas bien conocidas de fase sólida, fase líquida o técnicas de condensación de péptidos, o cualquier combinación de los mismos, pueden incluir aminoácidos naturales y no naturales. Los aminoácidos utilizados para la síntesis de péptidos pueden ser estándares Boc (N- α -t-butiloxycarbonilo protegido con N- α -amino) en resina con los protocolos estándares de desprotección, neutralización, acoplamiento y lavado del procedimiento de fase sólida original de Merrifield (1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154), o los aminoácidos 9-fluorenilmetoxycarbonilo protegidos con N- α -amino lábiles frente a bases, descritos por primera vez por Carpino y Han (1972, J. Org. Chem. 37:3403-3409). Pueden obtenerse aminoácidos protegidos tanto con Fmoc como con Boc N- α -amino, de Sigma, Cambridge Research Biochemical, o de otras compañías químicas que resulten familiares al experto en la materia. Además, pueden sintetizarse polipéptidos con otros grupos protectores N- α que resulten familiares al experto en la materia. La síntesis peptídica en fase sólida puede llevarse a cabo mediante técnicas que resulten familiares para el experto en la materia y proporcionadas en, por ejemplo, Stewart y Young, 1984, Solid Phase Synthesis, segunda edición, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.; Fields y Noble, 1990, Int. J. Pept. Protein Res. 35:161-214, o utilizando sintetizadores automatizados. Los polipéptidos de la invención pueden comprender D-aminoácidos (que son resistentes a las proteasas específicas de L-aminoácidos in vivo), una combinación de D-aminoácidos y L-aminoácidos, y diversos aminoácidos "de diseño" (p.ej., β -metil-aminoácidos, C- α -metil-aminoácidos y N- α -metilaminoácidos, etc.) para proporcionar propiedades especiales. Entre los aminoácidos sintéticos se incluyen la ornitina para la lisina, y la norleucina para la leucina o la isoleucina. Además, los polipéptidos pueden presentar enlaces peptidomiméticos, tales como enlaces éster, para preparar péptidos con propiedades nuevas. Por ejemplo, puede generarse un péptido que incorpore un enlace peptídico reducido, es decir, R¹-CH₂-NH-R², donde R¹ y R² son residuos o secuencias de aminoácidos. Puede introducirse un enlace peptídico reducido como subunidad dipéptido. Tal polipéptido sería resistente a la actividad de proteasa y poseería una semivida in vivo prolongada. De acuerdo con lo anterior, estos términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos aminoácidos son análogos químicos artificiales de un aminoácido natural correspondiente, así como polímeros de aminoácidos naturales. La naturaleza esencial de tales análogos de aminoácidos naturales es que, al incorporarlos en una proteína, dicha proteína es específicamente reactiva con anticuerpos inducidos contra la misma proteína pero consistentes completamente de aminoácidos naturales.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" también incluyen modificaciones, entre las que se encuentran, aunque sin limitarse a ellas, la glucosilación, la unión de lípidos, la sulfatación, la gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, la hidroxilación y la ADP-ribosilación. Se apreciará que es bien conocido y tal como se indica

posteriormente, que los polipéptidos pueden no ser completamente lineales. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ser ramificados como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser circulares, con o sin ramificación, generalmente como resultado de sucesos post-traduccionales, incluyendo sucesos de procesamiento naturales y sucesos producidos por la manipulación humana que no se producen naturalmente. Los polipéptidos circulares, ramificados y circulares
5 ramificados pueden sintetizarse mediante un procedimiento natural no de traducción y también mediante métodos completamente sintéticos. En algunas realizaciones, el péptido presenta cualquier longitud o tamaño.

El término "proenzima" o "zimógeno" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un precursor enzimático inactivo. Un zimógeno requiere un cambio bioquímico (tal como una reacción de hidrólisis que revela el sitio activo, o
10 la modificación de la configuración para revelar el sitio activo) para que se convierta en un enzima activo. El cambio bioquímico habitualmente se produce en un lisosoma, donde una parte específica del enzima precursor es cortada con el fin de activarlo. La cadena de aminoácidos que es liberada con la activación se denomina péptido de activación.

El término "proliferación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la expansión de una población de células mediante la división continua de células individuales en células hija idénticas.
15

La expresión "intersticio pulmonar" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al tejido y espacio en torno a los sacos aéreos de los pulmones.

La expresión "alvéolo pulmonar" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una estructura anatómica que presenta la forma de una cavidad hueca. Los alveolos se localizan en la zona respiratoria de los pulmones, en el extremo distal de los conductos alveolares y aurículas, formando el punto terminal del tracto respiratorio. Los alveolos pulmonares son salientes esféricos de los sitios respiratorios de intercambio gaseoso con la sangre y sólo se observan
20 en los pulmones de los mamíferos. La membrana alveolar es la superficie de intercambio gaseoso. La sangre transporta dióxido de carbono del resto del cuerpo para la liberación en los alveolos, y el oxígeno en los alveolos es incorporado por la sangre en los vasos sanguíneos alveolares, para el transporte a todas las células en el cuerpo. Los alveolos contienen algunas fibras de colágeno y elásticas. Las fibras elásticas permiten que los alveolos se estiren al llenarse de aire al inspirar. A continuación, recuperan su forma durante la espiración a fin de expulsar el aire rico en dióxido de carbono. Existen tres tipos celulares alveolares principales en la pared alveolar, (1) células alveolares escamosas que forman la estructura de la pared alveolar, (2) células alveolares grandes que secretan surfactante pulmonar para reducir la tensión superficial del agua y permitir la separación de la membrana, incrementando de esta
25 manera la capacidad de intercambio de gases, (3) macrófagos que destruyen los patógenos foráneos, tales como bacterias.

El término "similar" se utiliza intercambiamente con términos análogos, comparables o similares, es decir que presentan rasgos o características en común.
30

El término "solución" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una mezcla homogénea de dos o más sustancias. Frecuentemente, aunque no necesariamente, es un líquido. En una solución, las moléculas del soluto (o sustancia disuelta) están distribuidas uniformemente entre las del solvente.
35

Los términos "soluto" y "solubilidad" se refieren a la propiedad de ser susceptible de disolverse en un líquido específico (solvente). El término "insoluble" se refiere a la propiedad de un material que presenta una solubilidad mínima o limitada en un solvente específico. En una solución, las moléculas del soluto (o sustancia disuelta) están distribuidas uniformemente entre las del solvente.
40

La expresión "fibra de estrés" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una estructura de orden elevado en células que consisten en filamentos de actina, proteínas entrecruzantes (proteínas que unen a dos o más filamentos entre sí) y motoras de miosina II. La actina es una proteína globular (~43 kDa) que polimeriza y forma una estructura de filamentos ordenados que presenta dos protofilamentos que se entrelazan entre sí formando un único "filamento de actina" también conocido como "microfilamento". Las motoras de miosina en las fibras de estrés de mueven, haciendo deslizarse los filamentos de actina unos respecto a otros, de manera que la fibra pueda contraerse. Con el fin de que la contracción genere fuerzas, las fibras deben anclarse a algo. Las fibras de estrés pueden anclarse a la membrana celular y frecuentemente los sitios en donde se produce este anclaje también se conectan a estructuras fuera de la célula (la matriz o algún otro sustrato). Estos sitios de conexión se denominan adhesiones focales. Resultan necesarias muchas proteínas para la producción y mantenimiento correctos de la adhesión focal. La contracción contra estos sustratos externos fijos es lo que permite que la fuerza generada por las motoras de miosina y el crecimiento y reorganización de filamentos mueva y cambie la forma de la célula.
45

El término "suspensión" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una dispersión (mezcla) en la que se combina una especie finamente dividida con otra especie, estando la primera tan finamente dividida y mezclada que no sedimenta con rapidez. En la vida cotidiana, las suspensiones más comunes son las de sólidos en líquido.
50

Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se utilizan intercambiamente para referirse a un miembro de una especie animal de origen mamífero, incluyendo, aunque sin limitación, un ratón, una rata, un gato, una cabra, una
55

oveja, un caballo, un hámster, un hurón, un ornitorrinco, un cerdo, un perro, un cobaya, un conejo y un primate, tal como, por ejemplo, un mono, simio o ser humano.

La expresión "sujeto que necesita de dicho tratamiento" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un paciente que sufre de una enfermedad, trastorno, condición o proceso patológico. En algunas realizaciones, la expresión "sujeto que necesita de dicho tratamiento" también se utiliza para referirse a un paciente que: (i) recibirá la administración de por lo menos un polipéptido de la invención, (ii) recibe por lo menos un polipéptido de la invención, o (iii) ha recibido por lo menos un polipéptido de la invención, a menos que el contexto y uso de la expresión indique lo contrario.

El término "sustitución" se utiliza en la presente memoria para referirse a una situación en la que se intercambia una base o bases por otra base o bases en una secuencia de ADN. Las sustituciones pueden ser sustituciones sinónimas o sustituciones no sinónimas. Tal como se utiliza en la presente memoria, "sustituciones sinónimas" se refiere a sustituciones de una base por otra en un exón de un gen codificante de una proteína, de manera que la secuencia de aminoácidos producida no resulte modificada. La expresión "sustituciones no sinónimas" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a sustituciones de una base por otra en un exón de un gen codificante de una proteína, de manera que la secuencia de aminoácidos producida resulte modificada.

Las expresiones "cantidad terapéutica", una "cantidad eficaz", o "cantidad farmacéuticamente eficaz" de un agente activo se utilizan intercambiamente para referirse a una cantidad que resulta suficiente para proporcionar el beneficio de tratamiento deseado. Por ejemplo, la "cantidad terapéutica" de una composición inhibidora de quinasa de la invención descrita incluye, aunque sin limitación, una cantidad suficiente: (1) para eliminar o reducir el tamaño de por lo menos un locus fibrótico, o (2) para reducir la tasa de deposición de matriz extracelular, incluyendo colágeno y fibronectina, en los intersticios en los pulmones de un paciente de fibrosis pulmonar. El término comprende además una cantidad suficiente para suprimir o aliviar por lo menos un síntoma de un paciente de fibrosis pulmonar, en el que el síntoma incluye, aunque sin limitarse a ellos, saturación de oxígeno, disnea (dificultad para respirar), tos no productiva (referida a la expulsión ruidosa súbita de aire de los pulmones que puede estar causada por irritación o inflamación y que no elimina esputo del tracto respiratorio), hipocratismo digital (una desfiguración de los dedos, que adquieren una apariencia bulbosa) y crepitaciones (sonido crepitante en los pulmones durante la inhalación, ocasionalmente denominadas estertores o crepitaciones).

Una cantidad eficaz de un agente activo que puede utilizarse según la invención descrita generalmente se encuentra comprendida entre generalmente aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 10 g/kg de peso corporal. Sin embargo, los niveles de dosis se basan en una diversidad de factores, incluyendo el tipo de lesión, la edad, peso, sexo, condición médica del paciente, la severidad de la condición, la vía y frecuencia de administración y el agente activo particular utilizado. De esta manera, el régimen de administración puede variar ampliamente, pero puede ser determinado rutinariamente por el médico utilizando métodos estándares.

El término "tratar" o "tratamiento" incluye anular, sustancialmente inhibir, retrasar o revertir el avance de una enfermedad, condición o trastorno, sustancialmente aliviando los síntomas clínicos o estéticos de una condición, sustancialmente evitando la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una enfermedad, condición o trastorno, y proteger de síntomas perjudiciales o molestos. El tratamiento se refiere además a conseguir uno o más de los siguientes: (a) reducir la severidad del trastorno, (b) limitar el desarrollo de síntomas característicos del trastorno o trastornos bajo tratamiento, (c) limitar el agravamiento de los síntomas característicos del trastorno o trastornos bajo tratamiento, (d) limitar la recurrencia del trastorno o trastornos en pacientes que previamente han experimentado el trastorno o trastornos, y (e) limitar la recurrencia de síntomas en pacientes que anteriormente eran asintomáticos para el trastorno o trastornos.

Los términos "variantes", "mutantes" y "derivados" se utilizan en la presente memoria para referirse a secuencias de nucleótidos o polipeptídicas con identidad sustancial respecto a una secuencia de nucleótidos o polipeptídica de referencia. Las diferencias en las secuencias pueden ser el resultado de cambios, naturales o de diseño, de secuencia o estructura. Pueden producirse cambios naturales durante el curso de la replicación o duplicación normal en la naturaleza de la secuencia de ácidos nucleicos particular. Pueden diseñarse e introducirse específicamente cambios diseñados en la secuencia con fines específicos. Tales cambios específicos pueden llevarse a cabo in vitro utilizando una diversidad de técnicas de mutagénesis. Tales variantes de secuencia generadas específicamente pueden denominarse "mutantes" o "derivados" de la secuencia original.

El experto en la materia puede producir variantes polipeptídicas del polipéptido YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1) que presenten una o múltiples sustituciones, deleciones, adiciones o reemplazos de aminoácidos, pero que sean funcionalmente equivalentes a la SEC ID nº 1. Estas variantes pueden incluir, entre otros: (a) variantes en las que uno o más residuos aminoácidos se sustituyen por aminoácidos conservadores o no conservadores, (b) variantes en las que se añaden uno o más aminoácidos, (c) variantes en las que por lo menos un aminoácido incluye un grupo sustituyente, (d) variantes en las que residuos aminoácidos de una especie se sustituyen por el residuo correspondiente en otra especie, en posiciones conservadas o no conservadas, y (d) variantes en las que se fusiona una proteína diana con otro péptido o polipéptido, tal como una pareja de fusión, una etiqueta proteica u otra fracción química, que puede proporcionar propiedades útiles a la proteína diana, por ejemplo, un epítipo para un anticuerpo.

Las técnicas para obtener tales variantes, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, técnicas genéticas (supresiones, delecciones, mutaciones, etc.), químicas y enzimáticas, son conocidas por el experto en la materia. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "mutación" se refiere a un cambio de la secuencia de ADN dentro de un gen o cromosoma de un organismo que resulta en la creación de un nuevo carácter o rasgo no presente en el tipo parental, o el proceso por el que se produce tal cambio en un cromosoma, mediante una alteración de la secuencia de nucleótidos del ADN codificante de un gen o mediante un cambio en la organización física de un cromosoma. Son tres mecanismos de mutación, la sustitución (intercambio de un par de bases por otro), la adición (la inserción de una o más bases en una secuencia) y la delección (pérdida de una o más pares de bases).

El término "vehículo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una sustancia que facilita la utilización de un fármaco u otro material que se mezcla con el mismo.

La expresión "cicatrización de heridas" o "reparación de heridas" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere generalmente al proceso natural del cuerpo de reparación de tejidos después de un traumatismo. Al recibir un individuo una herida, tiene lugar un conjunto de complejos sucesos bioquímicos para reparar el daño, incluyendo la hemostasis, la inflamación, la proliferación y el remodelado.

I. Composiciones: péptidos terapéuticos para prevenir o tratar enfermedades caracterizadas por la proliferación aberrante de fibroblastos y la deposición de colágeno

Según un aspecto, tal como se define en la reivindicación 1, la invención descrita proporciona una composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento de una enfermedad, condición o proceso caracterizado por la proliferación aberrante de fibroblastos y la deposición de matriz extracelular en un tejido de un sujeto, en el que la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéutica de un polipéptido de secuencia de aminoácidos YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1) o un equivalente funcional del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable del mismo, y en el que la cantidad terapéutica resulta eficaz para reducir la proliferación de fibroblastos y la deposición de matriz extracelular en el tejido del sujeto.

Según otra realización, el tejido es un tejido pulmonar.

Según otra realización, la enfermedad o la condición se caracteriza además por una inflamación en el tejido.

Según otra realización, la inflamación es una inflamación aguda o una inflamación crónica.

Según otra realización, la inflamación está mediada por como mínimo una citoquina seleccionada del grupo que consiste en factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-1 β (IL-1 β).

Según otra realización, la proliferación aberrante de fibroblastos y la deposición de matriz extracelular en el tejido se caracterizan por una actividad aberrante de la proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2) en el tejido en comparación con la actividad de la proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2) en el tejido de un sujeto de control sano normal.

Según otra realización, la proliferación aberrante de fibroblastos y la deposición de matriz extracelular en el tejido se pone de manifiesto en una cantidad o distribución de la proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2) activada (fosforilada) en el tejido en comparación con la cantidad o distribución de proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2) en el tejido de un sujeto de control sano normal.

Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe una actividad de quinasa de una quinasa seleccionada del grupo indicado en la Tabla 1, en la presente memoria.

Según otra realización, dicha inhibición puede, por ejemplo, resultar eficaz para reducir la proliferación de fibroblastos, la deposición de matriz extracelular o una combinación de los mismos en el tejido del sujeto.

Según otra realización, dicha inhibición puede, por ejemplo, resultar eficaz para reducir por lo menos una patología seleccionada del grupo que consiste en una deposición aberrante de una proteína de la matriz extracelular en un intersticio pulmonar, una estimulación aberrante de la proliferación de los fibroblastos en el pulmón, una inducción aberrante de la diferenciación de los miofibroblastos y una estimulación aberrante de la unión de los miofibroblastos a la matriz extracelular, en comparación con un sujeto de control sano normal.

Según algunas realizaciones, los perfiles de inhibición de los inhibidores MMI in vivo dependen de las dosis, vías de administración y tipos celulares que responden a los inhibidores.

Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe por lo menos 50% de la actividad de quinasa de la quinasa.

Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe por lo menos 65% de la actividad de quinasa de la quinasa.

Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe por lo menos 75% de la actividad de quinasa de la quinasa.

Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe por lo menos 80% de la actividad de quinasa de la quinasa.

- Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe una actividad de quinasa de proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2), una actividad de quinasa de proteína quinasa I dependiente de calcio/calmodulina (CaMKI) y una actividad de quinasa de receptores de factor de crecimiento BDNF/NT-3 (TrkB).
- 5 Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe por lo menos 65% de la actividad de quinasa de la proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2).
- 10 Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe por lo menos 65% de la actividad de quinasa de la proteína quinasa 3 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK3).
- Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe por lo menos 65% de la actividad de quinasa de la proteína quinasa I dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKI).
- 15 Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe por lo menos 65% de la actividad de quinasa de receptores del factor de crecimiento BDNF/NT-3 (TrkB).
- Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe por lo menos 65% de la actividad de quinasa de proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2) y por lo menos 65% de la actividad de quinasa de proteína quinasa 3 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK3).
- 20 Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe por lo menos 65% de la actividad de quinasa de la proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2) y por lo menos 65% de la actividad de quinasa de proteína quinasa I dependiente de calcio/calmodulina (CaMKI).
- 25 Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe por lo menos 65% de la actividad de quinasa de la proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2) y por lo menos 65% de la actividad de quinasa de receptores del factor de crecimiento BDNF/NT-3 (TrkB).
- 30 Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe por lo menos 65% de la actividad de quinasa de la proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2), por lo menos 65% de la actividad de quinasa de la proteína quinasa 3 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK3), por lo menos 65% de la actividad de quinasa de la proteína quinasa I dependiente de calcio/calmodulina (CaMKI) y por lo menos 65% de la actividad de quinasa de los receptores del factor de crecimiento BDNF/NT-3 (TrkB).
- 35 Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe la actividad de quinasa de por lo menos una quinasa seleccionada del grupo de MK2, MK3, CaMKI, TrkB, sin inhibir sustancialmente la actividad de otra u otras quinasas seleccionadas del grupo restante indicado en la Tabla 1, en la presente memoria.
- 40 Según algunas realizaciones, los perfiles de inhibición de los inhibidores MMI in vivo dependen de las dosis, vías de administración y tipos celulares que responden a los inhibidores.
- Según dicha realización, la composición farmacéutica inhibe menos de 50% de la actividad de quinasa de la otra quinasa o quinasas seleccionadas. Según dicha realización, la composición farmacéutica inhibe menos de 65% de la actividad de quinasa de la otra quinasa o quinasas seleccionadas. Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe menos de 50% de la actividad de quinasa de la otra quinasa o quinasas seleccionadas. Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe menos de 40% de la actividad de quinasa de la otra quinasa o quinasas seleccionadas. Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe menos de 20% de la actividad de quinasa de la otra quinasa o quinasas seleccionadas. Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe menos de 15% de la actividad de quinasa de la otra quinasa o quinasas seleccionadas. Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe menos de 10% de la actividad de quinasa de la otra quinasa o quinasas seleccionadas. Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe menos de 5% de la actividad de quinasa de la otra quinasa o quinasas seleccionadas. Según otra realización, la composición farmacéutica incrementa la actividad de quinasa de las otras quinasas seleccionadas.
- 55 Según las realizaciones del párrafo inmediatamente anterior, la otra u otras quinasas seleccionadas que no resultan sustancialmente inhibidas se seleccionan de lgrupo de proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII, incluyendo su subunidad CaMKII δ), protooncogén serina/treonina-proteína quinasa (PIM-1), sarcoma celular (c-SRC), tirosina quinasa de bazo (SYK), tirosina quinasa de C-src (CSK) y receptor de factor 1 de crecimiento similar a insulina (IGF-1R).
- 60 Según algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además por lo menos un agente terapéutico adicional.
- 65 Según algunas de tales realizaciones, el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en colágenos de tipo V bovinos purificados (p.ej., IW-001, ImmuneWorks, United Therapeutics), antagonistas de

receptores de IL-13 (p.ej., QAX576; Novartis), inhibidores de proteína tirosina quinasa (p.ej., imatinib (Gleevec®); Craig Daniels/Novartis), antagonistas de receptores endoteliales (p.ej., ACT-064992 (macitentan); Actelion), antagonistas de receptor dual de endotelina (p.ej., bosentán (Tracleer®); Actelion), análogos de prostaciclina (iloprost inhalado (p.ej., Ventavis®); Actelion), anticuerpos monoclonales anti-CTGF (p.ej., FG-3019), antagonistas de receptores de endotelina (A-selectivo) (p.ej., ambrisentán (Letairis®), Gilead), AB0024 (Arresto), anticuerpos monoclonales de proteína 2 de tipo lisil oxidasa (LOXL2) (p.ej., GS-6624 (anteriormente AB0024); Gilead), inhibidores de quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) (p.ej., CC-930; Celgene), pirfenidona (p.ej., Esbriet® (InterMune), Pirespa® (Shionogi)), IFN- γ 1b (p.ej., Actimmune®; InterMune), anticuerpos humanos IgG4 pan-neutralizadores contra las tres isoformas de TGF- β (p.ej., GC1008; Genzyme), inhibidores de activación de TGF- β (p.ej., Stromedix (STX-100)), proteína pentraxina-2 humana recombinante (rhPTX-2) (p.ej., PRM151; Promedior), anticuerpos biespecíficos de IL4/IL13 (p.ej., SAR156597; Sanofi), anticuerpos monoclonales humanizados con diana en integrina α v β 6 (BIBF 1120; Boehringer Ingelheim), N-acetilcisteína (Zambon SpA), Sildenafil (Viagra®), antagonistas de TNF (p.ej., etanercept (Enbrel®); Pfizer), glucocorticoides (p.ej., prednisona, budesónido, furoato de mometasona, propionato de fluticasona y furoato de fluticasona), broncodilatadores (p.ej., modificadores de leucotrieno (p.ej., Montelukast (SINGUAIR®)), broncodilatadores anticolinérgicos (p.ej., bromuro de ipratropio y tiotropio), short-acting agonistas β 2 de acción corta (p.ej., mesilato de isoetarina (Bronkometer®), adrenalina, salbutamol/albuterol y terbutalina), agonistas β 2 de acción prolongada (p.ej., salmeterol, formoterol, indecaterol (Onbrez®), y una combinación de los mismos.

Según algunas otras realizaciones, el agente terapéutico adicional comprende un broncodilatador, incluyendo, aunque sin limitación, un modificador de leucotrieno, un broncodilatador anticolinérgico, un agonista β 2 o una combinación de los mismos.

Según otra realización, el agente terapéutico adicional comprende un corticoesteroide que incluye, aunque sin limitarse a ellos, prednisona, budesónida, mometasona, beclometasona o una combinación de los mismos.

Según algunas otras realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente antiinflamatorio.

Según algunas de tales realizaciones, el agente antiinflamatorio es un agente antiinflamatorio no esteroideo. La expresión "agente antiinflamatorio no esteroideo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo grande de agentes que son similares a la aspirina en su acción, incluyendo, aunque sin limitación, ibuprofeno (Advil®), naproxeno sodio (Aleve®) y acetaminofeno (Tylenol®). Entre los ejemplos adicionales de agentes antiinflamatorios no esteroideos que son utilizables en el contexto de la invención descrita se incluyen, aunque sin limitación, oxicams, tales como piroxicam, isoxicam, tenoxicam, sudoxicam, y CP-14,304; disalcid, benorilato, trilisato, safapryn, solprin, diflunisal, y fendosal; derivados de ácido acético, tales como diclofenac, fenclofenac, indometacina, sulindac, tolmetina, isoxepac, furofenac, tiopinac, zidometacina, acematacina, fentiazac, zomepirac, clindanac, oxepinac, felbinac, y ketorolac; fenamatos, tales como los ácidos mefenámico, meclofenámico, flufenámico, niflúmico, y tolfenámico; derivados del ácido propiónico, tales como benoxaprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, fenbufeno, indoprofeno, piroprofeno, carprofeno, oxaprozina, pranoprofeno, miroprofeno, tioxaprofeno, suprofeno, alminoprofeno, y tiaprofénico; pirazolas, tales como fenilbutazona, oxifenbutazona, feprazona, azapropazona y trimetazona. También pueden utilizarse mezclas de estos agentes antiinflamatorios no esteroideos, así como las sales y ésteres dermatológicamente aceptables de estos agentes. Por ejemplo, etofenamato, un derivado del ácido flufenámico, resulta particular útil para la aplicación tópica.

Según otra realización, el agente antiinflamatorio no esteroideo comprende factor β 3 de crecimiento transformante (TGF- β 3), un agente anti-factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) o una combinación de los mismos.

Según otra realización, el agente antiinflamatorio es un agente antiinflamatorio no esteroideo. La expresión "agente antiinflamatorio no esteroideo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquiera de numerosos compuestos que contienen un sistema de 4 anillos de 17 carbonos e incluye los esteroides, diversas hormonas (como esteroides anabólicos) y glucósidos. Entre los ejemplos representativos de fármacos antiinflamatorios esteroideos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, corticosteroides tales como hidrocortisona, hidroxiltriamcinolona, alfa-metil dexametasona, dexametasona-fosfato, dipropionatos de beclometasona, valerato de clobetasol, desónido, desoximetasona, acetato de desoxicorticosterona, dexametasona, diclorisona, valerato de diflucortolona, fludrenolona, acetónido de fluclorolona, pivalato de flumetasona, acetónido de fluosinolona, fluocinónido, butilésteres de flucortina, fluocortolona, acetato de fluprednido (fluprednilideno), flurandrenolona, halcinónido, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, metilprednisolona, acetónido de triamcinolona, cortisona, cortodoxona, flucetónido, fludrocortisona, diacetato de difluorosona, fluradrenolona, fludrocortisona, diacetato de diflorosona, acetónido de fluradrenolona, medrisona, amcinafel, amcináfido, betametasona y la cantidad de ajuste de sus ésteres, cloroprednisona, acetato de cloroprednisona, clocortelona, clescínolona, diclorisona, diflurprednato, fluclorónido, flunisólido, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, valerato de hidrocortisona, ciclopentilpropionato de hidrocortisona, hidrocortamato, meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona, triamcinolona, y mezclas de los mismos.

Según otra realización, el agente antiinflamatorio esteroideo comprende por lo menos un corticoesteroide seleccionado del grupo que consiste en prednisona, budesónida, mometasona, beclometasona y una combinación de los mismos.

Según otra realización, el agente terapéutico adicional comprende xantina o derivado de xantina, tal como metilxantina.

Según otra realización, el agente terapéutico adicional comprende un inhibidor de elastasa de neutrófilo.

5 Según otra realización, el agente terapéutico adicional es por lo menos un inhibidor de elastasa de neutrófilo, incluyendo, aunque sin limitación, ICI 200355, ONO-5046, MR-889, L-694,458, CE-1037, GW-311616, TEI-8362, ONO-6818, AE-3763, FK-706, ICI-200,880, ZD-0892, ZD-8321, y una combinación de los mismos.

10 Según otra realización, el agente terapéutico adicional comprende por lo menos un inhibidor de fosfodiesterasa, incluyendo, aunque sin limitación, inhibidor de fosfodiesterasa 4. Entre los ejemplos de inhibidores de fosfodiesterasa 4 se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, roflumilast, cilomilast o una combinación de los mismos.

15 Según otra realización, el agente terapéutico adicional es un agente analgésico. Según algunas realizaciones, el agente analgésico alivia el dolor mediante la elevación del umbral del dolor sin alterar la conciencia o alterar otras modalidades sensoriales. Según algunas de tales realizaciones, el agente analgésico es un analgésico no opioide. Los "analgésicos no opioides" son sustancias naturales o sintéticas que reducen el dolor pero no son analgésicos de opioides. Entre los ejemplos de analgésicos no opioides se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, etodolac, indometacina, sulindac, tolmetina, nabumetona, piroxicam, acetaminofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, naproxeno sodio, oxaprozina, aspirina, trisalicilato de colina y magnesio, diflunisal, ácido meclofenámico, ácido mefenámico y fenilbutazona. Según algunas otras realizaciones, el analgésico es un analgésico opioide. Los "analgésicos opioides", "opioides" o "analgésicos narcóticos" son sustancias naturales o sintéticas que se unen a receptores de opioide en el sistema nervioso central, produciendo una acción agonista. Entre los ejemplos de analgésicos opioides se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, codeína, fentanilo, hidromorfona, levorfanol, meperidina, metadona, morfina, oxycodona, oximorfona, propoxifeno, buprenorfina, butorfanol, dezocina, nalbufina y pentazocina.

25 Según otra realización, el agente terapéutico adicional es un agente antiinfeccioso. Según otra realización, el agente antiinfeccioso es un agente antibiótico. La expresión "agente antibiótico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquiera de un grupo de sustancias químicas con la capacidad de inhibir el crecimiento o de destruir bacterias y otros microorganismos, utilizado principalmente en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Entre los ejemplos de agentes antibióticos se incluyen, aunque si limitarse a ellos, penicilina G, meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, carbenicilina, mezlociclina, azlocilina, piperacilina, imipenem, aztreonam, cefalotina, cefaclor, cefoxitina, cefuroxima, cefonicid, cefmetazola, cefotetán, cefprozilo, loracarbef, cefetamet, cefoperazona, cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, cinoxacina, doxiciclina, minociclina, tetraciclina, amikacina, gentamicina, canamicina, netilmicina, tobramicina, estreptomina, azitromicina, claritromicina, eritromicina, estolato de eritromicina, etilsuccinato de eritromicina, glucoheptonato de eritromicina, lactobionato de eritromicina, estearato de eritromicina, vancomicina, teicoplanina, cloranfenicol, clindamicina, trimetoprim, sulfametoxazola, nitrofurantoína, rifampina, mupirocina, metronidazol, cefalexina, roxitromicina, co-amoxiclavulanato, combinaciones de piperacilina y tazobactam, y sus diversas sales, ácidos, bases y otros derivados. Entre los agentes antibióticos antibacterianos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, penicilinas, cefalosporinas, carbacefems, cefamicinas, carbapenems, monobactams, aminoglucósidos, gluco péptidos, quinolonas, tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas.

30 Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe la inflamación que se produce en un pulmón del sujeto. Según otra realización, la inflamación es una inflamación aguda. Según otra realización, la inflamación es una inflamación crónica. Según otra realización, la inflamación está mediada por el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α). Según otra realización, la inflamación está mediada por la interleuquina-6 (IL-6). Según otra realización, la inflamación está mediada por la interleuquina-1 β (IL-1 β).

35 Según otra realización, la composición farmacéutica modula la cantidad de factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) en el pulmón, en comparación con un control. Según otra realización, la composición farmacéutica modula la cantidad de interleuquina-6 (IL-6) en el pulmón, en comparación con un control. Según otra realización, la composición farmacéutica modula la cantidad de interleuquina-1 β (IL-1 β) en el pulmón, en comparación con un control.

40 Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe la actividad de la proteína 1 de choque térmico de 27 kDa (HSPB1). Según otra realización, la actividad de HSPB1 inhibida por la composición farmacéutica es una inducción aberrante de la proliferación de los fibroblastos. Según otra realización, la actividad de HSPB1 inhibida por la composición farmacéutica es una inducción aberrante de la diferenciación de los miofibroblastos. Según otra realización, la actividad de HSPB1 inhibida por la composición farmacéutica es una deposición de una proteína de la matriz extracelular en un intersticio pulmonar. Según otra realización, la proteína de matriz extracelular es el colágeno. Según otra realización, la actividad de HSPB1 inhibida por la composición farmacéutica es una estimulación de la formación de loci fibróticos. Según otra realización, la actividad de HSPB1 inhibida por la composición farmacéutica es un incremento de la actividad contráctil de los miofibroblastos. Según otra realización, la actividad de HSPB1 inhibida por la composición farmacéutica es una estimulación de la unión de los miofibroblastos a la matriz extracelular.

terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica es una cantidad de entre aproximadamente 0,000001 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 0,00001 mg/kg de peso corporal.

5 Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 1 µg/kg/día y 25 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 1 µg/kg/día y 2 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 2 µg/kg/día y 3 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 3 µg/kg/día y 4 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 4 µg/kg/día y 5 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 5 µg/kg/día y 6 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 6 µg/kg/día y 7 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 7 µg/kg/día y 8 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 8 µg/kg/día y 9 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 9 µg/kg/día y 10 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 1 µg/kg/día y 5 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 5 µg/kg/día y 10 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 10 µg/kg/día y 15 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 15 µg/kg/día y 20 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 25 µg/kg/día y 30 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 30 µg/kg/día y 35 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 35 µg/kg/día y 40 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 40 µg/kg/día y 45 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 45 µg/kg/día y 50 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 50 µg/kg/día y 55 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 55 µg/kg/día y 60 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 60 µg/kg/día y 65 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 65 µg/kg/día y 70 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 70 µg/kg/día y 75 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 75 µg/kg/día y 80 µg/kg/día y 85 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 80 µg/kg/día y 85 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 85 µg/kg/día y 90 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 90 µg/kg/día y 95 µg/kg/día. Según algunas otras realizaciones, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica se encuentra comprendida entre 95 µg/kg/día y 100 µg/kg/día.

50 Según otra realización, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica es 1 µg/kg/día.

Según otra realización, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica es 2 µg/kg/día.

55 Según otra realización, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica es 5 µg/kg/día.

60 Según otra realización, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica es 10 µg/kg/día.

65 Según algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende D-aminoácidos (que son resistentes a las proteasas específicas de L-aminoácidos in vivo), una combinación de D-aminoácidos y L-aminoácidos, y diversos aminoácidos "de diseño" (p.ej., β-metil-aminoácidos, C-α-metil-aminoácidos y N-α-metilaminoácidos, etc.) para proporcionar propiedades especiales. Entre los ejemplos de sustituciones de aminoácidos sintéticos se incluyen ornitina en lugar de lisina, y norleucina en lugar de leucina o isoleucina.

Según algunas realizaciones, el polipéptido puede unirse a otros compuestos para estimular una semivida in vivo incrementada, tal como polietilenglicol o dextrano. Dicho enlace puede ser covalente o no covalente, tal como entenderá el experto en la materia. Según algunas otras realizaciones, el polipéptido puede encapsularse en una micela, tal como una micela realizada en poli(etilenglicol)-bloque-poli(polipropilenglicol) o poli(etilenglicol)-bloque-poli(láctido). Según algunas otras realizaciones, el polipéptido puede encapsularse en nanopartículas o micropartículas degradables compuestas de poliésteres degradables, incluyendo, aunque sin limitación, ácido poliláctico, poliglicólido y policaprolactona.

Según otra realización, el polipéptido puede prepararse en una forma sólida (incluyendo gránulos, polvos o supositorios) o en una forma líquida (p.ej., soluciones, suspensiones o emulsiones).

Según otra realización, las composiciones de la invención descrita pueden encontrarse en forma de unos polvos secos dispersables para la administración mediante inhalación o insuflado (por la boca o por la nariz, respectivamente). Las composiciones de polvos secos pueden prepararse mediante procedimientos conocidos de la técnica, tales como la liofilización y molienda en molinos de chorro, tal como se da a conocer en la publicación de patente internacional nº WO91/16038, y tal como se da a conocer en la patente US nº 6.921.527, la exposición de la cual se incorpora como referencia. La composición de la invención descrita se introduce en un receptáculo de dosis adecuado en una cantidad suficiente para proporcionar a un sujeto un tratamiento de dosis unitaria. El receptáculo de dosis es uno que cabe dentro de un dispositivo de inhalación adecuado para permitir la aerosolización de la composición de polvos secos mediante dispersión en un flujo de gas para formar un aerosol, seguido de la captura del aerosol producido de esta manera, en una cámara con una boquilla unida para la posterior inhalación por un sujeto que necesita de tratamiento. Dicho receptáculo de dosis incluye cualquier recipiente que incluye la composición conocida de la técnica, tal como cápsulas de gelatina o plástico con una parte extraíble que permite dirigir un flujo de gas (p.ej., aire) hacia el interior del recipiente para dispersar la composición de polvos secos. Tales recipientes están ejemplificados por los mostrados en la patente US nº 4.227.522; patente US nº. 4.192.309 y patente US nº 4.105.027. Entre los recipientes adecuados se incluyen además los utilizados junto con el inhalador de polvos de la marca Ventolin® Rotohaler de Glaxo o el inhalador de polvos de la marca Spinhaler® de Fison. Otro recipiente de dosis unitaria adecuado que proporciona una barrera de humedad superior se forma a partir de una lámina de plástico y hoja de aluminio. Los polvos de base farmacéutica se utilizan para llenar en peso o en volumen la depresión en la lámina formable y se sellan herméticamente con una lámina de cubierta de aluminio-plástico. Dicho recipiente para la utilización con un dispositivo de inhalación de polvos se describe en la patente US nº 4.778.054 y se utiliza con el Diskhaler® de Glaxo (patentes US nº 4.627.432; nº 4.811.731 y nº 5.035.237). La totalidad de dichas referencias se incorpora como referencia en su totalidad en la presente memoria.

Según otra realización, el portador de la composición de la invención descrita incluye un agente de liberación, tal como un portador de liberación sostenida o de liberación retardada. En tales realizaciones, el portador puede ser cualquier material capaz de liberación sostenida o retardada del polipéptido para proporcionar una administración más eficiente, p.ej. resultante en una dosis menos frecuente y/o reducida del polipéptido, mejorando la facilidad de manipulación, y prolongando o retardando los efectos sobre enfermedades, trastornos, condiciones, síndromes y similares, tratados, prevenidos o estimulados. Entre los ejemplos no limitativos de tales portadores se incluyen liposomas, microesponjas, microesferas o microcápsulas de polímeros naturales y sintéticos, y similares. Los liposomas pueden formarse a partir de una diversidad de fosfolípidos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, colesterol, estearilaminas o fosfatidilcolinas.

Los métodos para la síntesis y preparación de péptidos pequeños son bien conocidos de la técnica y se dan a conocer en, por ejemplo, las patentes US nº 5.352.461; nº 5.503.852; nº 6.071.497; nº 6.331.318; nº 6.428.771 y la publicación de patente US nº 2006/0040953. Las patentes US nº 6.444.226 y nº 6.652.885 describen la preparación y provisión de micropartículas de dicetopiperazinas en suspensión acuosa a las que se añade una solución de agente activo con el fin de unir el agente activo a la partícula. Estas patentes describen además un método de eliminación de un medio líquido mediante liofilización, rindiendo micropartículas que comprenden un agente activo. La alteración de las condiciones del solvente de dicha suspensión para estimular la unión del agente activo a la partícula se da a conocer en las solicitudes de patentes US nº 60/717.524, nº 11/532.063 y nº 11/532.065; patente US nº 6.440.463 y solicitudes de patente US nº 11/210.709 y nº 11/208.087. Cada una de dichas patentes y solicitudes de patente se incorpora como referencia en la presente memoria.

En algunas realizaciones, MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) y sus equivalentes funcionales de la presente invención puede secarse mediante un método de secado por pulverización, tal como se da a conocer en, por ejemplo, la solicitud de patente US nº 11/678.046 (incorporada como referencia en la presente memoria).

En todavía otra realización, el polipéptido de la invención puede aplicarse en una diversidad de soluciones. Una formulación adecuada es estéril, disuelve cantidades suficientes de los polipéptidos y no resulta perjudicial para la aplicación propuesta. Por ejemplo, las composiciones de la invención descrita pueden formularse como suspensiones acuosas, en las que el ingrediente o ingredientes activos están en mezcla con excipientes adecuados para la preparación de suspensiones acuosas.

Entre tales excipientes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, agentes de suspensión (p.ej., carboximetil celulosa

- sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia), agentes de dispersión o humectantes, incluyendo un fosfátido natural (p.ej., lecitina), o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos (p.ej., estearato de polioxietileno), o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga (p.ej., heptadecaetil-enoxicetanol) o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol (p.ej., monooleato de polioxietilén-sorbitol), o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol (p.ej., monooleato de polietilén-sorbitán).
- Las composiciones de la invención descrita también pueden formularse como suspensiones aceitosas mediante la suspensión del ingrediente activo en un aceite vegetal (p.ej., aceite de araquís, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco) o en un aceite mineral (p.ej., parafina líquida). Las suspensiones aceitosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico.
- Las composiciones de la invención descrita también pueden formularse en forma de polvos dispersables y gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua. El ingrediente activo en tales polvos y gránulos se proporciona en mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y los agentes de suspensión adecuados se ejemplifican mediante los ya indicados anteriormente. También pueden encontrarse presentes excipientes adicionales.
- Según algunas realizaciones, los polvos secos se producen mediante un procedimiento de secado por pulverización.
- Según algunas otras realizaciones, los polvos secos se producen mediante micronización.
- Según otra realización, los polvos secos comprenden micropartículas con un diámetro aerodinámico de la mediana de la masa (DAMM) de entre 1 y 5 micrómetros.
- Según otra realización, los polvos secos comprenden micropartículas con un diámetro aerodinámico de la mediana de la masa (DAMM) de aproximadamente 2 micrómetros.
- Según otra realización, la composición farmacéutica se empaqueta en un dispositivo de inhalación, incluyendo, por ejemplo, aunque sin limitación, un nebulizador, un inhalador de dosis medida (IDM) y un inhalador de polvos secos (IPS).
- Según algunas otras realizaciones, la composición farmacéutica es un líquido para la administración aerosolizada utilizando un nebulizador. Según algunas de tales realizaciones, el caudal de la composición farmacéutica es de por lo menos 0,3 ml/min y la composición farmacéutica se administra como partículas de 2 mm, con distribución hasta los alveolos más profundos.
- Las composiciones de la invención descrita también pueden presentar la forma de una emulsión. Una emulsión es un sistema de dos fases preparado mediante la combinación de dos portadores líquidos inmiscibles, uno de los cuales se distribuye uniformemente en la totalidad del otro y consiste en glóbulos que presentan diámetros iguales o superiores a los de las partículas coloidales más grandes. El tamaño del glóbulo resulta crítico y debe ser tal, que el sistema alcance la máxima estabilidad. Habitualmente, la separación de las dos fases no se producirá a menos que se incorpore una tercera sustancia, un agente emulsionante. De esta manera, una emulsión básica contiene por lo menos tres componentes, los dos portadores líquidos inmiscibles y el agente emulsionante, así como el ingrediente activo. La mayoría de emulsiones incorporan una fase acuosa en una fase no acuosa (o viceversa). Sin embargo, resulta posible preparar emulsiones que son básicamente no acuosas, por ejemplo, surfactantes aniónicos y catiónicos del sistema inmiscible no acuoso de glicerina y aceite de oliva. De esta manera, las composiciones de la invención pueden encontrarse en forma de una emulsión de aceite-en-agua. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo aceite de oliva o aceite de araquís, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o una mezcla de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas naturales, por ejemplo goma acacia o goma tragacanto, fosfátidos naturales, por ejemplo soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietilén-sorbitán.
- Según algunas realizaciones, el polipéptido de la invención descrita se sintetiza químicamente. Dicho polipéptido sintético, preparados utilizando técnicas bien conocidas de fase sólida, fase líquida o técnicas de condensación de péptidos, o cualquier combinación de los mismos, puede incluir aminoácidos naturales y no naturales. Los aminoácidos utilizados para la síntesis de péptidos pueden ser estándares Boc (N- α -t-butiloxicarbonilo protegido con N- α -amino) en resina con los protocolos estándares de desprotección, neutralización, acoplamiento y lavado del procedimiento de fase sólida original de Merrifield (1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154), o los aminoácidos 9-fluorenilmetoxicarbonilo protegidos con N- α -amino lábiles frente a bases, descritos por primera vez por Carpino y Han (1972, J. Org. Chem. 37:3403-3409). Pueden obtenerse aminoácidos protegidos tanto con Fmoc como con Boc N- α -amino, de Sigma, Cambridge Research Biochemical, o de otras compañías químicas que resulten familiares al experto en la materia. Además, puede sintetizarse el polipéptido con otros grupos protectores N- α que resulten familiares al experto en la

materia. La síntesis peptídica en fase sólida puede llevarse a cabo mediante técnicas que resulten familiares para el experto en la materia y proporcionadas en, por ejemplo, Stewart y Young, 1984, Solid Phase Synthesis, segunda edición, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.; Fields y Noble, 1990, Int. J. Pept. Protein Res. 35:161-214, o utilizando sintetizadores automatizados, cada uno incorporado como referencia en su totalidad en la presente memoria.

5 Según otra realización, la fibrosis pulmonar se caracteriza por una actividad anormal de la proteína 1 de choque térmico de 27 kDa (HSPB1) en un pulmón del sujeto en comparación con un sujeto de control sano normal. Según otra realización, la actividad normal de HSPB1 es una deposición aberrante de una proteína de la matriz extracelular en un intersticio pulmonar del sujeto en comparación con un sujeto de control sano normal. Según otra realización, la proteína de matriz extracelular es el colágeno. Según otra realización, la actividad anormal de HSPB1 es una estimulación aberrante de la proliferación de fibroblastos en el pulmón en comparación con un sujeto de control sano normal. Según otra realización, la actividad anormal de HSPB1 es una inducción aberrante de la proliferación de miofibroblastos en el pulmón en comparación con un sujeto de control sano normal. Según otra realización, la actividad anormal de HSPB1 es una inducción estimulación de la formación de focos fibróticos en el pulmón en comparación con un sujeto de control sano normal. Según otra realización, la actividad anormal de HSPB1 es un incremento de la actividad contráctil de los miofibroblastos en el pulmón en comparación con un sujeto de control sano normal. Según otra realización, la actividad anormal de HSPB1 es una estimulación aberrante de la unión de los miofibroblastos a la matriz extracelular en el pulmón en comparación con un sujeto de control sano normal.

20 Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe la inflamación que se produce en un pulmón del sujeto. Según otra realización, la inflamación es una inflamación aguda. Según otra realización, la inflamación es una inflamación crónica. Según otra realización, la inflamación está mediada por el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α). Según otra realización, la inflamación está mediada por la interlequina-1 β (IL-1 β). Según otra realización, la inflamación está mediada por la interlequina-6 (IL-6).

25 Según otra realización, la composición farmacéutica modula la cantidad de factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) en el pulmón del sujeto, en comparación con un control. Según otra realización, la composición farmacéutica modula la cantidad de interlequina-1 β (IL-1 β) en el pulmón del sujeto, en comparación con un control. Según otra realización, la composición farmacéutica modula la cantidad de interlequina-6 (IL-6) en el pulmón del sujeto, en comparación con un control.

30 Según otra realización, la composición farmacéutica inhibe la actividad anormal de HSPB1 en comparación con un sujeto de control sano normal en un pulmón del sujeto. Según otra realización, la actividad anormal de HSPB1 es una deposición aberrante de una proteína de la matriz extracelular en un intersticio pulmonar del sujeto en comparación con un sujeto de control sano normal. Según otra realización, la proteína de matriz extracelular es el colágeno. Según otra realización, la actividad anormal de HSPB1 es una estimulación aberrante de la proliferación de fibroblastos en el pulmón en comparación con un sujeto de control sano normal. Según otra realización, la actividad anormal de HSPB1 es una inducción aberrante de la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos en el pulmón en comparación con un sujeto de control sano normal. Según otra realización, la actividad anormal de HSPB1 es una estimulación aberrante de la formación de focos fibróticos en comparación con un sujeto de control sano normal. Según otra realización, la actividad anormal de HSPB1 es un incremento aberrante de la actividad contráctil de los miofibroblastos en comparación con un sujeto de control sano normal. Según otra realización, la actividad contráctil de los miofibroblastos se caracteriza por un nivel elevado de alfa-actina de músculo liso (α -SMA) en comparación con un sujeto de control sano normal. Según otra realización, la actividad contráctil de los miofibroblastos se caracteriza por incrementos en la formación de las fibras de estrés en comparación con un sujeto de control sano normal. Según otra realización, la actividad anormal de HSPB1 es una estimulación aberrante de la unión de los miofibroblastos a la matriz extracelular en comparación con un sujeto de control sano normal.

50 Según otra realización, la etapa de administración puede realizarse sistémicamente, por vía oral, bucal, parenteral, tópica, mediante inhalación, mediante insuflado, o por vía rectal, o puede producirse localmente por medios tales como, aunque sin limitarse a ellos, inyección, implantación, injertación, aplicación tópica o por vía parenteral. Puede llevarse a cabo la administración adicional, por ejemplo por vía intravenosa, transmucosal, transdérmica, intramuscular, subcutánea, intratraqueal (incluyendo mediante inhalación pulmonar), intraperitoneal, intratecal, intralinfática, intralesional o epidural. La administración puede llevarse a cabo, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces, y/o durante uno o más periodos prolongados como dosis unitarias individuales o en forma de un régimen de tratamiento que comprende múltiples dosis unitarias de múltiples fármacos y/o sustancias.

60 Según algunas otras realizaciones, la etapa de administración se produce de una vez como una dosis individual. Según algunas otras realizaciones, la etapa de administración se lleva a cabo como pluralidad de dosis durante un periodo de tiempo. Según algunas de tales realizaciones, el periodo de tiempo es un día, una semana, un mes, un año o múltiplos de los mismos. Según algunas realizaciones, la etapa de administración se lleva a cabo diariamente durante un periodo de por lo menos una semana. Según algunas realizaciones, la etapa de administración se lleva a cabo diariamente durante un periodo de por lo menos un mes. Según algunas realizaciones, la etapa de administración se lleva a cabo diariamente durante un periodo de por lo menos dos meses. Según algunas realizaciones, la etapa de administración se lleva a cabo diariamente durante un periodo de por lo menos un año. Según otra realización, la etapa de administración se lleva a cabo por lo menos una vez al mes. Según otra realización, la etapa de

Según otra realización, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica es 5 µg/kg/día.

- 5 Según otra realización, la dosis terapéutica del péptido inhibitorio terapéutico de la composición farmacéutica es 10 µg/kg/día.

10 Dentro de la presente solicitud, a menos que se indique lo contrario, las técnicas utilizadas pueden encontrarse en cualquiera de entre varias referencias bien conocidas, tales como: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, vol. 185, editado por D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA), "Guide to Protein Purification" en: Methods in Enzymology (M.P. Deutscher, ed., (1990) Academic Press, Inc.); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, CA), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2a ed. (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY), y Gene Transfer and Expression Protocols, pp. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.), la totalidad de los cuales se incorpora en la presente memoria como referencia.

20 A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque también pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la invención descrita, a continuación se describen métodos y materiales preferentes.

25 En donde se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta las décimas de unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de dicho intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en dicho intervalo indicado se encuentra comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de dichos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños también se encuentran comprendidos dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Donde el intervalo indicado incluya uno o ambos límites, los intervalos que excluyan cualquiera de los límites o ambos límites incluidos también se encuentran incluidos en la invención.

35 Debe indicarse además que, tal como se utiliza en la memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado.

40 Las publicaciones comentadas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su exposición antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la invención descrita no posee el derecho de anteceder a dicha exposición en virtud de invención anterior. Además, las fechas de publicación pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, que pueden requerir una confirmación independiente.

EJEMPLOS

45 Los ejemplos a continuación se proporcionan a fin de proporcionar al experto ordinario en la materia una exposición y descripción completas de cómo realizar y utilizar la invención descrita, y no pretenden limitar el alcance de los que los inventores consideran su invención ni pretenden representar que los experimentos, posteriormente, son todos o los únicos experimentos llevados a cabo. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (p.ej., cantidades, temperatura, etc.), aunque deben considerarse algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso; el peso molecular es peso molecular medio; la temperatura se expresa en grados centígrados y la presión es igual o aproximadamente igual a la presión atmosférica.

I. Materiales y métodos

55

Desarrollo del fármaco MMI-0100

60 Para la producción según buenas prácticas de fabricación (BPF) de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1), se transfirió aproximadamente 1 kg de resina Fmoc-Ala-Wang a un recipiente de reacción de síntesis en fase sólida de vidrio de 50 l dotado de un agitador mecánico. Se dejó que la resina se hinchase en dimetilformamida (DMF) durante como mínimo (CM) 2 horas antes de drenar el DMF. A continuación, las perlas de resina se lavaron mediante enjuagues consecutivos de DMF. El grupo protector N-terminal (es decir, Fmoc) se eliminó (etapa de desbloqueo) mediante tratamiento con piperidina al 20% en DMF y la resina se lavó con DMF. El siguiente aminoácido en la secuencia se acopló en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y diisopropilcarbodiimida (DIC). Generalmente, se utilizaron 2,5 a 3,5 equivalentes molares de Fmoc-aminoácido (Fmoc-AA) a la escala de síntesis para el acoplamiento. Se disolvió Fmoc-AA en DMF y se activó mediante la adición de HOBt y DIC. Se monitorizó el

65

completado de cada acoplamiento mediante la prueba de ninhidrina. En el caso de que el acoplamiento fuese incompleto, se llevó a cabo un segundo acoplamiento con el mismo aminoácido mediante la utilización del método de anhídrido simétrico. Generalmente, para el acoplamiento se utilizaron 3,0 a 6,0 equivalentes molares de Fmoc-AA a la escala de síntesis. El Fmoc-AA se disolvió en diclorometano (DCM) y un volumen mínimo de DMF y se activó mediante la adición de DIC en una proporción molar de Fmoc-AA/DIC=1,0/0,5. Tras completar la secuencia completa del péptido, se enjuagó la resina peptídica a fondo con lavados sucesivos de DMF y MeOH. A continuación, se secó la resina bajo vacío durante CM 3 horas. La recuperación típica de la resina peptídica seca total era de aproximadamente 2.800 gramos, representando un rendimiento de resina peptídica de ~ 65%.

Aproximadamente 370 a 500 gramos de resina peptídica seguidamente se transfirieron a una botella de vidrio convenientemente dimensionado y dotada de una barra de agitación magnética. El matraz que contenía la resina peptídica se enfrió en un baño de hielo/agua o en una nevera durante no más de 30 minutos. El cóctel de ácido trifluoroacético (TFA) (una mezcla de TFA, TIS y agua en una proporción de 95 ml: 2,5 ml: 2,5 ml) se preenfrió en un baño de hielo/agua durante no más de 30 minutos. Se añadieron a este recipiente aproximadamente 8 a 12 ml de cóctel de corte de TFA por gramo de resina. Tan pronto como se agrupó la resina peptídica y el cóctel de TFA, se retiró el baño de hielo/agua y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas. A continuación, la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de vidrio grueso y la resina se lavó dos veces con 0,5 a 1,0 ml de TFA por gramo de resina en cada lavado. Se recolectó el filtrado agrupado y se descartó la resina. A continuación, se añadió el filtrado a éter preenfriado en una nevera durante menos de 30 minutos, en una proporción de 1 ml de filtrado por cada 10 ml de éter, para precipitar el péptido cortado. La mezcla de péptido-éter se equilibró a temperatura ambiente durante no más de 30 minutos. El péptido precipitado se recolectó sobre un filtro de vidrio del medio. El precipitado se lavó a fondo con éter frío tres veces, utilizando suficiente éter para por lo menos cubrir todo el precipitado sobre el filtro. A continuación, se eluyó el éter a través del mismo filtro de vidrio del medio. El péptido en bruto se transfirió a una botella de plástico y se introdujo en un desecador conectado a una bomba de vacío mecánica para el secado durante no más de 12 horas. Tras el secado, el péptido en bruto se almacenó a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. El procedimiento de corte se repitió múltiples veces hasta el corte de toda la resina peptídica. Una recuperación por lotes típica de péptido en bruto seco total es de aproximadamente 1.250 gramos, representando un rendimiento de corte de aproximadamente 110%.

El péptido en bruto procedente del corte se preparó para la purificación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) mediante disolución del péptido en tampón para HPLC a una concentración final del péptido en bruto de 20 mg/ml. Se filtró la solución de péptido a través de una membrana de filtración de vidrio de 1 μm y se cargó en una columna de fase inversa C18, que se operó mediante un sistema de HPLC preparativa. La columna se lavó y se equilibró. Se utilizó un gradiente lineal para eluir el péptido en bruto de la columna. Tras cada purificación de producto en bruto, se analizaron las fracciones mediante un sistema de HPLC analítica utilizando una columna Kromasil C18, 5 μm , 100 Å 4,6 x 250 mm. Las fracciones generadas a partir de la purificación inicial se agruparon basándose en la pureza del HPLC y un perfil de impurezas de cada fracción. Los conjuntos de péptidos se almacenaron a 2-8°C hasta el procesamiento posterior. Se repitió este procesamiento hasta la purificación de todo el péptido en bruto a través de la columna de HPLC y cumplir los criterios de pureza del Grupo principal. Se llevó a cabo un intercambio salino con sal acetato mediante HPLC. La solución peptídica final se filtró a través de un filtro de 0,22 μm y se cargó en un liofilizador de bandejas. El péptido se precongela a -40°C durante no más de 720 minutos antes de iniciar el ciclo de liofilización. La liofilización requiere aproximadamente 5 días. De las etapas de purificación y liofilización resultó un rendimiento final de aproximadamente 50% a 55%.

45 **Determinación radiométrica de IC₅₀**

Se estimó el valor de IC₅₀ a partir de una curva de 10 puntos de diluciones semilogarítmicas. El péptido se suministró en dimetilsulfóxido (DMSO). Específicamente, se incubó MK2 recombinante humano (h) (5 a 10 mU) con 3-glicerofosfato sódico 50 mM (pH=7,5), EGTA 0,1 mM, 30 μM de péptido de sustrato (KKLNRTLVA, SEC ID n° 21), acetato de magnesio 10 mM y γ -³³P-ATP 90 μM (volumen final: 25 μl) durante 40 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se detuvo la reacción con ácido fosfórico al 3%. Se aplicaron puntos de 10 μl de dicha mezcla en un Filtermat P30 y se lavaron tres veces durante cinco minutos con ácido fosfórico 75 mM y una vez con metanol. Finalmente, la membrana se secó y se utilizó un contador de centelleo. Se seleccionó una concentración de ATP a menos de 15 μM de la Km aparente para ATP, ya que Hayess y Benndorf (Biochem. Pharmacol., 1997, 53(9): 1239-47) han demostrado que el mecanismo de su péptido inhibidor original (es decir, el péptido KKKALNRQLGVAA, SEC ID n° 22) no era competitivo con la unión del ATP.

Además de determinar el valor de IC₅₀ para MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID n° 1), se sometió a ensayo la actividad inhibidora contra 266 quinasas humanas utilizando el servicio IC₅₀ Profiler Express de Millipore (Millipore, Billerica, MA).

Para el análisis de especificidad, se utilizaron 100 μM de cada MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID n° 1), MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEC ID n° 19), MMI-0300 (FAKLAARLYRKALARQLGVAA; SEC ID n° 3), MMI-0400 (KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA; SEC ID n° 4) y MMI-0500 (HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA; SEC ID n° 7) disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). Se seleccionó la concentración de 100 μM debido a que esta concentración inhibía la formación de adhesión en un estudio in vivo (tal como se da a conocer en la solicitud de

patente US nº 12/582.516, presentada el 20 de octubre de 2009, el contenido de la cual se incorpora como referencia en la presente memoria en su totalidad). Cada medición de actividad de quinasa se llevó a cabo por duplicado.

Histoquímica e inmunohistoquímica

5 Se generó un modelo en ratón de fibrosis pulmonar mediante la administración de 0,025 U de bleomicina/PBS por vía intratraqueal en ratones C57BL/6. Se administró MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) o MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEC ID nº 19) (a las dosis de 50 µg/kg, 75 µg/kg y 100 µg/kg al día) diariamente desde el día 7 posterior a la lesión con bleomicina (para el análisis de la etapa postinflamatoria/prefibrótica; un modelo de prevención) o el día 14 posterior a la lesión con bleomicina (para el análisis de la etapa postfibrótica; modelo de tratamiento) por vía intraperitoneal o mediante nebulización, hasta el día 21 o 28 posterior a la administración de bleomicina. A los 21 días de la administración de bleomicina (para el modelo de prevención) o a los 28 días de la administración de bleomicina (para el modelo de tratamiento), se sacrificaron con una inyección de pentobarbital sódico (120 mg/kg) y se abrió la cavidad torácica. Se ligó el conducto principal bronquial derecho y se extirpó el pulmón derecho. Se canuló la tráquea y se perfundió el pulmón izquierdo con paraformaldehído al 4% a una presión de H₂O de 21 cm. A continuación, los bloques de tejido se incluyeron en parafina y se prepararon secciones de 4 mm para la tinción. Se tiñeron secciones de cada animal con hematoxilina y eosina (H+E) para visualizar las células o con tinción tricrómica de Masson para destacar la deposición de colágeno. Tras la incubación, las secciones se lavaron con ácido acético al 0,2%, se deshidrataron mediante inmersión en alcohol al 95% y se clarificaron con xileno (3-4 veces) en una placa de tinción. Las secciones teñidas se montaron en un portaobjetos de vidrio etiquetado con medio de montaje orgánico.

II. Resultados

25 Ejemplo 1. IC₅₀ y especificidad de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1).

Se determinó el valor de IC₅₀ (concentraciones inhibitoras semimáximas) para el péptido inhibidor de MK2 (MMI-0100, YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1)) utilizando el IC₅₀ Profiler Express Service de Millipore. Este ensayo cuantitativo mide cuánto inhibidor resulta necesario para inhibir 50% de un proceso o componente biológico dado de un proceso (es decir, un enzima, célula o receptor celular) [IC₅₀]. Específicamente, en estos ensayos, un sustrato cargado positivamente se fosforiló con un grupo fosfato radiomarcado de un ATP en el caso de que la quinasa no resulte inhibida por un péptido inhibidor. A continuación, el sustrato cargado positivamente se atrajo a una membrana de filtración cargada negativamente, se cuantificó con un contador de centelleo y se comparó con un control de 100% de actividad.

35 Se seleccionaron concentraciones de ATP a 15 µM de la Km aparente para ATP ya que una concentración de ATP próxima a la Km puede permitir que las quinasas presenten la misma cantidad relativa de actividad de fosforilación. La IC₅₀ de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) se determinó que era 22 µM.

40 Además de determinar la IC₅₀ del compuesto, se evaluó la especificidad de los péptidos inhibidores de MK2 mediante el examen de las actividades de la totalidad de las 266 quinasas humanas disponibles para someterlas a ensayo en el servicio de perfilado de quinasas de Millipore (Tabla 1). Para el análisis, se determinaron las quinasas inhibidas en más de 65% por MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1); MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEC ID nº 19), MMI-0300 (FAKLAARLYRKALARQLGVAA; SEC ID nº 3); MMI-0400 (KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA; SEC ID nº 4) y MMI-0500 (HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA; SEC ID nº 7).

50 Tal como se muestra en la Tabla 1, a 100 µM, los péptidos inhibidores de MK2, MMI-0100 (SEC ID nº 1), MMI-0200 (SEC ID nº 19), MMI-0300 (SEC ID nº 3), MMI-0400 (SEC ID nº 4) y MMI-0500 (SEC ID nº 5) inhibieron un grupo específico de quinasas y mostraron una inhibición fuera de la diana de la quinasa muy limitada. Más específicamente, los péptidos inhibidores de MK2, MMI-0100 (SEC ID nº 1), MMI-0200 (SEC ID nº 19), MMI-0300 (SEC ID nº 3), MMI-0400 (SEC ID nº 4) y MMI-0500 (SEC ID nº 5) inhibieron in vitro más de 65% de las actividades de quinasa de la proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2), de la proteína quinasa 3 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK3), de la proteína quinasa I dependiente de calcio/calmodulina (CaMKI, proteína quinasa específica de serina/treonina) y receptores de factor de crecimiento BDNF/NT-3 (TrkB, tirosina quinasa).

Tabla 1. Ensayo de perfilado de quinasas

	MMI-0100 (SEC ID nº 1) (100 µM)	MMI-0200 (SEC ID nº 19) (100 µM)	MMI-0300 (SEC ID nº 3) (100 µM)	MMI-0400 (SEC ID nº 4) (100 µM)	MMI-0500 (SEC ID nº 7) (100 µM)
Abl(h)	136	107	69	84	16
Abl (H396P) (h)	130	121	101	105	51
Abl (M351T)(h)	128	119	90	121	61
Abl (Q252H) (h)	105	107	82	98	40

ES 2 711 670 T3

Abl (T315I)(h)	98	108	97	105	16
Abl(Y253F)(h)	104	102	86	78	29
ACK1(h)	106	97	104	95	64
ALK(h)	118	95	19	16	12
ALK4(h)	124	152	140	130	81
Arg(h)	89	82	72	84	22
AMPK α 1(h)	107	108	71	87	35
AMPK α 2(h)	121	88	54	58	9
ARK5(h)	108	93	78	69	20
ASK1(h)	100	101	80	69	-4
Aurora-A(h)	120	107	92	119	110
Aurora-B(h)	94	166	128	150	5
Axl(h)	81	99	52	41	12
Bmx(h)	62	76	N/D	26	45
BRK(h)	70	127	35	18	41
BrSK1(h)	100	93	67	76	72
BrSK2(h)	129	102	83	86	84
BTK(h)	112	100	102	94	18
BTK(R28H)(h)	91	104	74	24	10
CaMKI(h)	13	21	1	0	-1
CaMKI β (h)	58	53	2	11	3
CaMKI γ (h)	106	94	5	3	3
CaMKI δ (h)	59	47	10	17	0
CaMKI δ (h)	89	2	1	2	1
CaMKIV(h)	87	71	17	18	-1
CDK1/ciclina B(h)	96	115	73	74	57
CDK2/ciclina A(h)	97	114	86	92	87
CDK2/ciclina E(h)	106	112	94	83	19
CDK3/ciclina E(h)	106	104	94	92	8
CDK5/p25(h)	114	97	89	92	66
CDK5/p35(h)	94	92	79	76	59
CDK6/cyclinD3(h)	103	100	86	85	23
CDK7/ciclina H/MAT1(h)	89	67	65	47	15
CDK9/ciclina T1(h)	228	103	91	235	6
CHK1(h)	97	115	91	87	65
CHK2(h)	104	105	66	54	13
CHK2(I157T)(h)	97	85	43	41	3
CHK2(R145W)(h)	97	81	33	31	3
CK1 γ 1(h)	110	98	111	116	109
CK1 γ 2(h)	119	104	123	114	119
CK1 γ 3(h)	105	96	125	115	114
CK1 δ (h)	115	92	92	93	78
CK2(h)	90	83	90	101	93
CK2 α 2(h)	104	88	105	96	103
CLK2(h)	88	97	103	116	116
CLK3(h)	108	76	61	84	76
cKit(h)	95	110	53	43	45
cKit(D816V)(h)	117	118	60	35	30
cKit(D816H)(h)	79	106	126	143	194
cKit(V560G)(h)	94	115	102	124	198
cKit(V654A)(h)	69	113	134	150	223
CSK(h)	70	33	49	16	2
c-RAF(h)	97	115	107	102	19
cSRC(h)	70	32	26	14	30
DAPK1(h)	97	113	46	36	0
DAPK2(h)	41	92	32	16	3
DCAMKL2(h)	146	131	81	70	56
DDR2(h)	105	104	94	95	79
DMPK(h)	60	66	59	54	12
DRAK1(h)	47	34	14	14	8
DYRK2(h)	99	142	155	195	127
eEF-2K(h)	113	136	91	43	43
EGFR(h)	95	83	21	16	-1

ES 2 711 670 T3

EGFR(L858R)(h)	76	120	N/D	52	26
EGFR(L861Q)(h)	53	74	25	22	15
EGFR(T790M)(h)	106	113	100	106	70
EGFR(T790M,L858R)(h)	93	108	85	78	53
EphA1(h)	114	136	73	61	40
EphA2(h)	58	95	31	17	N/D
EphA3(h)	107	117	6	12	33
EphA4(h)	110	127	88	65	48
EphA5(h)	110	123	18	24	42
EphA7(h)	193	220	159	222	189
EphA8(h)	181	133	93	146	337
EphB2(h)	68	128	18	22	70
EphB1(h)	99	95	44	58	37
EphB3(h)	109	128	62	47	79
EphB4(h)	62	131	44	28	38
ErbB4(h)	73	82	40	0	2
FAK(h)	98	110	111	96	94
Fer(h)	117	101	130	108	196
Fes(h)	44	74	20	16	23
FGFR1(h)	120	97	55	59	18
FGFR1(V561M)(h)	108	72	74	74	113
FGFR2(h)	49	73	14	18	12
FGFR2(N549H)(h)	95	104	116	112	105
FGFR3(h)	73	208	102	0	10
FGFR4(h)	67	75	28	19	3
Fgr(h)	54	71	60	47	109
Flt1(h)	109	96	69	48	27
Flt3(D835Y)(h)	120	115	80	71	65
Flt3(h)	104	99	84	18	17
Flt4(h)	135	105	83	89	73
Fms(h)	89	92	45	37	14
Fms(Y969C)(h)	126	88	72	91	N/D
Fyn(h)	71	75	74	54	83
GCK(h)	98	99	70	66	30
GRK5(h)	117	135	136	131	116
GRK6(h)	131	132	147	141	174
GRK7(h)	111	124	122	100	93
GSK3 α (h)	183	119	157	164	175
GSK3 β (h)	113	132	205	202	238
Haspin(h)	127	71	48	36	25
Hck(h)	354	107	72	72	78
Hck(h) activado	58	100	82	81	67
HIPK1(h)	94	115	74	91	47
HIPK2(h)	98	102	73	90	38
HIPK3(h)	105	105	93	105	85
IGF-1R(h)	102	49	119	90	117
IGF-1R(h), activado	126	94	80	77	45
IKK α (h)	108	104	93	87	50
IKK β (h)	105	109	84	84	71
IR(h)	112	90	96	85	95
IR(h), activado	127	105	79	59	90
IRR(h)	85	69	8	8	10
IRAK1(h)	97	101	95	93	5
IRAK4(h)	100	110	59	59	3
Itk(h)	99	98	77	63	7
JAK2(h)	89	131	133	119	49
JAK3(h)	150	117	121	122	95
JNK1 α 1(h)	91	106	97	98	109
JNK2 α 2(h)	114	109	98	96	81
JNK3(h)	104	90	89	70	171
KDR(h)	100	110	101	94	15
Lck(h)	346	113	-2	228	359
Lck(h) activado	106	90	243	216	76

ES 2 711 670 T3

LIMK1(h)	103	109	88	92	87
LKB1(h)	111	99	101	89	51
LOK(h)	37	67	37	18	7
Lyn(h)	113	98	69	3	31
MAPK1(h)	108	97	107	100	102
MAPK2(h)	98	105	98	93	60
MAPKAP-K2(h)	19	35	5	5	9
MAPKAP-K3(h)	27	39	3	7	9
MEK1(h)	86	116	77	77	21
MARK1 (h)	109	102	132	120	110
MELK(h)	74	59	16	17	0
Mer(h)	47	90	52	50	17
Met(h)	104	71	65	62	27
Met(D1246H)(h)	99	139	125	68	150
Met(D1246N)(h)	114	149	82	31	90
Met(M1268T)(h)	114	143	255	265	239
Met(Y1248C)(h)	77	141	84	36	73
Met(Y1248D)(h)	87	118	102	31	218
Met(Y1248H)(h)	88	153	117	63	126
MINK(h)	96	103	48	52	5
MKK6(h)	74	98	48	44	18
MKK7 β (h)	137	117	100	94	102
MLCK(h)	85	103	2	1	0
MLK1(h)	77	84	40	33	43
Mnk2(h)	94	106	89	86	6
MRCK α (h)	98	103	104	97	5
MRCK β (h)	103	102	83	71	-10
MSK1(h)	52	50	32	28	8
MSK2(h)	105	88	56	52	14
MSSK1(h)	82	100	77	75	22
MST1(h)	85	72	14	6	3
MST2(h)	98	104	19	11	2
MST3(h)	104	95	45	36	4
mTOR(h)	102	110	91	93	135
mTOR/FKBP12(h)	117	118	145	125	140
MuSK(h)	85	106	93	93	27
NEK2(h)	102	97	78	61	0
NEK3(h)	100	100	92	85	20
NEK6(h)	109	98	82	85	49
NEK7(h)	97	96	84	87	89
NEK11(h)	102	95	53	33	2
NLK(h)	100	106	87	90	19
p70S6K(h)	89	84	35	33	3
PAK2(h)	71	69	65	59	44
PAK4(h)	92	98	94	89	86
PAK3(h)	N/D	50	140	121	102
PAK5(h)	97	100	110	117	125
PAK6(h)	121	105	104	100	107
PAR-1B α (h)	62	110	113	109	97
PASK(h)	81	60	29	28	9
PDGFR α (h)	104	108	65	40	40
PDGFR α (D842V)(h)	103	107	114	118	170
PDGFR α (V561D)(h)	58	106	82	100	146
PDGFR β (h)	116	137	81	53	40
PDK1(h)	144	143	135	159	178
PhKy2(h)	62	86	46	38	16
Pim-1(h)	44	18	8	7	0
Pim-2(h)	117	74	76	92	46
Pim-3(h)	98	94	80	80	37
PKA(h)	138	110	119	119	118
PKB α (h)	140	110	57	67	30
PKB β (h)	284	250	84	98	21
PKB γ (h)	105	103	20	41	20

ES 2 711 670 T3

PKC α (h)	94	100	89	86	3
PKC β I(h)	88	98	78	78	1
PKC β II(h)	102	100	82	75	3
PKC γ (h)	94	101	89	79	6
PKC δ (h)	100	101	101	90	61
PKC ϵ (h)	102	98	79	59	23
PKC η (h)	105	101	103	98	45
PKC ζ (h)	110	97	68	46	7
PKC μ (h)	79	73	22	14	10
PKC θ (h)	102	101	88	76	62
PKC ξ (h)	82	98	81	75	7
PKD2(h)	84	78	33	25	10
PKG1 α (h)	82	70	64	58	25
PKG1 β (h)	71	57	50	53	24
Plk1(h)	109	128	115	119	104
Plk3(h)	107	107	127	129	122
PRAK(h)	159	115	128	118	95
PRK2(h)	72	74	33	27	7
PrkX(h)	84	112	61	76	57
PTK5(h)	135	108	132	129	96
Pyk2(h)	113	127	47	34	46
Ret(h)	108	96	140	145	174
Ret (V804L)(h)	113	100	79	73	20
Ret(V804M)(h)	92	105	95	87	36
RIPK2(h)	92	98	97	98	30
ROCK-I(h)	99	117	79	73	17
ROCK-II(h)	102	85	74	77	2
Ron(h)	117	120	93	79	46
Ros(h)	107	86	95	99	150
Rse(h)	109	88	88	89	63
Rsk1(h)	86	102	46	54	34
Rsk2(h)	65	101	51	38	14
Rsk3(h)	76	109	76	71	23
Rsk4(h)	99	125	90	91	29
SAPK2a(h)	110	107	90	85	52
SAPK2a(T106M)(h)	101	100	97	99	32
SAPK2b(h)	99	95	81	82	42
SAPK3(h)	106	97	84	79	24
SAPK4(h)	98	106	96	91	48
SGK(h)	128	115	48	54	2
SGK2(h)	103	119	56	98	-1
SGK3(h)	95	58	10	8	-3
SIK(h)	113	102	66	68	40
Snk(h)	94	109	114	131	122
Src(1-530)(h)	95	75	23	19	21
Src(T341M)(h)	98	56	70	76	59
SRPK1(h)	69	93	90	96	80
SRPK2(h)	92	100	106	97	80
STK33(h)	99	98	45	52	16
Syk(h)	45	36	24	9	5
TAK1(h)	116	124	122	177	N/D
TAO1(h)	99	105	82	73	24
TAO2(h)	95	93	70	74	15
TAO3(h)	45	102	77	67	12
TBKI(h)	106	98	37	39	16
Tec(h) activado	100	77	56	29	33
Tie2(h)	28	53	26	21	22
Tie2(R849W)(h)	102	89	117	108	106
Tie2(Y897S)(h)	99	85	83	87	80
TLK2(h)	113	129	114	151	133
TrkA(h)	74	N/D	25	17	24
TrkB(h)	4	7	5	8	12
TSSK1(h)	99	98	79	79	46

TSSK2(h)	107	91	98	94	92
Txk(h)	87	98	48	37	10
ULK2(h)	123	132	122	131	124
ULK3(h)	142	164	167	147	177
WNK2(h)	95	94	64	54	8
WNK3(h)	100	97	77	74	9
VRK2(h)	112	109	161	185	169
Yes(h)	49	93	67	14	N/D
ZAP-70(h)	79	58	75	33	1
ZIPK(h)	80	67	28	13	1
N/D: el % de actividad no pudo determinarse al ser duplicados.					
MMI-0100: YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1)					
MMI-0200: YARAAARQARAKALNRQLGVA (SEC ID nº 19)					
MMI-0300: FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEC ID nº 3)					
MMI-0400: KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEC ID nº 4)					
MMI-0500: HRRIKAWLKKIKAL ARQLGVAA (SEC ID nº 7)					

Ejemplo 2. Formulación de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) y sus equivalentes funcionales

- 5 Según algunas realizaciones, MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) y sus equivalentes funcionales se formulan como polvos liofilizados mediante secado por pulverización, micronización (p.ej., molienda de chorro) o como formulación líquida para la nebulización.

Secado por pulverización

10 En algunas realizaciones, se utiliza el secado por pulverización para preparar MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) y sus equivalentes funcionales en consideración de los factores siguientes:

- 15 (a) las proteínas y péptidos tienden a la desnaturalización; es decir, la disrupción de las estructuras terciarias y, en ocasiones, secundarias;
- (b) la desnaturalización puede ser reversible o irreversible y puede estar causada por una diversidad de condiciones, tales como el incremento de temperatura, la reducción de la temperatura, los extremos de pH, la adición de solventes, la presión y la desnaturalización por cizalla (aplicable a la micronización);
- 20 (c) las proteínas desnaturalizadas son menos activas y no terapéuticas, en ocasiones completamente inactivas;
- (d) el secado por pulverización es capaz de convertir estas moléculas grandes amorfas en partículas esféricas discretas con una distribución específica de tamaños de partícula controlada por los parámetros de procesamiento; las partículas secadas por pulverización pueden ser muy esféricas, de forma de donut y típicamente son huecas, referidas a partículas >5 µm todavía pueden ser respirables, aunque resistentes a los
- 25 (e) el secado por pulverización, con o sin excipientes, generalmente mejora la estabilidad de las proteínas.

Se evalúa una formulación liofilizada de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) y sus equivalentes funcionales para sinergia potencial con el procedimiento de secado por pulverización (p.ej., la correspondencia de niveles óptimos de humedad/concentraciones de tampón/pH, selección de excipiente y similares) para garantizar la protección de la estabilidad peptídica.

30

Las tandas de secado por pulverización iniciales presentan como objetivo los criterios de aceptación mutuamente acordados a fin de definir los parámetros del procedimiento para el funcionamiento del secado por pulverización. Para un producto de inhalación, el tamaño de partícula se considera un criterio importante. Para la deposición alveolar en la región de interés (tipo II), diámetros aerodinámicos de la mediana de la masa (DAMM) de 1 a 5 micrómetros generalmente se aceptan como adecuados para la deposición periférica en los espacios alveolares (Heyder J. Proc. Am. Thorac. Soc. 1(4): 315-320, 2004; incorporada como referencia en la presente memoria). Otros estudios han sugerido que los DAMM de 1 a 3 micrómetros son un tamaño de partícula diana inicial deseable para el procedimiento de secado por pulverización. Debido a que la diana de bioespacio probable para MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) es la región alveolar, inicialmente se utiliza como diana un DAMM en el rango de aproximadamente 2 micrómetros para garantizar la deposición en el espacio alveolar.

35

40

Entre los criterios de aceptación se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, (1) tamaño de partícula (es decir, D₉₀ de aproximadamente 2 µm); (2) niveles de humedad (es decir, humedad inferior a 3% p/p); (3) densidad de los polvos, y (4) apariencia superficial (esférica, rugosa, toroidal).

45

Se llevó a cabo un experimento de diseño del procedimiento con el fin de optimizar los parámetros del procedimiento de secado por pulverización, incluyendo, por ejemplo, aunque sin limitación, (1) la presión de entrada y la temperatura

de secado, (2) la concentración de la carga de alimentación y tasa de alimentación, y (3) proporción de péptido/excipiente (los excipientes son, por ejemplo, sales tampón y un monosacárido).

5 **Ejemplo 3. Producción de lotes de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) para la evaluación continua del rendimiento de aerosoles**

Se llevaron a cabo 2-3 tandas de secado por pulverización a los parámetros de procedimiento definidos que se han indicado anteriormente, a fin de generar material para la evaluación del rendimiento del aerosol.

10 Los polvos secos por pulverización resultan muy adecuados para la administración desde un inhalador, por ejemplo, sin limitación un inhalador MicroDose. MicroDose rutinariamente consigue tanto una elevada dosis emitida y una fracción y dosis elevadas de partículas finas con este enfoque de formulación, tanto para mezclas puras como mezclas co-secadas por pulverización. Se muestran rendimientos ejemplares de aerosoles de insulina seca por pulverización en las figuras 1 y 2.

15 Aunque la micronización seca es un método de producción de polvos preferente para moléculas pequeñas para la administración pulmonar, en contraste con el secado por pulverización, es un método estresante, que utiliza elevadas fuerzas de cizalla. Debido a que la utilización de elevadas fuerzas de cizalla puede conducir a la fracturación de proteínas y péptidos, la micronización seca no se utiliza rutinariamente para moléculas grandes. Además, si los tamaños de dosis son pequeños, se requieren agentes de carga para mejorar la fluidez y permitir una medición precisa de los polvos durante las operaciones de llenado. El excipiente primario y uno de los únicos excipientes aprobados para la administración pulmonar con este fin es la lactosa, que puede requerir su ensayo para compatibilidad química con MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) o sus equivalentes funcionales, ya que la lactosa es incompatible con determinados péptidos.

25 El procedimiento de micronización es bastante sencillo y bien conocido de la técnica. Brevemente, se someten polvos secos liofilizados de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) y sus equivalentes funcionales a etapas de molienda hasta alcanzar la distribución prescrita diana de tamaños de partícula (es decir, MMAD, D10, D50, D90). Estos polvos micronizados puros se someten a ensayo para potencia para garantizar su actividad posterior a la micronización, optimizada para la administración desde el inhalador, y su estabilidad química y física sometida a ensayo en el envase primario (blíster termosellado). A continuación, los polvos puros se mezclan con una selección priorizada de grados de lactosa pulmonar aprobados hasta una diana, se someten a ensayo para la homogeneidad de la mezcla y se someten a los mismos ensayos de optimización del inhalador y de estabilidad.

35 **Inhalador de polvos secos (IPS) MicroDose**

Según alguna realización, MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) y sus equivalentes funcionales pueden administrarse utilizando un inhalador de polvos secos (IPS). Por ejemplo, el inhalador de polvos secos (IPS) MicroDose presenta un generador de aerosol activado piezoeléctricamente accionado por la respiración y consigue una elevada eficiencia de administración pulmonar independiente del caudal y volumen de inhalación del paciente. Al contrario que los IPS 'pasivos', que requieren una inhalación fuerte y vigorosa del orden de 40 a 60 litros por minuto (LPM) de flujo para una administración pulmonar eficaz, no existe ninguna maniobra respiratoria requerida para el IPS MicroDose, ya que puede administrarse eficazmente en un abanico muy amplio de caudales desde tan sólo 10 LPM hasta un flujo de 90 LPM, con un rendimiento equivalente (ver ejemplos de rendimiento en las figuras 3 y 4).

45 Según algunas otras realizaciones, MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) y sus equivalentes funcionales pueden administrarse utilizando una aplicación respiratoria tidal, tal como un 'nebulizador de polvos secos' (NPS). El NPS administra dosis de polvos secos sincronizados con la respiración tidal de inhalación con inducción de tan sólo 2 litros por minuto (LPM), flujos pico esperados de entre 5 y 15 LPM y volúmenes tidales de tan sólo 30 ml, que son condiciones mucho más fáciles que las esperables con pacientes adultos de IPS. Este nuevo NPS ha completado con éxito su segundo ensayo clínico en adultos, completándose su primer estudio en noviembre de 2011. Estos resultados son accesibles mediante Internet en la dirección "clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01489306?spons=Microdose&rank=1."

55 El sistema inhalador electrónico MicroDose es una formulación extremadamente flexible, puede administrarse con precisión y eficiencia tanto las modalidades de formulación anteriores con eficiencia particularmente elevada con productos farmacéuticos secados por pulverización y ha demostrado su capacidad de rendimiento con más de 30 moléculas pequeñas y grandes. La insulina seca por pulverización en el envase primario, por ejemplo, presenta una duración de por lo menos 18 meses. Se muestran ejemplos de rendimiento de administración de péptidos secados por pulverización y de moléculas pequeñas micronizadas en las figuras 5 a 8.

65 Respecto al efecto de la formulación de polvos secos sobre las membranas pulmonares, p.ej., sensibilización, la administración de polvos secos, especialmente a cargas de polvos bajas (<4-5 mg) es improbable que afecte a las membranas pulmonares o que provoque sensibilización (tos, etc.) a menos que ésta sea una propiedad intrínseca de la molécula activa (que no ha sido observada en estudios animales por los presentes inventores). Se seleccionan los excipientes ya aprobados para el uso pulmonar con excelente biocompatibilidad pulmonar y que se encuentran

presentes en cantidades muy bajas (es decir, rango de pocos mg). Por ejemplo, el manitol a cantidades bajas no es probable que presente un efecto.

Nebulización líquida

Alternativamente, MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) o sus equivalentes funcionales pueden administrarse mediante nebulización líquida. Estudios preclínicos anteriores han mostrado que MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) puede administrarse en roedores mediante un sistema nebulizador AeroGen® adaptado para el uso animal.

Con el fin de producir específicamente la capacidad de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) de ser dirigido para impactar positivamente sobre el pulmón comprometido, en los experimentos de eficacia en el modelo animal con bleomicina, se aerosolizó eficazmente una solución de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1). La administración pulmonar local de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) se llevó a cabo mediante un dispositivo nebulizador para roedores diseñado y fabricado por Aerogen® (www.aerogen.com). El nebulizador de microbomba de laboratorio Aeroneb® utiliza una tecnología de aerosolización de alta eficiencia para la utilización en la investigación preclínica de aerosoles y estudios de inhalación, proporcionando una valiosa asociación entre la etapa preclínica y el desarrollo clínico del producto. El caudal era >0,3 ml/min y estaba diseñado para administrar partículas de 2 mm de tamaño, con distribución hasta los alveolos más profundos. La eficacia de MMI-0100 nebulizado (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) y la incorporación celular en todo el pulmón ha sido demostrada en el modelo en ratón con bleomicina de fibrosis pulmonar (ver la figura 16). La administración inhalada clínicamente relevante localizada resulta tan eficaz como las inyecciones sistémicas convencionales en la atenuación de la activación de MK2.

Ejemplo 4. El nivel de MK2 activado se encuentra incrementado en lesiones fibróticas de pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI)

La proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (MK2) resulta activada con el estrés producido por p38MAPK- α y β . Estas dos isoformas de p38MAPK se unen a un motivo de anclaje básico en el extremo carboxi-terminal de MK2, que posteriormente fosforila sus sitios reguladores. Como consecuencia de la activación, se exporta MK2 del núcleo al citoplasma y cotransporta p38 MAPK activo a su compartimento. MK2 estabiliza la localización de p38MAPK y resulta esencial para la diferenciación, migración y producción de citoquinas (Kotlyarov A., Mol. Cell Biol. 22(13): 4827-4835, 2002).

Por lo tanto, con el fin de examinar si la ruta de señalización de p38MAPK-MK2 resulta activada en los pulmones afectados por FPI, se tiñeron secciones de pulmón obtenidas de pacientes normales y de FPI, con un anticuerpo fosfoespecífico contra una forma activada de MK2 (anti-fosfo-Thr³³⁴-MAPKAPK2). Se inmunotñeron tejidos de pulmón normal y de pulmón con FPI utilizando DAB y el núcleo se contratiñó con hematoxilina. Tal como se muestra en la figura 9, se observó una expresión incrementada de MK2 activado en las células en los focos fibróticos procedentes de explantes de tejido pulmonar derivados de pacientes con FPI en comparación con el tejido de biopsia de pulmón normal (izquierda). Esos resultados sugieren que la formación de fibrosis en los pulmones de los pacientes de FPI se caracteriza por la activación aberrante de la ruta de señalización de p38MAPK-MK2.

Ejemplo 5. La administración nebulizada y sistémica de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) protege frente a la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones.

Una de las características distintivas de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la activación de las células mesenquimatosas y la deposición exuberante de matriz, específicamente de colágeno. La acumulación resultante de colágeno en el pulmón puede medirse mediante técnicas tanto histológicas como bioquímicas, más notablemente a partir de la acumulación de hidroxiprolina, que se deriva prácticamente en su totalidad de colágeno en el pulmón y, de esta manera, sirve como variable sustitutiva del contenido de colágeno en el pulmón completo (Umezawa H. et al., Cancer 20(5):891-895, 1967).

Por lo tanto, se evaluó la eficacia terapéutica del péptido MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) sobre el tratamiento de la fibrosis pulmonar utilizando un modelo de ratón de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina mediante la administración del péptido MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) sistémicamente (vía intraperitoneal) o local (mediante administración nebulizada) durante la profilaxis o etapa prefibrótica (es decir, la administración de fármaco iniciada el día 7 después de la lesión por bleomicina, ver la figura 10) y mediante la medición de los niveles de colágeno como índices de fibrosis en el ratón con bleomicina.

Brevemente, se indujeron loci fibróticos en los pulmones de los ratones mediante la administración intratraqueal de aproximadamente 0,025 U de bleomicina (disueltos en PBS) en ratones C57BL/6. Con el fin de examinar la eficacia de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) en el tratamiento de los pulmones lesionados con bleomicina en la etapa de profilaxis/prefibrótica, se administró diariamente un control (PBS) o MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1), por vía intraperitoneal o mediante nebulización a partir del día 7 después de la administración de bleomicina (cuando cede la inflamación y se activan los mecanismos fibróticos) hasta

el día 21 después de la administración de bleomicina (cuando se observa un nivel significativo de fibrosis) (figura 10). El día 21 después de la administración de bleomicina, tejidos pulmonares procedentes de ratones con bleomicina tratados con MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) o un control (PBS) se aislaron, se fijaron, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones para la tinción. Brevemente, se sacrificaron los ratones con una inyección de pentobarbital sódico (120 mg/kg) y se abrió la cavidad torácica. Se ligó el conducto principal bronquial derecho y se extirpó el pulmón derecho. Se canuló la tráquea y se perfundió el pulmón izquierdo con paraformaldehído al 4% a una presión de H₂O de 21 cm. A continuación, los bloques de tejido se incluyeron en parafina y se prepararon secciones de 4 mm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H+E, para el examen patológico) o tricromía de Masson (para la tinción del colágeno).

Tal como se muestra en la figura 11, las secciones de pulmón procedentes de ratones tratados con PBS mostraban estructuras pulmonares (PN) y de las vías respiratorias (VR) normales. En contraste, las secciones pulmonares procedentes de ratones con bleomicina (el día 21) revelaron una estructura estrechada de las vías respiratorias (VR) con formación de focos fibróticos (FF) (panel superior; tinción de hematoxilina y eosina (H+E) y una acumulación incrementada de colágeno (flechas en el panel inferior; tinción tricrómica de Masson) en tejidos de pulmón, que recuerdan a las observadas en pacientes de FPI. Administración de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1), mediante nebulización o por vía intraperitoneal; sin embargo, redujo significativamente el desarrollo de loci fibróticos (panel superior, MMI-0100 (NEB) y MMI-0100 (IP)) y una acumulación reducida de colágeno (panel inferior, MMI-0100(NEB) y MMI-0100(IP)) en los pulmones de los ratones con bleomicina.

A continuación, se analizaron cuantitativamente los niveles totales de colágeno en los pulmones de los ratones lesionados con bleomicina (figura 12) mediante el cálculo de un factor de conversión constante (7,5) para el colágeno a partir de las concentraciones de hidroxiprolina (Neuman R. y Logan M, J Biol Chem., 186(2):549-56, 1950, incorporada como referencia. Tal como se muestra en la figura 12, la administración tanto nebulizada (BLEO+NEBULIZADO) como sistémica (BLEO+IP) de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) durante la etapa postinflamatoria/prefibrótica redujo significativamente la deposición de colágeno en comparación con el control de bleomicina.

Ejemplo 6. Datos de respuesta a dosis de inhibidores peptídicos de MK2 en el modelo de prevención de fibrosis pulmonar idiopática

A continuación, se examinó el efecto de dosis crecientes de inhibidores peptídicos de MK2 sobre la deposición de colágeno in vivo utilizando el modelo en ratón con bleomicina de fibrosis pulmonar idiopática (modelo de prevención). Brevemente, se sometieron ratones C57-BL/6 a lesión con bleomicina el día 0. A partir del día 7 y continuando hasta el día 21, se administraron en ratones 25, 50 o 75 µg/kg de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) o MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEC ID nº 19) diariamente mediante inyección intraperitoneal (IP). Tal como se muestra en la figura 13, la tinción tricrómica de azul de Masson reveló una reducción de los niveles de colágeno en el pulmón en los ratones lesionados con bleomicina tratados con MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1), sugiriendo que MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) puede proteger de la fibrosis en los pulmones debido a la lesión con bleomicina de una manera dependiente de la dosis. Estos datos sugieren que MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) conserva su potencial como compuesto fibroprotector incluso a dosis más altas.

En contraste, el tratamiento de los ratones lesionados con bleomicina con MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEC ID nº 19) no redujo sino que, por el contrario, incrementó la deposición de colágeno en el pulmón a las dosis sometidas a ensayo. Sin embargo, este resultado es consistente con un estudio anterior con ratones con desactivación de MK2 y fibroblastos embrionarios de ratón (FER) MK2^{-/-}, en los que se había anulado completamente la actividad de MK2, que mostraron un fenotipo de fibrosis agravada (Liu et al., Am J Respir Cell Mol Biol, 37: 507-517, 2007).

Sin respaldo teórico, estos resultados sugieren que: (1) los péptidos inhibidores de MK2 de la invención descrita pueden mostrar un espectro de actividades de inhibición de un grupo específico de quinasas; (2) MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) y MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEC ID nº 19) puede inhibir MK2 y otras quinasas diferencialmente, lo que, dependiendo de la dosis aplicada, contribuye a este espectro de actividades inhibitorias; (3) la formación y/o migración de miofibroblastos también podría ser una parte de la etapa de reparación de la fibrosis y no del daño activo, y (4) resulta necesario, por lo tanto, un determinado nivel de actividad de MK2 para que se produzca dicho proceso (Liu et al., Am J Respir Cell Mol Biol, 37: 507-517, 2007).

Además, los péptidos inhibidores de MK2 de la invención descrita se derivaron del sitio de unión a sustrato de MK2 posterior a HSPB1 diana. Por lo tanto, pueden inhibir competitivamente la actividad de quinasa de MK2 sobre HSPB1. Sin respaldo teórico, los efectos diferenciales de MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEC ID nº 19) sobre la fibrosis pueden atribuirse a sus diferencias de secuencia, su homología respecto a los sitios de unión de HSPB1, su inhibición diferencial de la actividad de quinasa de MK2 sobre un sitio de unión de proteína diana diferente, o una combinación de los mismos.

Ejemplo 7. La administración de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) bloquea eficazmente la activación sistémica de células T en el modelo de prevención de la fibrosis pulmonar idiopática.

Estudios recientes subrayan el papel clave de los linfocitos T en la fibrosis inducida por bleomicina (Wilson, M. et al., *The Journal of Experimental Medicine*, 207(3): 535-552, 2010). Por lo tanto, con el fin de investigar el papel funcional de las células (pan) T esplénicas en los ratones lesionados con bleomicina tratados con MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1), se llevó a cabo la reacción de linfocitos mixtos autólogos (LMA) tal como se ha descrito anteriormente (Wilkes, D. et al., *Journal of Leukocyte Biology*, 64(5):578-586, 1998, incorporada como referencia en la presente memoria) Específicamente, se examinó en el ensayo la capacidad de las células presentadoras de antígeno purificadas de C57BL/6 de inducir la proliferación de linfocitos T de C57BL/6.

Se sometieron ratones C57-BL/6 a lesión con bleomicina el día 0. El día 7, en ratones se administraron 50 µg/kg de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) diariamente mediante inyección intraperitoneal (IP) o nebulizador (NEB) hasta el día 21. Se aislaron las células T esplénicas y se cultivaron solas o en presencia de células presentadoras de antígenos autólogas (CPA procedentes de ratones C57-BL/6) o estimuladas con anticuerpos contra CD3 (α-CD3) durante 48 h. A continuación, las células se marcaron radioactivamente con timidina tritiada, durante 16 h, y se evaluaron las tasas de proliferación.

Tal como se muestra en la figura 14, las células T solas, con independencia del tratamiento, mostraron una capacidad proliferativa muy baja. Sin embargo, al cocultivar las células T con células presentadoras de antígeno autólogas (es decir, CPA aisladas de ratones C57-BL/6), la capacidad proliferativa era significativamente más alta para los ratones lesionados con bleomicina que para los ratones de control. Resulta interesante que la proliferación de células T procedentes de ratones tratados con bleomicina observada en presencia de células presentadoras de antígeno se redujo significativamente mediante la administración sistémica de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1), aunque tal como se esperaba, no mediante el modo inhalado. Estos datos sugieren la supresión de la activación de las células T esplénicas por MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) e indican que el inhibidor peptídico de MK2 es fibroprotector.

También se confirmó la viabilidad de las células T mediante la estimulación de las células con anticuerpos contra α-CD3, un activador de células T policlonales. α-CD3 indujo una robusta proliferación de las células con independencia del grupo de tratamiento. La respuesta proliferativa al activador policlonal sugiere que el inhibidor peptídico MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) no afecta a las propiedades funcionales de las células T esplénicas y que no existe toxicidad con la administración de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) a esta dosis particular. Además, la falta de respuesta de células T esplénicas a MMI-0100 nebulizado (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) sugiere que se produce poca distribución sistémica con este modo de administración del péptido.

Ejemplo 8. El tratamiento sistémico o nebulizado de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) protege los pulmones lesionados con bleomicina en la etapa postfibrótica

El modelo clásico de bleomicina, tal como se ilustra en la figura 10, se ha utilizado ampliamente en la literatura en la etapa prefibrótica para someter a ensayo la eficacia de cualquier intervención. Debido a que la administración tanto nebulizada como sistémica de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) protege significativamente el pulmón de la fibrosis inducida por bleomicina, el efecto de la administración sistémica (intraperitoneal) o local (nebulizada) de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) en el tratamiento de pulmones lesionados con bleomicina se examinó adicionalmente en la etapa postfibrótica, iniciando la intervención farmacológica el día 14, un punto temporal en que los pulmones se encuentran significativamente fibrosados (figura 15) (Pottier, N. et al., *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176(11): 1098-1107, 2007; incorporada como referencia en la presente memoria). El rescate de los pulmones cicatrizados que se muestra en dicho modelo es clínicamente relevante, dado que los pulmones de los pacientes de FPI ya se encuentran cicatrizados en el momento del diagnóstico.

Más específicamente, los loci fibróticos en los pulmones se indujeron mediante la administración intratraqueal de aproximadamente 0,025 U de bleomicina (disueltos en PBS) en ratones C57BL/6. Con el fin de examinar la eficacia de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) en el tratamiento de pulmones lesionados con bleomicina en la etapa postfibrótica, se administró PBS (control) o MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1), en los ratones por vía intraperitoneal o mediante nebulización diariamente desde el día 14 posterior a la administración de bleomicina, hasta el día 28 posterior a la administración de bleomicina. El día 28 después de la administración de bleomicina, tejidos pulmonares procedentes de ratones con bleomicina tratados con MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) o un control (PBS) se aislaron, se fijaron, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones para la tinción. Se sacrificaron los ratones con una inyección de pentobarbital sódico (120 mg/kg) y se abrió la cavidad torácica. Se ligó el conducto principal bronquial derecho y se extirpó el pulmón derecho. Se canuló la tráquea y se perfundió el pulmón izquierdo con paraformaldehído al 4% a una presión de H₂O de 21 cm. A continuación, los bloques de tejido se incluyeron en parafina y se prepararon secciones de 4 mm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H+E, para el examen patológico) o tricromía de Masson (para la tinción del colágeno).

Tal como se muestra en la figura 16, con independencia del modo de administración del fármaco, es decir, si se administra por vía intraperitoneal o se aplica localmente en el pulmón, el tratamiento de MMI-0100

(YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) "rescató" los pulmones severamente cicatrizados. Se utilizó la evaluación histológica para examinar la arquitectura pulmonar (tinción de hematoxilina y eosina (H+E), panel superior) y la distribución del colágeno (tinción tricrómica de azul de Masson, panel inferior). Los resultados de la histoquímica muestran que, mientras los pulmones lesionados con bleomicina se encuentran severamente cicatrizados, los ratones tratados con MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) presentan un parénquima pulmonar más claro.

A continuación, se determinó cuantitativamente la deposición del colágeno mediante la utilización del ensayo estándar de hidroxiprolina con el pulmón izquierdo completo. Se evaluó la deposición de colágeno total (soluble e insoluble) mediante el análisis de las concentraciones de hidroxiprolina en pulmones murinos el día 28 posterior a la lesión con bleomicina. Se administró MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) a la dosis de 50 µg/kg mediante inyección intraperitoneal (IP) o nebulizador (NEB) desde el día 14 posterior a la lesión con bleomicina.

Tal como se muestra en la figura 17, el tratamiento de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) detuvo significativamente la progresión posterior de la deposición del colágeno, en comparación con la línea base, 28 días después de la lesión con bleomicina y el inicio del tratamiento de MM-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1). Esto resulta significativo porque, aunque la literatura actual demuestra la profilaxis eficaz en el desarrollo del fármaco, en el diagnóstico de los pacientes de FPI, hay fibrosis preexistente. Estos resultados también sugieren que MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) presenta el potencial de detener o retrasar eficazmente la progresión posterior de la enfermedad y mejorar la calidad de vida, y que el péptido MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1), en caso de utilizarse a una dosis más alta y/o durante un periodo de tiempo más largo, puede resultar en una mejora incluso mayor de la histología y fisiología pulmonares, y una menor fibrosis.

Ejemplo 9. La administración sistémica o local de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) se correlaciona con un nivel reducido de MK2 activado en el modelo de ratón con bleomicina de fibrosis pulmonar idiopática.

Tal como se ha comentado anteriormente, una de las dianas principales de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) y sus equivalentes funcionales en el pulmón es la quinasa MK2, que induce respuestas inflamatorias y fibróticas en los pulmones afectados. Por lo tanto, con el fin de validar adicionalmente los efectos de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) in vivo, se examinaron los niveles de MK2 activado (phospho-Thr³³⁴-MAPKAPK2) en ratones lesionados con bleomicina no tratados, así como en ratones tratados con MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1).

Brevemente, ratones C57-BL/6 se sometieron a lesión con bleomicina el día 0. El día 14, en ratones se administraron 50 µg/kg de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) diariamente mediante inyección intraperitoneal (IP) o nebulizador (NEB) hasta el día 28 posterior a la lesión con bleomicina. Se inmunotifieron secciones de tejido pulmonar fijadas en formalina contra fosfo-Thr³³⁴ MK2. La tinción de control fue con anticuerpo IgG secundario biotinilado. Se utilizó peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina con 3,3'-diaminobencideno como sustrato y se contratiñeron los núcleos con hematoxilina. Mientras que los ratones con bleomicina mostraron un incremento visible de la presencia de MK2 activada (nódulos oscuros) si se dejaban sin tratar, más particularmente en zonas de deposición significativa de colágeno, los ratones tratados con MMI-0100 mostraron una presencia de MK2 activada similar al tejido normal, con una distribución concentrada en zonas periféricas de las vías respiratorias y en los vasos sanguíneos.

Tal como se muestra en la figura 18, con independencia del modo de administración, es decir, administración sistémica o local, en contraste con el control, la administración de MMI-0100 nebulizado o intraperitoneal (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) estaba asociada a una tinción disminuida de fosfo-Thr³³⁴-MAPKAPK2 (forma activada de MK2) en el modelo en ratón con bleomicina.

Ejemplo 10. MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) regula negativamente las citoquinas inflamatorias en el modelo de tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática

Un mecanismo potencial por el que MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) puede inhibir la formación de fibrosis en el pulmón es mediante la reducción de las concentraciones locales de citoquinas proinflamatorias y, de esta manera, impedir la atracción de monocitos y el remodelado extracelular aberrante por macrófagos en el pulmón (p.ej., incremento de la deposición de colágeno, incremento de la adhesión y migración celular, reducción de la degradación de la matriz). Para explorar esta posibilidad, se examinó la capacidad del péptido MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias mediante la medición de cambios en los niveles de interleuquina-6 (IL-6) y de factor alfa de necrosis tumoral (TNF-α) tras el tratamiento con MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID nº 1) por vía intraperitoneal o mediante nebulización.

La interleuquina-6 (IL-6) es una citoquina multifuncional las acciones principales de la cual incluyen la potenciación de la síntesis de inmunoglobulinas, la activación de células T y la modulación de la síntesis de proteínas de fase aguda.

Es conocido que muchos tipos diferentes de células producen IL-6, incluyendo monocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos, y la expresión del gen de IL-6 en estas células se encuentra regulado por una diversidad de inductores. La interleuquina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) son dos inductores conocidos clave de expresión del gen de IL-6. Entre otros inductores se incluyen activadores de la proteína quinasa C, el ionóforo de calcio A23187 y diversos agentes que causan la elevación de los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPc).

El factor de necrosis tumoral (TNF, también denominado TNF- α) es una citoquina que participa en la inflamación sistémica y es un miembro de un grupo de citoquinas que estimula la reacción de fase aguda. Los estudios han demostrado que TNF- α induce la expresión de IL-6 mediante tres rutas de señalización diferentes dentro de la célula, es decir, 1) la ruta de NF- κ B, 2) la ruta de MAPK y 3) la ruta de señalización de muerte.

Tal como se muestra en la figura 20, la administración de MMI-0100 intraperitoneal (BLEO+MMI-0100 (IP)) o nebulizado (BLEO+MMI-0100 (NEB)) (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID n° 1) redujo significativamente el nivel plasmático tanto de TNF- α (A, panel superior) como de IL-6 (B, panel inferior) en el modelo en ratón con bleomicina de fibrosis pulmonar idiopática.

Ejemplo 11. La administración sistémica o local de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID n° 1) bloquea eficazmente la acumulación de miofibroblastos activados en pulmón murino que está significativamente cicatrizado debido a la lesión con bleomicina

La característica principal de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la acumulación de miofibroblastos en lesiones fibróticas y la expresión de abundante actina alfa del músculo liso (α -SMA), un marcador de activación de miofibroblastos. Además, los miofibroblastos activados son responsables en parte de la rigidez del parénquima pulmonar y del agravamiento de la función pulmonar.

Por lo tanto, el nivel de expresión de α -SMA en pulmones lesionados con bleomicina se evaluó en los pulmones de ratones lesionados con bleomicina tratados con MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID n° 1) por vía sistémica (mediante administración intraperitoneal) o localmente (mediante nebulización). Tal como se muestra en la figura 21, el nivel de α -SMA se encontraba significativamente atenuado en pulmones tratados con MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID n° 1) en comparación con el nivel de α -SMA en pulmones lesionados con bleomicina no tratados.

Ejemplo 12. Estudios de respuesta a dosis de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID n° 1) en la modulación de la activación de miofibroblastos inducida por TGF- β 1 in vitro

Las características principales de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) son la presencia de células epiteliales atípicas y apoptóticas, junto con miofibroblastos activados que secretan cantidades exuberantes de proteínas de la matriz, incluyendo colágenos, fibronectina y metaloproteinasas de matriz (Horowitz, J and Thannickal, V., *Treatments in Respiratory Medicine*, 5(5):325-42, 2006). En los procesos normales de cicatrización de heridas, los miofibroblastos forman una matriz provisional como andamiaje temporal. La contracción de la matriz provisional resulta en la posterior reepitelización y la eventual cicatrización de la herida. Sin embargo, en el caso de que los miofibroblastos activados sean resistentes a apoptosis, la deposición de colágeno exuberante resultante conduce a la estabilización de la matriz (Tomasek, J. et al., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(5): 349-63, 2002). El resultado final de la proliferación, activación y resistencia a apoptosis no controladas de los miofibroblastos da como resultado lesiones fibróticas con una matriz estabilidad debido a la deposición del colágeno y, de esta manera, la eventual distorsión de la arquitectura pulmonar (Yamashita, C. et al., *The American Journal of Pathology*, 179(4): 1733-45, 2011).

Por lo tanto, debido a que los fibroblastos son las células clave implicadas en la formación de cicatriz, se evaluó el efecto de MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID n° 1) sobre la activación de los miofibroblastos mediante el examen de los niveles proteicos de actina α del músculo liso (α -SMA) y fibronectina en fibroblastos pulmonares fetales humanos en cultivo (células IMR-90) tratados con TGF- β . Tal como se muestra en las figuras 22 y 23, MMI-0100 (YARAAARQARAKALARQLGVAA; SEC ID n° 1) evitó eficazmente la activación de los miofibroblastos inducida por TGF- β de una manera dependiente e la dosis, tal como muestran las reducciones de los niveles de tanto la actina α del músculo liso (α -SMA) (figura 22) como de fibronectina (figura 23).

En contraste, MMI-0200 (YARAAARQARAKALNRQLGVA; SEC ID n° 19) a las dosis sometidas a ensayo no afectó a la activación de los miofibroblastos mediada por TGF- β , tal como indica la ausencia de cambios en el nivel proteico de los marcadores de activación de los miofibroblastos actina α del músculo liso (figura 21) y fibronectina (figura 23). Sin respaldo teórico, estos resultados sugieren que: (1) los péptidos inhibidores de MK2 de la invención descrita pueden mostrar un espectro de actividades de inhibición de un grupo específico de quinasas; (2) MMI-0100 (SEC ID n° 1) y MMI-0200 (SEC ID n° 19) puede inhibir MK2 y otras quinasas diferentemente, que, dependiendo de la dosis aplicada, contribuye a este espectro de actividades inhibitorias; (3) podrían existir rutas compensatorias que regulan la actina α del músculo liso; (4) la formación y/o migración de los miofibroblastos también podrían ser una parte de la etapa de reparación de la fibrosis antes bien que de daño activo, y (5) resulta necesario un nivel determinado de actividad de MK2, por lo tanto, par que se produzca el proceso (Liu et al., *Am J Respir Cell Mol Biol*, 37: 507-517, 2007).

ES 2 711 670 T3

<212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 5 <223> De mamífero

 <400> 4
 Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Leu Ala
 1 5 10 15

 Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala
 20
 <210> 5
 10 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 15 <223> De mamífero

 <400> 5
 Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg
 1 5 10 15

 Gln Leu Ala Val Ala
 20
 <210> 6
 20 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 25 <223> De mamífero

 <400> 6
 Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg
 1 5 10 15

 Gln Leu Gly Val Ala
 20
 <210> 7
 30 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 35 <223> De mamífero

 <400> 7
 His Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Lys Lys Ile Lys Ala Leu Ala Arg
 1 5 10 15

 Gln Leu Gly Val Ala Ala
 20
 <210> 8
 40 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 45 <223> De mamífero

ES 2 711 670 T3

<400> 8
 Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Ala Val Ala
 1 5 10

5 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

10 <220>
 <223> De mamífero

<400> 9
 Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Gly Val Ala
 1 5 10

15 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido

20 <220>
 <223> De mamífero

<400> 10
 Lys Ala Leu Ala Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala
 1 5 10

25 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido

30 <220>
 <223> De mamífero

<400> 11
 Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
 1 5 10

35 <210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Desconocido

40 <220>
 <223> De mamífero

45 <400> 12
 Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala
 1 5 10

50 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Desconocido

55 <220>
 <223> De mamífero

<400> 13
 Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala
 1 5

60 <210> 14
 <211> 11

ES 2 711 670 T3

<212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 5 <223> De mamífero

 <400> 14
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

 10 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 15 <220>
 <223> De mamífero

 <400> 15
 Trp Leu Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Arg Arg Ile
 1 5 10

 20 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 25 <220>
 <223> De mamífero

 <400> 16
 Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg
 30 1 5 10

 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Desconocido

 <220>
 <223> De mamífero

 40 <400> 17
 Lys Ala Phe Ala Lys Leu Ala Ala Arg Leu Tyr Arg
 1 5 10

 <210> 18
 <211> 11
 45 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> De mamífero

 50 <400> 18
 His Arg Arg Ile Lys Ala Trp Leu Lys Lys Ile
 1 5 10

 <210> 19
 55 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Desconocido

 <220>
 60 <223> De mamífero

ES 2 711 670 T3

<400> 19
 Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Lys Ala Leu Asn Arg
 1 5 10 15

Gln Leu Gly Val Ala
 20

<210> 20
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> De mamífero

10 <400> 20
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5

<210> 21
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 20 <223> De mamífero

<400> 21
 Lys Lys Leu Asn Arg Thr Leu Ser Val Ala
 1 5 10

25 <210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Desconocido

30 <220>
 <223> De mamífero

<400> 22
 Lys Lys Lys Ala Leu Asn Arg Gln Leu Gly Val Ala Ala
 1 5 10

35 <210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Desconocido

40 <220>
 <223> De mamífero

<220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(12)
 <223> en donde los "Xaa" representan cualquier aminoácido y una secuencia de aminoácidos con una longitud de 10 residuos

50 <400> 23
 Lys Lys Xaa Lys Arg Arg Lys
 1 5 10 15

Lys

<210> 24
 <211> 7

- <212> PRT
<213> Desconocido
- <220>
5 <223> De mamífero
- <400> 24
Leu Leu Lys Arg Arg Lys Lys
1 5
- 10 <210> 25
<211> 6
<212> PRT
<213> Desconocido
- 15 <220>
<223> De mamífero
- <220>
<221> MISC_FEATURE
20 <222> (1)..(1)
<223> en donde "Xaa" representa un residuo hidrofóbico voluminoso seleccionado del grupo que consiste en Val, Ile, Leu, Met y Phe
- <220>
25 <221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> en donde "Xaa" representa cualquier aminoácido
- <220>
30 <221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(5)
<223> en donde los "Xaa" representan cualquier aminoácido y una secuencia de aminoácidos con una longitud de 2 residuos
- <220>
35 <221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> en donde "Xaa" representa Ser fosforilado o Thr fosforilado
- <400> 25
Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa
1 5

REIVINDICACIONES

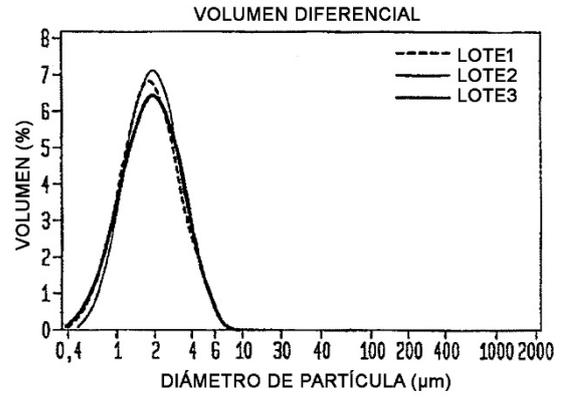
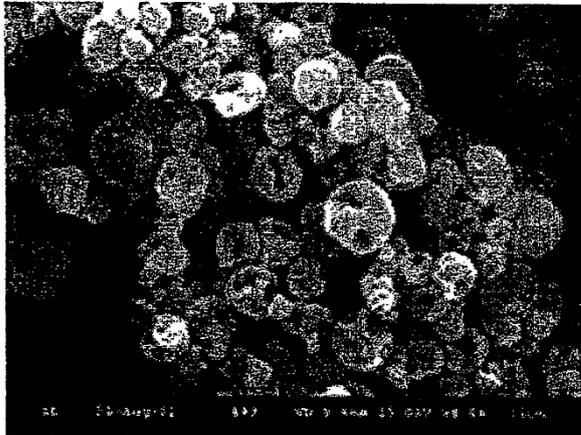
1. Composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento de fibrosis pulmonar en un sujeto que resulta de la administración de bleomicina, una reacción alérgica, la inhalación de partículas ambientales, el tabaquismo, una infección bacteriana, una infección vírica, daños mecánicos en un pulmón del sujeto, rechazo del trasplante pulmonar, un trastorno autoinmunitario, un trastorno genético, o una combinación de los mismos, en donde la fibrosis pulmonar se **caracteriza por** como mínimo una patología seleccionada del grupo que consiste en una deposición aberrante de una proteína de la matriz extracelular en un intersticio pulmonar, una estimulación aberrante de la proliferación de fibroblastos en el pulmón, una inducción aberrante de la diferenciación de los miofibroblastos en el pulmón y una estimulación aberrante de la unión de miofibroblastos a la matriz extracelular, en comparación con un sujeto de control sano normal, en donde la composición farmacéutica comprende:
- (a) una cantidad terapéutica de un polipéptido de la secuencia de aminoácidos YARAAARQARAKALARQLGVAA (SEC ID nº 1) o un equivalente funcional del mismo seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido de secuencia de aminoácidos FAKLAARLYRKALARQLGVAA (SEC ID nº 3), un polipéptido de secuencia de aminoácidos KAFKLAARLYRKALARQLGVAA (SEC ID nº 4), y un polipéptido de secuencia de aminoácidos HRRIKAWLKKIKALARQLGVAA (SEC ID nº 7) y
- (b) un portador farmacéuticamente aceptable,
- en donde la cantidad terapéutica resulta eficaz
- (1) para inhibir la actividad de quinasa de una quinasa seleccionada del grupo de una proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2), una proteína quinasa 3 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK3), una proteína quinasa I dependiente de calcio/calmodulina (CaMKI, proteína quinasa específica de serina/treonina) y un receptor de factor de crecimiento BDNF/NT-3 (TrkB, tirosina quinasa) y
- (2) para reducir la proliferación de fibroblastos y la deposición de matriz extracelular en los tejidos del sujeto.
2. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 1, en donde:
- (a) la fibrosis pulmonar se **caracteriza** además **por** una inflamación del tejido pulmonar, o
- (b) la proliferación aberrante de fibroblastos y la deposición de matriz extracelular en el tejido se **caracteriza por** una actividad aberrante de la proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2) en el tejido en comparación con la actividad de la proteína quinasa 2 activada por proteína quinasa activada por mitógeno (MK2) en el tejido de un sujeto de control sano normal.
3. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 2, en donde la inflamación está mediada por como mínimo una citoquina seleccionada del grupo que consiste en factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-1 β (IL-1 β).
4. Composición farmacéutica para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en donde:
- (a) la composición farmacéutica se formula para la administración por vía intratraqueal, tal como mediante inhalación pulmonar; por vía parenteral, intravenosa o intraperitoneal, o
- (b) la composición farmacéutica comprende además por lo menos un agente terapéutico adicional.
5. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 4, en donde el agente terapéutico adicional:
- (a) es un glucocorticoide seleccionado del grupo que consiste en prednisona, budesónida, furoato de mometasona, propionato de fluticasona, furoato de fluticasona y una combinación de los mismos, o
- (b) es un broncodilatador seleccionado del grupo que consiste en un modificador de leucotrieno, un broncodilatador anticolinérgico, un agonista β_2 de acción corta y un agonista β_2 de acción prolongada, y una combinación de los mismos, o
- (c) se selecciona del grupo que consiste en un colágeno de tipo V bovino purificado, un antagonista de receptor de IL-13, un inhibidor de proteína tirosina quinasa, un antagonista de receptor endotelial, un antagonista dual de receptor de endotelina, un análogo de prostaciclina, un anticuerpo monoclonal anti-CTGF, un antagonista de receptor de endotelina (A-selectivo), AB0024, un anticuerpo monoclonal de tipo lisil oxidasa 2 (LOXL2), un inhibidor de quinasa N-terminal de c-Jun (JNK), pirfenidona, IFN- γ 1b, un anticuerpo humano IgG4 pan-neutralizador contra la totalidad de las tres isoformas de TGF- β , un inhibidor de activación de TGF- β , una proteína pentraxina-2 humana recombinante (rhPTX-2), un anticuerpo biespecífico de IL-4/IL-13, un anticuerpo monoclonal humanizado con diana en la integrina $\alpha v \beta 6$, N-acetilcisteína, sildenafil, un antagonista de factor de necrosis tumoral (TNF) (etanercept) y una combinación de los mismos, o

(d) es un agente analgésico o un agente antiinfeccioso.

- 5 6. Composición farmacéutica para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en donde el portador se selecciona del grupo que consiste en un portador de liberación controlada, un portador de liberación retardada, un portador de liberación sostenida y un portador de liberación a largo plazo.
- 10 7. Composición farmacéutica para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en donde la cantidad terapéutica de la composición farmacéutica se administra mediante un dispositivo de inhalación seleccionado de un nebulizador, un inhalador de dosis medida (IDM), un inhalador de polvos secos (IPS) o un nebulizador de polvos secos.
- 15 8. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 7, en donde la composición farmacéutica se encuentra en forma de unos polvos secos que comprenden micropartículas con un diámetro aerodinámico de la mediana de la masa (DAMM) de entre 1 y 5 μm .

FIG. 1

INSULINA PURA SECADA POR PULVERIZACIÓN

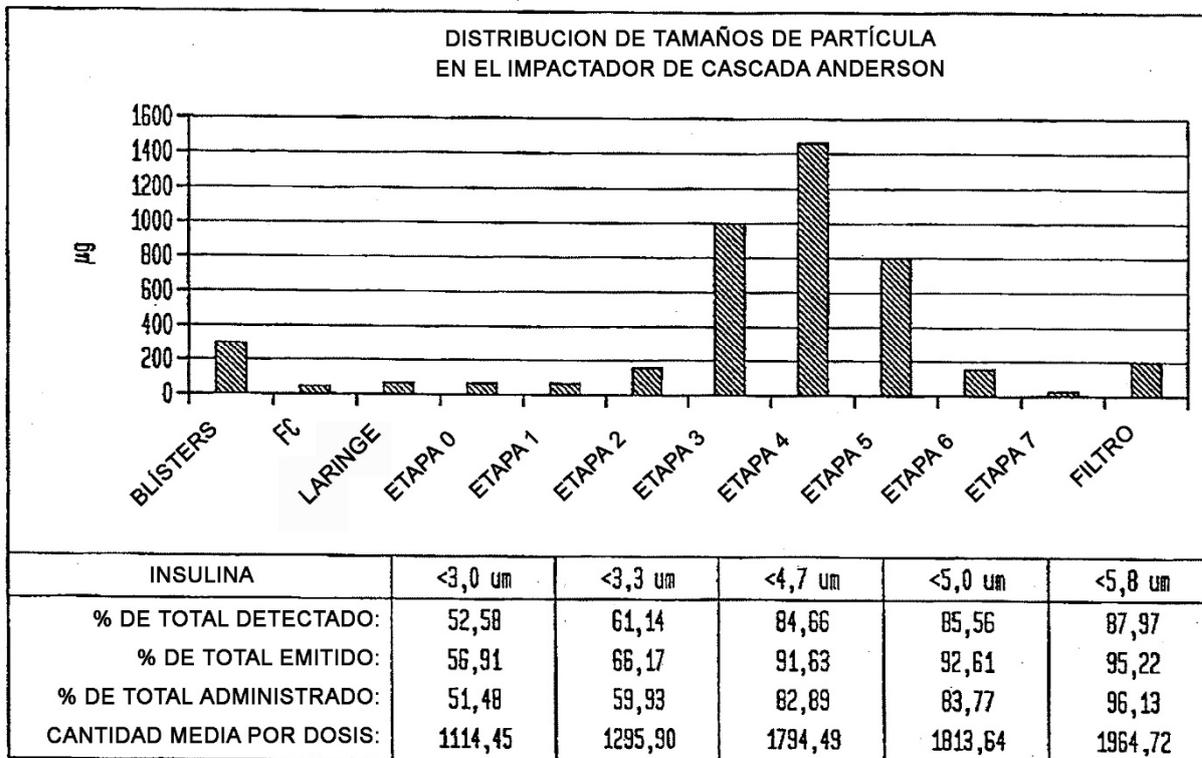


* TAMAÑO MEDIO DE PARTÍCULA
APROXIMADAMENTE 1,8 MICRÓMETROS

FIG. 2

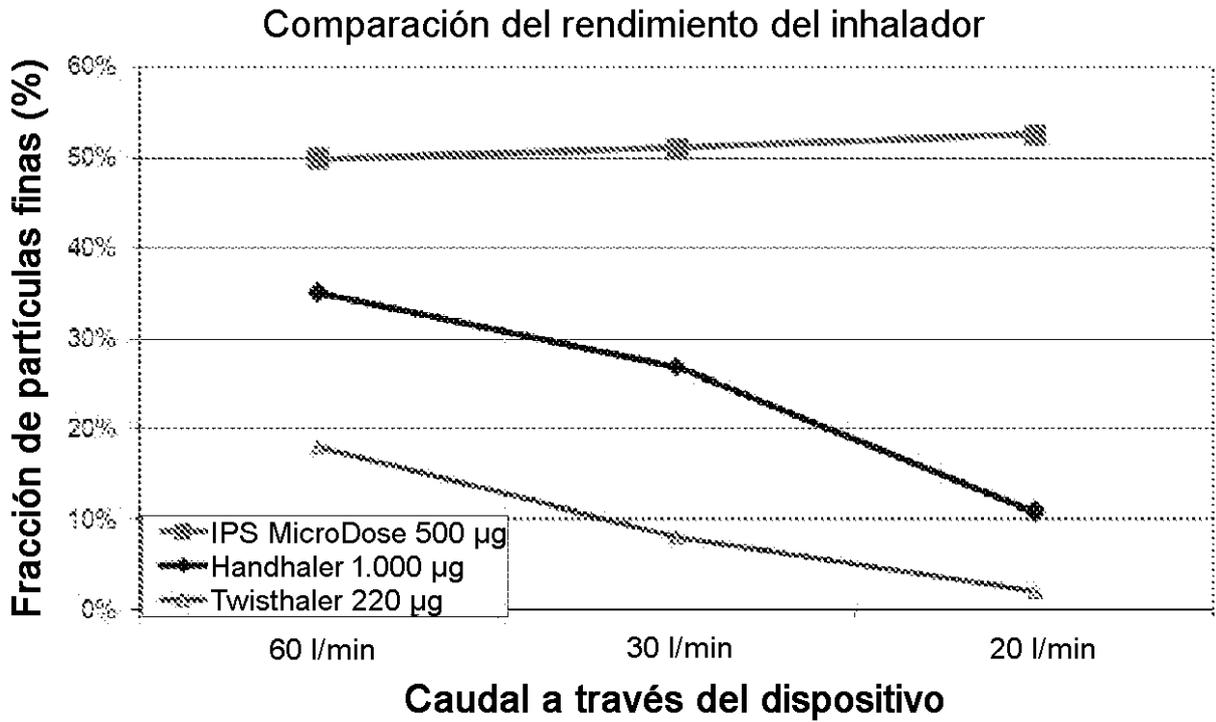
DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE PARTÍCULA - INSULINA

DOSIS: 2,4 mg, ICA a 28,3 l/min



DOSIS EMITIDA MEDIA = 93.76%

Comparación de la eficiencia y caudal del IPS MicroDose vs. dos IPS 'pasivos' comerciales

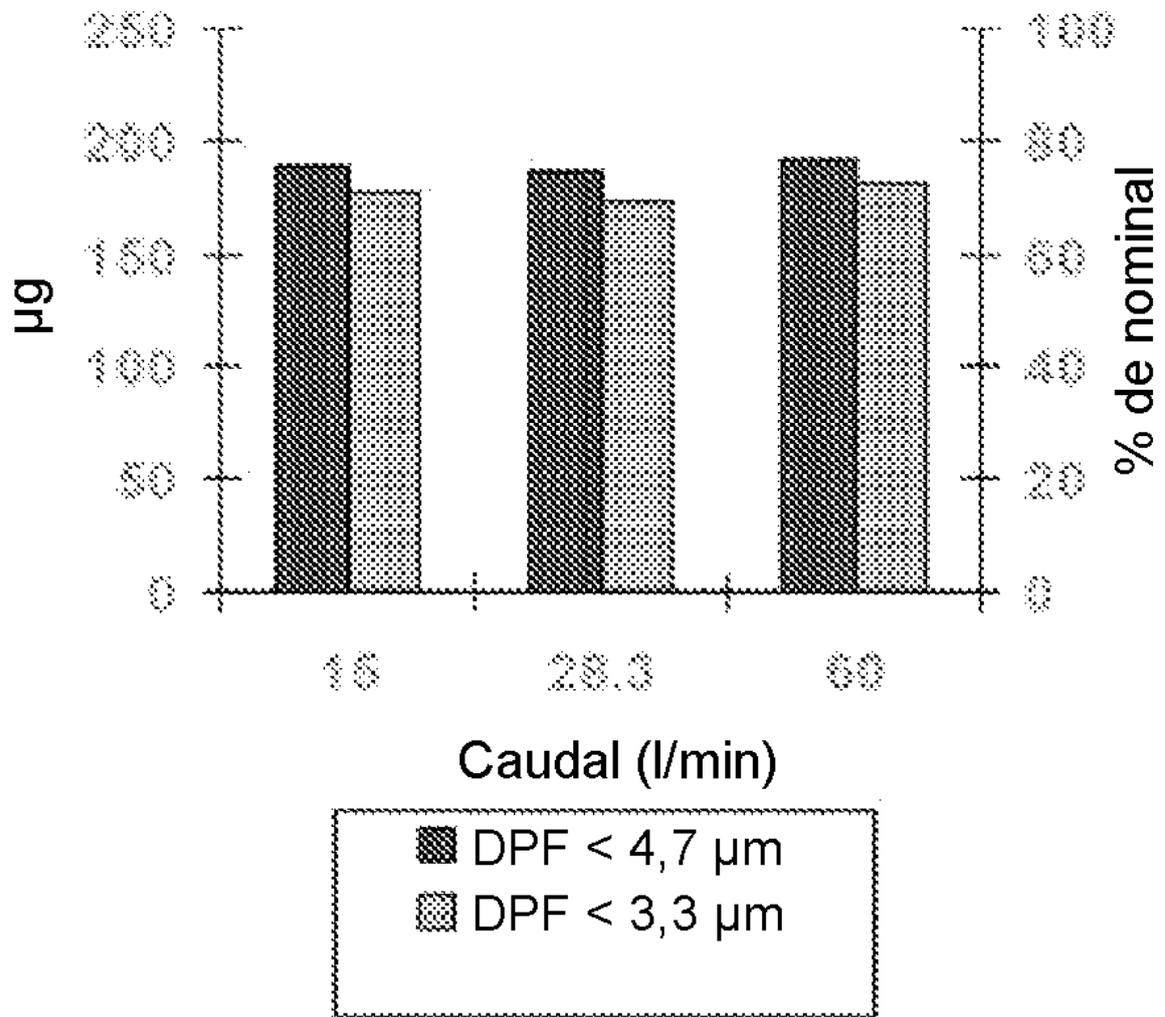


Corticoesteroide molido con chorro (micronizado) con lactosa

FIGURA 3

Independencia del caudal

Dosis de partículas finas



Péptido puro secado por pulverización 250 µg

FIGURA 4

Péptido secado por pulverización nº 2 (no insulina)

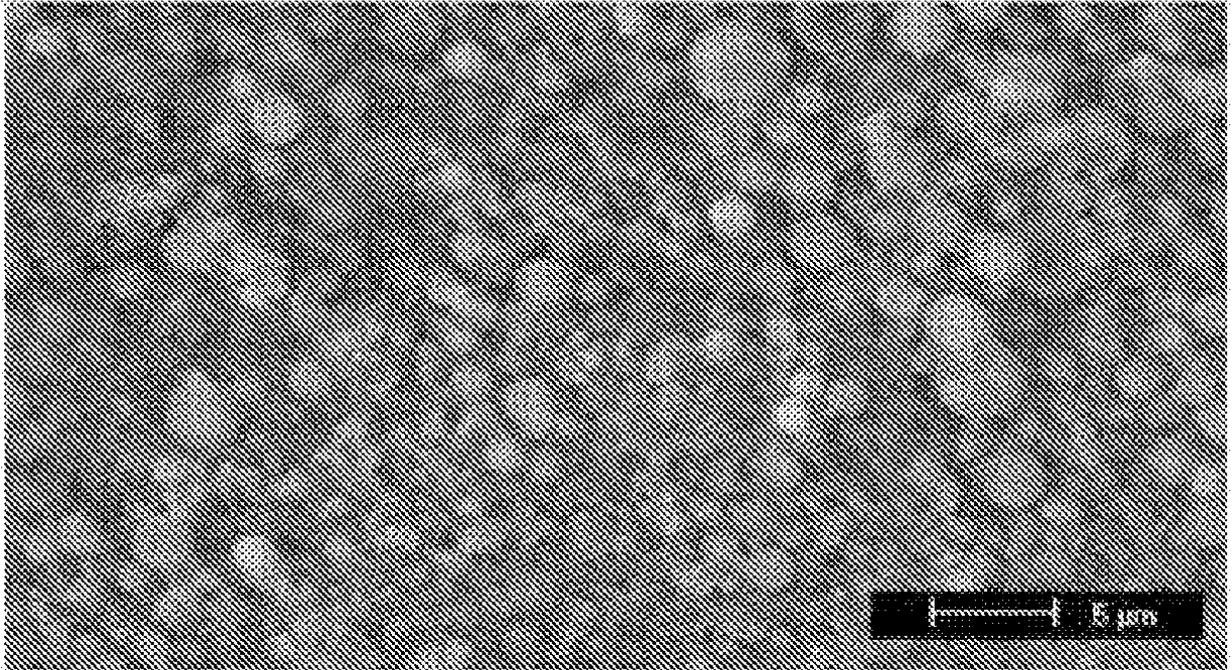


FIGURA 5

FIG. 6
 DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE PARTÍCULA - PÉPTIDO n° 2
 DOSIS: 250 µg, ICA a 28,3 l/min

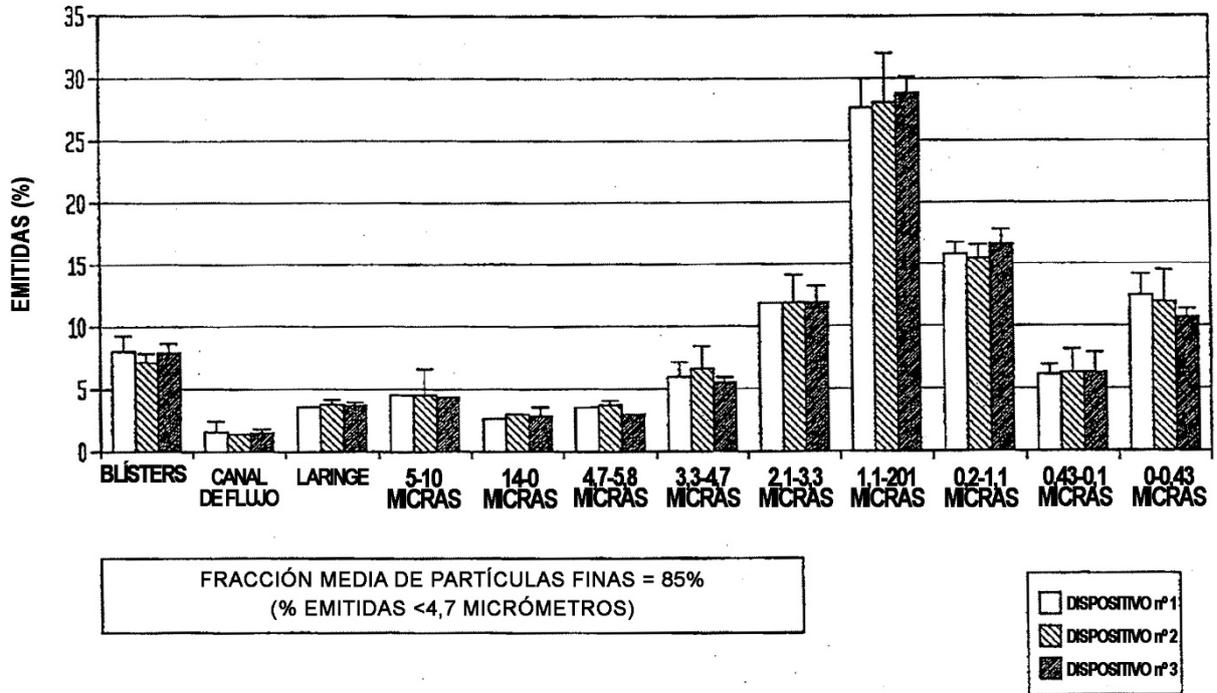
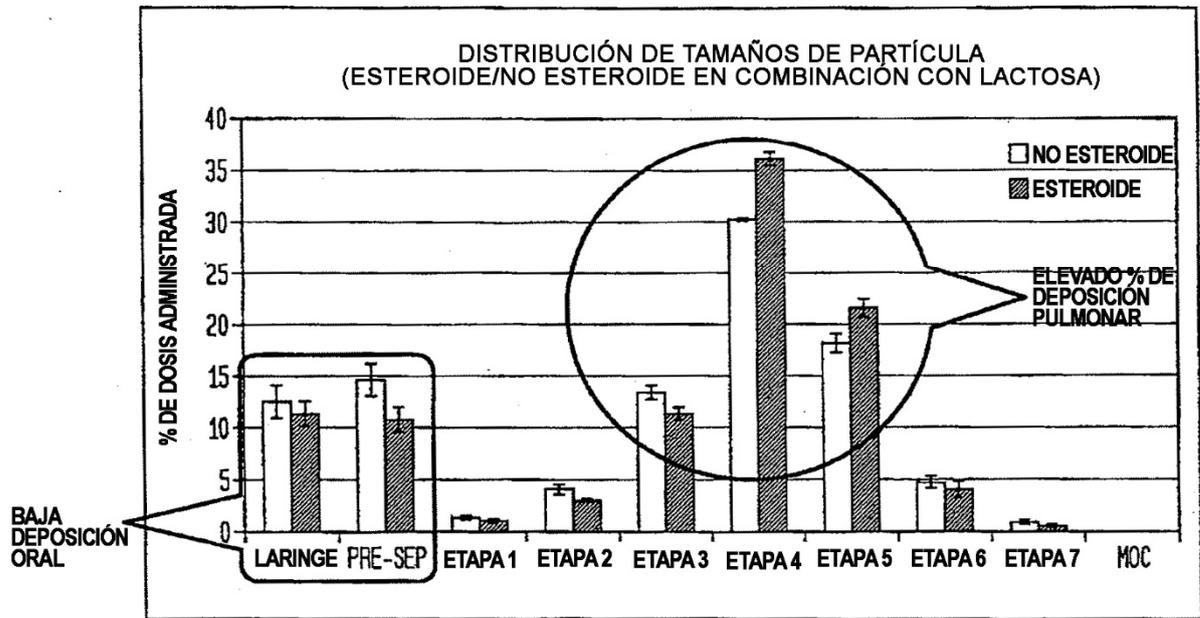


FIG. 7

COMBINACIÓN DE MEZCLA DE LACTOSA MICRONIZADA
 DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE PARTÍCULA POR IPG
 (3 tandas a 30 l/min de caudal / 1 mg peso de relleno)

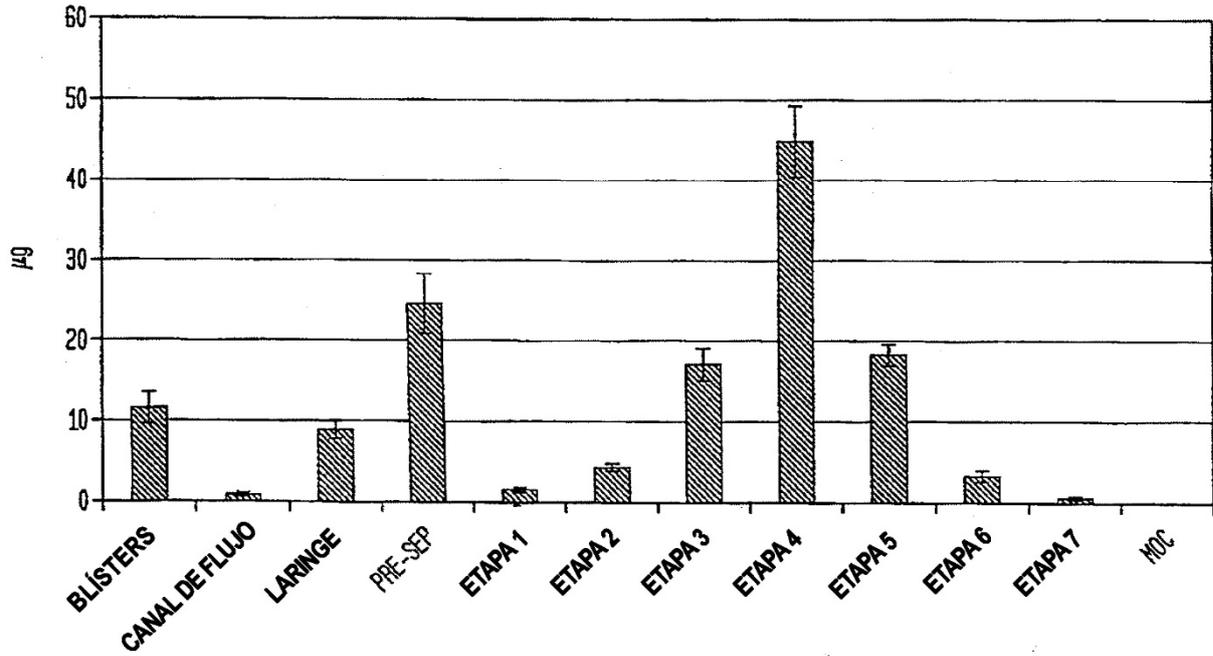


- 62% DOSIS PULMONAR $\leq 5,0 \mu\text{m}$ PARA 'OTROS' RSD 1,95% CON n=5
- 70% DOSIS PULMONAR $\leq 5,0 \mu\text{m}$ PARA ESTEROIDES RSD 1,92% CON n=5

FIG. 8

MEZCLA MICRONIZADA DE AMAP/LACTOSA

- %PFP = 63% ($\leq 5,0 \mu\text{m}$), RSD 1,9% con n=3 (150 μg relleno nominal)
- DAMM = 3,1 μm
- BAJA DEPOSICIÓN EN LARINGE
- DOSIS ADMINISTRADA --> CUMPLE DIRECTRIZ FDA DE 1998 -85%-115% DE LA MEDIA



MK2 activado expresado diferencialmente en pulmón humano FPI vs. normal

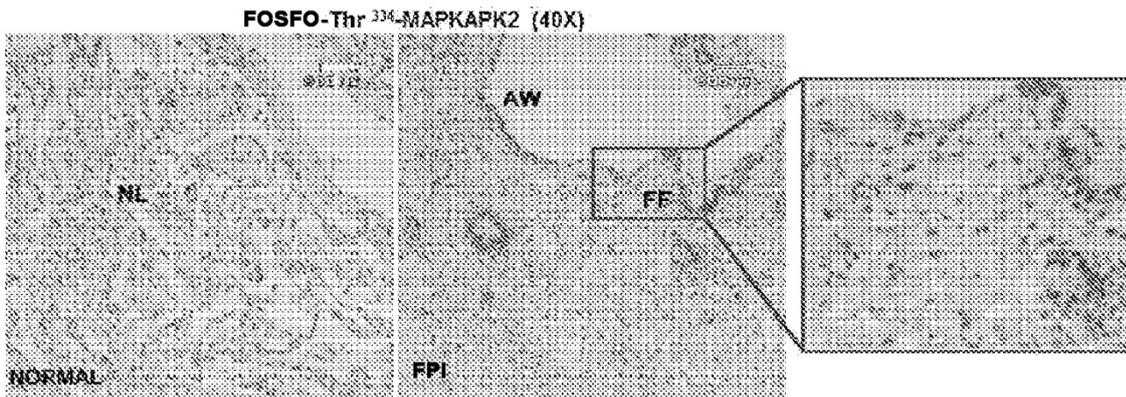


FIGURA 9

Modelo con bleomicina de fibrosis pulmonar idiopática: modelo de prevención

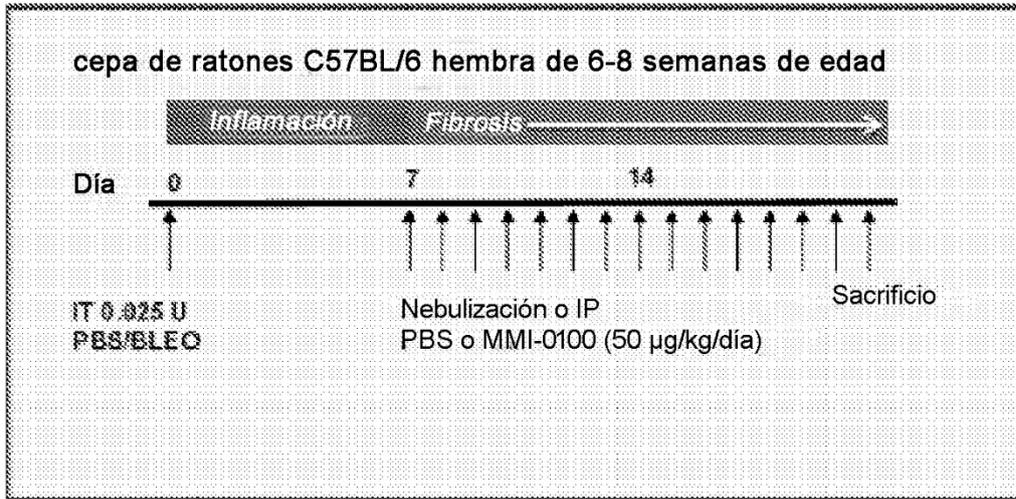


FIGURA 10

MMI-0100 inhibe el desarrollo de fibrosis en el modelo de prevención de fibrosis pulmonar idiopática

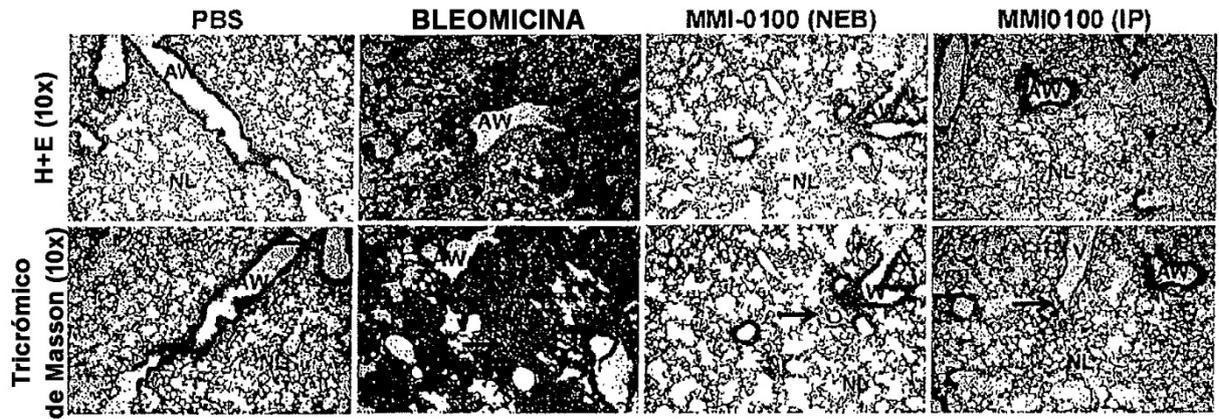


FIGURA 11

MMI-0100 inhibe el desarrollo de fibrosis en el modelo de prevención de fibrosis pulmonar idiopática

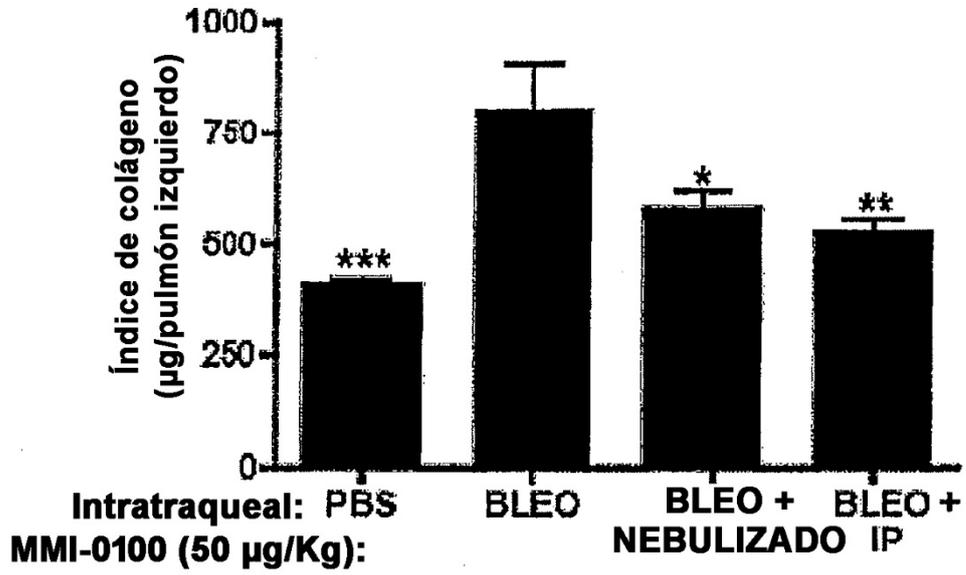


FIGURA 12

Datos de respuesta a dosis de MMI-0100 en el modelo de prevención de fibrosis pulmonar idiopática

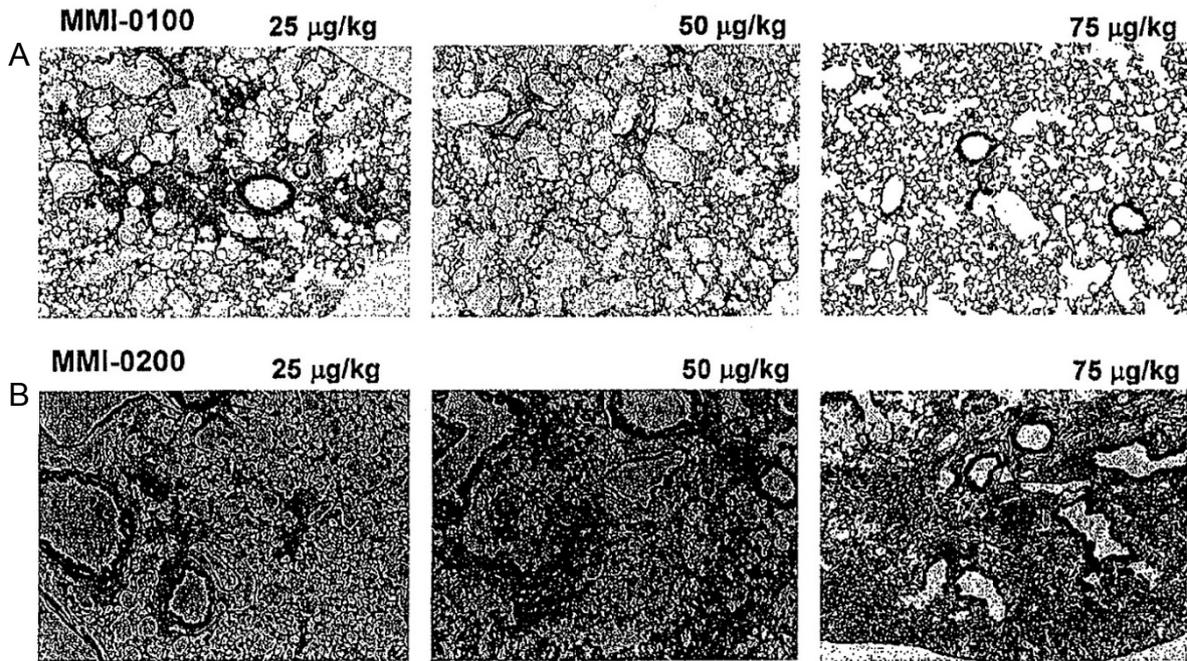


FIGURA 13

MMI-0100 reduce la activación sistémica de células T en el modelo de prevención de fibrosis pulmonar idiopática

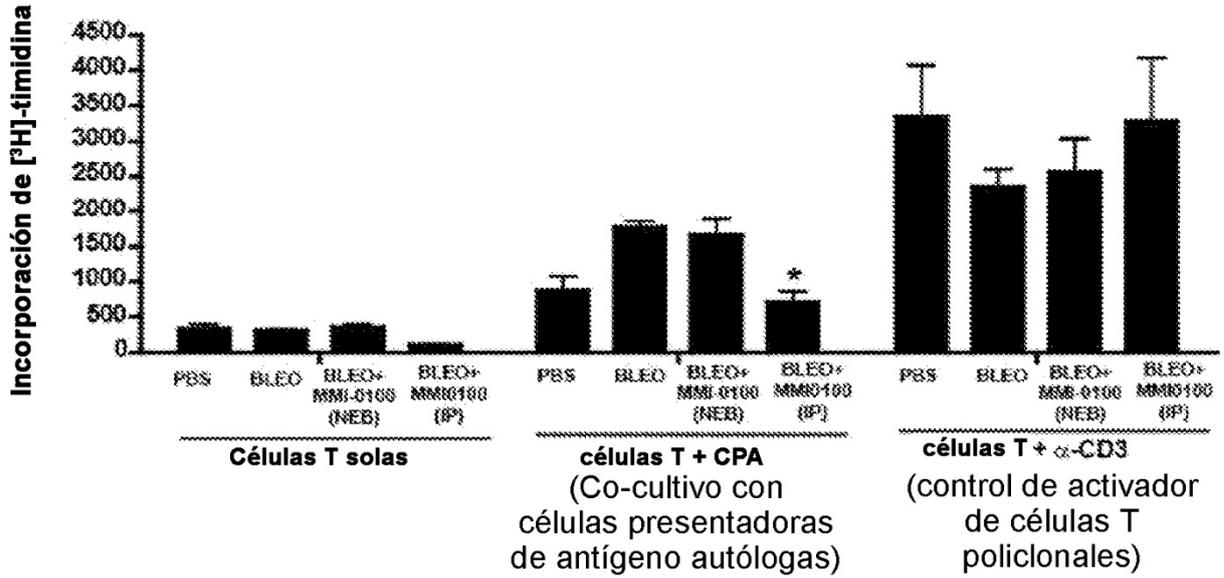


FIGURA 14

Modelo con bleomicina de fibrosis pulmonar idiopática: modelo de tratamiento

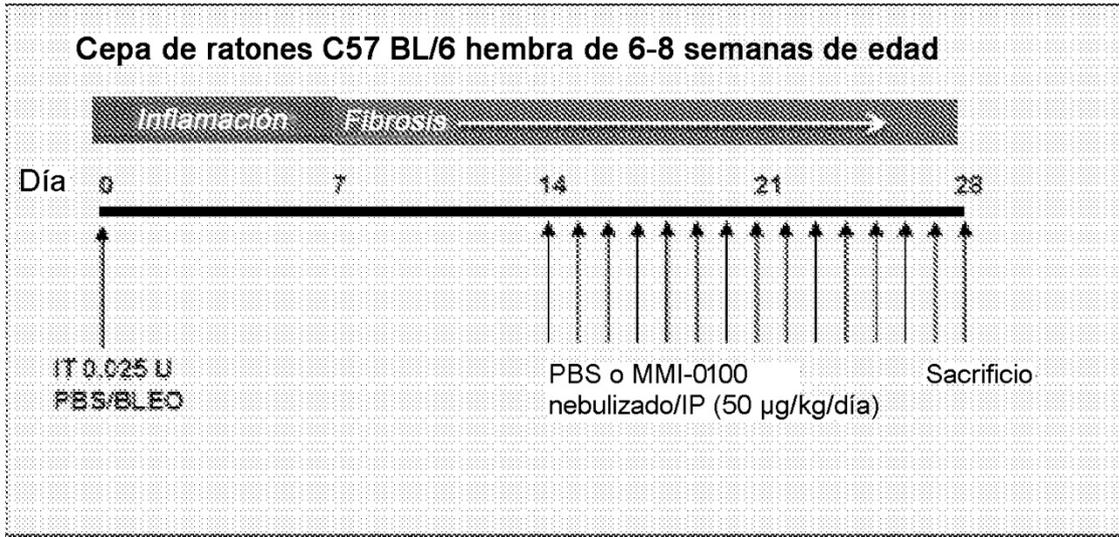


FIGURA 15

MMI-0100 mejora la fibrosis en el modelo de tratamiento con FPI

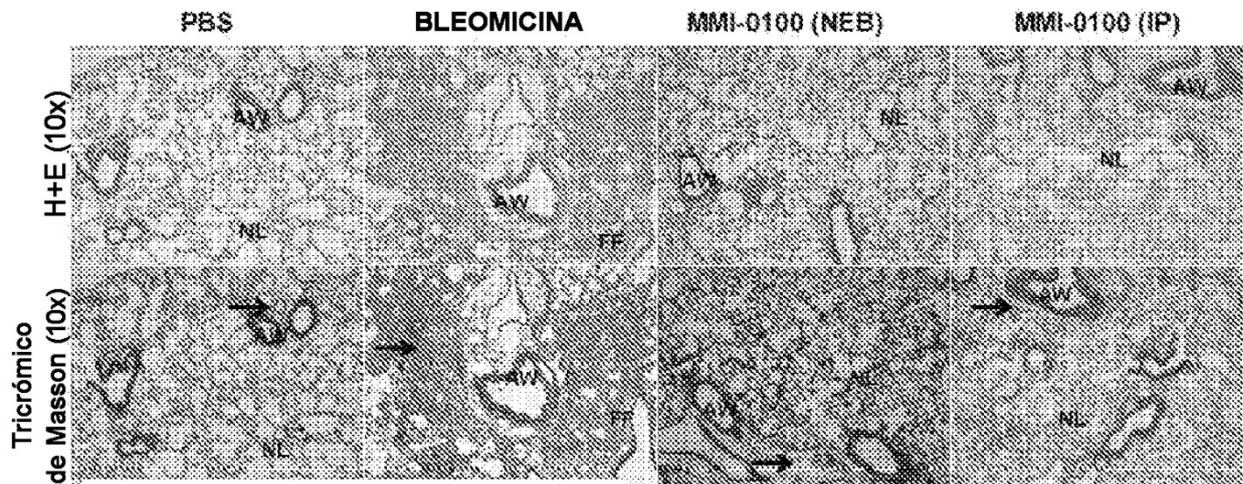


FIGURA 16

ANÁLISIS CUANTITATIVOS DEL COLÁGENO

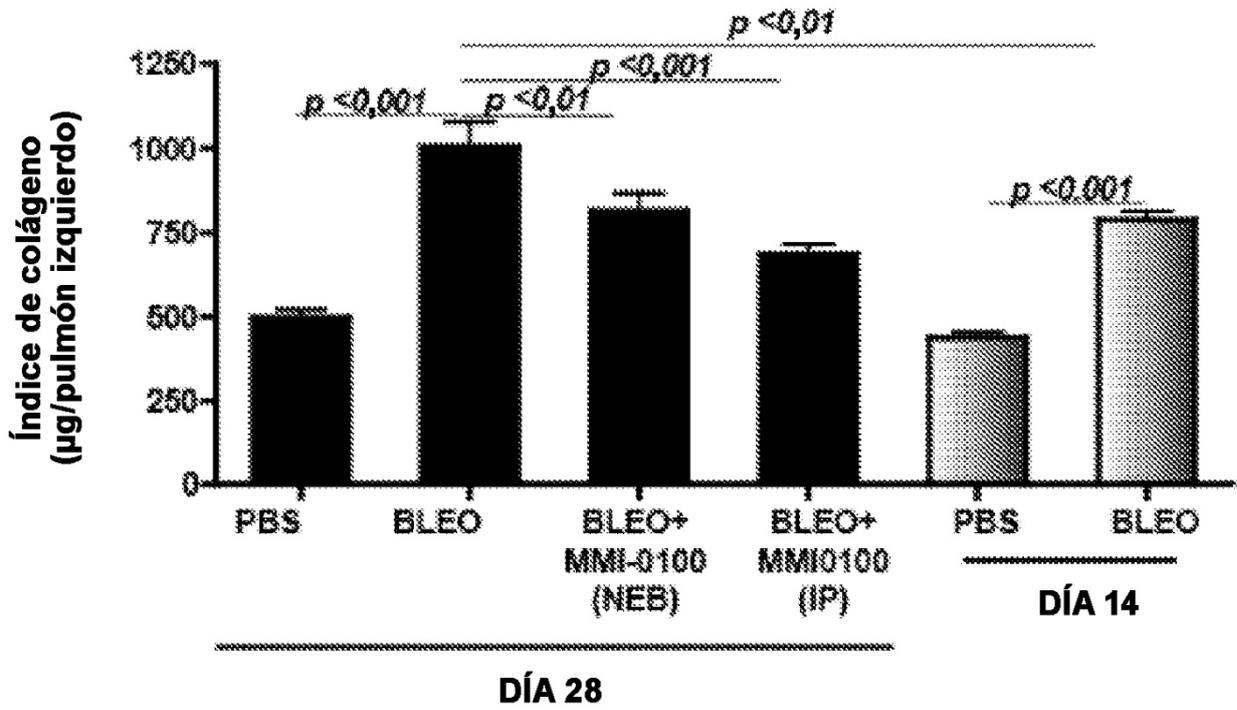


FIGURA 17

Nivel reducido de MK2 activado con MMI-0100 en el modelo de tratamiento de FPI

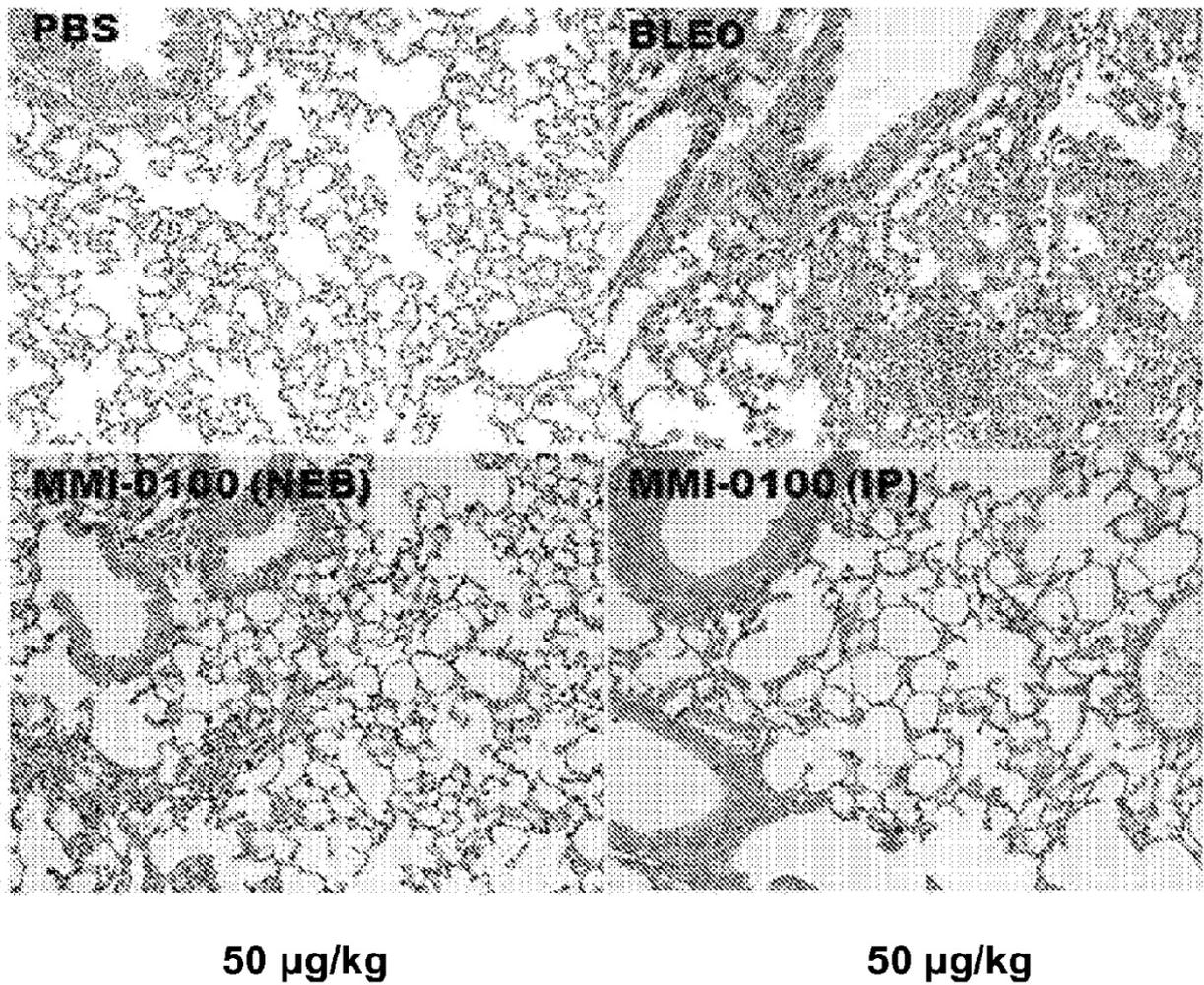


FIGURA 18

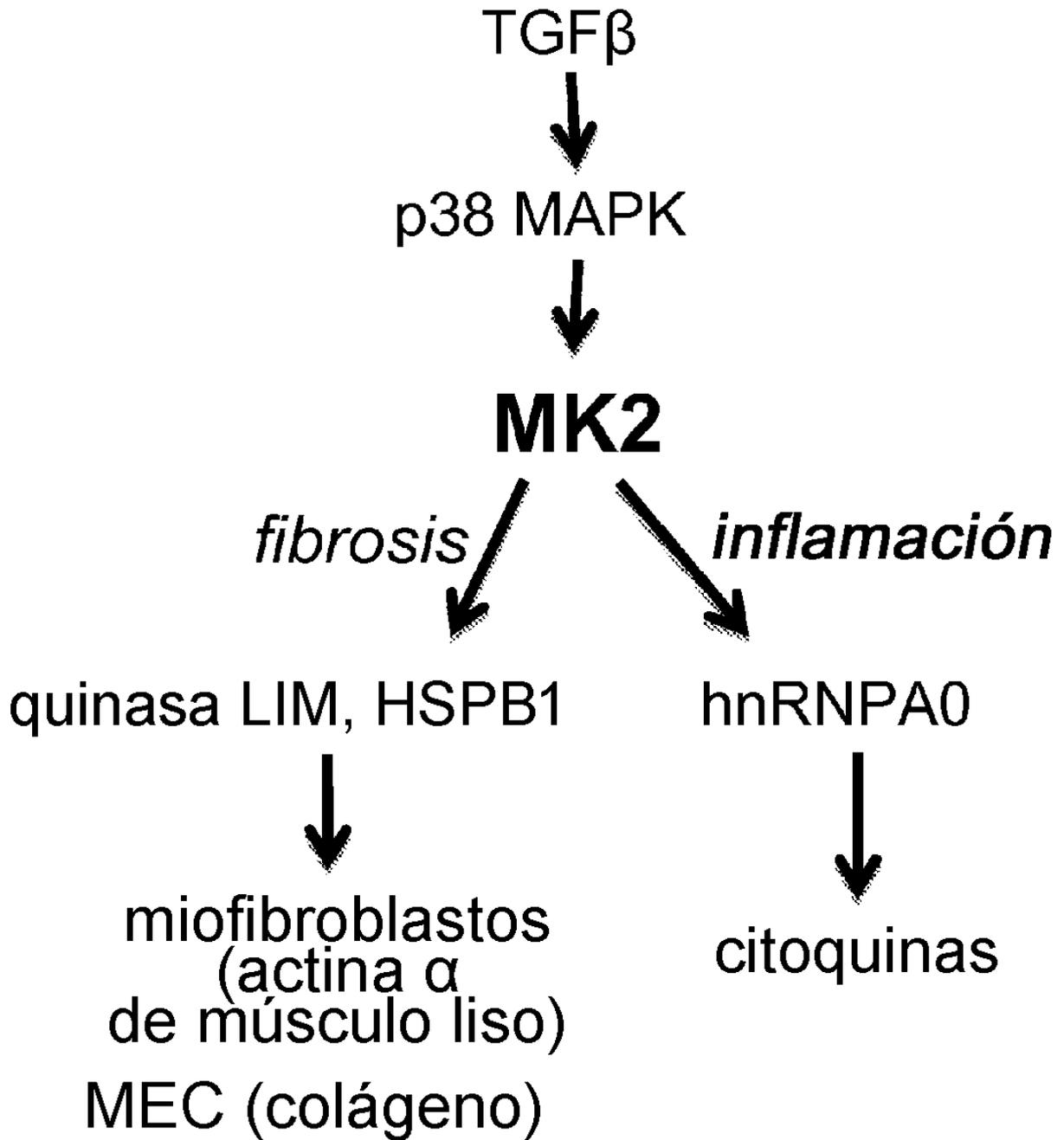


FIGURA 19

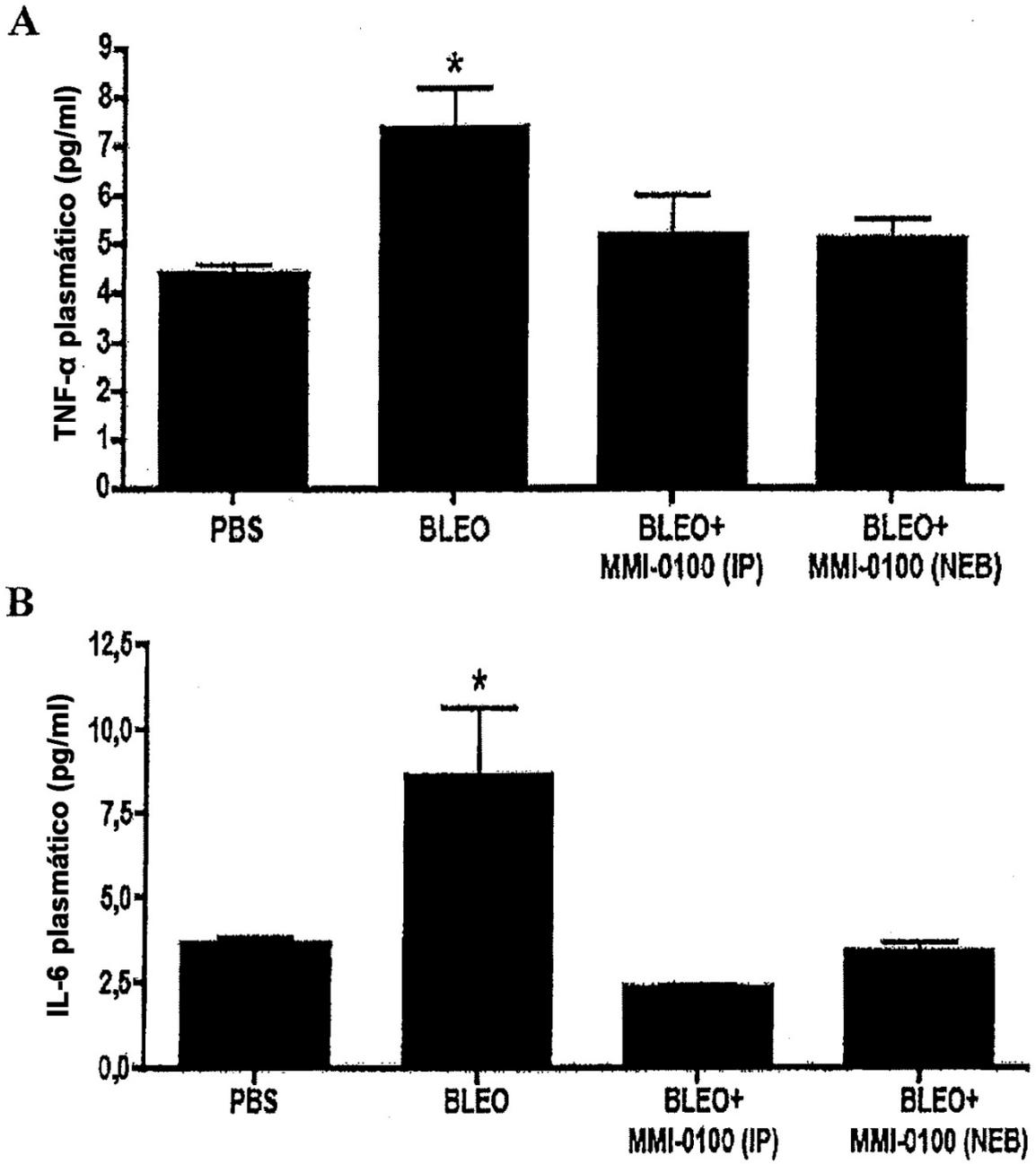


FIGURA 20

MMI-0100 inhibe la activación de miofibroblastos (α -SMA) en el modelo de tratamiento de FPI

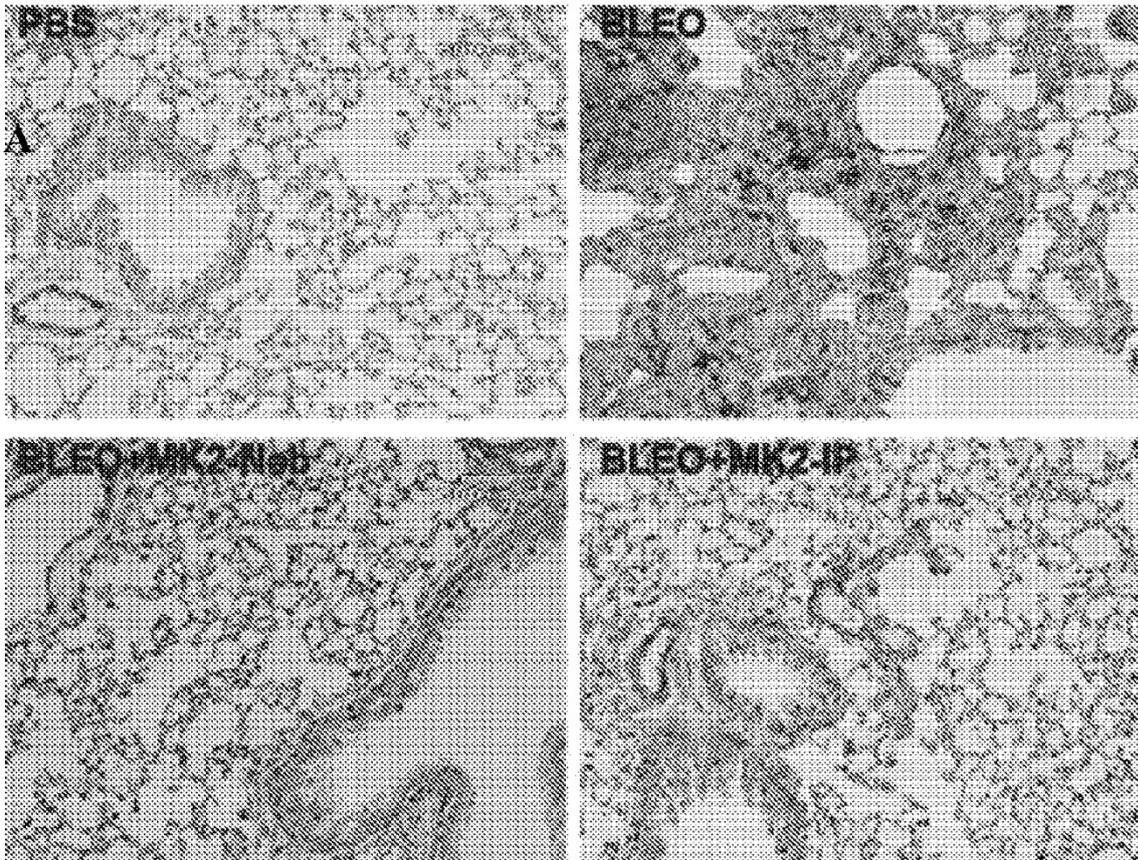


FIGURA 21

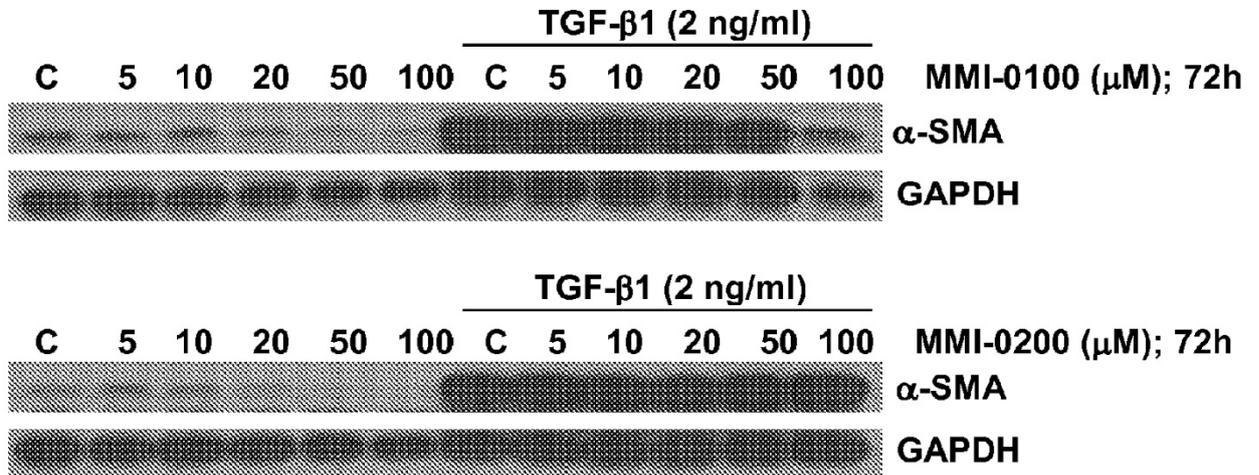


FIGURA 22

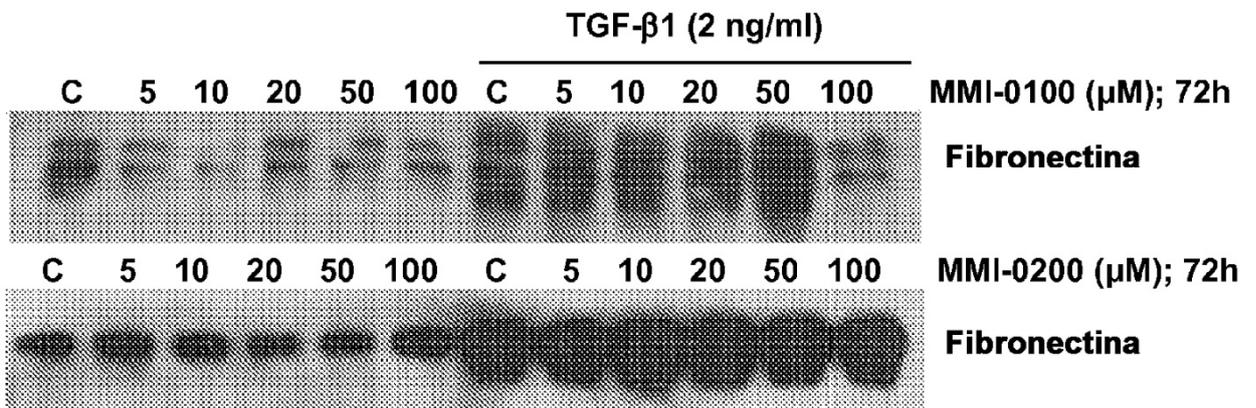


FIGURA 23

La migración de CMM está regulada por la fibronectina a través de la activación mediada por la integrina $\alpha 5\beta 1$ de PDGFR- β

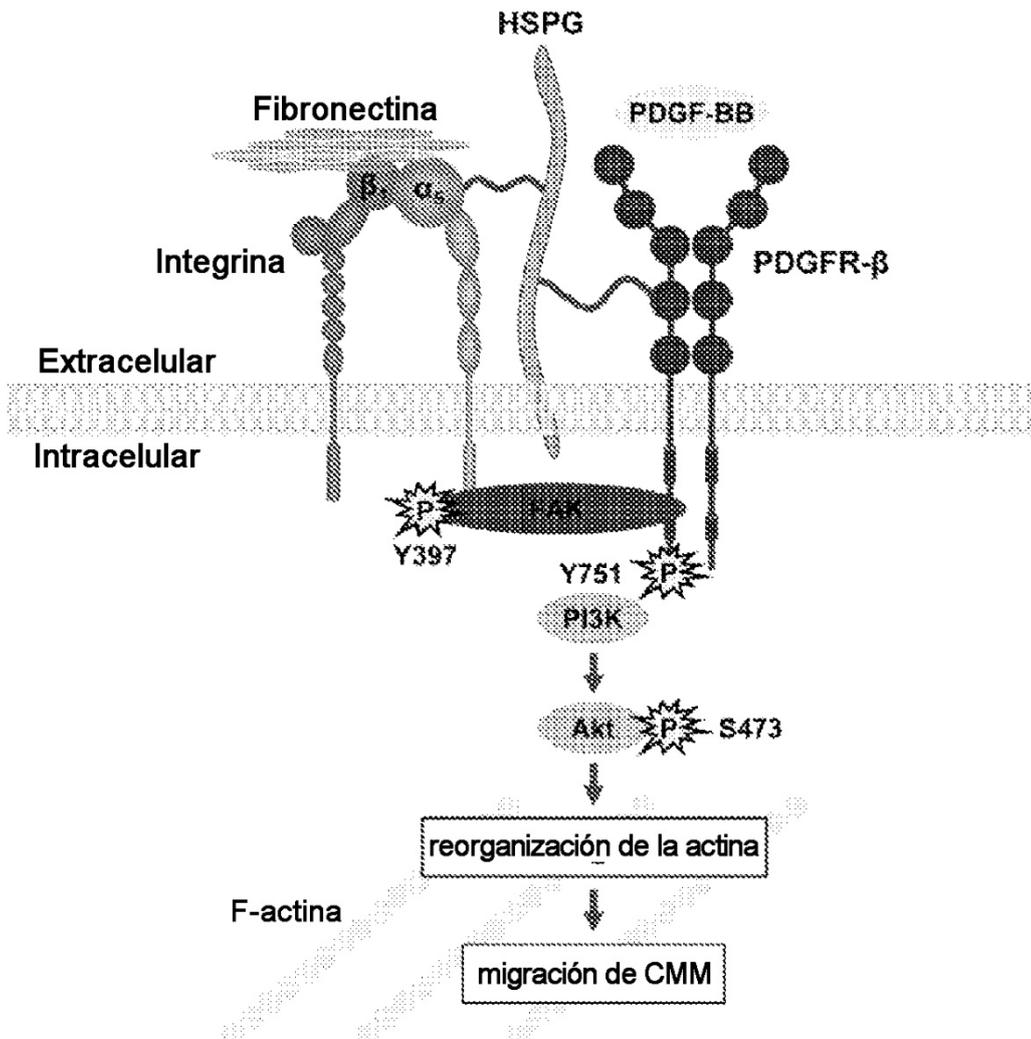
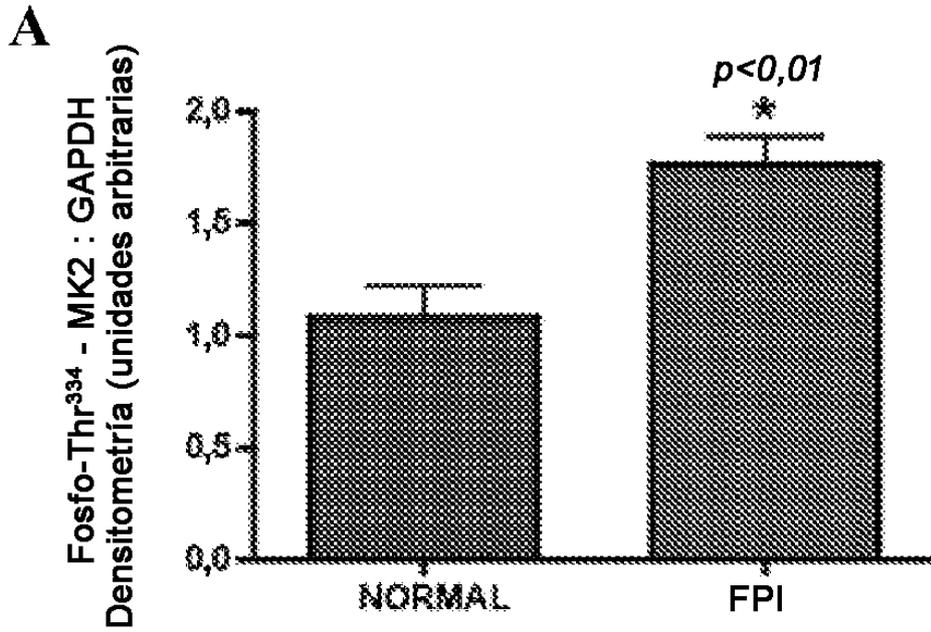


FIGURA 24



B
Correlación entre función pulmonar y activación de MK2

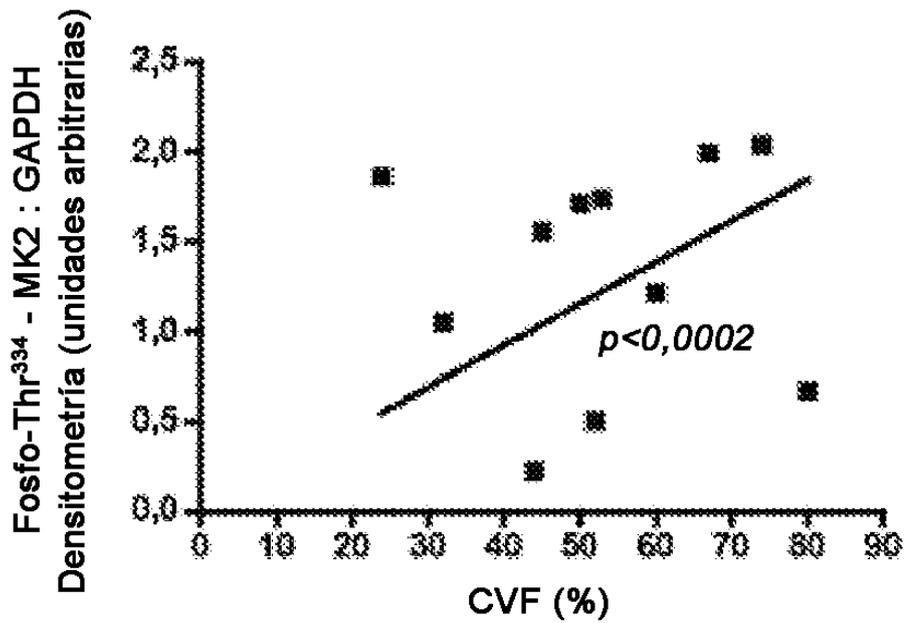


FIGURA 25