

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 844 899**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61K 31/428 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2016 PCT/US2016/065153**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017 WO17100193**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2016 E 16873677 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020 EP 3386544**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de enfermedades de las neuronas motoras**

30 Prioridad:

10.12.2015 US 201562265704 P
13.05.2016 US 201662336168 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.07.2021

73 Titular/es:

FIBROGEN, INC. (100.0%)
409 Illinois Street
San Francisco, CA 94158, US

72 Inventor/es:

BRANDAN, ENRIQUE y
GONZÁLEZ, DAVID

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 844 899 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

Métodos para el tratamiento de enfermedades de las neuronas motoras

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La invención se refiere a agentes útiles para el tratamiento de enfermedades de las neuronas motoras (ENM), en particular, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). También se proporcionan agentes para tratar varias características fisiológicas y patológicas asociadas con enfermedades de las neuronas motoras.

10

ANTECEDENTES

Las enfermedades de las neuronas motoras son un grupo de trastornos neurológicos degenerativos y progresivos que destruyen las neuronas motoras, las células que controlan la actividad muscular voluntaria esencial. Como resultado de la pérdida de neuronas motoras, las fibras musculares correspondientes se desnervan y se atrofian (amiotrofia) lo que lleva a debilidad muscular y, en algunas enfermedades, parálisis muscular y muerte por insuficiencia respiratoria.

En adultos, la ENM más común es la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, que afecta tanto a las neuronas motoras superiores (neuronas corticoespinales) como a las neuronas motoras inferiores (cuerno ventral de la médula espinal). La ELA afecta aproximadamente a 2 de cada 100.000 personas cada año y la enfermedad se observa más comúnmente en hombres que en mujeres (proporción 3:2), la ELA típicamente se manifiesta clínicamente en la quinta década de la vida o más tarde. A medida que progresa la enfermedad, los pacientes requieren asistencia respiratoria y, en última instancia, muere por insuficiencia respiratoria aproximadamente en 2-3 años desde la presentación clínica.

Actualmente, la única terapia aprobada en los Estados Unidos para las ENM es el riluzol, 6-(trifluorometoxi)benzotiazol-2-amina, aprobado para el ELA. Se piensa que el riluzol actúa inhibiendo la liberación de glutamato. El riluzol, desafortunadamente, solo tiene un efecto modesto, extendiendo la supervivencia mediana en aproximadamente de 2 a 3 meses.

En vista de la naturaleza devastadora de la enfermedad, y la falta de enfoques terapéuticos eficaces, hay una necesidad de métodos y agentes útiles para tratar eficazmente las ENM, para reducir la tasa de progresión y gravedad de las ENM y para prevenir o reducir uno o más síntomas de las ENM.

La invención satisface esta necesidad proporcionando nuevos métodos y agentes para el tratamiento de las ENM inhibiendo la actividad o expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF).

Rebolledo et al. describe la función de CTGF/CCN2 en la fibrosis asociada con la denervación del músculo esquelético y el modelo de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (J. Cell. Commun, Signal, 10:97-98 (2016)).

Spliet et al. describe la expresión aumentada del factor de crecimiento del tejido conectivo en la médula espinal humana con esclerosis lateral amiotrófica (Acta Neuropathology, 106:449-457 (2003)).

45 **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

En un aspecto de la invención, se proporciona un agente anti-CTGF para su uso en un método para tratar una ENM. El método comprende administrar a un sujeto con necesidad de ello, una cantidad eficaz de un agente anti-CTGF, tratando de este modo la ENM. En algunas realizaciones, la ENM se selecciona del grupo que consiste de esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, atrofia muscular espinal, parálisis bulbar progresiva, parálisis pseudobulbar, atrofia muscular espinal-bulbar, paraplejía espástica hereditaria y síndrome pospoliomielítico. En realizaciones particulares, la ENM es esclerosis lateral amiotrófica.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un agente anti-CTGF para su uso en un método para prevenir o reducir un síntoma clínico de una ENM. El método comprende administrar a un sujeto con necesidad de ello una cantidad eficaz de un agente anti-CTGF, previniendo o reduciendo de este modo un síntoma clínico de la ENM. En algunas realizaciones, el síntoma clínico de la ENM se selecciona del grupo que consiste de disfagia, disartria, pérdida de peso, debilidad muscular, fatiga muscular, espasticidad muscular, hiperreflexia y contracturas articulares o musculares, fasciculación o dolor.

En otro aspecto, se proporciona un agente anti-CTGF para su uso en un método para prevenir el desarrollo, o reducir la velocidad de progresión de una ENM. El método comprende administrar a un sujeto con necesidad de ello una cantidad eficaz de un agente anti-CTGF, previniendo de este modo el desarrollo o reduciendo la velocidad de progresión de una ENM.

65

En un aspecto adicional, se proporciona un agente anti-CTGF para su uso en un método para prevenir o reducir el daño muscular en un sujeto con distrofia muscular, el método comprendiendo administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente anti-CTGF, previniendo o reduciendo de este modo el daño muscular en el sujeto. En ciertas realizaciones, el daño muscular es daño del músculo esquelético.

En realizaciones particulares, el agente anti-CTGF se selecciona del grupo que consiste de anticuerpos anti-CTGF, fragmentos de anticuerpos anti-CTGF, miméticos de anticuerpos y oligonucleótidos anti-CTGF. En algunas realizaciones, el agente anti-CTGF es un anticuerpo anti-CTGF. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CTGF es un anticuerpo humano o humanizado. En una realización específica, el anticuerpo anti-CTGF es idéntico a CLN1 o mAbl como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7.405.274. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CTGF se une al dominio 2 de CTGF humano. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CTGF se une al mismo epítipo que CLN1 o mAbl. En realizaciones adicionales, el oligonucleótido anti-CTGF se selecciona del grupo que consiste de oligonucleótidos antisentido anti-CTGF, ARNip anti-CTGF, ARNhc anti-CTGF, ARNmi anti-CTGF y ribozimas anti-CTGF. En ciertas realizaciones, el agente anti-CTGF se usa en combinación con otra modalidad terapéutica. En realizaciones particulares, el agente anti-CTGF se usa en combinación con una cantidad eficaz de riluzol.

Estas y otras realizaciones de la invención se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la técnica a la luz de la divulgación de la presente, y todas estas realizaciones se contemplan específicamente. Cada una de las limitaciones de la invención puede abarcar varias realizaciones de la invención. Por lo tanto, se anticipa que cada una de las limitaciones de la invención que implican cualquier elemento o combinaciones de elementos puede incluirse en cada aspecto de la invención. Esta invención no se limita en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención es susceptible de otras realizaciones y de ponerse en práctica o de realizarse de varias maneras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra el cambio en el peso corporal a lo largo del tiempo para ratones de tipo salvaje y hSOD1^{G93A}. Durante un período de estudio de siete semanas, los ratones de tipo salvaje aumentaron de manera constante en peso corporal aumentando aproximadamente un 30% en peso. Por el contrario, el peso corporal de ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulG (25 mg/kg, ip, 3 veces a la semana) cayó inicialmente, aumentó y luego cayó de nuevo para finalizar esencialmente sin cambios al final del período de estudio. El tratamiento de ratones hSOD1^{G93A} con el anticuerpo anti-CTGF FG-3019 (25 mg/kg, 3 veces a la semana) resultó en un peso corporal significativamente más elevado en comparación con ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulG en todos los puntos temporales del estudio excepto en la semana 14. ANOVA de dos vías, *p<0,05, **p<0,01. Estos resultados demuestran que la inhibición de CTGF reduce el grado de pérdida de peso experimentado en un modelo de ENM.

Las Figuras 2A-C muestran una transferencia Western de extractos de proteínas del músculo gastrocnemio (FIG. 2A) y resultados de expresión de proteínas normalizados (FIGS. 2B y 2C). La transferencia se investigó secuencialmente para fibronectina (FN), madres contra el homólogo 3 decapentapléjico (Smad3) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Las bandas de proteína se visualizaron con tinción Ponceau S. Los ratones de tipo salvaje mostraron una expresión mínima de fibronectina (FIGS. 2A y 2B). Por el contrario, la expresión de fibronectina se incrementó moderadamente en ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulG. El tratamiento con el anticuerpo anti-CTGF FG-3019 redujo significativamente el nivel de expresión de fibronectina en ratones hSOD1^{G93A}, p<0,005, n = 6. Los ratones de tipo salvaje mostraron niveles bajos de Smad3 (FIGS. 2A y 2C). Por otro lado, la expresión de Smad3 fue notablemente elevada en ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulG. El tratamiento con FG-3019 no redujo significativamente la expresión de Smad3 en comparación con los ratones de tipo salvaje. Estos resultados demuestran que la inhibición de CTGF reduce la expresión de fibronectina.

La Figura 3 ilustra la distribución de tamaños del diámetro de Feret (μm) de las fibras del músculo gastrocnemio de ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulG o FG-3019. Los ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulG tenían, en general, fibras musculares con un diámetro de Feret más pequeño en comparación con los ratones hSOD1^{G93A} tratados con FG-301. Estos resultados demuestran que la inhibición de CTGF reduce la atrofia muscular en un modelo de ENM.

Las Figuras 4A y 4B ilustran, respectivamente, la fuerza isométrica generada por los músculos diafragma y tibial anterior de ratones hSOD1^{G93A}. Los músculos de los ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulG generaron aproximadamente la mitad de la fuerza isométrica en todas las frecuencias probadas en comparación con los músculos de los ratones hSOD1^{G93A} tratados con FG-3019. Estos resultados demuestran que el tratamiento con un anticuerpo anti-CTGF conserva la fuerza muscular en un modelo de ENM.

Las Figuras 5A y 5B ilustran, respectivamente, el peso del músculo tibial anterior y gastrocnemio de ratones hSOD1^{G93A} de tipo salvaje tratados con hulG o FG-3019. Los músculos de los ratones de tipo salvaje eran aproximadamente dos veces más pesados que los músculos de cualquier otro grupo de ratones hSOD1^{G93A}. El tratamiento con un agente anti-CTGF no pareció influir significativamente en el peso muscular en un modelo de

ENM.

Las Figuras 6A-D ilustran el grado de desmielinización del nervio ciático presente en secciones teñidas con toluidina de ratones de tipo salvaje y ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG o FG-3019. En las Figuras 6A-C se muestran imágenes representativas de nervios seccionados. Las imágenes están a 100 X y la barra de escala es de 10 µm. Los asteriscos blancos muestran axones desmielinizados. La Figura 6D muestra la fracción de axones desmielinizados presentes. Aproximadamente el 1% de los axones totales se desmielinizaron en ratones de tipo salvaje en comparación con aproximadamente el 8% de los axones totales en ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG. El tratamiento con FG-3019 redujo significativamente la fracción de axones desmielinizados en ratones hSOD1^{G93A} a aproximadamente el 6% de los axones totales. Los datos son la media ± SEM y se derivaron de 3 campos por animal, n = 3 para todos los grupos. La significancia fue **p<0,01 y se calculó usando ANOVA de una vía. Los resultados demuestran que el tratamiento con un agente anti-CTGF reduce la desmielinización de axones en un modelo de ENM.

Las Figuras 7A-D ilustran el grado de inervación de las uniones neuromusculares del diafragma en ratones de tipo salvaje y hSOD1^{G93A}. Las Figuras 7A-C muestran campos representativos de uniones neuromusculares teñidas usando anticuerpos contra neurofilamento-H, vesícula sináptica-2 (NF-H+SV2, verde) y α-bungarotoxina (α-BTX, rojo). Las flechas muestran las placas terminales inervadas y los asteriscos muestran las placas terminales desnervadas. Barra de escala, 50µm. La Figura 7D muestra el porcentaje de placas terminales inervadas. Tipo salvaje (n=1), hSOD1^{G93A} + hulgG (n=3) y hSOD1^{G93A} + FG-3019 (n=3). Se examinaron tres campos por animal y los datos se muestran como media ± SEM. Estos resultados demuestran que el tratamiento con un agente anti-CTGF reduce la desmielinización de los axones en un modelo de ENM.

La Figura 8 ilustra el tiempo de retención de ratones de tipo salvaje y hSOD1^{G93A} en una prueba de suspensión de dos extremidades. Los ratones individuales se probaron tres veces y se representó el tiempo más largo. En cada ensayo, los ratones de tipo salvaje pudieron agarrar un hilo de alambre durante todo el período de prueba de 180 segundos, n = 8. Los ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG fueron más débiles a las 13 semanas de edad con un tiempo medio de suspensión de 69,6 ± 29,0 segundos que disminuyó en la semana 15 a 24,4 ± 5,4 segundos, n = 5. El tratamiento con FG-3019 permitió a los ratones hSOD1^{G93A} colgarse del cable durante 93,4 ± 18,8 segundos a las 13 semanas que disminuyó en la semana 15 a 44,0 ± 8,4 segundos con y, n = 7. La diferencia en la semana 14 entre los ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG o FG-3019 fue estadísticamente significativo, p<0,05. Estos resultados demuestran que el tratamiento con un agente anti-CTGF conserva la fuerza muscular y reduce la velocidad a la que se pierde la fuerza en un modelo de ENM.

Las Figuras 9A y 9B ilustran el grado de actividad locomotora de ratones de tipo salvaje y hSOD1^{G93A} en una prueba de campo abierto. La Figura 9A ilustra la distancia total recorrida (m) en 10 minutos. Los ratones de tipo salvaje recorrieron aproximadamente 4 veces la de los ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG. El tratamiento con el anticuerpo anti-CTGF FG-3019 aumentó la distancia recorrida por los ratones hSOD1^{G93A} aproximadamente 2 veces. La Figura 9B ilustra la velocidad media (m/s) de los ratones durante el período de prueba de 10 minutos. Los ratones de tipo salvaje se desplazaron aproximadamente 3,5 veces más rápido que los ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG. El tratamiento con FG-3019 casi duplicó la velocidad media de los ratones hSOD1^{G93A} en comparación con ratones tratados con hulgG, N = 3. Estos resultados demuestran la capacidad de un agente anti-CTGF para conservar la movilidad (reducir la gravedad de la pérdida muscular y el control) en un modelo de ENM.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

Debe entenderse que la invención no se limita a las metodologías, protocolos, líneas celulares, ensayos y reactivos particulares descritos en la presente, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que se pretende que la terminología usada en la presente describa realizaciones particulares de la invención, y de ninguna manera se pretende que limite el alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Cada una de las limitaciones de la invención puede abarcar varias realizaciones de la invención. Por lo tanto, se anticipa que cada una de las limitaciones de la invención que implican cualquier elemento o combinaciones de elementos puede incluirse en cada aspecto de la invención. Esta invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes que se exponen en la siguiente descripción o se ilustran en los dibujos. La invención es susceptible de otras realizaciones y de ser puesta en práctica o llevada a cabo de varias maneras.

Debe indicarse que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, la forma singular "un", "uno" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "un oligonucleótido anti-CTGF" incluye una pluralidad de tales oligonucleótidos anti-CTGF; una referencia a "un anticuerpo" es una referencia a uno o más anticuerpos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y demás.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen

los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente en la puesta en práctica o ensayo de la invención, ahora se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

La puesta en práctica de la invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, biología celular, genética, inmunología y farmacología, dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Ver, por ejemplo, Gennaro, AR, ed. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. Mack Publishing Co. (1990); Colowick, S et al. eds., Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, DM Weir y CC Blackwell, eds., Blackwell Scientific Publications (1986); Maniatis, T. et al., eds. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Ausubel, F. M. et al, eds. Short Protocols in Molecular Biology, 4ª edición, John Wiley & Sons (1999); Ream et al., eds. Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press (1998); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. Newton & Graham eds., Springer Verlag (1997).

Definiciones

Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$ del valor numérico del número que se está usando. Por lo tanto, la administración de aproximadamente 15 mg/kg de un anticuerpo anti-CTGF significa la administración de 13,5 mg/kg-16,5 mg/kg del anticuerpo.

Además, la fraseología y terminología usadas en la presente tienen el propósito de describir y no deben considerarse limitativas. Se pretende que el uso de "que incluye", "que comprende" o "que tiene", "que contiene", "que implica" y variaciones de los mismos en la presente abarque los elementos enumerados a continuación y sus equivalentes, así como elementos adicionales.

Como se usa en la presente, el término "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente para referirse a un mamífero. En una realización preferida, el mamífero es un primate, y más preferiblemente un ser humano.

Como se usa en la presente, el término "enfermedades de las neuronas motoras" o "ENM" describe trastornos neurológicos degenerativos caracterizados por la pérdida progresiva de neuronas motoras del cerebro ('neuronas motoras superiores'), de la médula espinal ('neuronas motoras inferiores') o ambas, dando lugar a atrofia y/o espasticidad de la musculatura asociada. Las enfermedades de las neuronas motoras incluyen, por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria (PLS), atrofia muscular progresiva (PMA), atrofia muscular espinal (SMA), parálisis bulbar progresiva (PBP), parálisis pseudobulbar, atrofia muscular espinal-bulbar (SBMA), paraplejía espástica hereditaria (HSP) y síndrome pospoliomielítico. La clasificación tradicional de las ENM se basa en los tipos de células afectadas. La PLS y la parálisis pseudobulbar afectan a las neuronas motoras superiores. La PMA, PBP, SMA y SBMA afectan las neuronas motoras inferiores. Tanto las neuronas motoras superiores como las inferiores se ven afectadas en la ELA. Los métodos y agentes de la invención pueden usarse para tratar cualquier tipo de ENM.

Los términos "esclerosis lateral amiotrófica" y "ELA" como se usan en la presente se refieren al grupo de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la pérdida de neuronas motoras en los cuernos ventrales de la médula espinal y las neuronas corticales que proporcionan su entrada aferente. La ELA puede afectar inicialmente principalmente o a las neuronas motoras superiores o a las inferiores, pero independientemente del área de la lesión primaria, con el tiempo, la enfermedad adquiere una naturaleza generalizada simétrica (Mitsumoto, H. et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis, en Contemporary Neurology Series 49, Filadelfia, F.A. Davis Company (1998)). Tanto las formas esporádicas como las familiares de ELA se producen con ELA familiar, habitualmente autosómica dominante, que representa aproximadamente el 10% de la ELA (Dion PA et al., Nat, Rev, Genet. 10:769-782 (2009)). Los síntomas de la ELA aparecen típicamente más temprano en los casos familiares, pero los cursos clínicos de las formas familiares y esporádicas son comparables. Se han identificado varios tipos de mutaciones genéticas como causantes del desarrollo de ELA familiar con aproximadamente el 20% de los casos familiares provocados por mutaciones hereditarias en la proteína Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1) que protege a las neuronas motoras del daño de los radicales libres (Rosen DR et al., Nature, 362:59-62 (1993)).

A diferencia de algunas formas de ELA familiar, la etiología específica de la ELA esporádica sigue siendo esquivada con diferentes hipótesis propuestas que incluyen excitotoxicidad mediada por glutamato, función mitocondrial deteriorada, estrés oxidativo, neuroinflamación y agregación de proteínas aberrante (Dib M, Drugs, 63:289-310 (2003); Strong MJ, Pharmacology & Therapeutics, 98:379-414 (2003); Brajn LI et al., Annu. Rev. Neurosci 27:723-749 (2004); Dibenardo AB et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1762:1139-1149 (2006)).

Los términos "esclerosis primaria lateral" y "PLS," como se usan en la presente, se refieren a una enfermedad degenerativa progresiva de las neuronas motoras superiores caracterizada por espasticidad progresiva. La PLS afecta típicamente a los adultos y habitualmente es esporádica. Afecta a las extremidades inferiores, tronco,

extremidades superiores y músculos bulbares, habitualmente en ese orden. El principal desafío clínico que plantea la presentación de la PLS es distinguirla de la ELA, la paraparesia espástica hereditaria y de las afecciones no degenerativas que pueden presentar una presentación similar en las primeras etapas de su desarrollo.

5 Los términos "atrofia muscular progresiva" y "PMA", como se usan en la presente, se refieren a una enfermedad neuromuscular progresiva no hereditaria de inicio en la edad adulta caracterizada clínicamente por signos de disfunción de las neuronas motores inferiores y que puede evolucionar a ELA viéndose afectadas las neuronas motoras superiores.

10 Los términos "atrofia muscular espinal" y "SMA", como se usan en la presente, se refieren a la principal causa genética de muerte infantil, que afecta a 1 de cada 10.000 nacidos vivos por año (Pearn J, J Med Genet 15:414-417 (1978); Prior TW et al., Am J Med Genet A, 1:152A(7):1608-1616 (2010)). Clínicamente, la SMA se caracteriza por debilidad muscular progresiva y pérdida de neuronas motoras alfa de la médula espinal. La SMA está provocada por mutaciones o deleciones en el gen SMN1 (Lefebvre S et al, Cell, 80:155-165 (1995)). Debido a una
15 segunda copia parcialmente funcional denominada SMN2, la SMA es una enfermedad de niveles bajos de SMN, en lugar de ningún SMN (Brzustowicz LM et al., Hum Hered, 43:380-387 (1993); Rochette CF et al., Hum Genet, 108:255-266 (2001)). La gravedad clínica de la SMA se clasifica en 4 tipos principales, que varían en su momento de aparición y pronóstico esperado. Además, SMN2 sirve como modificador de la enfermedad, ya que el número de copias del gen SMN2 en pacientes con SMA modula la gravedad de la enfermedad.

20 Los términos "parálisis bulbar progresiva" y "PBP", como se usan en la presente, se refieren a una enfermedad neuromuscular que afecta a las neuronas motoras inferiores. Los síntomas de la PBP incluyen debilidad de los músculos faríngeos que afectan a la capacidad para tragar, debilidad de los músculos faciales y de la mandíbula, pérdida progresiva del habla, y atrofia eventual del músculo de la lengua. La debilidad de las
25 extremidades casi siempre es evidente, pero menos prominente. Típicamente, los pacientes con PBP progresan a ELA (Karam C et al., Amyotroph Lateral Scler, 11:364-368 (2010)).

Como se usa en la presente, el término "parálisis pseudobulbar" se refiere a una enfermedad que comparte muchos síntomas de la PBP, pero que se caracteriza por la degeneración de las neuronas motoras superiores. Las
30 personas afectadas tienen una pérdida progresiva de la capacidad de hablar, masticar y tragar. La debilidad progresiva de los músculos faciales lleva a un rostro inexpressivo. Los individuos pueden desarrollar una voz grave y un aumento del reflejo nauseoso.

Los términos "atrofia muscular espinal-bulbar", "SBMA" y "enfermedad de Kennedy", como se usan en la
35 presente, se refieren a una enfermedad neuromuscular de aparición en adultos caracterizada por la degeneración y pérdida de neuronas motoras inferiores que lleva al desgaste muscular. La enfermedad afecta aproximadamente a 1-2 de cada 100.000 personas. La SBMA se caracteriza por una atrofia muscular de inicio tardío que comienza en las caderas, luego los hombros y progresa a los músculos inervados por el tronco cerebral (músculos bulbares), lo que da como resultado dificultad para caminar, hablar y tragar (Atsuta N et al, Brain, 129:1446-1455). (2006); Fischbeck KH, J Inherit Metab Dis, 20:152-158 (1997); Kennedy WR et al., Neurology, 18:671-680 (1968)).

A nivel molecular, la SBMA es provocada por la expansión de una repetición de trinucleótido CAG que
45 codifica poliglutamina (poliQ) en el primer exón del gen que codifica el receptor de andrógenos (AR). Estas repeticiones son tóxicas y llevan a la muerte de las neuronas motoras provocando debilidad respiratoria en pacientes con SBMA (Bricceno KV et al, Neurodegener. Dis, 9:199-209 (2012)). Hay una correlación entre el número de repeticiones y la edad de inicio de la debilidad muscular. Las manifestaciones de la enfermedad completa se observan solo en hombres, mientras que las mujeres heterocigotas son en su mayoría asintomáticas y las mujeres homocigotas para la mutación son raras y muestran solo síntomas leves (Schmidt. B et al., Neurology 59:770-772 (2002)).

50 Los términos "paraplejía espástica hereditaria", "HSP" y "paraparesia espástica familiar", como se usan en la presente, se refieren a un grupo de trastornos hereditarios provocados por la degeneración del tracto corticoespinal que se manifiesta como debilidad progresiva y espasticidad de las piernas (Tallaksen CM et al., Curr Opin Neurol, 14:457-463 (2001)). Se estima que la prevalencia combinada de todos los tipos de paraplejas espásticas hereditarias es de 1 a 10 por cada 100.000 personas (Ruano L et al, Neuroepidemiology, 42:174-183 (2014)). Los primeros síntomas clínicos típicamente incluyen dificultades leves para la marcha y rigidez de la pierna. Estos síntomas generalmente progresan lentamente y eventualmente llevan a que las personas afectadas requieran la ayuda de un bastón, un andador, o una silla de ruedas.

60 Como se usa en la presente, los términos "síndrome postpoliomielítis" y "PPS" se refieren a una enfermedad neuromuscular que afecta a las neuronas motoras que sobrevivieron a una infección aguda inicial con polio, un virus que infecta y destruye las neuronas motoras. Aproximadamente entre el 25% y el 65% de los supervivientes de polio desarrollan PPS y atrofia muscular postpoliomielítis, habitualmente décadas después de recuperarse de la poliomielitis cuando las neuronas motoras supervivientes se pierden debido al envejecimiento, lesiones o
65 enfermedad (Ramlow J. et al. Am J Epidemiol, 136:769-786 (1992); Windebank AJ et al. Neurology, 41:501-507

(1991)). Los síntomas incluyen fatiga, debilidad muscular lentamente progresiva, atrofia muscular, fasciculaciones, intolerancia al frío y dolor muscular y articular.

Los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento", como se usan en la presente, se refieren a la administración de un agente terapéutico (por ejemplo, agente anti-CTGF) al sujeto con necesidad de ello, para lograr un efecto beneficioso que incluye prevenir, estabilizar, reducir o revertir el desarrollo de una condición patológica de un tipo de célula, tejido u órgano afectado por la ENM; prevenir, estabilizar, reducir o revertir uno o más síntomas de una ENM; mejorar el pronóstico del sujeto: o extender la supervivencia de un sujeto con ENM. El tratamiento de una ENM puede aumentar la movilidad del sujeto, detener el deterioro físico del sujeto, reducir la necesidad de medicación o medidas de apoyo, extender el periodo de vida independiente o libertad de necesidad de asistencia de ventilador o aumentar el tiempo para necesitar una traqueotomía.

En algunas realizaciones, la condición patológica tratada afecta a las neuronas, incluyendo las neuronas motoras, células musculares, fibras musculares, células de Schwann, astrocitos, oligodendrocitos, microglía, células T y/o macrófagos. En realizaciones adicionales, la condición patológica incluye apoptosis, atrofia, degradación axonal, denervación, desmielinización, fibrosis e inflamación, incluida la neuroinflamación.

En realizaciones adicionales, el tratamiento con un agente anti-CTGF previene, estabiliza, reduce o revierte uno o más síntomas de una ENM que incluyen pérdida de peso, debilidad muscular, fatiga muscular, calambres musculares, espasticidad muscular, fasciculación muscular, hiperreflexia, contracturas articulares o musculares, pérdida de control del movimiento muscular voluntario, dificultad para respirar, disfagia y disartria provocadas por atrofia de las fibras musculares (miofibras) y fibrosis muscular resultante de la denervación muscular. Los síntomas de ENM adicionales que se previenen, estabilizan, reducen o revierten mediante el tratamiento con un agente anti-CTGF incluyen dolor articular o muscular, arrebatos emocionales que incluyen períodos incontrolables de risa o llanto.

Como se usa en la presente, los términos "reducir", "reduciendo" o "reducción" en el contexto del tratamiento de un sujeto con ENM se refieren a un tratamiento que relaja, mitiga, alivia, mejora o disminuye el efecto o la gravedad de una condición patológica o síntoma de una ENM, por ejemplo, ELA, sin curar la enfermedad. Se reconoce que cualquier indicio de éxito en la reducción de una condición patológica o un síntoma de una ENM reduce la condición patológica, o síntoma. La reducción de una condición patológica o síntoma de ENM puede determinar usando pruebas clínicas rutinarias estándar, observaciones y cuestionarios que están dentro de la capacidad y el conocimiento de un profesional médico. Las pruebas ejemplares no limitativas pueden incluir pruebas de imagenología, como imagenología por resonancia magnética (MRI) o mielografía de contraste; pruebas de neurofisiología, incluyendo pruebas de electromiografía, estimación del número de unidades motoras, miografía de impedancia eléctrica, estimulación magnética transcraneal y pruebas de velocidad de conducción nerviosa; observaciones realizadas durante un examen físico; así como las autoevaluaciones de los pacientes y los cuestionarios de calidad de vida.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención reducen la aparición o gravedad de una condición patológica o síntoma de ENM en por lo menos un 10%, por lo menos un 15%, por lo menos un 20%, por lo menos un 25%, por lo menos un 30%, por lo menos un 35%, por lo menos un 40%, por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80% o por lo menos un 90% en comparación con un grupo de control o controles históricos.

Cuando se usan en el contexto de la progresión de una ENM, los términos "reducir", "reduciendo" y "reducción" se refieren a ralentizar la velocidad de una condición patológica, un síntoma de enfermedad o la progresión de la enfermedad. En algunas realizaciones, los métodos de la invención ralentizan la progresión de una condición patológica de ENM o un síntoma de ENM en por lo menos 1 mes, por lo menos 2 meses, por lo menos 3 meses, por lo menos 4 meses, por lo menos 5 meses, por lo menos 6 meses, por lo menos 8 meses, por lo menos 10 meses, por lo menos 12 meses, por lo menos 15 meses, por lo menos 18 meses o por lo menos 24 meses en comparación con un grupo de control o un control histórico. En realizaciones adicionales, el tratamiento de un sujeto con una ENM con un agente anti-CTGF aumenta la supervivencia del sujeto con ENM en por lo menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% en comparación con un grupo de control o controles históricos.

En otras realizaciones, la administración de un agente anti-CTGF aumenta la supervivencia de un sujeto con ENM en por lo menos 1 mes, por lo menos 2 meses, por lo menos 3 meses, por lo menos 4 meses, por lo menos 5 meses, por lo menos 6 meses, por lo menos 7 meses, por lo menos 8 meses, por lo menos 9 meses, por lo menos 10 meses, por lo menos 11 meses, por lo menos 12 meses, por lo menos 15 meses, por lo menos 18 meses, por lo menos 24 meses, por lo menos 3 años, por lo menos por lo menos 4 años o por lo menos 5 años en comparación con un grupo de control o un control histórico.

Como se usa en la presente, el término "cantidad eficaz" "en el contexto de la administración de un agente anti-CTGF a un sujeto con una ENM o con una susceptibilidad genética para desarrollar una ENM, se refiere a la cantidad de un agente anti-CTGF que es suficiente para producir un efecto beneficioso o terapéutico buscado por un

investigador, veterinario, médico, clínico u otro profesional de la salud, incluyendo la prevención, estabilización, reducción o reversión de la gravedad de una o más condiciones patológicas de una célula, tejido u órgano, o síntomas de la enfermedad. En realizaciones adicionales, una "cantidad eficaz" de un agente anti-CTGF aumenta la supervivencia de un sujeto con una ENM.

En realizaciones específicas, una "cantidad eficaz" de un agente anti-CTGF se refiere a una cantidad del agente anti-CTGF que es suficiente para prevenir o retrasar la presentación clínica de por lo menos uno o más de los siguientes síntomas en un individuo con una ENM o la susceptibilidad genética a desarrollar ENM: pérdida de peso, debilidad muscular, fatiga muscular, calambres musculares, espasticidad muscular, fasciculación muscular, hiperreflexia, contracturas articulares o musculares, pérdida de control del movimiento muscular voluntario, dificultad para respirar, disfagia, disartria, dolor en los músculos o las articulaciones, arrebatos emocionales que incluyen períodos incontrolables de risa o llanto, o el desarrollo de neumonía.

En otras realizaciones, una "cantidad eficaz" de un agente anti-CTGF se refiere a una cantidad del agente anti-CTGF que es suficiente para estabilizar (es decir, prevenir el avance) o ralentizar el avance de uno o más síntomas de una ENM; o reducir la gravedad de uno o más síntomas de una ENM, incluyendo pérdida de peso, fatiga muscular, calambres musculares, espasticidad muscular, fasciculación muscular, hiperreflexia, contracturas articulares o musculares, pérdida de control del movimiento muscular voluntario, dificultad para respirar, disfagia, disartria, dolores musculares o articulares, arrebatos emocionales que incluyen períodos incontrolables de risa o llanto.

En realizaciones adicionales, una "cantidad eficaz" de un agente anti-CTGF se refiere a una cantidad del agente anti-CTGF que es suficiente para prevenir o reducir el daño muscular, desgaste muscular, atrofia muscular, debilidad muscular, degeneración muscular, necrosis de las fibras musculares, fibrosis muscular, inflamación endomisial o perimisial e infiltración de células inflamatorias mononucleares en el músculo. En otras realizaciones, una "cantidad eficaz" de un agente anti-CTGF se refiere a una cantidad del agente anti-CTGF que es suficiente para prevenir o reducir la desmielinización de fibras nerviosas y axones, degradación axonal o denervación de músculos.

Sujetos

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de beneficios inesperados y sorprendentes para sujetos con ENM conferidos a través de la inhibición de CTGF. La invención proporciona varios métodos y agentes para tratar las ENM. La enfermedad de las neuronas motoras se refiere a un grupo de enfermedades musculares caracterizadas, en parte, por la pérdida progresiva de las neuronas motoras del cerebro ('neuronas motoras superiores'), la médula espinal ('neuronas motoras inferiores') o ambas, lo que lleva a atrofia espasticidad de la musculatura asociada. En algunas realizaciones, los sujetos adecuados para, o con necesidad de tratamiento de los métodos y agentes anti-CTGF de la presente invención son mamíferos, más preferiblemente humanos, que están en riesgo de desarrollar una ENM o ya han mostrado por lo menos un síntoma de una ENM. Los síntomas tempranos de una ENM que se observan a menudo en el momento de la presentación clínica incluyen problemas de destreza, incluyendo debilidad asimétrica de las manos que generalmente se manifiesta como dificultad para recoger y sostener objetos y dificultad para realizar tareas motoras delicadas, debilidad del hombro que limita el movimiento del brazo por encima de la cabeza, problemas con la marcha y el equilibrio, incluyendo un aumento de los tropiezos y calambres y espasticidad de brazos y piernas. Con la enfermedad de inicio bulbar (por ejemplo, PBP y parálisis pseudobulbar), la disartria suele ser el primer signo de la enfermedad. Los síntomas que aparecen posteriormente en una ENM incluyen disfagia, disartria, atrofia muscular, parálisis muscular, espasticidad muscular, hiperreflexia, fasciculaciones y contracturas o dolor articular o muscular.

Los sujetos sospechosos de tener una ENM pueden identificarse fácilmente por cualquier médico competente usando pruebas y criterios de diagnóstico estándar que incluyen pruebas de electrodiagnóstico que incluyen electromiografía (EMG) y velocidad de conducción nerviosa (NCV); estudios de sangre y orina que incluyen electroforesis de proteínas séricas de alta resolución; niveles de hormona tiroidea y paratiroidea; recogida de orina de 24 horas para metales pesados; punción lumbar; estudios de imagenología de rayos X y resonancia magnética (MRI); mielograma de la columna cervical; ultrasonido neuromuscular (NMUS); biopsia de músculos y/o nervios; y un examen neurológico completo.

Los criterios de diagnóstico para las ENM son bien conocidos en la técnica e incluyen los Criterios de El Escorial revisados (Brooks B.R. et al. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord; 1:293-299 (2000); Directrices de EFNS (Andersen PM et al. Eur J Neurol, 13:360-375 (2012)); y Criterios de Awaji (Carvalho M, et al. Shinkei Kenkyu No Shinpo, 59:1023-1029 (2007)).

También pueden emplearse pruebas genéticas para diagnosticar a un sujeto con ENM. Las técnicas usadas en las pruebas genéticas incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transferencia Southern, escaneo de mutaciones y/o análisis de secuencias. El ADN puede extraerse de cualquier tejido o tipo de célula relevante, incluyendo sangre o glóbulos blancos. Se contempla específicamente la identificación de sujetos con una ENM, incluyendo la esclerosis lateral amiotrófica, o con propensión a desarrollar una ENM, usando pruebas

genéticas. El tratamiento de sujetos con un agente anti-CTGF antes del desarrollo de síntomas clínicos evidentes de una ENM puede retrasar o prevenir el desarrollo de síntomas clínicos, aumentando de este modo la esperanza de vida o la calidad de vida de un individuo afectado.

5 Agentes

En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, se contempla particularmente que el agente o medicamento que inhibe CTGF (es decir, el agente o medicamento anti-CTGF) puede ser un polipéptido, polinucleótido o molécula pequeña; por ejemplo, un anticuerpo que se une a CTGF, una molécula antisentido de CTGF, ARNm, ribozima o ARNip, un compuesto químico de molécula pequeña, etc. En algunas realizaciones, la inhibición de CTGF se logra usando un anticuerpo que se une específicamente a CTGF. En realizaciones adicionales, la invención contempla inhibir CTGF usando un oligonucleótido anti-CTGF, pero la inhibición de CTGF puede lograrse mediante cualquiera de los medios bien conocidos en la técnica para modular la expresión o actividad de CTGF.

Anticuerpos

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. El término anticuerpo incluye además miméticos de anticuerpos, que se analizan más adelante.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal típicamente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptidos que se une a un objetivo, en donde la secuencia de polipéptidos que se une al objetivo se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia de polipéptidos de unión al objetivo de una pluralidad de secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, como un grupo de clones de hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión al objetivo seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por el objetivo, para humanizar la secuencia de unión al objetivo, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad in vivo, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión al objetivo alterada también es un anticuerpo monoclonal de esta invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante de un antígeno.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler G y Milstein C, *Nature*, 256:495-497 (1975).); Harlow E et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567); tecnologías de presentación de fagos (ver, por ejemplo, Clackson T et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks JD et al., *J Mol Biol* 222: 581-597 (1992); y Lee V et al., *J Immunol Methods* 284(1-2): 119-132 (2004)), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a los humanos en animales que tienen partes o todos los loci o genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits A et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2551 (1993); Patentes de Estados Unidos Nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016).

Los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; y Morrison S et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una o más regiones hipervariables (HVR) del receptor se reemplazan por residuos de una o más HVR de una especie no

humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. Para detalles adicionales, ver, por ejemplo, Jones TA et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann L et al., Nature 332:323-329 (1988); y las Patentes de Estados Unidos N° 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o que ha sido elaborado usando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos (ver por ejemplo, Hoogenboom HR y Winter G, J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Marks JD et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991); Boerner R et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991); Li J et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) y la Patentes de Estados Unidos N° 6.075.181 y 6.150.584).

Un "anticuerpo desnudo" para los propósitos de la presente es un anticuerpo que no está conjugado con una fracción citotóxica o un marcador, incluyendo un radiomarcador. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CTGF es un anticuerpo desnudo.

Los anticuerpos anti-CTGF de la invención pueden ser específicos para CTGF endógeno a la especie del sujeto a tratar o pueden tener reactividad cruzada con CTGF de una o más de otras especies. En algunas realizaciones, el anticuerpo para su uso en los presentes métodos se obtiene de la misma especie que el sujeto que lo necesita. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico en el que los dominios constantes se obtienen de la misma especie que el sujeto que lo necesita y los dominios variables se obtienen de otra especie. Por ejemplo, en el tratamiento de un sujeto humano, el anticuerpo para usar en los presentes métodos puede ser un anticuerpo quimérico que tiene dominios constantes que son de origen humano y dominios variables que son de origen de ratón. En realizaciones preferidas, el anticuerpo para usar en los presentes métodos se une específicamente al CTGF endógeno para la especie del sujeto que lo necesita. Por tanto, en ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado, en particular un anticuerpo monoclonal, que se une específicamente al CTGF humano (N° de registro de GenBank NP_001892).

Se describen anticuerpos ejemplares para su uso en los métodos de tratamiento de la presente invención, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.408.040; PCT/US1998/016423; PCT/US1999/029652 y Publicación Internacional N° WO 99/33878. Preferiblemente, el anticuerpo anti-CTGF es un anticuerpo monoclonal. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En realizaciones particulares, el anticuerpo es el anticuerpo descrito y reivindicado en las Patentes de Estados Unidos N° 7.405.274 y 7.871.617. En algunas realizaciones, el anticuerpo para el tratamiento de una ENM tiene la secuencia de aminoácidos del anticuerpo producido por la línea celular identificada por el N° de registro de la ATCC PTA-6006. En realizaciones adicionales, el anticuerpo se une a CTGF de forma competitiva con un anticuerpo producido por el N° de registro de la ATCC PTA-6006. En realizaciones adicionales, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo producido por el N° de registro ATCC PTA-6006. Un anticuerpo particular para usar en los métodos de tratamiento divulgados es CLN1 o mAb1 como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7.405.274, o un anticuerpo sustancialmente equivalente al mismo o derivado del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CTGF es CLN1, un anticuerpo idéntico al anticuerpo producido por la línea celular identificada por el N° de registro de la ATCC PTA-6006 que está abarcado por las reivindicaciones de las Patentes de Estados Unidos N° 7.405.274 y 7.871.617.

Como se hace referencia en la presente, la frase "un anticuerpo que se une específicamente a CTGF" incluye cualquier anticuerpo que se une a CTGF con alta afinidad. La afinidad puede calcularse a partir de la siguiente ecuación:

$$Afinidad = K_a = \frac{[Ab \cdot Ag]}{[Ab][Ag]} = \frac{1}{K_d}$$

donde [Ab] es la concentración del sitio de unión del antígeno libre en el anticuerpo, [Ag] es la concentración del antígeno libre, [Ab·Ag] es la concentración de los sitios de unión del antígeno ocupados, K_a es la constante de asociación del complejo de antígeno con sitio de unión de antígeno, y K_d es la constante de disociación del complejo. Un anticuerpo de alta afinidad típicamente tiene una afinidad por lo menos del orden de 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} o 10^{10} M^{-1} . En realizaciones particulares, un anticuerpo para usar en los presentes métodos tendrá una afinidad de unión por CTGF entre 10^8 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} , entre 10^8 M^{-1} y 10^9 M^{-1} o entre 10^9 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} . En algunas realizaciones, el anticuerpo de alta afinidad tiene una afinidad de aproximadamente 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} o 10^{10} M^{-1} .

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden un fragmento funcional o una parte de un anticuerpo intacto, que preferiblemente comprende una región de unión al antígeno del mismo. Un fragmento funcional de un anticuerpo será un fragmento con una especificidad y afinidad similares (no necesariamente idénticas) para el anticuerpo del que se deriva. Los ejemplos no limitativos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, $F(ab')_2$ y Fv que pueden producirse mediante digestión enzimática de anticuerpos completos, por ejemplo, digestión con papaína, para producir fragmentos Fab. Otros ejemplos no limitativos incluyen fragmentos de anticuerpos manipulados como diacuerpos (Holliger P et al. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 6444-6448 (1993)); anticuerpos lineales (Zapata G et al. Protein Eng, 8(10): 1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (Bird KD et al. Science, 242:

423-426 (1988)); anticuerpos de dominio único, también conocidos como nanocuerpos (Ghahoudi MA et al. FEBS Lett. 414: 521-526, (1997)); anticuerpos de dominio (Ward ES et al. Nature. 341: 544-546, (1989)); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

5 Miméticos de anticuerpos

Los miméticos de anticuerpos son proteínas, típicamente en el intervalo de 3 a 25 kD, que están diseñadas para unirse a un antígeno con alta especificidad y afinidad como un anticuerpo, pero no están relacionadas estructuralmente con los anticuerpos. Frecuentemente, los miméticos de anticuerpos se basan en un motivo estructural o andamiaje que puede encontrarse como un dominio único o repetido de una biomolécula más grande. Ejemplos de miméticos de anticuerpos derivados de dominios incluyen AdNectinas que utilizan el décimo dominio de fibronectina III (Lipovšek D. Protein Eng Des Sel, 24: 3-9 (2010)); anticuerpos que utilizan el dominio Z de la proteína A estafilocócica (Nord K et al. Nat Biotechnol. 15: 772-777 (1997)), y DARPs que utilizan el dominio de repetición de anquirina de consenso (Amstutz P. Protein Eng Des Sel. 19:219-229 (2006)). Alternativamente, los miméticos de anticuerpos también pueden basarse en la estructura completa de una biomolécula más pequeña, como las Anticalinas que utilizan la estructura de la lipocalina (Beste G et al. Proc Natl Acad Sci USA. 5:1898-1903 (1999)). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CTGF es un mimético de anticuerpo.

20 Oligonucleótidos

En algunos aspectos, la presente invención comprende oligonucleótidos sintéticos que disminuyen la expresión del ARNm de CTGF humano. Estos oligonucleótidos anti-CTGF incluyen ácidos nucleicos aislados, miméticos de ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos. Los oligonucleótidos de la invención comprenden oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS) (oligozimas) y ARN inhibidor (ARNi) incluyendo ARNiP, microARN (ARNmi) y ARN de horquilla corta (ARNhc). Los oligonucleótidos que disminuyen la expresión del ARNm de CTGF son útiles para tratar las ENM y, en particular, la ELA.

Los términos "oligonucleótido" y "ácido nucleico oligomérico" se refieren a oligómeros o polímeros de ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN), miméticos o análogos de ARN o ADN, o combinaciones de los mismos, en forma de cadena sencilla o doble. Los oligonucleótidos son moléculas formadas por el enlace covalente de dos o más nucleótidos o sus análogos.

Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren al apareamiento de bases de Watson-Crick convencional de ácidos nucleicos. Por ejemplo, en la complementariedad del ADN, la guanina forma un par de bases con la citosina y la adenina forma un par de bases con la timina, mientras que en la complementariedad del ARN, la guanina forma un par de bases con la citosina, pero la adenina forma un par de bases con el uracilo en lugar de la timina. Un oligonucleótido es complementario a una secuencia de ARN o ADN cuando los nucleótidos del oligonucleótido son capaces de formar enlaces de hidrógeno con un número suficiente de nucleótidos en la secuencia de ARN o ADN correspondiente para permitir que el oligonucleótido hibride con la secuencia de ARN o ADN. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos tienen una complementariedad perfecta con el ARNm de CTGF humano, es decir, no hay malapareamientos.

Cuando se usa en el contexto de un oligonucleótido, "modificado" o "modificación" se refiere a un oligonucleótido que incorpora uno o más enlaces de azúcar, nucleobases o internucleosídicos no naturales (modificados). Los oligonucleótidos modificados son estructuralmente distinguibles, pero funcionalmente intercambiables con oligonucleótidos no modificados de origen natural o sintético y habitualmente tienen propiedades mejoradas como resistencia aumentada a la degradación por exonucleasas y endonucleasas, o afinidad de unión aumentada. En algunas realizaciones, se modifican los oligonucleótidos anti-CTGF.

Los enlaces internucleosídicos covalentes no naturales, es decir, estructuras principales modificadas, incluyen aquellos enlaces que retienen un átomo de fósforo en la estructura principal y también aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la estructura principal. En la técnica se conocen numerosas estructuras principales de oligonucleótidos modificados que contienen fósforo e incluyen, por ejemplo, fosforamiditas, fosforodiamidato morfolinos, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquilfosfonatos que incluyen 3'-alquilen-fosfonatos, 5'-alquilen-fosfonatos y fosfonatos quirales, y fosfinatos. Ver Swayze E y Bhat B en Antisense Drug Technology Principles. Strategies, and Applications. 2ª Ed. CRC Press, Boca Rotan FL, p. 144-182 (2008).

En realizaciones adicionales, los enlaces internucleosídicos no naturales no están cargados y, en otras, los enlaces son aquirales. En algunas realizaciones, los enlaces internucleosídicos no naturales no están cargados y son aquirales, por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA).

En algunas realizaciones, la fracción de azúcar modificado es un azúcar distinto de ribosa o desoxirribosa. En ciertas realizaciones, el azúcar es arabinosa, xilulosa o hexosa. En realizaciones adicionales, el azúcar está sustituido con uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquénilo; O-, S- o N-

alquinilo; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser alquilo C1 a C10 o alquenilo y alquinilo C2 a C10 sustituido o no sustituido. En algunas realizaciones, las modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-alilo (2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-alilo (2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación 2' puede estar en la posición arabino (arriba) o en la posición ribo (abajo). También pueden realizarse modificaciones similares en otras posiciones de un oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en los oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido 5' terminal.

En algunas realizaciones, el azúcar modificado está conformacionalmente restringido. En realizaciones adicionales, la restricción conformacional es el resultado de que el azúcar posee una fracción bicíclica. En otras realizaciones, la fracción bicíclica enlaza los átomos de oxígeno 2' y de carbono 3' o 4'. En realizaciones adicionales, el enlace es un grupo metileno (-CH₂-)_n que une el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', donde n es 1 o 2. Este tipo de disposición estructural produce lo que se conoce como "ácidos nucleicos bloqueados". (LNA). Ver Koshkin AA et al. *Tetrahedron*, 54, 3607-3630 (1998); y Singh SK et al., *Chem. Commun*, 4:455-456 (1998).

En algunas realizaciones, el azúcar es un mimético de azúcar que está conformacionalmente restringido dando como resultado un monómero conformacionalmente restringido. En ciertas realizaciones, el mimético de azúcar comprende un anillo de ciclohexilo que comprende un heteroátomo de anillo y un puente que hacen que el sistema de anillo sea bicíclico. Ver PCT/US2010/044549. En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos comprenden por lo menos un nucleótido que tiene una fracción de azúcar bicíclica o está restringido conformacionalmente de otra manera.

En algunas realizaciones, la fracción de azúcar modificado es un mimético de azúcar que comprende un anillo morfolino. En realizaciones adicionales, el enlace internucleosídico fosfodiéster se reemplaza por un enlace fosforodiamidato no cargado. Ver Summerton J y Weller D, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 7: 187-195 (1997).

En algunas realizaciones, tanto los grupos fosfato como las fracciones de azúcar se reemplazan con una estructura principal de poliamida compuesta de unidades repetidas de N-(2-aminoetil)-glicina a las que se unen las nucleobases mediante conectores de metileno carbonilo. Estos constructos se denominan ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Los PNA son aquirales, no cargados y, debido a los enlaces peptídicos, resistentes a endo- y exonucleasas. Ver Nielsen PE et al., *Science*, 254:1497-1500 (1991) y la Patente de Estados Unidos N° 5.539.082.

Los oligonucleótidos útiles en los métodos de la invención incluyen aquellos que comprenden total o parcialmente nucleobases de origen natural. Las nucleobases de origen natural incluyen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, 5-metilcitosina, pseudouridina, dihidouridina, inosina, ribotimidina, 7-metilguanina, hipoxantina y xantina.

Los oligonucleótidos incluyen además aquellos que comprenden nucleobases total o parcialmente modificadas (derivadas semisintéticamente o sintéticamente). Ver Herdewijn P, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 10: 297-310 (2000); y Sanghvi Y S, et al. *Nucleic Acids Res*, 21: 3197-3203 (1993).

En algunas realizaciones, se modifica por lo menos un nucleósido, es decir, una base y un azúcar unidos, en un oligonucleótido, es decir, un mimético de nucleósido. En ciertas realizaciones, el nucleósido modificado comprende un nucleósido de tetrahidropirano, en donde un anillo de tetrahidropirano sustituido reemplaza al anillo de pentofuranosa natural. Ver PCT/US2010/022759 y PCT/US2010/023397. En otras realizaciones, el mimético de nucleósido comprende un sustituyente 5' y un sustituyente 2'. Ver PCT/US2009/061913. En algunas realizaciones, el mimético de nucleósido es un nucleósido α-L-bicíclico sustituido. Ver PCT/US2009/058013. En realizaciones adicionales, el mimético de nucleósido comprende una fracción de azúcar bicíclico. Ver PCT/US2009/039557. En realizaciones adicionales, el mimético de nucleósido comprende un nucleósido bicíclico bis modificado. Ver PCT/US2009/066863. En ciertas realizaciones, el mimético de nucleósido comprende un anillo ciclohexilo bicíclico en donde uno de los carbonos del anillo está reemplazado por un heteroátomo. Ver PCT/US2009/033373. En otras realizaciones más, un nucleósido bicíclico 3' o 5' terminal se une covalentemente mediante un enlace internucleosídico neutro al oligonucleótido. Ver PCT/US2009/039438. En otras realizaciones, el mimético de nucleósido es un nucleósido tricíclico. Ver PCT/US2009/037686.

Los oligonucleótidos de la invención pueden contener cualquier número de las modificaciones descritas en la presente. Las modificaciones mencionadas anteriormente pueden incorporarse uniformemente a través de un oligonucleótido completo, en regiones específicas o localizaciones discretas dentro del oligonucleótido incluyendo en un solo nucleótido. La incorporación de estas modificaciones puede crear oligonucleótidos químicos o híbridos en los que existen dos o más áreas químicamente distintas, cada una compuesta por uno o más nucleótidos.

Los oligonucleótidos de la invención pueden sintetizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, usando síntesis enzimática y/o síntesis química. Los oligonucleótidos pueden sintetizarse in vitro (por ejemplo, usando síntesis enzimática y síntesis química) o in vivo (usando tecnología de ADN recombinante bien conocida en la técnica). En una realización preferida, se usa síntesis química para polinucleótidos modificados. La síntesis química de oligonucleótidos lineales es bien conocida en la técnica y puede lograrse mediante técnicas de

solución o fase sólida. Preferiblemente, la síntesis se realiza mediante métodos en fase sólida. Los sintetizadores automatizados de oligonucleótidos en fase sólida usados para construir los oligonucleótidos de la invención están disponibles a través de varios proveedores, incluyendo GE Healthcare Biosciences (Piscataway, NJ).

Los protocolos de síntesis de oligonucleótidos son bien conocidos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.830.653; WO 98/13526; Stec W et al. J Am Chem Soc 106:6077-6079 (1984); Stec W et al. J Org. Chem 50:3908-3913 (1985); Stec W et al. J Chromatog 326:263-280 (1985); LaPlanche JL et al. Nucl Acid Res 26:251-60 (1986); Fasman G D, Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology (1989). CRC Press, Boca Raton, Fla.; Patente de Estados Unidos N° 5.013.830; Patente de Estados Unidos N° 5.214.135; Patente de Estados Unidos N° 5.525.719; WO 92/03568; Patente de Estados Unidos N° 5.276.019; y Patente de Estados Unidos N° 5.264.423.

Como se usa en la presente, el término "oligonucleótido antisentido" se refiere a un ácido nucleico oligomérico que es capaz de hibridar con su secuencia de ácidos nucleicos objetivo complementario dando como resultado el deterioro de la función normal de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. Se han descrito y utilizado oligonucleótidos antisentido que inhiben la expresión de CTGF para disminuir la expresión de CTGF en varios tipos de células. (Ver, por ejemplo, PCT/US1996/008140; PCT/US1999/026189; PCT/US1999/029652; PCT/US2002/038618; Kothapalli D et al. Cell Growth Differ 8:61-68, 1997; Shimo T et al. J Biochem (Tokyo) 124:130-140 (1998); Uchio K et al. Wound Repair Regen 12:60-66 (2004); Guha M et al. FASEB J 21:3355-3368 (2007); Patente de Estados Unidos N° 6.358.741; Patente de Estados Unidos N° 6.965.025; Patente de Estados Unidos N° 7.462.602; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2008/0070856; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2008/0176964; y Patente de Estados Unidos N° 8.802.839; PCT/US02/38618; PCT/US2009/054973; PCT/US2009/054974; PCT/US2009/054975; PCT/US2009/054976; PCT/US2012/023620; y Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 13/364.547.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos usados para disminuir la expresión de ARNm de CTGF humano son ARN interferente pequeño (ARNip). Como se usa en la presente, los términos "ARN interferente pequeño" o "ARNip" se refieren a moléculas de ARN de cadena sencilla o doble que inducen la vía de interferencia del ARN (ARNi) y actúan en concierto con las proteínas del huésped, por ejemplo, complejo silenciador inducido por ARN (RISC) para degradar el ARNm de una manera específica de secuencia. En el ARNi de origen natural, la proteína ARNasa III/helicasa, Dicer, escinde un ARN de cadena doble (ARNdc) en pequeñas moléculas de ARN interferente (ARNip). Estos ARNip se incorporan en una ribonucleasa multicomponente denominada complejo silenciador inducido por ARN (RISC). Una cadena de ARNip permanece asociada con RISC y guía al complejo hacia un ARN afín que tiene una secuencia complementaria al mc-ARNip guía en RISC. Esta endonucleasa dirigida a ARNip digiere el ARN, inactivándolo de este modo.

El silenciamiento selectivo de la expresión de CTGF por ARNi puede lograrse administrando oligonucleótidos de ARNip aislados o mediante la expresión in vivo de precursores de ARN manipulados (ver las Patentes de Estados Unidos N° 7.056.704, 7.078.196, 7.459.547, 7.691.995 y 7.691.997).

En algunas realizaciones, se proporcionan vectores de expresión recombinantes que expresan oligonucleótidos anti-CTGF para su uso en tratamiento. Tales constructos genéticos pueden diseñarse usando vectores y reguladores de expresión apropiados para la expresión específica de células o tejidos y la expresión constitutiva o inducible. Estos constructos genéticos pueden formularse y administrarse de acuerdo con procedimientos establecidos dentro de la técnica. En algunas realizaciones, a los pacientes se les administran vectores de expresión recombinantes que codifican un oligonucleótido de horquilla corta. En realizaciones adicionales, los vectores de expresión recombinantes son plásmidos de ADN, mientras que en otras realizaciones, los vectores de expresión son vectores virales. Los vectores virales que expresan ARN pueden construirse basándose en, pero sin limitarse a, virus adenoasociados, retrovirus, adenovirus, o alfavirus. En algunas realizaciones, los vectores de expresión persisten en las células objetivo. Alternativamente, tales vectores pueden administrarse repetidamente como sea necesario.

En algunas realizaciones, la disminución en la expresión de ARNm de CTGF por un oligonucleótido anti-CTGF comprende la interferencia en la función de la secuencia de ADN de CTGF objetivo (gen CTGF), lo que típicamente da como resultado una replicación y/o transcripción disminuida del ADN del CTGF objetivo. En otras realizaciones, la disminución en la expresión de ARNm de CTGF por un oligonucleótido anti-CTGF comprende la interferencia en la función del ARN de CTGF, lo que típicamente da como resultado un corte y empalme deficiente del ARN de CTGF transcrito (pre-ARNm) para producir especies de ARNm maduras, estabilidad del ARN de CTGF disminuida, translocación del ARNm de CTGF disminuida al sitio de traducción de la proteína y traducción deteriorada de la proteína del ARNm maduro. En otras realizaciones, la disminución en la expresión de ARNm de CTGF por un oligonucleótido anti-CTGF comprende la disminución en el número de ARNm de CTGF celular o el contenido celular de ARNm de CTGF. En algunas realizaciones, la disminución en la expresión de ARNm de CTGF por un oligonucleótido anti-CTGF comprende la regulación por disminución o desactivación de la expresión del gen CTGF. En otras realizaciones, la disminución en la expresión de ARNm de CTGF por un oligonucleótido anti-CTGF comprende la disminución en la expresión de la proteína de CTGF o el contenido de proteína de CTGF celular.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden la administración de una cantidad eficaz de un oligonucleótido anti-CTGF que disminuye la velocidad de transcripción de ARNm de CTGF, el nivel de ARNm de CTGF celular, la velocidad de expresión de CTGF, el nivel de proteína de CTGF celular o el nivel de proteína de CTGF intersticial. En realizaciones adicionales, los métodos de la invención comprenden la administración de una cantidad eficaz de un oligonucleótido anti-CTGF que disminuye la velocidad de transcripción del ARNm de CTGF, el nivel de ARNm de CTGF celular, la velocidad de expresión de CTGF, el nivel de proteína de CTGF celular en por lo menos un 5%, por lo menos un 10%, por lo menos un 15%, por lo menos un 20%, por lo menos un 25%, por lo menos un 30%, por lo menos un 35%, por lo menos un 40%, por lo menos un 45%, por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80% o por lo menos un 90% en comparación con los controles.

Administración y dosificación

Puede administrarse una cantidad eficaz de un agente anti-CTGF o una composición farmacéutica del mismo tantas veces como sea necesario, por ejemplo, una, dos o tres veces al día, cada dos días, una, dos o tres veces a la semana, cada dos semanas, cada tres semanas o mensualmente. El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y la cadencia requeridos para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero no limitado a, la gravedad o extensión de la enfermedad, la vía de administración, tratamientos previos, medicamentos concurrentes, estado funcional, peso, género, raza u origen étnico y/o edad del sujeto. En ciertas realizaciones, los métodos para tratar una ENM presentados en la presente comprenden la administración a un sujeto con necesidad de ello de un agente anti-CTGF en un intervalo de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 10.000 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5.000 mg, de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 2.500 mg, de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 1.000 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1.000 mg, de aproximadamente 0,10 mg a aproximadamente 50 mg o de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 50 mg.

En algunas realizaciones, los métodos para tratar una ENM presentados en la presente comprenden la administración a un sujeto con necesidad de ello por lo menos aproximadamente 0,1 mg, 0,5 mg, 1,0 mg, 2,0 mg, 4 mg, 8 mg, 16 mg, 25 mg, 50 mg., 100 mg, 200 mg, 400 mg, 800 mg, 1.000 mg, 2.000 mg, 3.000 mg, 5.000 mg o 10.000 mg de un agente anti-CTGF. En algunas realizaciones, los métodos para tratar una ENM presentados en la presente comprenden la administración a un sujeto con necesidad de ello de no más de aproximadamente 1 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg. mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 250 mg, 500 mg, 750 mg, 1.000, 2.000, 5.000 mg o 10.000 mg de un agente anti-CTGF.

En realizaciones adicionales, los métodos para tratar una ENM presentados en la presente comprenden la administración a un sujeto con necesidad de ello de un agente anti-CTGF de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 5.000 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg o de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

En algunas realizaciones, se administra una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CTGF en una dosis de entre aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg, de 5 mg/kg a 75 mg/kg, de 10 mg/kg a 50 mg/kg, de 15 mg/kg a 45 mg/kg o de 20 mg/kg a 45 mg/kg. En otras realizaciones, una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CTGF comprende una dosis de aproximadamente 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg o 50 mg/kg. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CTGF se administra sistémicamente, por ejemplo, administración i.v.

En realizaciones adicionales, el tratamiento con un anticuerpo anti-CTGF comprende la administración de una dosis de carga inicial. Como se usa en la presente, el término "dosis de carga" se refiere a una dosis de anticuerpo inicial usada para alcanzar rápidamente un nivel objetivo de anticuerpo deseado, típicamente, un nivel de anticuerpo en estado estable objetivo o un nivel de anticuerpo que se correlaciona con una respuesta farmacológica o clínica deseada. Una dosis de carga puede administrarse como una única inyección o infusión, o alternativamente, la dosis de carga puede administrarse como múltiples inyecciones o infusiones de anticuerpos dentro de un marco temporal de tratamiento inicial, por ejemplo, tres infusiones de 15 mg/kg separadas durante 21 días de un ciclo de tratamiento de 28 días para una infusión total de 45 mg/kg. En realizaciones particulares, la dosis de carga es de por lo menos 15 mg/kg, 20 mg/kg, 22,5 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 55 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 100 mg/kg o 120 mg/kg. En realizaciones específicas, la dosis de carga es de aproximadamente 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 45 mg/kg, 55 mg/kg o 60 mg/kg.

En algunas realizaciones, una cantidad eficaz de un oligonucleótido anti-CTGF comprende una dosis entre aproximadamente 0,01 mg y aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 100 mg, aproximadamente 1,0 mg y aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1,0 mg y aproximadamente 25 mg, o aproximadamente 5 mg y aproximadamente 50 mg.

En realizaciones adicionales, los métodos para tratar una ENM presentados en la presente comprenden la

administración a un sujeto con necesidad de ello de un agente anti-CTGF o una composición farmacéutica del mismo a una dosificación que logre una concentración en plasma o tejido objetivo del agente anti-CTGF. En realizaciones particulares, la dosificación administrada alcanza una concentración en plasma o tejido del agente anti-CTGF que varía de aproximadamente 0,001 µg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml o de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml en un sujeto con una ENM. En otras realizaciones, la administración a un sujeto con necesidad de ello de un anticuerpo anti-CTGF logra una concentración objetivo en plasma o tejido del anticuerpo anti-CTGF de por lo menos aproximadamente 10 µg/ml, por lo menos aproximadamente 50 µg/ml, por lo menos alrededor de 100 µg/ml, por lo menos aproximadamente 200 µg/ml, por lo menos aproximadamente 300 µg/ml o por lo menos aproximadamente 400 µg/ml. En realizaciones adicionales, la administración a un sujeto con necesidad de un anticuerpo anti-CTGF logra una concentración objetivo en plasma o tejido de un intervalo de aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 2.000 µg/ml, de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 1000 µg/ml, o de aproximadamente 20 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml.

En ciertas realizaciones, las dosis posteriores de un agente anti-CTGF pueden ajustarse en consecuencia en base a la concentración en plasma o tejido del agente anti-CTGF conseguida con las dosis anteriores del agente anti-CTGF. En general, la dosificación y la frecuencia de administración de un agente anti-CTGF pueden ajustarse con el tiempo para proporcionar niveles suficientes del agente anti-CTGF para mantener el efecto deseado.

Terapia de combinación

En algunas realizaciones, un agente anti-CTGF para su uso en los métodos para tratar una ENM, por ejemplo, ELA, proporcionados en la presente se administran en combinación con una o más terapias adicionales. Como se usa en la presente, el término "en combinación" se refiere a la administración del agente anti-CTGF antes, junto con o después de la administración de una o más terapias adicionales para su uso en el tratamiento de una ENM o un síntoma de una ENM. El uso del término "en combinación" no restringe el orden en el que el agente anti-CTGF y la una o más terapias adicionales se administran a un sujeto. Las terapias adicionales pueden administrarse por la misma vía o por una vía de administración diferente a la usada para el agente anti-CTGF.

En algunas realizaciones, la terapia adicional administrada en combinación con el agente anti-CTGF es un fármaco o composición farmacéutica que comprende un fármaco. En realizaciones particulares, el agente anti-CTGF se administra en combinación con riluzol. En otras realizaciones, el agente anti-CTGF se administra en combinación con una cantidad eficaz de uno o más fármacos seleccionados del grupo que consiste de amitriptilina; andrografólido; anticonvulsivos; antiespasmódicos (por ejemplo, tizanidina, cloruro de oxibutinina); arimoclomol; atropina; AVP-923; basiliximab; benzodiazepinas (por ejemplo, diazepam, clonazepam); ceftriaxona; celecoxib; glucósidos totales de cistanche; CK-2017357; Coenzima Q10; cobre; corticotropina; creatina; deferiprona; dexpropamipexol; dronabinol; escitalopram; ezogabina; fasudil; fingolimod; acetato de glatiramer; glicopirrolato; GM604; factor estimulante de colonias de granulocitos, hormona del crecimiento (somatropina); GSK1223249; imipramina; toxina A incobotulínica; inosina; factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1; antagonista del receptor de interleucina 1; interleucina-2 (IL-2); relajantes musculares involuntarios (por ejemplo, tartato de tolterodina); ISIS 333611; KNS-760704; levetiracetam; carbonato de litio; MCI-186; mecobalamina; memantina; metilprednisolona; mexiletina; minociclina; MN-166; micofenolato mofetilo; fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE); nortriptilina; NP001; ODM-109; olanzapina; ONO-2506PO; opiáceos; ozanezumab; pimozida; pioglitazona; R(+) pramipexol; prednisona; propantelina; pirimetamina; rasagilina; riluzol; RNS60; SB-509; escopolamina; l-serina; sNNO029; fenilbutirato de sodio; valproato de sodio; tacrolimus; talampanel; tamoxifeno; ácido tauroursodesoxicólico; TCH346; talidomida; tirasemtiv; tocilizumab; tretinoína; TRO19622; relajantes musculares voluntarios (por ejemplo, baclofeno); YAM80; y zinc.

En realizaciones adicionales, el agente anti-CTGF se administra en combinación con otra terapia que incluye radiación infrarroja lejana; estimulación nerviosa fenica; trasplante de células madre o progenitoras, incluyendo células madre neurales derivadas de la médula espinal, mesioangioblastos, células madre adipocitarias, células madre de médula ósea autólogas, células madre mesenquimales de médula ósea o células estromales, células madre hematopoyéticas CD133+ movilizadas en la médula ósea y células progenitoras CD34+ de sangre periférica o sangre de cordón umbilical y células madre pluripotentes inducidas; suplementos dietéticos, por ejemplo, Oxepa, Jevity 1.5, Jevity 1.0, KetoCal o Calogen; terapia génica, por ejemplo, VM202; ejercicio; asistencia ventilatoria (por ejemplo, ventilación con presión positiva intermitente, presión de las vías respiratorias positiva binivel, ventilación con coraza bifásica); terapia ocupacional; y fisioterapia.

En realizaciones específicas, el intervalo de tiempo entre la administración de un agente anti-CTGF y la administración de una o más terapias adicionales puede ser de aproximadamente 0 a 15 minutos, de 0 a 30 minutos, de 30 minutos a 60 minutos, de 1 a 2 horas, de 2 a 6 horas, de 2 a 12 horas, de 12 a 24 horas, de 1 a 2 días, de 2 a 4 días, de 4 a 7 días, de 1 a 2 semanas, de 2 a 4 semanas, de 4 a 12 semanas, de 12 a 24 semanas, o de 24 a 52 semanas. En ciertas realizaciones, un agente anti-CTGF y una o más terapias adicionales se administran con menos de 1 día, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, un mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses o 1 año de diferencia.

En algunas realizaciones, la administración de un agente anti-CTGF en combinación con una o más terapias adicionales tiene un efecto aditivo, mientras que en otras realizaciones la combinación de terapias tiene un efecto sinérgico. En realizaciones específicas, un efecto sinérgico logrado con la terapia de combinación permite el uso de dosificaciones más bajas (por ejemplo, dosis convencionales subóptimas) de la terapia adicional, por ejemplo, riluzol. En otras realizaciones, el efecto sinérgico logrado con la terapia de combinación permite una administración menos frecuente de la terapia adicional a un sujeto. En ciertas realizaciones, la capacidad de utilizar dosificaciones más bajas de una terapia adicional y/o de administrar la terapia adicional con menos frecuencia reduce la toxicidad asociada con la administración de la terapia adicional, sin reducir la eficacia de la terapia adicional. En algunas realizaciones, un efecto sinérgico da como resultado una eficacia mejorada de un anticuerpo anti-CTGF y/o las terapias adicionales en el tratamiento de una ENM.

La combinación de un agente anti-CTGF y una o más terapias adicionales puede administrarse a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Alternativamente, un agente anti-CTGF y una o más terapias adicionales pueden administrarse concurrentemente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. También pueden administrarse un agente anti-CTGF y una o más terapias adicionales a un sujeto por la misma o diferentes vías de administración.

Formulaciones farmacéuticas y vías de administración.

Las composiciones y compuestos adecuados para su uso en los métodos de la presente invención pueden administrarse directamente o en composiciones farmacéuticas que contienen excipientes, como es bien conocido en la técnica. En la técnica se encuentran disponibles varias formulaciones y sistemas de administración de fármacos y dependen en parte de la vía de administración pretendida. (Ver, por ejemplo, Gennaro AR, ed. Remington's Pharmaceutical Sciences, (2000); y Hardman JG, Limbird LE y Gilman LS, eds. The Pharmacological Basis of Therapeutics, (2001))

Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, la administración oral, rectal, tópica, nasal, pulmonar, intestinal y parenteral. Las vías primarias para la administración parenteral incluyen la administración intravenosa, intramuscular y subcutánea. Las vías de administración secundarias incluyen la administración intraperitoneal e intraarterial.

Las formas de dosificación farmacéutica de un compuesto adecuado para su uso en la invención pueden proporcionarse en un sistema de liberación instantánea, liberación controlada, liberación sostenida o de administración de fármaco objetivo. Las formas de dosificación comúnmente usadas incluyen, por ejemplo, soluciones y suspensiones, (micro-) emulsiones, pomadas, geles y parches, liposomas, comprimidos, grageas, cápsulas de cubierta blanda o dura, supositorios, óvulos, implantes, polvos amorfos o cristalinos, aerosoles, y formulaciones liofilizadas. Dependiendo de la vía de administración usada, pueden requerirse dispositivos especiales para la aplicación o administración del fármaco como, por ejemplo, jeringuillas y agujas, inhaladores, bombas, plumas de inyección, aplicadores o matraces especiales. Las formas de dosificación farmacéuticas se componen a menudo del fármaco, un excipiente(s) y un sistema de recipiente/cierre. Pueden añadirse uno o varios excipientes, también denominados ingredientes inactivos, a un compuesto de la invención para mejorar o facilitar la fabricación, estabilidad, administración y seguridad del fármaco, y pueden proporcionar un medio para lograr un perfil de liberación del fármaco deseado. Por tanto, el tipo de excipientes que se añaden al fármaco puede depender de varios factores como, por ejemplo, las propiedades físicas y químicas del fármaco, la vía de administración y el procedimiento de fabricación. Los excipientes farmacéuticamente aceptables están disponibles en la técnica e incluyen los enumerados en varias farmacopeas. (Ver, por ejemplo, USP, JP, EP y BP), Inactive Ingredient Guide disponible a través del sitio web de la FDA, y Handbook of Pharmaceutical Additives, ed. Ash; Synapse Information Resources, Inc. (2002)).

Las formas de dosificación farmacéuticas de un compuesto para su uso en la presente invención pueden fabricarse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica como, por ejemplo, mediante procesos de mezclado, tamizado, disolución, fusión, granulación, preparación de grageas, formación de comprimidos, suspensión, extrusión, secado por pulverización, levigación, emulsión, (nano/micro) encapsulación, atrapamiento o liofilización. Como se ha indicado anteriormente, las composiciones para usar en la presente invención pueden incluir uno o más ingredientes inactivos fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de moléculas activas en preparaciones para uso farmacéutico.

La formulación apropiada depende de la vía de administración deseada. Para inyección intravenosa, por ejemplo, la composición puede formularse en solución acuosa, si es necesario, usando tampones fisiológicamente compatibles, que incluyen, por ejemplo, fosfato, histidina o citrato para ajustar el pH de la formulación, y un agente de tonicidad como, por ejemplo, cloruro de sodio o dextrosa. Para la administración nasal o transmucosa, pueden preferirse formulaciones líquidas, semisólidas, o parches, que posiblemente contengan potenciadores de la penetración. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica. Para la administración oral, los compuestos pueden formularse en formas de dosificación líquidas o sólidas y como formulaciones de liberación instantánea o controlada/sostenida. Las formas de dosificación adecuadas para la ingestión oral por un sujeto

incluyen comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas de cubierta dura y blanda, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones, y emulsiones.

Pueden obtener formas sólidas de dosificación oral usando excipientes, que pueden incluir, rellenos, disgregantes, aglutinantes (secos y húmedos), retardantes de disolución, lubricantes, deslizantes, antiadherentes, resinas de intercambio catiónico, agentes humectantes, antioxidantes, conservantes, colorantes y aromatizantes. Estos excipientes pueden ser de origen sintético o natural. Ejemplos de tales excipientes incluyen derivados de celulosa, ácido cítrico, fosfato dicálcico, gelatina, carbonato de magnesio, lauril sulfato de magnesio/sodio, manitol, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, silicatos, dióxido de silicio, benzoato de sodio, sorbitol, almidones, ácido esteárico o una sal del mismo, azúcares (es decir, dextrosa, sacarosa, lactosa, etc.), talco, mucílago de tragacanto, aceites vegetales (hidrogenados) y ceras. El etanol y el agua pueden servir como auxiliares de granulación. En ciertos casos, es deseable el recubrimiento de comprimidos con, por ejemplo, una película que enmascara el sabor, una película resistente al ácido del estómago o una película retardante de la liberación. Se usan a menudo polímeros naturales y sintéticos, en combinación con colorantes, azúcares y solventes orgánicos o agua, para recubrir comprimidos, lo que da como resultado grageas. Cuando se prefiere una cápsula a una tableta, el fármaco en polvo, suspensión o solución del mismo puede administrarse en una cápsula de cubierta dura o blanda compatible.

Las composiciones formuladas para administración parenteral mediante inyección son habitualmente estériles y pueden presentarse en formas de dosificación unitarias, por ejemplo, en ampollas, jeringuillas, plumas de inyección o en recipientes multidosis, estos últimos conteniendo habitualmente un conservante. Las composiciones pueden adoptar formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación como tampones, agentes de tonicidad, agentes potenciadores de la viscosidad, surfactantes, agentes de suspensión y de dispersión, antioxidantes, polímeros biocompatibles, agentes quelantes y conservantes. Dependiendo del sitio de inyección, el vehículo puede contener agua, un aceite sintético o vegetal y/o cosolventes orgánicos. En ciertos casos, como con un producto liofilizado o un concentrado, la formulación original se reconstituiría o diluiría antes de la administración. Las formulaciones de depósito, que proporcionan una liberación controlada o sostenida de un compuesto de la invención, pueden incluir suspensiones inyectables de nano/micropartículas o nano/micro cristales o cristales no micronizados. Polímeros como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), o copolímeros de los mismos, pueden servir como matrices de liberación controlada/sostenida, además de otros bien conocidos en la técnica. Pueden presentarse otros sistemas de administración de depósito en forma de implantes y bombas que requieren incisión.

Los portadores adecuados para inyección intravenosa de las moléculas de la invención son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones a base de agua que contienen una base como, por ejemplo, hidróxido de sodio, para formar un compuesto ionizado, sacarosa o cloruro de sodio como agente de tonicidad, por ejemplo, el tampón contiene fosfato o histidina. Pueden añadirse cosolventes como, por ejemplo, polietilenglicoles. Estos sistemas a base de agua son eficaces para disolver los compuestos de la invención y producen baja toxicidad tras la administración sistémica. Las proporciones de los componentes de un sistema de solución pueden variarse considerablemente, sin destruir las características de solubilidad y toxicidad. Además, puede variarse la identidad de los componentes. Por ejemplo, pueden usarse surfactantes de baja toxicidad, como polisorbatos o poloxámeros, así como pueden añadirse polietilenglicol u otros cosolventes, polímeros biocompatibles como polivinilpirrolidona, y otros azúcares y polioles pueden sustituirse por dextrosa.

Las formulaciones de anticuerpos anti-CTGF para su uso de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mezclando un anticuerpo anti-CTGF con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no sean tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Las formulaciones de anticuerpos anti-CTGF pueden incluir tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); portadores; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales como sodio; complejos metálicos; y/o surfactantes no iónicos o polietilenglicol.

En particular, las formulaciones de anticuerpos anti-CTGF pueden comprender además polipéptidos de bajo peso molecular; portadores como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; y aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina. Las formulaciones de anticuerpos anti-CTGF pueden liofilizarse como se describe en el PCT/US1996/012251. Además, también pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Con frecuencia, polímeros como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) o copolímeros de los mismos sirven como matrices de liberación controlada/sostenida, además de otros bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos anti-CTGF pueden suministrarse o administrarse a cualquier concentración deseada. En algunas realizaciones, la concentración de anticuerpos anti-CTGF es de por lo menos 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml o 200 mg/ml. En otras realizaciones, la

concentración de anticuerpo anti-CTGF no es de más de aproximadamente 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml o 300 mg/ml. En realizaciones adicionales, la concentración de anticuerpos anti-CTGF está entre 5 mg/ml y 20 mg/ml, 20 mg/ml y 50 mg/ml, 50 mg/ml y 100 mg/ml, 100 mg/ml y 200 mg/ml, o 200 mg/ml y 300 mg/ml.

Artículos de fabricación

Las presentes composiciones pueden, si se desea, presentarse en un paquete o dispositivo dispensador que contiene una o más formas de dosificación unitarias que contienen un agente anti-CTGF. Dicho paquete o dispositivo puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tapones de vidrio y goma, viales o jeringuillas. El recipiente que contiene una composición de agente anti-CTGF que es eficaz para tratar una ENM y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). El artículo de fabricación puede comprender además un recipiente adicional que comprende un tampón diluyente farmacéuticamente aceptable como agua bacteriostática para inyección (BFWI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y/o solución de dextrosa. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial o del usuario incluyendo, por ejemplo, filtros o agujas.

Las composiciones que comprenden un agente anti-CTGF formulado en un portador farmacéutico compatible pueden proporcionarse en un recipiente apropiado etiquetado para el tratamiento de una ENM. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones de administración que proporcionan una guía específica con respecto a la dosificación del agente anti-CTGF, incluyendo una descripción del tipo de pacientes que pueden ser tratados (por ejemplo, una persona con ELA), el programa (por ejemplo, dosis y frecuencia) y vía de administración, y similares.

Estas y otras realizaciones de la presente invención se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la técnica a la vista de la divulgación en la presente.

EJEMPLOS

La invención se comprenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que se pretende que sean puramente ejemplares de la invención. Estos ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la invención reivindicada. El alcance de la presente invención no está limitado por las realizaciones ejemplificadas, que se pretende que sean ilustraciones de aspectos individuales de la invención solamente. Cualquier método que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de la divulgación. Varias modificaciones de la invención además de las descritas en la presente resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras acompañantes.

La cepa de ratón transgénico más ampliamente usada para modelar ELA es el ratón SOD1, que expresa un transgén SOD1 humano con un cambio causante de glicina a alanina en el residuo 93 (mutación G93A) (Gurney ME, et al., Science 264:1772- 1775 (1994)). Este modelo de ratón tiene una aparición de debilidad de las extremidades traseras aproximadamente a los 90 días, acompañado de cambios degenerativos en las neuronas motoras que se comparan bien con la patología de ELA humana (Synofzik M et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry 81:764-767 (2010)). Los ratones transgénicos, además, no aumentan de peso en comparación con los ratones de tipo salvaje. La morbilidad se desarrolla alrededor de ~120 días y la muerte alrededor de 125-127 días, dependiendo de los antecedentes genéticos.

Ejemplo 1: La inhibición de CTGF mejora la pérdida de peso en un modelo animal de ELA

Para estudiar los efectos de la inhibición de CTGF en un modelo animal de ELA, se administró intraperitonealmente a ratones macho hSOD1^{G93A} de 8 semanas de edad, o IgG humana no específica (hulgG, FibroGen, Inc., San Francisco, California) o anticuerpo de IgG monoclonal humano que se une específicamente a CTGF (FG-3019, FibroGen, Inc.). Los anticuerpos se administraron a 25 mg/kg, tres veces por semana durante 2 meses. Los ratones B6.SJL (de tipo salvaje) sirvieron como control. Los ratones se pesaron semanalmente a partir de las 10 semanas de edad (FIG. 1).

Durante el período de estudio de siete semanas, los ratones de tipo salvaje aumentaron su peso corporal en un 36,5%. Por el contrario, el peso corporal de los ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG se mantuvo esencialmente sin cambios en -2,8% al final del período de estudio. Sorprendentemente, el tratamiento de ratones hSOD1^{G93A} con FG-3019 provocó un aumento significativo en el peso corporal, mostrando los ratones tratados con FG-3019 un aumento del 11,3% en el peso corporal en comparación con los ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG al final del estudio. Este experimento demuestra la capacidad de un agente anti-CTGF para mejorar un síntoma clínico de la ELA, la pérdida de peso asociada con la progresión de ELA.

Ejemplo 2: La inhibición de CTGF reduce la expresión de fibronectina

Los ratones del Ejemplo 1 se sacrificaron al final del período de tratamiento de 2 meses y se recogieron muestras de los músculos gastrocnemio y tibial anterior (Morales MG et al. Hum. Mol. Genet. 22:4938-4951 (2013)). Para probar la capacidad de FG-3019 para reducir la producción de componentes de la matriz extracelular (ECM) y, por tanto, el desarrollo de fibrosis muscular, se analizó la presencia de fibronectina mediante análisis de inmunotransferencia. Además, las muestras se examinaron para determinar la expresión de Smad3 y GAPDH. Brevemente, los músculos se homogeneizaron en 10 volúmenes de tampón Tris-EDTA con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM. La concentración de proteína total se determinó para alícuotas de extractos musculares usando un kit de ensayo de proteína de ácido bicineónico (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), con albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Se sometieron alícuotas (60 µg) a electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio (SDS) en geles de poliacrilamida al 9%, transferidas electroforéticamente a membranas de PVDF (Schleicher & Schuell Bioscience, Inc., Keene, NH) y se sondaron secuencialmente con anticuerpos específicos contra CTGF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), fibronectina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), colágeno III (Rockland, USA), Smad-3 total (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA) y GAPDH (EMD Millipore, Billerica, MA). Todas las inmunorreacciones se visualizaron mediante quimioluminiscencia mejorada (ThermoFisher Scientific). El análisis densitométrico y la cuantificación se realizaron usando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).

Las muestras de músculo de ratones de tipo salvaje muestran una expresión mínima de fibronectina, FIGS. 2A y 2B. Por el contrario, el nivel de fibronectina (FN) fue aproximadamente 2,7 veces mayor en ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG en comparación con los ratones de tipo salvaje. El tratamiento con FG-3019 redujo significativamente el nivel de fibronectina en el tejido muscular de ratones hSOD1^{G93A} a aproximadamente 1,8 veces más que el observado en ratones de tipo salvaje, $p < 0,005$, $n = 6$.

Los ratones de tipo salvaje mostraron expresión nominal de Smad3, un mediador de la vía de señalización de TGF-β. FIGS. 2A y 2C. Por otro lado, la expresión de Smad3 fue notablemente elevada en ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG, aproximadamente 6 veces mayor que el control. La expresión de Smad3 en ratones hSOD1^{G93A} tratados con FG-3019 fue aproximadamente 4,9 veces mayor que la del control. La diferencia en la expresión de Smad3 entre ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG y FG-3019 no fue estadísticamente significativa.

Estos resultados demuestran que la inhibición de la actividad de CTGF reduce la expresión del constituyente de ECM, fibronectina, en el músculo esquelético obtenido de un modelo animal de ELA. La expresión aumentada de ECM se produce durante el desarrollo de fibrosis del músculo esquelético a medida que el músculo dañado y necrótico es reemplazado por ECM. Estos resultados demuestran que los agentes y métodos de la invención son eficaces para reducir el depósito de ECM y, por tanto, la fibrosis muscular en un modelo de ELA. La reducción de esta condición patológica observada en el tejido muscular de un modelo de ELA sugiere que los agentes anti-CTGF serían eficaces para tratar ELA y otras ENM.

Ejemplo 3: La inhibición de CTGF reduce el depósito de EMC

Se obtuvieron muestras de músculo gastrocnemio de ratones en el Ejemplo 1 al final del período de tratamiento y se congelaron rápidamente en isopentano. Las muestras crioecionadas (7 mm) se fijaron en paraformaldehído al 4%, se bloquearon durante 1 h en BSA al 5% en PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos específicos contra fibronectina (Sigma-Aldrich), colágeno-I (EMD Millipore), laminina (Sigma-Aldrich) y fosfo-Smad3 (Cell Signaling Technologies). Como anticuerpo secundario, se usaron IgG anti-conejo de cabra conjugada con Alexa e IgG anti-ratón de conejo (ThermoFisher Scientific). Para los anticuerpos monoclonales anti-ratón, todas las incubaciones se realizaron con solución de bloqueo de IgG de ratón de un kit de ratón sobre ratón (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluido en Triton X-100/PBS al 0,01%. Para tinción nuclear, las secciones se incubaron con 1 mg/ml de Hoechst 33258 en PBS durante 10 min. Para la tinción total de colágeno, las secciones se incubaron en rojo Sirius al 1% en ácido pícrico. Después del enjuague, los cubreobjetos se montaron y se observaron en un microscopio invertido equipado para epifluorescencia.

El análisis de los portaobjetos demostró que los ratones hSOD1^{G93A} tratados con FG-3019 tenían un depósito reducido de fibronectina, colágeno-1 y colágeno total en comparación con los ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG. Estos resultados muestran que la inhibición de la actividad de CTGF reduce el depósito de ECM y, por tanto, reduce la fibrosis muscular en un modelo de ELA. La reducción de la fibrosis muscular sugiere que los agentes anti-CTGF serían eficaces para tratar la ELA y otras ENM.

Ejemplo 4: La inhibición de CTGF reduce la atrofia muscular

Se analizaron portaobjetos de histología de músculo gastrocnemio preparados en el Ejemplo 3 que se tiñeron con un anticuerpo anti-laminina y Hoechst 33258 para determinar el diámetro de Feret de las fibras musculares individuales. Se analizaron cinco imágenes capturadas aleatoriamente usando el software Image J. Las fibras musculares individuales se seleccionaron manualmente y el software calculó el diámetro mínimo de Feret de cada fibra (Morales MG et al. 2013, supra).

Las fibras musculares de los ratones hSOD1^{G93A} tratados con FG-3019 tenían diámetros de Feret más grandes que los ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulG (FIG. 3). Los resultados demuestran que la inhibición de CTGF reduce el desarrollo de atrofia muscular, como lo evidencia la prevalencia de fibras musculares de mayor diámetro en los ratones hSOD1^{G93A} tratados con FG-3019. Estos resultados sugieren que los ratones hSOD1^{G93A} tratados con FG-3019 tendrán una fuerza muscular aumentada en comparación con los ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulG. Además, los resultados sugieren que el tratamiento con un agente anti-CTGF conservará la fuerza muscular o reducirá la velocidad a la que un sujeto que padece ELA u otras ENM pierde fuerza.

Ejemplo 5: La inhibición de CTGF conserva la fuerza muscular

Se obtuvieron muestras de los músculos diafragma, gastrocnemio y tibial anterior de ratones en el Ejemplo 1 al final del período de tratamiento. Se midió la fuerza isométrica de los músculos aislados como se ha descrito anteriormente (Morales MG et al. (2013); Acuña MJ, et al. Hum Mol Genet 23 (5): 1237-1249 (2014); Cabrera D et al. Skelet. Muscle 4(6) (2014)). Brevemente, la longitud óptima del músculo (Lo) y el voltaje de estimulación se determinaron a partir de la micromanipulación de la longitud del músculo para producir una fuerza de contracción isométrica máxima. La fuerza tetánica isométrica máxima (Po) se determinó a partir de la meseta de la relación frecuencia-fuerza después de sucesivas estimulaciones a 1-200 Hz durante 450 ms, con 2 min de descanso entre los estímulos. Después de medir las propiedades contráctiles isométricas, los músculos se sometieron a un protocolo de estimulación tetánica que se realizó tres veces. Los músculos en Lo se estimularon al máximo durante 450 ms una vez cada 5 s. Después de la prueba funcional, los músculos se retiraron del baño, se cortaron los tendones y cualquier tejido no muscular adherido, se transfirieron una vez en un papel de filtro y se pesaron. Se usaron la masa muscular y Lo para calcular la fuerza neta específica (fuerza normalizada por área de sección transversal de fibra muscular total, mN/mm²).

En comparación con el músculo esquelético de ratones de tipo salvaje (no mostrado), el músculo esquelético obtenido de ratones hSOD1^{G93A} a los que se les administró hulG mostró una reducción en la fuerza tetánica isométrica máxima. Se esperaba esta reducción en la función muscular y refleja lo que se observa en sujetos humanos con ELA y otras ENM. El tratamiento con FG-3019 aumentó la fuerza tetánica isométrica máxima del músculo de ratones hSOD1^{G93A} (FIGS. 4A y 4B). Estos resultados indican que la debilidad muscular se reduce mediante la inhibición de CTGF en un modelo animal de ELA. Estos resultados sugieren además que el uso de un agente anti-CTGF proporcionaría un tratamiento eficaz para la ELA y otras ENM.

Curiosamente, los pesos musculares obtenidos de ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulG o FG-3019 no fueron significativamente diferentes (FIGS. 5A y 5B).

Ejemplo 6: La inhibición de CTGF reduce la desmielinización de los nervios

Se obtuvieron muestras de los nervios ciáticos de los ratones del Ejemplo 1 al final del período de tratamiento. Las secciones se tiñeron con azul de toluidina y luego se examinaron microscópicamente para determinar la fracción de axones que se habían desmielinizado. Las imágenes representativas se muestran en las Figuras 6A-C. Las imágenes son 100X y la barra de escala es 10 μ m. Los asteriscos blancos muestran axones desmielinizados. La Figura 6D muestra la fracción de axones desmielinizados. Aproximadamente 0,01 de los axones totales se desmielinizaron en ratones de tipo salvaje en comparación con aproximadamente 0,08 de los axones totales en ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulG. El tratamiento con FG-3019 redujo significativamente la fracción de axones desmielinizados en ratones hSOD1^{G93A} hasta aproximadamente el 0,06 de los axones totales. Los datos son la media $\pm$ SEM y se derivaron de 3 campos por animal, n = 3 para todos los grupos. La significancia fue **p<0,01 y se calculó usando ANOVA de una vía. Los resultados demuestran que el tratamiento con un agente anti-CTGF reduce la desmielinización de axones en un modelo de ELA. Como la desmielinización está relacionada con la pérdida de axones y la denervación de los músculos, los resultados sugieren que el tratamiento con un agente anti-CTGF reducirá la denervación de los músculos, reduciendo de este modo la atrofia muscular, el daño muscular y la fibrosis muscular en sujetos con ELA y otras ENM.

Ejemplo 6: La inhibición de CTGF reduce la denervación muscular

Se obtuvieron muestras de músculo de diafragma de los ratones del Ejemplo 1 al final del período de tratamiento. Las muestras de músculo se seccionaron y luego se tiñeron con anticuerpos contra neurofilamento-H (Sigma Aldrich), vesícula sináptica-2 (Development Studies Hybridoma Bank, University of Iowa) y α -bungarotoxina (Invitrogen, Waltham, MA). Se examinaron las uniones neuromusculares del diafragma para determinar el grado de inervación con tres campos examinados por animal, tipo salvaje, n = 1; ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulG, n = 3; y hSOD1^{G93A} tratados con FG-3019, n = 3. Las figuras 7A-C muestran campos representativos de uniones neuromusculares con flechas que muestran placas terminales inervadas y asteriscos que muestran placas terminales desnervadas. Barra de escala, 50 μ m. La Figura 7D muestra el porcentaje de placas terminales inervadas para cada grupo. Tipo salvaje (n=1), hSOD1^{G93A} + hulG (n=3) y hSOD1^{G93A} + FG-3019 (n=3). Se examinaron tres campos por animal y los datos se muestran como media $\pm$ SEM. Estos resultados demuestran que el tratamiento con

un agente anti-CTGF reduce la denervación muscular en un modelo de ELA. Como la denervación muscular está relacionada causalmente con el desarrollo de atrofia muscular, daño muscular, el depósito de constituyentes de la matriz ECM y el desarrollo de fibrosis muscular, los resultados sugieren además que el tratamiento con un agente anti-CTGF puede reducir el desarrollo de estas condiciones patológicas observadas en ELA y otras ENM.

Ejemplo 7: La inhibición de CTGF retrasa la progresión de la enfermedad

Se probaron ratones de tipo salvaje y hSOD1^{G93A} del Ejemplo 1 en una prueba de suspensión de dos extremidades durante el transcurso de tres semanas comenzando a la edad de 13 semanas. Los ratones fueron cronometrados por su capacidad para agarrar un hilo de alambre durante un período de prueba de 180 segundos. El cronometraje comenzó cuando un ratón agarró el cable con ambas patas y el tiempo se detuvo cuando el ratón soltó el hilo del cable y cayó al suelo. Cada ratón se probó tres veces usándose el tiempo de suspensión más largo para cada ratón en el análisis. Todos los ratones de tipo salvaje, n=8, pudieron agarrar el cable durante todo el período de tiempo de 180 segundos, FIG 8. Por el contrario, los ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG tenían un tiempo de suspensión medio de 69,6 ± 29,0 segundos a las 13 semanas de edad, n=5. El tiempo de suspensión disminuyó en la semana 15 a un tiempo de suspensión medio de 24,4 ± 5,4 segundos. Los ratones hSOD1^{G93A} tratados con FG-3019 tuvieron un tiempo de suspensión medio de 93,4 ± 18,8 segundos a las 13 semanas, n=7. En la semana 15, el tiempo de suspensión disminuyó a 44,0 ± 8,4 segundos. Los resultados de la prueba de suspensión demuestran que el tratamiento con un agente anti-CTGF mantiene la fuerza muscular y reduce la velocidad a la que se pierde la fuerza en un modelo de ELA, lo que sugiere que el tratamiento con un agente anti-CTGF puede conservar la fuerza muscular en la ELA y otras ENM.

Ejemplo 8: La inhibición de CTGF reduce la pérdida de actividad locomotora

Los ratones del Ejemplo 1 se probaron semanalmente durante el curso de los tratamientos respectivos para la actividad locomotora usando una prueba de campo abierto (Gerber YN, et al. Front Cell Neurosci. 7:280 (2013)). Los animales se colocaron en un recinto vacío (40 × 40 cm) y para evitar el sesgo de comportamiento debido al estrés, los ratones se aclimataron primero durante 2 minutos antes de grabar en vídeo su comportamiento y movimientos durante 10 minutos. Los videos se analizaron usando el software ANY-maze® (Stoelting CO, USA) para medir la distancia total recorrida. En la semana 17, los ratones de tipo salvaje recorrieron aproximadamente 20,5 m con una velocidad media de aproximadamente 0,034 m/s. Ver las Figuras 9A y 9B. Por el contrario, los ratones hSOD1^{G93A} tratados con hulgG recorrieron una media de 6,6 m a una velocidad media de aproximadamente 0,012 m/s en una prueba de campo abierto. El tratamiento con FG-3019 mejoró la distancia media recorrida de los ratones hSOD1^{G93A} a aproximadamente 12,2 m y aumentó la velocidad media a 0,020 m/s. N = 3. Los resultados de la prueba de campo abierto demuestran que la inhibición de CTGF reduce la tasa de pérdida de actividad locomotora en un modelo de ELA. Estos resultados sugieren que el uso de un agente anti-CTGF puede aumentar el período de vida independiente y la movilidad en sujetos con ELA u otras ENM al disminuir la tasa a la que se desarrolla la debilidad muscular.

En resumen, los resultados descritos anteriormente demostraron que los métodos y agentes de la invención eran eficaces para mantener el peso corporal y reducir las características distintivas de la fibrosis muscular, es decir, la expresión patológica y el depósito de componentes ECM (fibronectina, colágeno I y colágeno total) en un modelo animal de ELA. Además, estos resultados muestran que los métodos y agentes de la invención fueron eficaces para reducir la fibrosis muscular y el daño muscular, a la vez que conservaban la fuerza muscular y la actividad locomotora. Estos descubrimientos predicen que la inhibición de CTGF, usando los métodos y agentes de la invención, proporcionará un tratamiento eficaz para la ELA y otras ENM.

Varias modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior.

REIVINDICACIONES

1. Un agente anti-factor de crecimiento conectivo (CTGF) para su uso en un método para:

- a) tratar una enfermedad de las neuronas motoras;
- b) prevenir el desarrollo o reducir la tasa de progresión de una enfermedad de las neuronas motoras;
- c) prevenir o reducir un síntoma clínico de una enfermedad de las neuronas motoras; o
- d) mejorar la función muscular, o prevenir o reducir el daño muscular en un sujeto con una enfermedad de las neuronas motoras.

2. El agente anti-CTGF para el uso de la reivindicación 1, en donde el agente anti-CTGF se selecciona del grupo que consiste de anticuerpos anti-CTGF, fragmentos de anticuerpos anti-CTGF, miméticos de anticuerpos anti-CTGF y oligonucleótidos anti-CTGF.

3. El agente anti-CTGF para el uso de la reivindicación 2, en donde el agente anti-CTGF es un anticuerpo anti-CTGF.

4. El agente anti-CTGF para el uso de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo anti-CTGF: a) es un anticuerpo humano o humanizado; b) tiene la misma secuencia de aminoácidos que el anticuerpo producido por la línea celular identificada por el N° de registro de la ATCC PTA-6006; o c) se une a CTGF competitivamente con un anticuerpo producido por la línea celular identificada por el N° de registro de la ATCC PTA-6006.

5. El agente anti-CTGF para el uso de la reivindicación 3, en donde la cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CTGF es por lo menos 10 mg/kg.

6. El agente anti-CTGF para el uso de la reivindicación 2, en donde el oligonucleótido anti-CTGF se selecciona del grupo que consiste de oligonucleótidos antisentido, ARNip, ARNmi y ARNhc.

7. El agente anti-CTGF para el uso de la reivindicación 1, en donde el método comprende además la administración de riluzol.

8. El agente anti-CTGF para el uso de la reivindicación 1, en donde la enfermedad de las neuronas motoras se selecciona del grupo que consiste de esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, atrofia muscular espinal, parálisis bulbar progresiva, parálisis pseudobulbar, atrofia muscular espinal-bulbar, paraplejía espástica hereditaria y síndrome pospoliomielítico.

9. El agente anti-CTGF para el uso de la reivindicación 8, en donde la enfermedad de las neuronas motoras es esclerosis lateral amiotrófica.

10. El agente anti-CTGF para el uso de la reivindicación 1, en donde el agente anti-CTGF es para su uso en un método para prevenir o reducir un síntoma clínico de una enfermedad de las neuronas motoras, y en donde el síntoma clínico de la enfermedad de las neuronas motoras se selecciona del grupo que consiste de disfagia, disartria, pérdida de peso, debilidad muscular, fatiga muscular, espasticidad muscular, hiperreflexia y contracturas, fasciculaciones o dolor articulares o musculares.

11. El agente anti-CTGF para el uso de la reivindicación 1, en donde el agente anti-CTGF es para su uso en un método para prevenir o reducir el daño muscular en un sujeto con una enfermedad de las neuronas motoras, y en donde el daño muscular es daño muscular esquelético.

12. El anticuerpo anti-CTGF para el uso de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo anti-CTGF está en una composición farmacéutica.

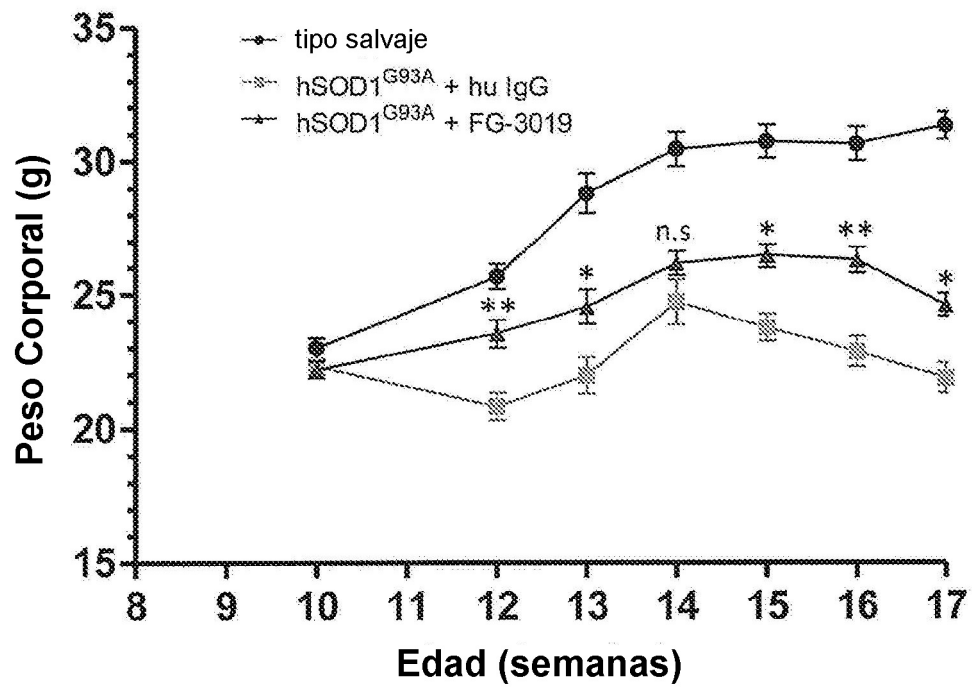


FIG. 1

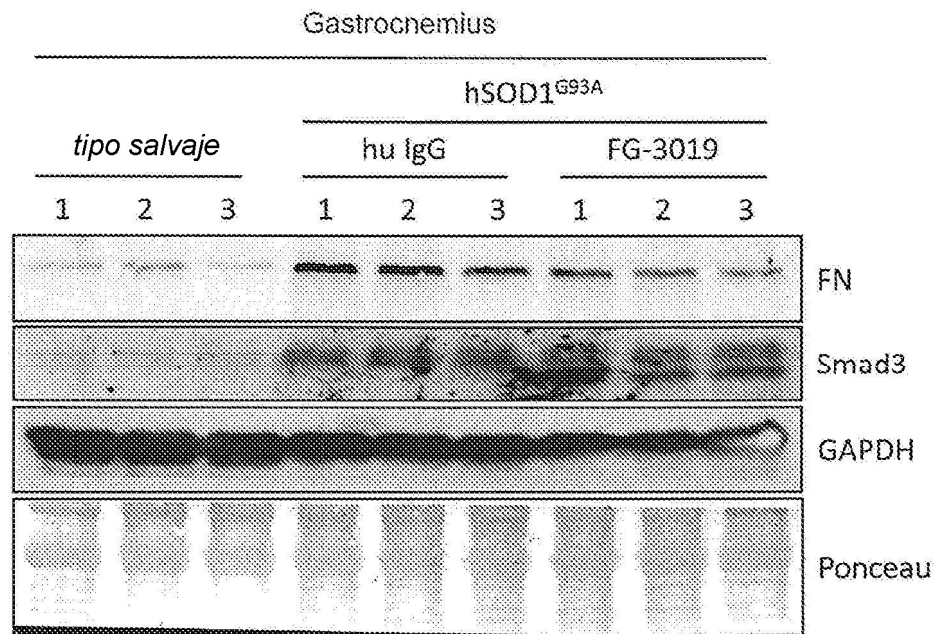


FIG. 2A

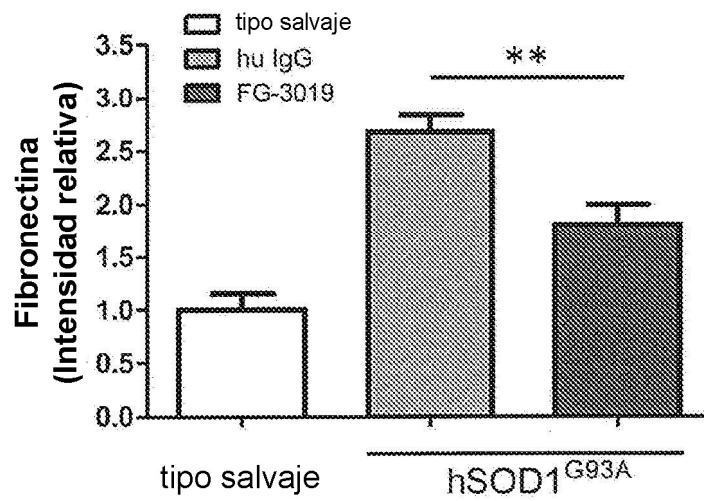


FIG. 2B

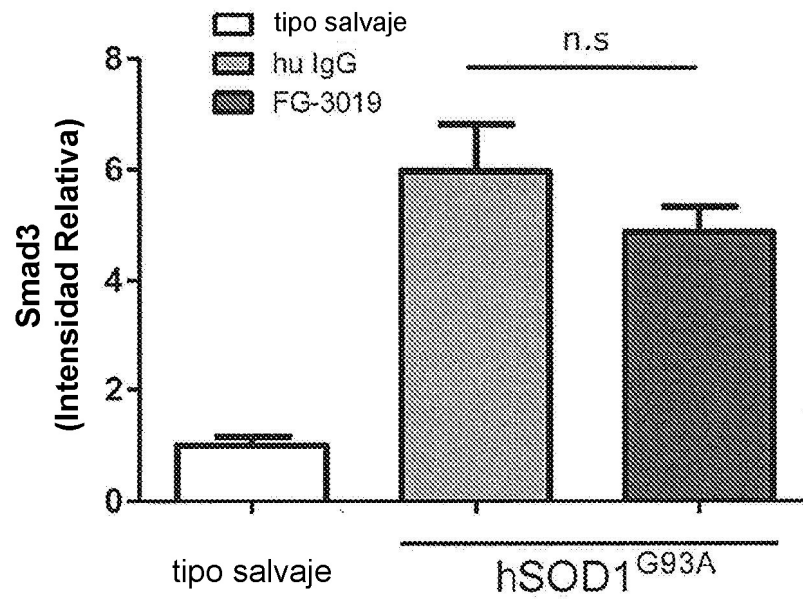


FIG. 2C

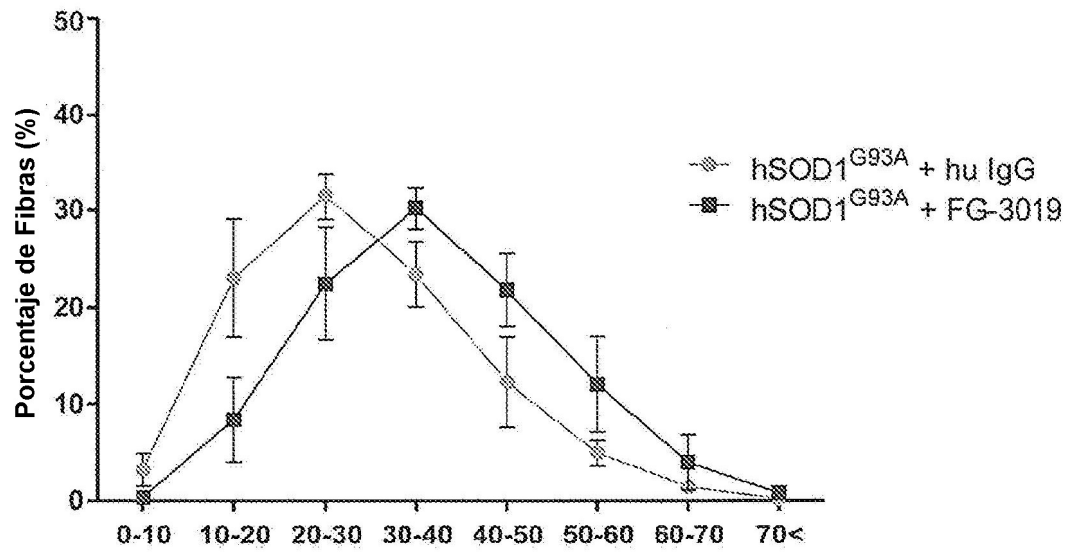


FIG. 3

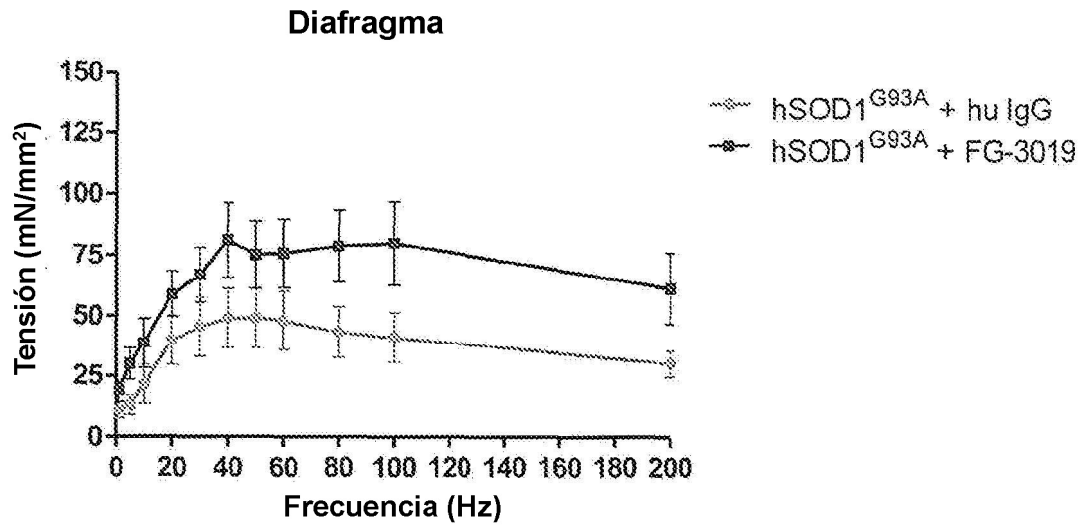


FIG. 4A

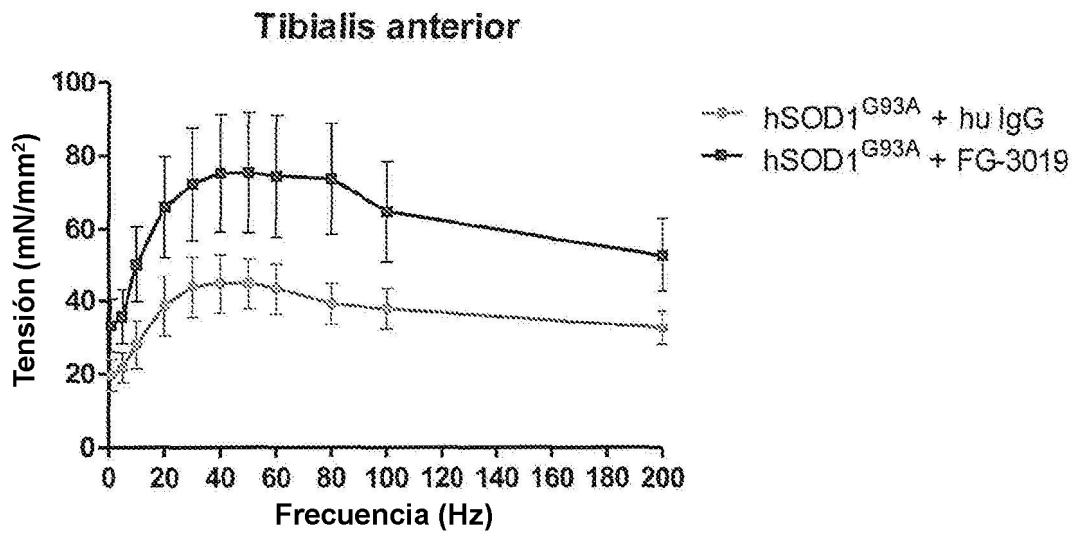


FIG. 4B

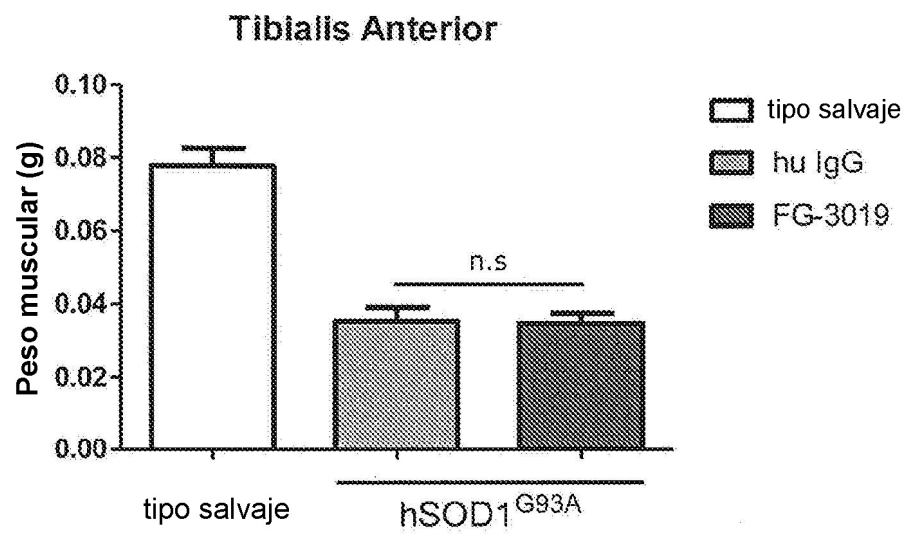


FIG. 5A

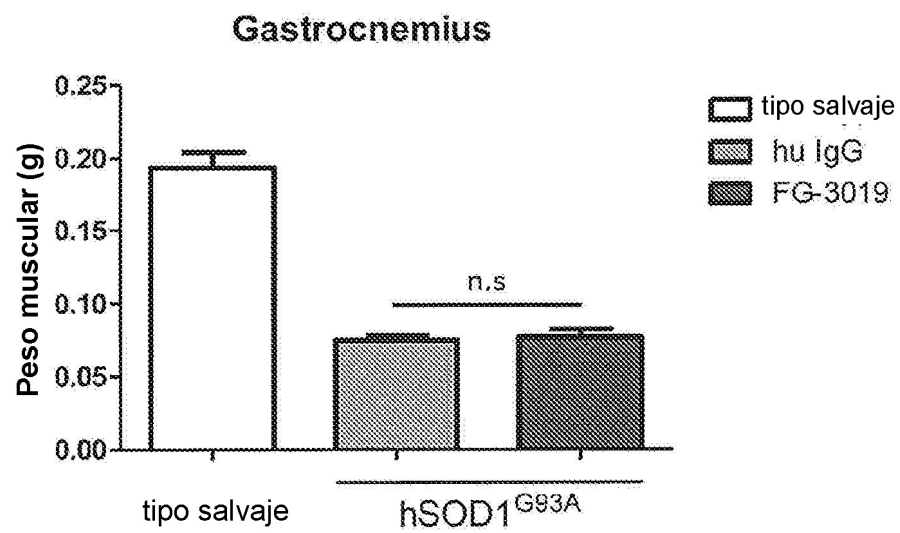
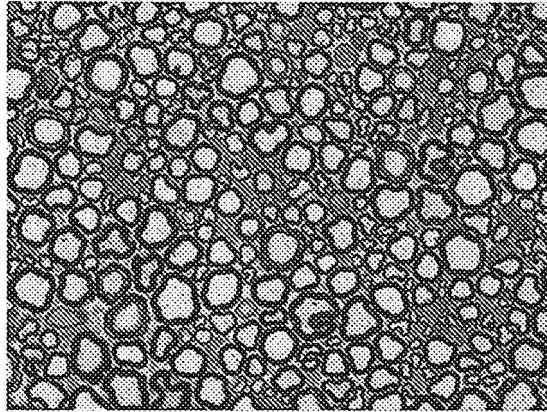
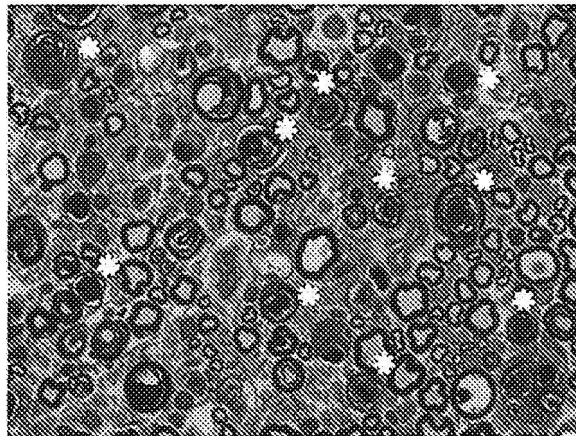


FIG. 5B



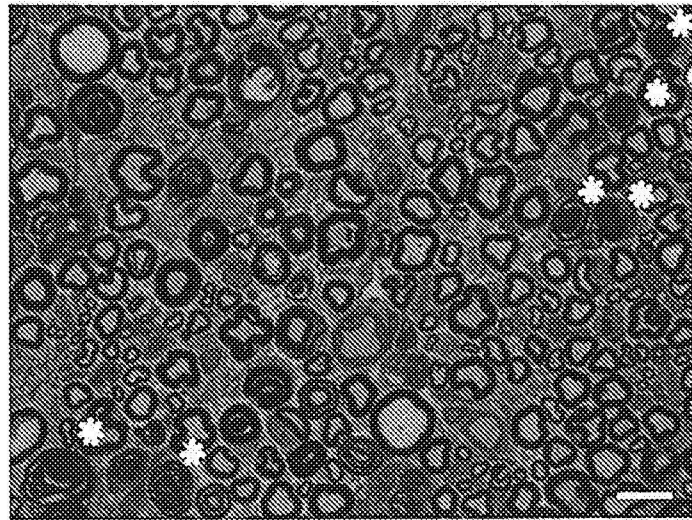
tipo salvaje

FIG. 6A



hSOD1^{G93A} + hIgG

FIG. 6B

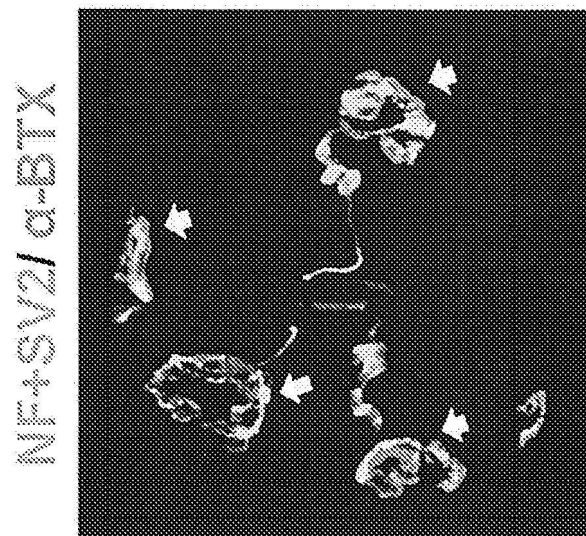


hSOD1^{G93A} + FG-3019

FIG. 6C

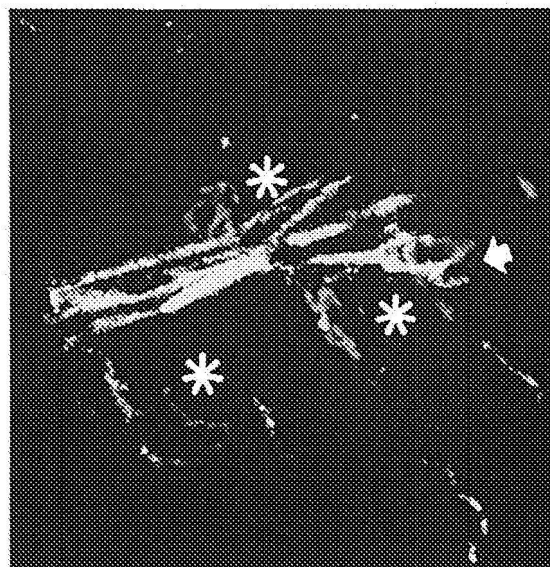


FIG. 6D



tipo salvaje

FIG. 7A



hSOD1^{G93A} + hIgG

FIG. 7B



hSOD1^{G93A} + FG-3019

FIG. 7C

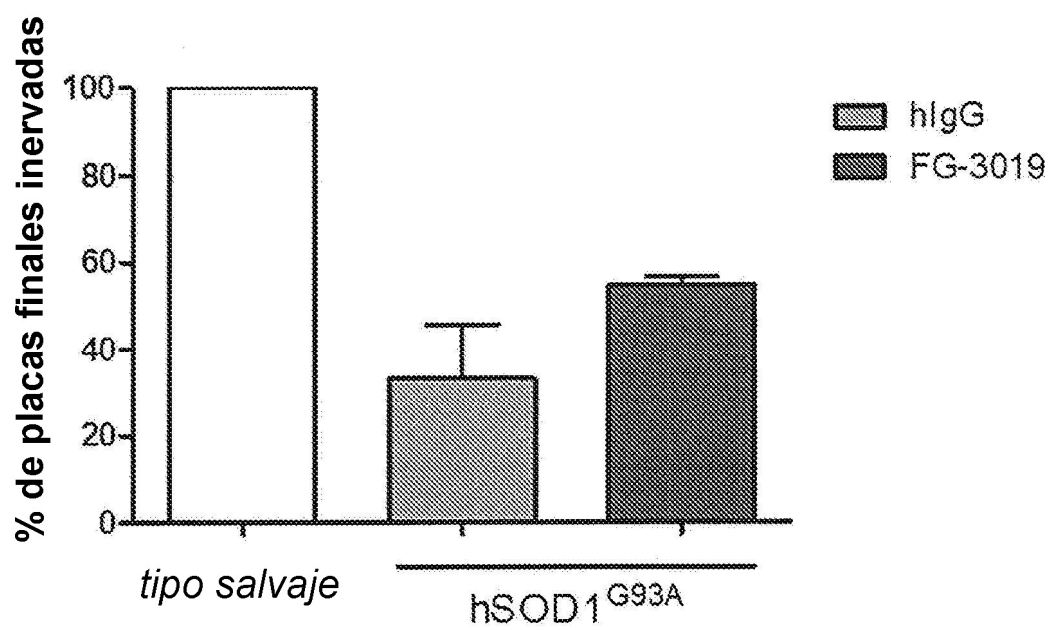


FIG. 7D

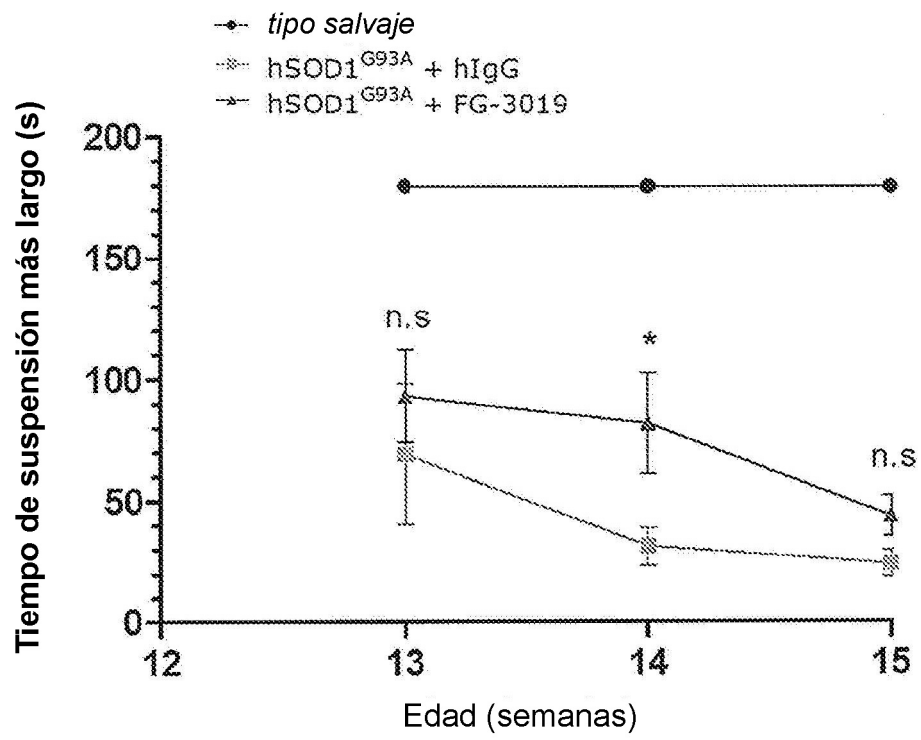


FIG. 8

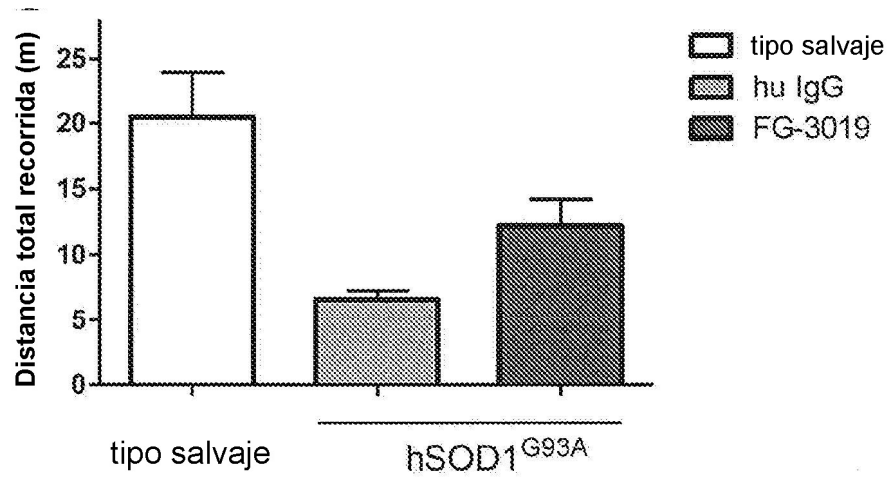


FIG. 9A

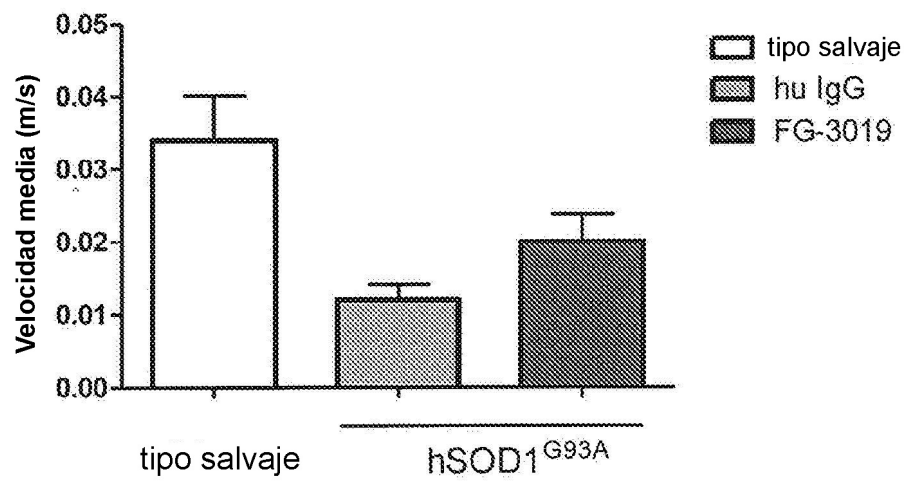


FIG. 9B