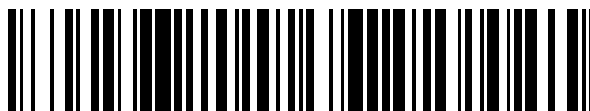


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 705**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61K 31/4178** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2006** **E 06826778 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014** **EP 1948675**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de síndrome de Marfan y trastornos asociados**

30 Prioridad:

**25.10.2005 US 729976 P**

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

**14.01.2015**

73 Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)  
3400 N. CHARLES STREET  
BALTIMORE, MD 21218, US**

72 Inventor/es:

**DIETZ, HARRY C.;  
JUDGE, DANIEL P.;  
NEPTUNE, ENID R.;  
COHN, RONALD y  
HABASHI, JENNIFER**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 526 705 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 y composiciones para el tratamiento de síndrome de Marfan y trastornos asociados

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El síndrome de Marfan (MFS) es un trastorno sistémico del tejido conjuntivo con herencia dominante autosómica y una prevalencia de aproximadamente 1 por 5.000 habitantes (Pyeritz, R.E. y McKusick, V.A. (1979) N Engl J Med. 300, 772-777). El síndrome no muestra preferencia racial, y ambos sexos están afectados igualmente. Se ha estimado que el 25% de los casos se producen debido a mutaciones espontáneas. Aunque esta afección muestra una penetrancia elevada, la norma es la variabilidad clínica interfamiliar marcada (Pyeritz, R.E. et al. (1979) Birth Defects Orig Artic Ser. 15, 155-178). La falta de un marcador bioquímico o genético específico de la enfermedad, acoplado con la variabilidad en la presentación clínica, ha frustrado el diagnóstico de casos equívocos y ha contribuido probablemente a una subestimación significativa de la prevalencia de la enfermedad.

Las características fundamentales de este trastorno implican los sistemas ocular, esquelético, y cardiovascular. La patología cardiovascular, incluyendo dilatación, disección, y ruptura de la raíz aórtica, dilatación de la arteria pulmonar, cambios en la válvula mixomatosa con insuficiencia de las válvulas mitral y aórtica, y la disfunción miocárdica progresiva, es la causa principal de mortalidad en el MFS. La mayoría de sucesos mortales asociados con MFS sin tratar se produce en la vida adulta temprana. En un estudio potencial de 72 pacientes en 1972, la edad promedio de muerte fue 32 años (Murdoch, J.L. et al. (1972) N Engl J Med. 286, 804-808).

Una reevaluación reciente de la esperanza de vida en el síndrome de Marfan sugirió que el diagnóstico temprano y el manejo médico y quirúrgico refinado han mejorado enormemente esta situación (Silverman, D.I. et al. (1995) Am J Cardiol. 75, 157-160). No obstante, el MFS continúa estando asociado con morbilidad significativa, y subgrupos selectos son refractarios a la terapia y continúan mostrando una mortalidad temprana Morse, R.P. et al. (1990) Pediatrics. 86, 888-895; Sisk, H.E.; et al. (1983) Am J Cardiol. 52, 353-358). En una revisión de 54 pacientes diagnosticados durante la infancia, Morse et al. dio a conocer que el 89% tuvo patología cardíaca grave, y que la enfermedad cardíaca fue progresiva a pesar del cuidado estándar (el 22% murió durante la niñez, el 16% antes de la edad de 1 año). En la forma más clásica de síndrome de Marfan, se estima que más del 90% de los individuos tendrán un "suceso" cardiovascular durante su vida, definido como la necesidad de reparación quirúrgica profiláctica de la raíz aórtica, o muerte debido a disección aórtica (Gillinov, A.M., et al. (1997) Ann Thorac Surg. 64, 1140-1144; discusión 1144-1145; Pyeritz, R.E. (1993) Semin Thorac Cardiovasc Surg. 5, 11-16; Silverman, D.I., et al. (1995) J Am Coll Cardiol. 26, 1062-1067; Gott, V.L., et al. (1999) N Engl J Med. 340, 1307-1313). La morbilidad ocular y esquelética se cuantifica de forma menos fácil (Mauumenee, I.H. et al. (1981) Trans Am Ophthalmol Soc. 79, 684-733; Magid, D., et al. (1990) AJR Am J Roentgenol. 155, 99-104; Sponseller, P.D., et al. (1995) J Bone Joint Surg Am. 77, 867-876). Aproximadamente el 60% de individuos con MFS tiene dislocación de la lente, requiriendo a menudo afaquia quirúrgica para el manejo óptimo. El desprendimiento retiniano y el glaucoma pueden provocar una alteración visual devastadora.

La implicación esquelética es evidente en casi todas las personas con MFS. La deformidad del pecho anterior progresiva o escoliosis puede provocar disfunción cardiopulmonar, y habitualmente requiere corrección quirúrgica. La inestabilidad articular puede provocar incapacidad física y predisponer a artritis prematura. La neumopatía se manifiesta muy habitualmente con neumotórax espontáneo, y se ha identificado en 4-11% de los pacientes con MFS (Wood, J.R., et al. (1984) Thorax. 39, 780-784; Hall, J.R., et al. (1984) Ann Thorac Surg. 37, 500-504). Los hallazgos patológicos incluyen bulas en el lóbulo superior con o sin enfermedad obstructiva fija difusa de las vías respiratorias que puede ser progresiva y se ha equiparado tradicionalmente con enfisema destructivo (Lipton, R.A., et al. (1971) Am Rev Respir Dis. 104, 924; Dominguez, R., et al. (1987) Pediatr Radiol. 17, 365-369). La mayoría de los pacientes con MFS presenta una deficiencia marcada en la masa muscular esquelética y almacenes de grasa a pesar de la ingesta calórica adecuada y sin signos de mala absorción (Behan, W.M., et al. (2003) J Neurol Neurosurg Psychiatry. 74, 633-638; H.H., et al. (1973) Neurology. 23, 1257-1268; Gross, M.L., et al. (1980) J Neurol Sci. 46, 105-112; Joyce, D.A., et al. (1984) Aust N Z J Med. 14, 495-499). Se han observado signos de miopatía muscular esquelética, incluyendo menor fuerza y tono, en un subconjunto de individuos afectados, y puede contribuir a un menor comportamiento funcional, insuficiencia respiratoria, pérdida de alineamiento ocular, y desarrollo alterado del esqueleto, incluyendo cifosis y escoliosis.

Un reto creciente es definir la "nueva" historia natural de MFS ahora que muchos individuos están sobreviviendo a su predisposición para la disección de la raíz aórtica temprana; los fenotipos asociados con el envejecimiento ya apreciados incluyen una predisposición a la disección de la aorta torácica y abdominal descendente. De este modo, a pesar de los avances en nuestra capacidad para incrementar la duración de vida de muchos individuos con MFS, hay una oportunidad más que suficiente para mejorar la calidad de vida de la mayoría de los individuos afectados.

En 1991, un análisis de candidatos posicionales tradicional culminó con la demostración de que la enfermedad produce mutaciones en el gen *FBN1* en el cromosoma 15q21.1 que codifica fibrilina-1 (Dietz, H.C., et al. (1991) Nature. 352, 337-339). Desde ese momento, ha habido una generación y caracterización de múltiples modelos de ratón del síndrome de Marfan. Este trabajo ha revolucionado verdaderamente la comprensión de la patogénesis de la enfermedad, y ha conducido a estrategias excitantes para el tratamiento de la patogénesis multisistémica del

síndrome de Marfan.

Muchas de las características del síndrome de Marfan son comunes en la población general, y representan una carga de salud pública tremenda. Éstas incluyen aneurisma aórtica (1-2% de la población en general), prolapso de la válvula mitral (~7%), enfisema (11%), escoliosis (0,5%), catarata (30%), artritis (muy habitual), y miopatía (muchas formas genéticas y adquiridas comunes).

En consecuencia, existe la necesidad de métodos y composiciones para el tratamiento del síndrome de Marfan y enfermedades asociadas, trastornos y afecciones, por ejemplo enfermedades, trastornos y afecciones asociados con expresión aberrante de TGF- $\beta$ .

#### SUMARIO DE LA INVENCION

La actual invención se basa en el descubrimiento de que los antagonistas de TGF- $\beta$  tratan efectivamente el síndrome de Marfan y la enfermedad y trastornos relacionados con el síndrome de Marfan, por ejemplo enfermedades, trastornos y afecciones asociados con la expresión aberrante de TGF- $\beta$ .

En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar el síndrome de Marfan o una afección clínica asociada con síndrome de Marfan, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente que module la actividad o expresión de TGF $\beta$ , tratando de ese modo al sujeto.

En una realización relacionada, la enfermedad o trastorno es un aneurisma aórtico, enfermedad de la válvula, enfisema, miopatía, escoliosis, o enfermedad ocular. En una realización específica, la enfermedad ocular se selecciona del grupo que consiste en cataratas, miopía, glaucoma, y desprendimiento retiniano. En una realización relacionada, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno que se refiere a crecimiento, mantenimiento o regeneración muscular, por ejemplo distrofia muscular. En una realización específica, la enfermedad o trastorno es distrofia muscular de Duchenne.

El agente es el antagonista del receptor de angiotensina tipo 1, sal monopotásica de 2-butil-4-cloro-1-[p-(o-1H-tetrazol-5-ilfenil)bencil]imidazol-5-metanol (losartán potásico).

La invención describe métodos para tratar un sujeto que tiene síndrome de Marfan o una afección asociada con Marfan, administrando al sujeto una cantidad eficaz de un agente que modula la actividad o expresión de TGF $\beta$ , tratando de ese modo al sujeto.

El agente es un antagonista de TGF $\beta$ , por ejemplo una molécula pequeña, un ácido nucleico, un péptido, un anticuerpo, un scFV, o un fragmento Fab. El anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. El agente es un ARNip o ARNhc específico para TGF $\beta$ , o reguladores de la ruta de señalización de TGF $\beta$ . El ARNip o ARNhc es específico para la molécula de ácido nucleico expuesta como SEC ID NO: 1.

El agente es un agente que se une al receptor de angiotensina, por ejemplo al receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1). En una realización específica, el agente es un antagonista del receptor de angiotensina tipo 1, tal como la sal monopotásica de 2-butil-4-cloro-1-[p-(o-1H-tetrazol-5-ilfenil)bencil]imidazol-5-metanol (losartán potásico).

En otro aspecto, la invención describe métodos para tratar un sujeto que tiene distrofia muscular de Duchenne, administrando al sujeto una cantidad eficaz de un agente que modula la actividad o expresión de TGF $\beta$ , tratando de ese modo el sujeto.

El agente es un antagonista de TGF $\beta$ , por ejemplo una pequeña molécula, un ácido nucleico, un péptido, un anticuerpo, un scFV, o un fragmento Fab. El anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. El agente es un ARNip o ARNhc específico para TGF $\beta$ , o reguladores de la ruta de señalización de TGF $\beta$ . El ARNip o ARNhc es específico para la molécula de ácido nucleico expuesta como SEC ID NO: 1.

El agente es un agente que se une al receptor de angiotensina, por ejemplo al receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1). En una realización específica, el agente es un antagonista del receptor de angiotensina tipo 1, tal como sal monopotásica de 2-butil-4-cloro-1-[p-(o-1H-tetrazol-5-ilfenil)bencil]imidazol-5-metanol (losartán potásico).

En otro aspecto, la invención describe un método para tratar un sujeto que tiene artritis, administrando al sujeto una cantidad eficaz de un agente que modula la actividad o expresión de TGF $\beta$ , tratando de ese modo el sujeto.

El agente es un antagonista de TGF $\beta$ , por ejemplo una pequeña molécula, un ácido nucleico, un péptido, un anticuerpo, un scFV, o un fragmento Fab.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas para el tratamiento de síndrome de Marfan o una afección clínica asociada con síndrome de Marfan, en el que la composición farmacéutica comprende un agente que modula la actividad o expresión de TGF $\beta$ , en el que el agente es un antagonista del receptor de angiotensina tipo 1 sal monopotásica de 2-butil-4-cloro-1-[p-(o-1H-tetrazol-5-ilfenil)bencil]imidazol-5-metanol (losartán potásico).

En una realización relacionada, la enfermedad o trastorno es un aneurisma aórtico, enfermedad de la válvula, enfisema, miopatía, escoliosis, o enfermedad ocular. En una realización específica, la enfermedad ocular se selecciona del grupo que consiste en cataratas, miopía, glaucoma, y desprendimiento retiniano. En una realización relacionada, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno que se refiere al crecimiento, mantenimiento o regeneración muscular, por ejemplo distrofia muscular. En una realización específica, la enfermedad o trastorno es distrofia muscular de Duchenne.

#### DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A-B demuestran que ratones deficientes en fibrilina-1 presentan insuficiencia primaria de la tabicación del espacio aéreo distal. El examen histológico de pulmones postnatales del día 9 (D9) deficientes en fibrilina-1 (tras la inflación controlada) reveló un ensanchamiento notable del espacio aéreo distal. El análisis morfológico demostró agrandamiento del espacio aéreo distal en pulmones mutantes tanto heterocigotos como homocigotos hacia atrás hasta el día 1. El análisis histológico no mostró ningún signo de destrucción o inflamación, sino más bien una escasez de tabiques alveolares primordiales (véanse las cabezas de las flechas).

Las figuras 2A-B demuestran un incremento drástico en material inmunorreactivo en pulmones mutantes (-/-). Los datos mostrados en la figura 2B demostraron un incremento de 4 y 25 veces en la señalización de TGFβ (señal de GFP) en ratones dianizados *Fbn1* heterocigotos (+/-) y homocigotos (-/-) que poseen el transgén informador (Tg) en comparación con el tipo salvaje (+/+), respectivamente.

Las figuras 3A-B demuestran que el análisis de crías en ED7 reveló un rescate dependiente de la dosis de la tabicación pulmonar en ratones dianizados *Fbn1* tanto heterocigotos como homocigotos, un resultado confirmado mediante morfometría.

La figura 4 demuestra que los pulmones de ratones mutantes mostraron agrandamiento del espacio aéreo difuso con destrucción del tejido, inflamación, y mayor expresión de MMP2 y MMP9.

Las figuras 5A-D representan cambios mixomatosos adquiridos de forma postnatal de las válvulas AV en ratones deficientes en fibrilina-1. La ecocardiografía demostró función alterada, que incluye prolapso y regurgitación de la válvula mitral. Estos cambios se asocian con TGFβ libre creciente, señalización creciente de TGFβ (como se evidencia por acumulación nuclear de pSmad2), mayor proliferación celular y menor apoptosis (marcada por tinciones de Ki67 y TUNEL, respectivamente; Fig. 5B, C). La administración prenatal de TGFβNAb rescató tanto la longitud como el grosor de la válvula, demostrando una relación de causa y efecto (Fig. 5D).

Las figuras 6A-D demuestran que sujetos que tienen MFS tienen hipoplasia del músculo esquelético profunda que está asociada con hipotonía. Los cambios dependientes con la edad en todos los grupos musculares examinados incluyeron una reducción general y variación de la anchura del tamaño de las fibras, aumento de colágeno endomesial, y pérdida celular con infiltración grasa (Fig. 6A). Los ratones deficientes en fibrilina-1 mostraron una insuficiencia profunda de regeneración muscular tras lesión inducida (18 días tras la inyección de cardiotoxina; Fig. 6B). Un cociente normal de SCs (marcado mediante tinción de C-met), pero una reducción drástica en SCs proliferantes (marcada por tinción de M-cadherina; Fig. 6C). La respuesta se normalizó totalmente tras la inyección de TGFβNAb, incluyendo proliferación restaurada en respuesta a lesión, menor expresión de pSmad2 y periostina, y normalización de la arquitectura muscular con fibras musculares nucleadas centralmente que demuestran signos directos de regeneración exitosa (Fig. 6B, C). Los ratones que recibieron administración crónica de NAb mostraron una arquitectura muscular de estado estacionario normal (Fig. 6D).

Las figuras 7A-B demuestran mayor TGFβ en la aorta ascendente de ratones deficientes en fibrilina-1.

Las figuras 8A-H demuestran que el tratamiento con losartán es eficaz para el síndrome de Marfan y trastornos asociados. Se distribuyeron al azar ratones C1039G/+ a uno de tres brazos de tratamiento (n > 7 por grupo) a 7 semanas de edad: placebo, losartán (50 mg/kg) o propranolol (40 mg/kg). Las dosis en cada brazo de tratamiento se titularon para lograr efectos hemodinámicos comparables. Se realizaron tres medidas independientes de la raíz aórtica a partir de la vista del eco del eje largo en sístole en cada uno de 3 puntos de tiempo (valor inicial, 2 y 4 meses de tratamiento (Fig. 8A). Todos los análisis se llevaron a cabo de forma enmascarada para el genotipo y el brazo de tratamiento. El crecimiento aórtico durante los 4 meses de tratamiento se redujo significativamente en los grupos de losartán ( $0,03 \pm 0,07$  mm;  $p < 0,0001$ ) y propranolol ( $0,22 \pm 0,06$ ;  $p < 0,001$ ), en comparación con placebo ( $0,44 \pm 0,09$ ) (Fig. 8B). El crecimiento en el grupo de losartán fue menor que el observado con propranolol ( $p < 0,01$ ), e indistinguible del observado en ratones de tipo salvaje. El tratamiento con propranolol no mejoró la arquitectura de la matriz elástica, mientras que todos los parámetros histológicos se normalizaron en ratones tratados con losartán (Fig. 8C, D). Los estudios muestran que la administración de un anticuerpo neutralizante de TGFβ proporcionó protección similar ( $p < 0,02$ ). Losartán también rescató otros aspectos del fenotipo, incluyendo la tabicación alveolar (Fig. 8E) y la regeneración y arquitectura musculares (Fig. 8F). Losartán ha demostrado ser eficaz en pacientes jóvenes (n



= 8) con una tasa agresiva de crecimiento aórtico a pesar de la terapia estándar (bloqueo  $\beta$  adrenérgico/ACE; pacientes representativos mostrados en la Fig. 8G). Como signo directo de que la eficacia de losartán no está estrictamente relacionada con sus propiedades reductoras de la tensión arterial, se observó poca mejora en cualquier parámetro después del tratamiento con una dosis de propranolol que logró el mismo efecto antihipertensivo que losartán (Figs. 8B-E), y se mostró que el anticuerpo neutralizante de TGF $\beta$  podría lograr un rescate similar en ratones (Fig. 8H).

Las figuras 9A-C demuestran que los pulmones en ratones tratados mostraron normalización en el calibre del espacio aéreo distal, incluyendo animales en los que el tratamiento se inició a alrededor de 2 meses de edad (más allá de la ventana de dos semanas para la tabicación alveolar que se ha observado previamente; Fig. 9A). Losartán también normalizó la arquitectura del estado estacionario del músculo esquelético, y permitió el inicio normal de la regeneración muscular tanto a los 4 como a los 18 días después de la lesión inducida con cardiotoxina (Fig. 9B, C).

La figura 10 demuestra que la regeneración muscular deficiente en ratones MDX (según se evidencia por una escasez drástica de tinción con miosina neonatal tras lesión) se rescató drásticamente tras la administración de Ab neutralizantes de TGF $\beta$ .

Las figuras 11A-B representan que la tinción con hematoxilina y eosina del músculo cuádriceps demuestra variación notable del tamaño de las fibras en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (nivel superior). Obsérvense varias fibras pequeñas y divididas (asteriscos), fibras con nucleación central y engrosamiento endomisial. El antagonismo de TGFP invierte *in vivo* la arquitectura miopática en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>. Pruebas de mayor señalización de TGFP (dos paneles inferiores). La tinción inmunofluorescente para pSmad2/3 revela mayor tinción nuclear en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>, en comparación con ratones de tipo salvaje. El panel inferior muestra una sección en serie con aumento de la expresión sarcolemal de periostina en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>, en comparación con el músculo esquelético maduro de tipo salvaje. No se detecta ni la expresión nuclear de pSmad2/3 ni la expresión sarcolemal de periostina en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con anticuerpo neutralizante de TGFP. El análisis del área de sección transversal (XSA de miofibras en  $\mu\text{m}^2$ ) de las fibras del músculo tibial anterior revela una disminución en el tamaño de las fibras en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (tamaño medio de las fibras,  $1698 \pm 49 \mu\text{m}^2$ ) cuando se compara con ratones de tipo salvaje (tamaño medio de las fibras,  $2622 \pm 55 \mu\text{m}^2$ ) que se restaura con el tratamiento con NAb de TGFP (tamaño medio de las fibras,  $2443 \pm 41 \mu\text{m}^2$ );  $P < 0,005$ . (b) Regeneración muscular alterada en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>. La lesión inducida por cardiotoxina conduce a formación de miofibras recientemente formadas con núcleos localizados centralmente en ratones de tipo salvaje y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con NAb de TGFP 4 días después de la inyección. Por el contrario, sólo se forman unas pocas miofibras nuevas en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> no tratados (panel superior). Se observan numerosas fibras pequeñas (\*), que parecen haberse detenido en el crecimiento durante la regeneración, en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> 18 días tras la inyección de cardiotoxina. Por el contrario, la mayoría de las fibras musculares en ratones de tipo salvaje y *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con anticuerpo neutralizante de TGFP completaron con éxito la regeneración, con una homogeneidad incrementada y relativa en el tamaño de las fibras, en comparación con crías de la camada mutantes no tratadas. No se observa tinción significativa de pSmad2/3 nuclear y de periostina sarcolemal en ratones de tipo salvaje y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados, en oposición a la expresión persistente de pSmad2/3 y periostina en animales *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> no tratados. El análisis del área de sección transversal (XSA de miofibras en  $\mu\text{m}^2$ ) del músculo tibial anterior 18 días después de la inyección de cardiotoxina revela una reducción en el tamaño medio de las fibras en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> ( $1145 \pm 69 \mu\text{m}^2$ ) que se rescata con el tratamiento con Nab de TGFP ( $2092 \pm 47 \mu\text{m}^2$ ; tamaño medio de las fibras de ratones de tipo salvaje,  $2389 \pm 51 \mu\text{m}^2$ ;  $P < 0,005$ ).

La figura 12 representa la arquitectura del músculo esquelético del estado estacionario (músculo del cuádriceps) y la acumulación nuclear de pSmad2/3 en ratones de tipo salvaje y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados postnatalmente con placebo y losartán (panel superior). Los análisis morfométricos revelaron área de sección transversal de fibra muscular reducida en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>, que se invirtió con el tratamiento con losartán [tamaño medio de las fibras del tipo salvaje,  $2741 \pm 69 \mu\text{m}^2$ ; *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>  $1746 \pm 39 \mu\text{m}^2$ ; *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> más losartán,  $2527 \pm 58 \mu\text{m}^2$ ;  $P < 0,009$ ]. Arquitectura muscular y expresión de miosina neonatal 4 días y 18 días después de lesión inducida con cardiotoxina en ratones de tipo salvaje y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con placebo o losartán (panel inferior).

Las figuras 13A-B representan (a) acumulación nuclear incrementada de pSmad2/3 y expresión sarcolemal de periostina en ratones *mdx* deficientes en distrofina y ratones deficientes tanto para distrofina como para miostatina (*mdx/mstn*<sup>-/-</sup>; paneles de la derecha), y (b) capacidad de regeneración mejorada en ratones *mdx* tratados con NAb de TGF $\beta$ . Secciones representativas se tiñen para miosina neonatal, un marcador para regeneración activa, 4 días después de la inyección de cardiotoxina (panel superior). Los ratones de tipo salvaje muestran que numerosas células sufren regeneración activa, mientras que los ratones *mdx* muestran solamente fibras que se regeneran de forma dispersa. Por el contrario, los ratones *mdx* tratados con NAb de TGFP o con losartán demuestran regeneración activa comparable a la observada en ratones de tipo salvaje (segundo panel desde la parte de arriba). Dieciocho días después de la inyección de cardiotoxina, los ratones de tipo salvaje muestran casi ninguna fibrosis según se muestra mediante tinción de vimentina negativa

(verde). Por el contrario, los ratones *mdx* muestran áreas diseminadas de fibrosis, mientras que los ratones *mdx* tratados con NAb de TGF $\beta$  o con losartán muestran una reducción notable en la fibrosis (los dos paneles inferiores). La gráfica muestra el porcentaje de área fibrótica en comparación con el área total de tejido muscular.

Las figuras 14A-C representan análisis inmunofluorescentes de proteínas diana aguas abajo del receptor de angiotensina II tipo 1. El músculo esquelético del diafragma de tipo salvaje muestra sólo una expresión débil de trombospondina-1 (TSP). Se detecta mayor expresión sarcolemal en diafragma de ratones *mdx* no tratados. Por el contrario, los ratones tratados con losartán muestran una expresión enormemente reducida de trombospondina-1 (panel superior). Además, el tratamiento con losartán conduce a una acumulación nuclear disminuida de pSmad2 (panel central) y expresión sarcolemal de periostina (panel inferior). La caja presenta potenciación nuclear de pSmad2 en tejido conjuntivo. (b) El tratamiento a largo plazo con losartán atenúa la progresión de la enfermedad miopática en ratones *mdx* de 9 meses. El nivel superior presenta secciones diafragmáticas representativas de tinción de van-Gieson de ratones de tipo salvaje, ratones *mdx* y ratones *mdx* tratados con losartán. Los ratones tratados con losartán muestran fibrosis significativamente menor que los ratones *mdx* no tratados, Bar = 150  $\mu$ m. El segundo panel muestra la cuantificación de las áreas fibróticas (izquierda) [tipo salvaje 4%  $\pm$  1; *mdx* 32%  $\pm$  5; *mdx* losartán 18%  $\pm$  4] y el porcentaje de núcleos localizados centralmente en el diafragma (derecha) [tipo salvaje 2%  $\pm$  0,5; *mdx* 35%  $\pm$  5; *mdx* losartán 48%  $\pm$  6]. La tinción de Van-Gieson de los músculos gastrocnemios de ratones de tipo salvaje, ratones *mdx* y ratones *mdx* tratados con losartán se muestran en el tercer panel (Bar = 100  $\mu$ m). El análisis cuantitativo correspondiente de fibrosis [tipo salvaje 4%  $\pm$  2; *mdx* 75%  $\pm$  6,4; *mdx* losartán 89%  $\pm$  5,8] y núcleos localizados centralmente se presentan en el panel inferior [tipo salvaje 2%  $\pm$  0,5; *mdx* 25%  $\pm$  5; *mdx* losartán 36%  $\pm$  6]. (c) Análisis funcional de ratones *mdx* tratados con losartán. Después de 6 meses, los ratones *mdx* tratados con losartán demuestran una fuerza de agarre de las patas traseras mejorada (medida como fuerza pico en N, gráfica superior, m = macho, f = hembra, n = 6 ratones cada grupo, lado izquierdo, panel superior) cuando se comparan con ratones *mdx* no tratados (1,89  $\pm$  0,23 [macho]/1,79  $\pm$  0,14 [hembra]N frente a 1,45  $\pm$  0,19 [macho]/1,39  $\pm$  0,14 [hembra]N, respectivamente; \*  $P$  < 0,002 y \*\* $P$  < 0,001). Además, los ratones tratados con losartán mostraron una fatiga muscular significativamente menor en respuesta a exposición repetitiva (16,2%  $\pm$  5 [macho]/17,1 + 4[hembra]% frente a 39,5%  $\pm$  6 [macho]/37,6%  $\pm$  6[hembra]; \*  $P$  < 0,008 y \*\*  $P$  < 0,005, lado derecho, panel superior). Secciones representativas correspondientes teñidas con hematoxilina y eosina de músculo extensor largo de los dedos (EDL), del sóleo (SOL), del tibial anterior (TA) de ratones de 9 meses de tipo salvaje, *mdx* y *mdx* tratados con losartán que demuestran daño morfológico significativamente menor en músculo esquelético de ratones *mdx* tratados con losartán.

Las figuras 15A-D demuestran que el peso corporal total está significativamente reducido en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/C1039G</sup> (A). Se expresa el número medio de las fibras musculares y el diámetro medio de las fibras  $\pm$  SEM, demostrando una disminución tanto en el número como en el tamaño de las fibras en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/C1039G</sup>. (b) Hipoplasia e hipotrofia muscular grave en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/C1039G</sup>. La tinción con hematoxilina y eosina revela variación en el tamaño de las fibras del músculo esquelético de ratones *Fbn1*<sup>C1039G/C1039G</sup> a los 10 días con fibras más pequeñas e incremento del tejido intersticial entre las fibras, cuando se compara con crías de la misma camada de tipo salvaje de edad parecida (M. cuádriceps). Bar representa 40  $\mu$ m. (c) La deficiencia de fibrilina-1 provoca miopatía esquelética en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> heterocigotos. La tinción inmunohistoquímica para fibrilina-1 revela expresión endomisial y perimisial disminuida en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>, en comparación con crías de camada de tipo salvaje. (d) Expresión endomisial disminuida de fibrilina-1 en un paciente de 5 años de edad con síndrome de Marfan (MFS, M. latissimus dorsi). Obsérvese la reducción y variación significativa en el tamaño de las fibras y el engrosamiento endomisial según se compara a un niño de 5 años sin ningún signo de un trastorno del músculo esquelético. Bar representa 45  $\mu$ m.

Las figuras 16A-D representan potenciación nuclear de la expresión de pSmad2/3 en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> según se evidencia mediante tinción fusionada con el marcador nuclear DAPI (a). (b) Imágenes de baja potencia del músculo tibial anterior 18 días después de la inyección de cardiotoxina que enfatizan el menor tamaño de las fibras musculares en ratones deficientes en fibrilina. (c) Expresión disminuida de trombospondina-1 (TSP1) y periostina en músculo esquelético de ratones deficientes en fibrilina-1 tratados con losartán. (d) Beneficio funcional del tratamiento con losartán. El tratamiento a largo plazo con losartán rescata los déficit funcionales en ratones de 6 meses deficientes para fibrilina-1 (*Fbb1*<sup>mgR/mgR</sup>). Los datos representan la fuerza de agarre de los miembros delanteros en N, y la fatiga expresada como porcentaje. A los 6 meses, los ratones *Fbn1*<sup>mgR/mgR</sup> demostraron una disminución significativa en la fuerza muscular cuando se comparan con ratones de tipo salvaje de edad parecida (1,39 Newton [N]  $\pm$  0,16 frente a 1,93 N  $\pm$  0,12, respectivamente). Además, los ratones *Fbn1*<sup>mgR/mgR</sup> demostraron fatiga muscular excesiva en respuesta a exposición repetitiva (28%  $\pm$  2,5 frente a 3%  $\pm$  0,8, respectivamente). Después de 5 meses de tratamiento con losartán, los ratones *Fbn1*<sup>mgR/mgR</sup> mostraron una fuerza de agarre mejorada de las extremidades delanteras (1,87 N  $\pm$  0,15) y fatiga reducida (9%  $\pm$  1,8) cuando se comparan con crías de la misma camada *Fbn1*<sup>mgR/mgR</sup> no tratadas. El modelo de ratón de síndrome de Marfan usado para estudios funcionales es homocigoto para un alelo de *Fbn1* hipomórfico (*Fbn1*<sup>mgR/mgR</sup>)<sup>47</sup> que expresa fibrilina-1 normal a un nivel que se aproxima al

15% del normal. Esta estirpe de ratón recapitula la patología aórtica, pulmonar y de válvula observada en ratones C1039G, no obstante a una velocidad acelerada 21, 49, 50. Lo mismo es cierto para músculo esquelético, aumentando el potencial para observar y restaurar un déficit funcional.

Las figuras 17A-C demuestran que no hay diferencia en el número de fibras musculares positivas a c-met, un marcador para células satélite en reposo, en ratones de tipo salvaje y *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>. (b) Función de células satélites perturbada en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>. A 48 y 72 horas después de la inyección de cardiotoxina, los ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> muestran menos núcleos positivos a M-cadherina y a miogenina, en comparación con ratones de tipo salvaje y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con NAb de TGFO. Las imágenes fusionadas muestran colocalización de núcleos teñidos con M-cadherina con núcleos teñidos con DAPI (violeta); la tinción con laminilla III delimita la membrana de pasamento (panel superior). (c) Las células positivas para miogenina se colocalizan con el marcador nuclear DAPI.

Las figuras 18A-C representan la expresión inmunofluorescente de distrofina, a-distroglucano (a-DG), e [i-sarcoglicano ((3-SG) en ratones de tipo salvaje, ratones *mdx* y ratones *mdx* tratados con losartán. La distrofina está ausente en ratones *mdx* tratados y no tratados (\* representa fibras revertientes). Además, la expresión sarcolemal de a-distroglucano e [i-sarcoglicano está reducida en ambos grupos de animales cuando se compara con ratones de tipo salvaje. (b) Niveles de creatinina cinasa en ratones de tipo salvaje, ratones *mdx* y ratones *mdx* tratados con losartán (n = 6 cada grupo). No hay significancia estadística entre ratones *mdx* tratados frente a los no tratados, los cuales muestran una elevación significativa de creatinina cinasa sérica. (c) Después de 6 meses, los ratones *mdx* tratados con losartán (*mdx* L) demuestran una fuerza de agarre mejorada global de las extremidades delanteras (medida como fuerza pico en N, gráfica superior, m = macho, hembra, n = 6 ratones cada grupo) cuando se comparan con ratones *mdx* no tratados (1,64 ± 0,29 [macho]/1,41 ± b0,15 [hembra]N frente a 1,25 ± 0,15 [macho]/1,32 ± 0,12 [hembra] N; p < 0,004 y p < 0,008). Además, los ratones tratados con losartán mostraron fatiga muscular significativamente menor en respuesta a exposición repetitiva (16,3% ± 5 [macho]/15,2 ± 6 [hembra]% frente a 36,3% ± 6,5 [macho]/34,7% ± 5,7 [hembra]; p<0,003 y p<0,009).

Las figuras 19A-H representan el tratamiento postnatal con NAb de TGF-β. Caracterización de la aorta ascendente en ratones de tipo salvaje no tratados [(A) y (E)] y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con placebo [(B) y (F)], 1 mg/kg de NAb de TGF-β [(C) y (G)], y 10 mg/kg de NAb de TGF-β [(D) y (H)]. En (A) a (D), la tinción de Verhoeff's-van Gieson (VVG) revela perturbación difusa de la arquitectura de fibras elásticas y engrosamiento de la media aórtica (delineado por flechas) en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con placebo (B) con respecto a la arquitectura de fibras elásticas normal observada en ratones de tipo salvaje (A). La mejora en ambos parámetros se observa en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con NAb [(C) y (D)]. Barras de escala, 40 μm. En (E) a (H), la inmunohistoquímica (IH) revela pSmad2 nuclear, un marcador para la tinción de TGF-β (las flechas indican núcleos positivos representativos). Se observa incremento de pSmad2 en los ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con placebo (F) con respecto a los ratones de tipo salvaje (E). La tinción de pSmad2 normalizada se observa en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con NAb [(G) y (H)]. Barras de escala, 50 μm. (I) Crecimiento promedio de la raíz aórtica (± SD) medido mediante ecocardiograma a lo largo del período de tratamiento de 2 meses. Obsérvese la velocidad de crecimiento reducida en los ratones tratados con NAb con respecto a los ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con placebo. \*P < 0,0001, \*\*P < 0,03, †P = 0,11, ††P = 1,0. (J) Grosor promedio (± SD) de la media aórtica ascendente proximal de cuatro secciones representativas medido mediante un observador que no conoce el genotipo ni el brazo de tratamiento. Obsérvese la normalización total del grosor en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con NAb. \*P < 0,01, †P = 0,91, ††P = 0,38. (K) Puntuación promedio de la arquitectura de la pared aórtica (± SD) de la aorta ascendente proximal. Tres observadores distintos, que no conocían el genotipo ni el brazo de tratamiento, clasificaron la arquitectura de fibras elásticas en cuatro áreas representativas en una escala de 1 (láminas elásticas completamente intactas) a 4 (fragmentación amplia). Obsérvese la mejora en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con NAb. \*P < 0,007, \*\*P < 0,0001, \*\*\*P < 0,001, †P = 0,21.

Las figuras 20A-D representan el tratamiento prenatal con losartán y propranolol. (A a D) La tinción de VVG resalta la arquitectura de fibras elásticas intacta y grosor normal de la pared aórtica ascendente (flechas) en ratones de tipo salvaje (A) y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con losartán (D). Es manifiesta la alteración notable de las fibras elásticas y el engrosamiento de las paredes en los ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con placebo y con propranolol [(B) y (C)]. Barras de escala, 40 μm. (E) Grosor promedio de la pared aórtica (± SD) después de 10 meses de tratamiento. Obsérvese la normalización total del grosor de la pared en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con losartán con respecto a ratones que recibieron un tratamiento con placebo o con propranolol. \*P < 0,0001, \*\*P < 0,002, †P = 0,24, ††P = 0,19. (F) Puntuación promedio de la arquitectura de la pared aórtica (± SD) después del tratamiento. Obsérvese la mejora en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con losartán. \*P < 0,02, \*\*P < 0,0001, †P = 0,16.

Las figuras 21A-K representan el tratamiento postnatal con losartán y propranolol. Tinción de VVG [(A) a (D)] e inmunotinción de pSmad2 [(E) a (H)] de la pared aórtica. Las láminas elásticas están intactas, y la media aórtica tiene un grosor normal en ratones de tipo salvaje (A) y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con losartán (D). Los ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con placebo y con propranolol [(B) y (C)] tienen fragmentación difusa de las

5 fibras elásticas y engrosamiento de la media aórtica (flechas). Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ . La tinción de pSmad2 nuclear está reducida en la media aórtica de ratones de tipo salvaje (E) y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con losartán (H). Se observa un incremento señalado en la tinción nuclear para pSmad2 (células positivas representativas representadas por cabezas de flecha) en los ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con placebo (F) y con propranolol (G). Barras de escala, 40  $\mu\text{m}$ . (I) Crecimiento promedio de la raíz aórtica ( $\pm$  SD) durante los 6 meses de tratamiento. Obsérvese que el crecimiento de la raíz aórtica en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con propranolol es menor que aquel con placebo, aunque sigue siendo mayor que el observado en ratones de tipo salvaje. El tratamiento con losartán normaliza la velocidad de crecimiento. \* $P < 0,0001$ , \*\* $P < 0,001$ , \*\*\* $P < 0,02$ , † $P = 0,55$ . (J) Grosor promedio de la pared aórtica ( $d \pm$  SD). El grosor de la pared aórtica en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con losartán está reducido con respecto a ratones tratados con placebo y con propranolol, y es indistinguible del observado en ratones de tipo salvaje. \* $P < 0,002$ , \*\* $P < 0,0001$ , \*\*\* $P < 0,05$ , † $P = 0,67$ , †† $P = 0,17$ . (K) Arquitectura promedio de la pared aórtica ( $\pm$  SD). Obsérvese la normalización total lograda con el tratamiento con losartán. \* $P < 0,002$ , \*\* $P < 0,0001$ , \*\*\* $P < 0,05$ , † $P = 0,20$ , †† $P = 0,47$ .

15 Las figuras 22A-D representan el tratamiento con losartán postnatal de enfermedad pulmonar en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>. El análisis histológico de pulmón en ratones de tipo salvaje (A) muestra un calibre normal del espacio aéreo. Los ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con placebo (B) muestran ensanchamiento del espacio aéreo distal difuso (ejemplo delineado con flechas). El calibre del espacio aéreo distal está reducido en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con losartán (C). Barras de escala, 500  $\mu\text{m}$ . (D) La interceptación lineal media promedio, un marcador del calibre del espacio aéreo, es mayor para ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con placebo que para ratones de tipo salvaje no tratados y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con losartán. \* $P < 0,01$ , \*\* $P < 0,001$ .

Las figuras 23A-B presentan la secuencia de ácido nucleico (SEC ID NO:1) y la secuencia polipeptídica (SEC ID NO:2) de TGF- $\beta$ , respectivamente.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La actual invención se basa en el descubrimiento de que el antagonista de TGF- $\beta$ , losartán, trata de forma eficaz el síndrome de Marfan y la enfermedad y trastornos relacionados con síndrome de Marfan. En consecuencia, la invención proporciona métodos y composiciones para tratar el síndrome de Marfan y enfermedades y trastornos relacionados.

### Agente de la invención

La invención proporciona el agente losartán (Cozaar) para modular la expresión o actividad de TGF- $\beta$ . El agente es un antagonista de TGF- $\beta$ .

El antagonista de TGF- $\beta$  que es útil en los métodos de la invención es sal monopotásica de 2-butil-4-cloro-1-[p-(o-1H-tetrazol-5-ilfenil)bencil]imidazol-5-metanol (losartán potásico).

### Composiciones farmacéuticas de la invención

El agente descrito aquí se puede formular en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de las enfermedades, trastornos y afecciones descritos aquí. La frase "composición farmacéutica" incluye preparaciones adecuadas para administración a mamíferos, por ejemplo seres humanos. Cuando el compuesto usado en los métodos de la presente invención se administra como una sustancia farmacéutica a mamíferos, por ejemplo seres humanos, se puede administrar per se o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0,1 a 99,5% (más preferiblemente, 0,5 a 90%) de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" está reconocida en la técnica, e incluye un material farmacéuticamente aceptable, composición o vehículo, adecuado para administrar compuestos de la presente invención a mamíferos. Los vehículos incluyen carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicado en llevar o transportar el agente objeto desde un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada vehículo debe de ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación, y no lesivo para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de alazor, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de haba de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; disolución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico; disoluciones de tampón de fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

También pueden estar presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, edulcorantes, saborizantes y agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio, y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Las formulaciones de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, nasal, tópica, transdérmica, bucal, sublingual, rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria, y se pueden preparar mediante cualesquiera métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una forma de dosificación individual será generalmente aquella cantidad de compuesto que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de cien por ciento, esta cantidad oscilará de alrededor de 1 por ciento a alrededor de noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferiblemente de alrededor de 5 por ciento a alrededor de 70 por ciento, lo más preferible de alrededor de 10 por ciento a alrededor de 30 por ciento.

Los métodos para preparar estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de asociar un compuesto de la presente invención con el vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente un compuesto de la presente invención con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

Las formulaciones de la invención adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, saquitos, píldoras, comprimidos, tabletas (usando una base de sabor, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, gránulos, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica) y/o como colutorios y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como ingrediente activo. Un compuesto de la presente invención también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

En formas de dosificación sólidas de la invención para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el ingrediente activo se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábica; humectantes, tales como glicerol; agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio; agentes que retrasan la disolución, tales como parafina; aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonítica; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, y sus mezclas; y agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina llenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así como polietilenglicoles de peso molecular elevado y similares.

Un comprimido se puede obtener mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos prensados se pueden preparar usando agente aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden obtener moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos, y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, se pueden ranurar opcionalmente o se pueden preparar con revestimientos y cubiertas, tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También se pueden formular para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo en ellos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseada, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes del uso. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes, y pueden ser de una composición de manera que liberen el ingrediente o ingredientes activos solamente, o preferentemente, en una cierta porción del tubo digestivo, opcionalmente, de manera retrasada. Los ejemplos de composiciones de incrustación que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El ingrediente activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado con uno

o más de los excipientes descritos anteriormente.

- Las formas de dosificación líquidas para administración oral del compuesto de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, de nuez molida, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles, y ésteres de ácidos grasos con sorbitán, y mezclas de los mismos.
- Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.
- Las suspensiones, además del compuesto activo, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de polioxietilen sorbitol y sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y sus mezclas.
- Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención para administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio, que se puede preparar mezclando el compuesto de la invención con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorios o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a la temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirá en el recto o en la cavidad vaginal y liberará el compuesto activo.
- Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen vehículos tales como se conocen en la técnica como apropiados.
- Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen polvos, pulverizaciones, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualesquiera conservantes, tampones, o propelentes que se puedan necesitar.
- Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de esta invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o sus mezclas.
- Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además de un compuesto de esta invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarbonos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano.
- Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar el suministro controlado de un compuesto de la presente invención al cuerpo. Tales formas de dosificación se pueden obtener disolviendo o dispersando el compuesto en el medio apropiado. También se pueden usar potenciadores de la absorción para incrementar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de tal flujo se puede controlar proporcionando una membrana que controla la velocidad, o dispersando el compuesto activo en una matriz polimérica o gel.
- También se contemplan dentro del alcance de esta invención las formulaciones oftálmicas, ungüentos para el ojo, polvos, disoluciones y similares.
- Las composiciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para administración parenteral comprenden el compuesto de la invención en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que se pueden reconstituir en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido, o agentes de suspensión o espesantes.
- Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y sus mezclas adecuadas, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partículas en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.
- Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar

mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares, en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede provocar mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, a fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable ralentizar la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene una mala solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución, que a su vez puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retrasada de una forma farmacéutica administrada parenteralmente se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

Las formas de depósito inyectables se obtienen formando matrices de microencapsulamiento de los compuestos objeto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero, y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

Las preparaciones de la presente invención se pueden administrar oralmente, parenteralmente, tópicamente, o rectalmente. Por supuesto, se administran mediante formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de comprimidos o cápsulas, mediante inyección, inhalación, loción ocular, ungüento, supositorio, etc., administración mediante inyección, infusión o inhalación; tópica mediante loción o ungüento; y rectal mediante supositorios. Se prefiere la administración oral.

Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente", como se usan aquí, significan modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

Las frases "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente", como se usan aquí, significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material directamente de otra forma en el sistema nervioso central, de manera que entra en el sistema del paciente y, de este modo, se somete a metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo administración subcutánea.

El compuesto se puede administrar a seres humanos y otros animales para terapia mediante cualquier vía adecuada de administración, incluyendo oralmente, nasalmente, como por ejemplo mediante una pulverización, rectalmente, intravaginalmente, parenteralmente, intrasistémicamente y tópicamente, como mediante polvos, ungüentos o gotas, incluyendo bucalmente y sublingualmente.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, el compuesto de la presente invención, que se puede usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formula en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por aquellos de pericia en la técnica.

Los niveles de dosificación reales del ingrediente activo en las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxica al paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto particular de la presente invención empleado, o su éster, sal o amida, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplee, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el compuesto particular empleado, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historia médica previa del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Un médico o veterinario que tenga pericia normal en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles menores que el requerido a fin de lograr el efecto terapéutico deseado, e incrementar gradualmente la dosificación hasta que se logra el efecto deseado.

En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la invención será aquella cantidad del compuesto que es la dosis más baja efectiva para producir un efecto terapéutico. Tal dosis efectiva dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Generalmente, las dosis intravenosas y subcutáneas de los compuestos de esta invención para un paciente, cuando se usan para los efectos analgésicos indicados, oscilarán desde alrededor de

0,0001 hasta alrededor de 100 mg por kilogramo de peso corporal por día, más preferiblemente desde alrededor de 0,01 hasta alrededor de 50 mg por kg por día, y todavía más preferiblemente de alrededor de 1,0 a alrededor de 100 mg por kg por día. Una cantidad efectiva es aquella cantidad que trata una enfermedad, trastorno o afección expuesta aquí.

- 5 Si se desea, la dosis diaria efectiva del compuesto activo se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis, administradas separadamente a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente en formas de dosificación unitarias.

Aunque es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una composición farmacéutica.

- 10 En realizaciones ejemplares de la invención, la composición farmacéutica es losartán (comercializada como Cozaar por Merck).

#### Métodos de tratamiento

- 15 Como se usa aquí, la expresión "síndrome de Marfan o enfermedades, trastornos y afecciones asociados" pretende significar síndrome de Marfan o uno cualquiera de la multitud de enfermedades, trastornos o afecciones que está provocada o asociada con los sucesos bioquímicos que provocan síndrome de Marfan, por ejemplo la expresión o actividad aberrante de TGF $\beta$ . Las afecciones ejemplares incluyen aneurisma, un aneurisma aórtico, enfermedad de la válvula, enfisema, miopatía, escoliosis, o enfermedad ocular. Las enfermedades oculares ejemplares incluyen cataratas, miopía, glaucoma, y desprendimiento retiniano. Además, el síndrome de Marfan o enfermedades, trastornos y afecciones asociados incluyen enfermedades y trastornos que se refieren al crecimiento, mantenimiento o regeneración muscular, por ejemplo distrofias musculares tales como distrofia muscular de Duchenne. Además, la enfermedad o trastorno puede ser una enfermedad o trastorno pulmonar, por ejemplo enfisema, neumotórax, y COPD.

- 25 El término "tratado", "tratar" o "tratamiento" incluye la disminución o alivio de al menos un síntoma asociado o provocado por síndrome de Marfan, o una enfermedad, trastorno o afección asociado. Por ejemplo, el tratamiento puede ser la disminución de uno o varios síntomas de una enfermedad o trastorno, o la erradicación completa de la enfermedad o trastorno, por ejemplo síndrome de Marfan.

- 30 El término "sujeto" pretende incluir organismos, por ejemplo procariotas y eucariotas, que son capaces de sufrir o verse afectados con el síndrome de Marfan, o una enfermedad, trastorno o afección relacionado con aquél. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas, y animales no humanos transgénicos. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano, por ejemplo un ser humano que sufre, que está en riesgo de sufrir, o que es potencialmente capaz de sufrir un síndrome de Marfan, o una enfermedad, trastorno o afección relacionada con aquél.

El agente y las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar a un sujeto para tratar o prevenir síndrome de Marfan o enfermedades o trastornos asociados con síndrome de Marfan.

- 35 En una realización, el agente o composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad eficaz usando un programa de dosificación determinado por un médico que proporciona el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno expuesto aquí. El agente o composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una variedad de métodos descritos aquí y conocidos por un experto en la técnica.

#### EJEMPLOS

- 40 Se debería apreciar que la invención no se debe de interpretar como limitada a los ejemplos que se describen ahora; antes bien, la invención se debería interpretar para incluir cualesquiera y todas las aplicaciones proporcionadas en las reivindicaciones.

**Ejemplo 1: El ejemplo 1 demuestra que el síndrome de Marfan y las enfermedades y trastornos asociados se caracterizan por una mayor señalización de TGF $\beta$ .**

- 45 Fallo de la tabicación alveolar debido a señalización excesiva de TGF $\beta$  en ratones deficientes en fibrilina-1.

- 50 A) Los ratones deficientes en fibrilina-1 presentan insuficiencia primaria de tabicación del espacio aéreo distal: Aunque la mayoría de las imágenes muestran deriva de ratones mgD/mgD, se han observado hallazgos idénticos en razas mgD/+, mgR/mgR, mgR/+, C1039G/+ y C1039G/C1039G (véase más abajo y datos no mostrados). La visión histórica prevalente ha sido que la enfermedad pulmonar obstructiva y el neumotórax en MFS manifiestan la consecuencia de estrés fisiológico crónico que actúa sobre un tejido estructuralmente deficiente y por lo tanto biomecánicamente predispuesto. Notablemente, el examen histológico de pulmones postnatales deficientes en fibrilina-1 del día 9 (D9) (tras la inflación controlada) reveló un ensanchamiento notable del espacio aéreo distal. El análisis morfométrico preciso demostró agrandamiento del espacio aéreo distal en pulmones mutantes tanto heterocigotos como homocigotos hasta



el día 1 (Fig. 1). El análisis histológico cuidadoso no mostró ningún signo de destrucción o inflamación, sino más bien una escasez de tabiques alveolares primordiales (cabezas de flechas, Fig. 1). Estos datos son muy consistentes con el fallo primario de la tabicación alveolar en lugar del enfisema destructivo clásico. Estudios adicionales documentaron contenido normal de elastina en el pulmón en desarrollo de ratones deficientes en fibrilina-1, y localización normal hacia la punta de tabiques alveolares escasos. Adicionalmente, se ha mostrado distribución normal de marcadores de la diferenciación tanto epitelial (SPC) como mesenquimal (SM-actina).

B) Activación y señalización excesivas de TGFβ en pulmones deficientes en fibrilina-1: En consideración de mecanismos potenciales que podrían alterar programas de desarrollo pulmonar, se creyó que la deficiencia en fibrilina-1 podría dar como resultado la desregulación de TGFβ. Este postulado deriva del conocimiento previo respecto a 1) el secuestro de la matriz del gran complejo latente, 2) colocalización de LTBP1 y microfibrillas, y más recientemente 3) la demostración de la interacción bioquímica directa entre fibrilina-1 y LTBP-1. A fin de evaluar este modelo, pulmones de tipo salvaje (+/+) y deficientes en fibrilina-1 (-/-) se tiñeron con un anticuerpo policlonal que es específico para TGFβ1 libre y activo. Los datos mostrados en la figura 2A demuestran un incremento drástico en material inmunorreactivo en pulmones mutantes (-/-). Por el contrario, LAP se redujo abundantemente, tanto en los análisis de inmunohistoquímica como en análisis western, sugiriendo activación incrementada de TGFβ en lugar de producción incrementada. Para abordar si TGFβ libre incrementado se podría traducir en una mayor señalización en este contexto de desarrollo, se creó un alelo informador transgénico que conduce la expresión de GFP a partir de una repetición en tándem de un elemento promotor sensible a TGFβ (caja CAGA). El trabajo previo mostró especificidad completa de este elemento por TGFβ (en comparación con BMPs o activina). Los datos mostrados en la figura 2B demostraron un incremento de 4 y 25 veces en la señalización de TGFβ (señal de GFP) en ratones dianizados *Fbn1* heterocigotos (+/-) y homocigotos (-/-) que poseen el transgén informador (Tg), en comparación con el tipo salvaje (+/+), respectivamente.

C) La abolición de la señalización de TGFβ rescata el fenotipo pulmonar en ratones dianizados *Fbn1*: A ED17 y 19, hembras preñadas se trataron con Ab neutralizante de TGFβ (Nab; específico para TGFβ1 y 2) o un control de IgG irrelevante. El análisis de las crías a ED7 reveló un rescate de la tabicación pulmonar, dependiente de la dosis, en ambos ratones dianizados heterocigotos, un resultado confirmado mediante morfometría (Figs. 3A y B, respectivamente). De forma importante, los ratones de tipo salvaje tratados mostraron tabicación suprafisiológica, documentando que TGFβ es un regulador negativo fisiológico de la tabicación alveolar. El efecto se exageró enormemente en ratones deficientes en fibrilina-1, demostrando señalización excesiva de TGFβ en la patogénesis de enfermedad pulmonar en MFS.

D) Los defectos de tabicación del desarrollo evolucionan a enfisema abierto: El análisis de ratones mgR/mgR, que viven más que los homocigotos mgD, permitió la inspección de la historia natural de la enfermedad pulmonar. A ED6-9, estos ratones muestran hallazgos similares a los descritos anteriormente. Hacia los 6 meses, los pulmones de ratones mutantes mostraron agrandamiento del espacio aéreo difuso con destrucción tisular, inflamación, y mayor expresión de MMP2 y MMP9 (Fig. 4 y datos no mostrados). Esto demuestra que las anomalías del desarrollo imponen una predisposición para el formas aparentemente adquiridas, de comienzo tardío, de enfermedad pulmonar.

#### Relevancia de la señalización alterada de TGFβ para otros tejidos

La señalización excesiva de TGFβ es relevante para la patogénesis de la enfermedad de MFS en muchos tejidos.

A) Válvulas auriculoventriculares (AV): Como se muestra en la figura 5A, se han mostrado cambios mixomatosos adquiridos postnatalmente de las válvulas AV en ratones deficientes en fibrilina-1. La ecocardiografía demostró función alterada, incluyendo prolapso y regurgitación de la válvula mitral. Estos cambios se asocian con aumento de TGFβ libre, aumento de señalización de TGFβ (como se evidencia mediante acumulación nuclear de pSmad2), aumento de la proliferación celular, y disminución de la apoptosis (marcada por tinciones de Ki67 y TUNEL, respectivamente; Fig. 5B, C). La administración prenatal de NAb de TGFβ rescató tanto la longitud como el grosor de la válvula, demostrando una relación de causa y efecto (Fig. 5D). La obtención del perfil de expresión de valvas de la válvula mutantes mostró aumento de genes sensibles a TGFβ, incluyendo bIGH3, EDNI, y TIMP1. También hubo un aumento de la expresión de múltiples proteínas morfogenéticas óseas (BMPs 2, 4 y 6).

B) Músculo esquelético: Muchos pacientes con MFS tienen una hipoplasia profunda del músculo esquelético que se puede asociar con hipotonía. La base molecular para este hallazgo está totalmente inexplorada. Se encontraron cambios dependientes de la edad en todos los grupos musculares examinados, incluyendo una reducción general y variación amplia en el tamaño de las fibras, aumento de colágeno endomesial, y pérdida celular con infiltración grasa (Fig. 6A). Se observaron cambios idénticos en biopsias musculares de pacientes con MFS. Una vez más, estos cambios se correlacionan con aumento de TGFβ libre, aumento de señalización de TGFβ, y aumento de la expresión de genes sensibles a TGFβ (por ejemplo periostina). Los ratones deficientes en fibrilina-1 mostraron un fallo profundo de regeneración muscular tras lesión inducida

(18 días tras la inyección de cardiotoxina; Fig. 6B). En teoría, esto se podría relacionar con un número reducido o una proliferación reducida de células satélite (SCs), es decir, células madre musculares residentes que son esenciales para la regeneración normal del músculo. Se encontró un cociente normal de SCs (marcadas por tinción de C-met), pero una drástica reducción en SCs proliferantes (marcadas por tinción de M-cadherina; Fig. 6C). Esta respuesta se normalizó completamente tras la inyección de NAb de TGF $\beta$ , incluyendo proliferación restaurada en respuesta a lesión, expresión disminuida de pSmad2 y periostina, y normalización de la arquitectura muscular con fibras musculares nucleadas centralmente, que es una prueba directa de la regeneración exitosa (Fig. 6B, C). Los ratones que recibieron administración crónica de NAb mostraron arquitectura muscular del estado estacionario normal (Fig. 6D). Todas las impresiones visuales se confirmaron mediante morfometría precisa.

C) TGF $\beta$  y otros tejidos: También se ha demostrado el incremento de TGF $\beta$  en otros tejidos, incluyendo la aorta ascendente (Fig. 7), condrocitos hipertróficos en la placa de crecimiento, y la dura. A diferencia de la tabicación alveolar o remodelación de la válvula AV, que se produce a lo largo de un intervalo de tiempo breve y predecible en el período postnatal inmediato, o de la regeneración muscular, que se puede inducir rápidamente y evaluar cuantitativamente, el sobrecrecimiento óseo largo, la formación de aneurisma, y la expansión del saco dural se producen insidiosamente y representan fenotipos continuos (en lugar de discretos). Se ha usado una serie de manipulaciones genéticas y/o farmacológicas para monitorizar su progresión a lo largo del tiempo. Estos estudios se esquematizan más abajo.

#### Manipulación farmacológica de la señalización de TGF $\beta$

Hay una amplia bibliografía que describe la capacidad de bloqueadores del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1) (por ejemplo losartán) para lograr una inhibición clínicamente relevante de la señalización de TGF $\beta$  *in vivo*. Para muchos estados mórbidos, incluyendo enfermedad renal crónica y cardiomiopatía, los efectos antifibróticos de losartán se han ligado directamente a la inhibición de TGF $\beta$ , y se producen independientemente de las consecuencias hemodinámicas del uso del fármaco. Los marcadores del antagonismo de TGF $\beta$  han incluido niveles plasmáticos reducidos de TGF $\beta$  libre, iniciación intracelular reducida de la cascada de señalización de TGF $\beta$ , y expresión tisular reducida de genes sensibles a TGF $\beta$ . Se cree que el tratamiento con losartán podría proporcionar protección particular frente a aneurisma tanto al disminuir el estrés hemodinámico como al atenuar sucesos patogenéticos iniciados por TGF $\beta$ . Se distribuyeron al azar ratones C1039G/+ en uno de tres brazos de tratamiento ( $n \geq 7$  por grupo) a las 7 semanas: placebo, losartán (50 mg/kg) o propranolol (40 mg/kg). Las dosis en cada brazo de tratamiento se valoraron para lograr efectos hemodinámicos comparables. Se realizaron tres medidas independientes de la raíz aórtica a partir de la vista de eco del eje largo en sístole en cada uno de 3 puntos de tiempo (valor inicial, 2 y 4 meses de tratamiento; Fig. 8A). Todos los análisis se realizaron de forma enmascarada para el genotipo y el brazo de tratamiento. El crecimiento aórtico durante los 4 meses de tratamiento se redujo significativamente en los grupos de losartán ( $0,03 \pm 0,07$ mm;  $p < 0,0001$ ) y propranolol ( $0,22 \pm 0,06$ ;  $p < 0,001$ ), en comparación con placebo ( $0,44 \pm 0,09$ ) (Fig. 8B). El crecimiento en el grupo de losartán fue menor que el observado con propranolol ( $p < 0,01$ ) e indistinguible del observado en ratones de tipo salvaje. El tratamiento con propranolol no mejoró la arquitectura de la matriz elástica mientras que todos los parámetros histológicos se normalizaron en ratones tratados con losartán (Fig. 8C, D). Estudios preliminares demostraron que la administración de anticuerpo neutralizante de TGF $\beta$  proporcionó protección similar ( $p < 0,02$ ). Losartán también rescató otros aspectos del fenotipo, incluyendo tabicación alveolar (Fig. 8E) y regeneración y arquitectura musculares (Fig. 8F). Ahora hemos observado una respuesta notable a losartán en pacientes jóvenes ( $n = 8$ ) con una velocidad agresiva de crecimiento aórtico a pesar de la terapia estándar (bloqueo  $\beta$  adrenérgico/ACE; pacientes representativos mostrados en la Fig. 8G). Como signo directo de que la eficacia de losartán no está relacionada estrictamente con sus propiedades reductoras de la tensión arterial, hubo poca mejora en cualquier parámetro después del tratamiento con una dosis de propranolol que logró el mismo efecto antihipertensivo que losartán (Figs. 8B-E), y se mostró que el anticuerpo neutralizante de TGF $\beta$  podría lograr un rescate similar en ratones (Fig. 8H, I). Esto representa la primera estrategia terapéutica para MFS que deriva de la interrogación de la patogénesis de la enfermedad, y la primera posibilidad de prevención primaria de las manifestaciones de la enfermedad.

#### Tratamiento de otros tejidos

Losartán también tuvo un efecto profundo sobre otros tejidos alterados en el fenotipo de Marfan. El pulmón en ratones tratados mostró normalización del calibre del espacio aéreo distal, incluyendo animales en los que el tratamiento se inició a alrededor de 2 meses (más allá de la ventana de dos semanas para tabicación alveolar que se ha observado previamente; Fig. 9A). Losartán también normalizó la arquitectura del estado estacionario del músculo esquelético, y permitió el inicio normal de la regeneración muscular tanto a los 4 como a los 18 días después de lesión inducida con cardiotoxina (Fig. 9B, C).

#### Tratamiento de otras enfermedades

También se determinó que la activación y señalización excesivas de TGF $\beta$  contribuyen a otras formas de enfermedad muscular. Los experimentos descritos anteriormente han utilizado un modelo de distrofia muscular de Duchenne provocada por alteración del gen de distrofina (ratón MDX). Se demostró señalización excesiva de TGF $\beta$

en este modelo de ratón vía la demostración de la mayor acumulación nuclear de pSmad2 y la mayor expresión de periostina. De forma importante, estas mismas anomalías se observaron en ratones MDX que fueron nulos para miostatina, otro miembro inhibidor de la familia de TGF $\beta$ . Entonces se demostró que la regeneración muscular deficiente en ratones MDX (como se evidencia por una escasez drástica de tinción con miosina neonatal tras la lesión) se rescató drásticamente tras la administración de Ab neutralizante de TGF $\beta$  (Fig. 10).

## **Ejemplo 2: El bloqueo del receptor de angiotensina II tipo I atenúa la insuficiencia, inducida por TGF- $\beta$ , de la regeneración muscular en estados miopáticos múltiples**

### **Ratones**

Todos los protocolos con ratón fueron aprobados por el Animal Care and Use Committee de Johns Hopkins University School of Medicine. La creación de la estirpe de ratón que posee la mutación de *Fbn1*<sup>C1039G</sup> se ha descrito previamente (Judge, D. P. et al. (2004) J Clin Invest 114, 172-81). Todos los análisis se llevaron a cabo en ratones macho tras retrocruzar (>9 veces) esta mutación en el antecedente C57BL/6J, permitiendo comparaciones válidas entre camadas. Los ratones se sacrificaron con una sobredosis por inhalación de halotano (Sigma-Aldrich), o por dislocación cervical. Para los experimentos de regeneración muscular en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>, se inyectaron 100  $\mu$ l de cardiotoxina (10  $\mu$ M Naja nigricollis; Calbiochem, La Jolla, CA) (Goetsch, S. C. et al. (2003) Physiol Genomics 14, 261-71; Cohn, R. D. et al. (2002) Cell 110, 639-48) en el músculo tibial anterior de ratones de tipo salvaje y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados o no tratados con anticuerpo neutralizante de TGF $\beta$  (n = 6, cada grupo) a los 4 meses. Subsecuentemente, los ratones se analizaron a 4, 7, 18 y 28 días después de la lesión. Para los experimentos de regeneración en ratones *mdx*, se inyectaron 150  $\mu$ l de cardiotoxina en el músculo tibial anterior de ratones de tipo salvaje y ratones *mdx*, ya sea tratados o no tratados con anticuerpo neutralizante de TGF $\beta$  (n = 6 cada grupo) a los 9 meses, y se analizó el músculo esquelético a los 4 días y 18 días tras la inyección.

### **Tratamiento con anticuerpo neutralizante de TGF $\beta$**

Ratones de tipo salvaje y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> recibieron inyecciones intraperitoneales de anticuerpo neutralizante de TGF $\beta$  (R&D Systems, una vez cada dos semanas) a partir de las 7 semanas. El anticuerpo se diluyó en PBS (pH 7,4) y se administró a una dosis de 1 mg/kg o 10 mg/kg de peso corporal. Se administró IgG de conejo (10 mg/kg; Zymed Laboratories Inc.) de manera similar como control negativo. Los ratones se sacrificaron después de 2 meses de tratamiento, y se usó un mínimo de 6 ratones por genotipo para los análisis histológicos y morfométricos.

### **Tratamiento con losartán**

Los ratones de tipo salvaje y *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> comenzaron el tratamiento a las 7 semanas de nacimiento con losartán oral (0,6 g/l en el agua de beber; n = 5), o con placebo (n = 10). Los ratones continuaron en terapia oral durante 6 meses, y se sacrificaron. Para los experimentos de regeneración muscular, los ratones *mdx* deficientes en fibrilina y de 9 meses se colocaron en losartán durante catorce días antes de que se inyectase cardiotoxina. Los ratones (n = 4) continuaron en losartán durante todo el período tras la lesión inducida con cardiotoxina. A fin de monitorizar los beneficios a largo plazo del tratamiento con losartán, los ratones *mdx* machos y hembras (n = 6 cada grupo) comenzaron en losartán a la edad de 6 semanas. Ratones de tipo salvaje y *mdx* de edad parecida (tratados con placebo) sirvieron como grupo de control. Después de 6 meses de tratamiento, se evaluó la fuerza de agarre de las extremidades anteriores y de las extremidades posteriores usando un medidor de fuerza de agarre automatizado (Columbus Instruments, Columbus, OH). Los experimentos para el ensayo de fuerza de agarre de las extremidades anteriores y de las extremidades posteriores se realizaron en días diferentes, permitiendo un período mínimo de recuperación de 10 días. La fuerza pico total (en Newtons) se determinó mediante un calibrador del esfuerzo electrónico como se describe previamente, y se corrigió para el peso corporal (Wagner, K. R., et al. (2002) Ann Neurol 52, 832-6). Se tomaron cinco medidas en 2 minutos para cada animal. Las tres medidas más altas para cada animal se promediaron para dar la puntuación de la fuerza. El grado de fatiga se calculó comparando los primeros dos tirones con los dos últimos tirones, proporcionando el incremento negativo entre los tirones 1 + 2 y los tirones 4 + 5 una medida de la fatiga. De forma similar, se llevaron a cabo medidas funcionales en ratones deficientes en fibrilina de 6 meses (*Fbn1*<sup>mgR</sup>) (Pereira, L. et al. (1997) Nat Genet 17, 218-22) después de 5 meses de tratamiento.

### **Histología y morfometría del músculo esquelético**

Para análisis morfométricos, el músculo esquelético se congeló instantáneamente en isopentano enfriado, y se montó en TragaCanth (Sigma Aldrich, USA). Subsecuentemente, secciones de 10  $\mu$ m se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las fibras musculares se contaron en un área definida (9 mm<sup>2</sup>) del músculo tibial anterior de ratones de 10 días de tipo salvaje (n = 3) y *Fbn1*<sup>C1039G/C1039G</sup> (n=6), y el diámetro de las fibras se determinó midiendo el eje de fibra más corto en secciones transversales del músculo tibial anterior, contando un total de 850-1500 fibras. El área de sección transversal de miofibras no dañadas y que se regeneran del músculo tibial anterior de ratones de tipo salvaje y *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> se expresó como una distribución del porcentaje del número total de miofibras analizadas (850-1500) (Horsley, V. et al (2003) Cell 113, 483-94). Se tomaron secciones del músculo esquelético a lo largo de la misma región anatómica de la panza central del músculo tibial anterior. El número de células positivas para c-met, M-cadherina y miogenina en 50 campos del área del vientre central del músculo tibial anterior se puntuó usando el objetivo x40. Se puntuaron al menos seis animales por genotipo, y todos los análisis se llevaron a cabo mediante

investigadores que desconocían el genotipo y el grupo de tratamiento. Todas las imágenes se tomaron usando un microscopio Eclipse E400 (Nikon Inc.), y las medidas del área de sección transversal se determinaron usando el software IPLAB (Scanalytics, Fairfax, VA). Las fibras positivas a miosina neonatal tras la exposición a cardiotoxina se cuantificaron contando 900-1240 fibras por músculo expuesto a la toxina (n = 4). Para la cuantificación de la formación de tejido fibrótico en ratones expuestos a la toxina (n = 4), se llevó a cabo la tinción inmunofluorescente para vimentina. Se analizaron cinco secciones a lo largo de todo el músculo tibial anterior a un aumento bajo, y las áreas positivas para vimentina se calcularon como un porcentaje del área muscular total usando el software de imagen NIH Scion, de dominio público. De forma similar, se usaron secciones teñidas de van-Gieson y vimentina para definir el porcentaje de área muscular fibrótica frente al área muscular total en diafragma y gastrocnemio de ratones *mdx* tratados con losartán a largo plazo, *mdx* tratados con placebo, y ratones de tipo salvaje (n = 6 cada grupo) usando el software NIH Scion. Para la evaluación del porcentaje de núcleos localizados centralmente, se calculó un total de 1100-1300 fibras musculares por diafragma de cada ratón (n = 6, cada grupo) y un total de 1900-2200 fibras musculares por gastrocnemio de cada ratón (n = 6, cada grupo).

#### Análisis estadístico

Todos los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. Para determinar la significancia entre dos grupos, se realizaron comparaciones usando las pruebas de la t de Student no pareados. Los análisis de múltiples grupos se llevaron a cabo usando ANOVA de una vía, considerándose  $p < 0,05$  estadísticamente significativo.

#### Inmunofluorescencia

Los estudios de inmunofluorescencia se llevaron a cabo como se describió previamente (Cohn, R. D. et al. (2002) Cell 110, 639-48). La tinción de células satélite se llevó a cabo en secciones congeladas fijadas en paraformaldehído al 4%, después se lavaron en PBS que contiene 0,3% de Triton X durante 15 min., y se bloquearon subsiguientemente con 5% de seroalbúmina bovina. En este estudio se usaron los siguientes anticuerpos: anti-pSmad 2/3 policlonal de cabra, anti-c-met policlonal de conejo, y anti-miogenina policlonal de conejo (todos de Santa Cruz Biotechnology Inc.); anti-pSmad2 policlonal de conejo (#3104, Cell Signal), anti-lamininilo policlonal de rata, anti-distrofina policlonal de conejo, anti-trombospondina-1 policlonal de conejo y anti-periostina policlonal de conejo (todos de Abcam); anti-fibrilina-1 policlonal de conejo (pAb 9543) (Judge, D. P. et al. (2004) J Clin Invest 114, 172-81); anti-vimentina policlonal de cabra (Sigma), y anti-beta-sarcoglicano monoclonal de ratón y anti-miosina de desarrollo monoclonal de conejo (Novocastra). El anticuerpo anti-a-distroglicano IIH6 fue suministrado generosamente por Dr. Kevin Campbell, Iowa. Se aplicaron IgM e IgG1 anti-conejo, anti-rata, anti-ratón de burro con Alexa fluor secundario y anticuerpos conjugados anti-cabra (Molecular probes) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI durante 5 minutos, y se montaron cubreobjetos invertidos sobre portaobjetos de vidrio usando Cytoseal (Vector Laboratories).

La regeneración y reparación del músculo esquelético es un proceso muy complejo y sólo parcialmente comprendido, orquestado mediante la activación de células satélite musculares. La elucidación de los mecanismos implicados en la plasticidad del músculo esquelético es de amplio interés ya que la modulación y potenciación de la regeneración muscular es de beneficio potencial para pacientes con diversos trastornos musculares, incluyendo enfermedades degenerativas del músculo esquelético. TGF $\beta$  pertenece a una familia de citocinas que transducen su señal a través de la cascada de señalización intracelular SMAD (Heldin, C. H., et al. (1997) Nature 390, 465-71). En el músculo esquelético, hay pruebas *in vitro* que TGF $\beta$  altera la diferenciación miocítica durante la miogénesis (Allen, R. E. y Boxhom, L. K. (1987) J Cell Physiol 133, 567-72; Martin, J. F., Li, L. y Olson, E. N. (1992) J Biol Chem 267, 10956-60; Zhu, S., et al. (2004) Circ Res 94, 617-25; Olson, E. N., et al. (1986) J Cell Biol 103, 1799-805; Liu, D., Kang, J. S. y Derynck, R. (2004) Embo J 23, 1557-66). Además, TGF $\beta$  se ha visto implicado en la formación de fibrosis en respuesta a lesión, inflamación o enfermedad (Li, Y. et al. (2004) Am J Pathol 164, 1007-19; Salvadori, C., et al. (2005) Muscle Nerve 31, 192-8; Gosselin, L. E. et al. (2004) Muscle Nerve 30, 645-53; Leask, A. y Abraham, D. J. (2004) Faseb J 18, 816-27). Sin embargo, no se ha demostrado un papel patogénico para TGF $\beta$ 3 en otros aspectos de trastornos miopáticos heredados.

A fin de investigar un papel potencial para la señalización de TGF $\beta$  en el desarrollo de miopatía en ratones deficientes en fibrilina-1, se analizaron animales que poseen una mutación dianizada (C1039G) en el exón 25 del gen *Fbn1* de ratón (Judge, D. P. et al. (2004) J Clin Invest 114, 172-81). Esta mutación es representativa de la clase más común de mutación que provoca síndrome de Marfan humano, es decir sustituciones de cisteína en dominios semejantes a EGF. Los ratones homocigotos para la mutación C1039G (*Fbn1*<sup>C1039G/C1039G</sup>) tienen un aspecto demacrado, y mueren entre 10-14 días de edad como consecuencia de la disección aórtica. El análisis de crías de la misma camada mutantes de 10 días de tipo salvaje y homocigotas mostró una discrepancia significativa en el peso corporal (4,13 g  $\pm$  0,5 g frente a 2,86 g  $\pm$  0,41, respectivamente;  $p < 0,005$ ), que se correlaciona con anomalías arquitectónicas en todos los grupos musculares esqueléticos examinados (cuádriceps, diafragma, gastrocnemio, tibial anterior, sóleo y bíceps). Las anomalías incluyeron una notable disminución en el tamaño de las fibras musculares (18,5  $\mu$ m  $\pm$  2 frente a 133  $\mu$ m  $\pm$  1,5,  $p < 0,001$ ; Figure 15a), y el número de fibras (1504  $\pm$  26 fibras frente a 1380  $\pm$  25 fibras,  $p < 0,001$ ; Fig. 15a Suplementaria), y mayores cantidades de tejido intersticial y grasa entre los manojos de fibras musculares (Figura 15b). Estos hallazgos proporcionan pruebas tanto de hipotrofia muscular como de hipoplasia muscular. Los ratones heterocigotos para la mutación C1039G (*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>) recapitulan la naturaleza dominante de MFS humano, y muestran manifestaciones fenotípicas en los sistemas pulmonar, cardiovascular y

esquelético. La tinción inmunohistoquímica para fibrilina-1 reveló expresión endomisial disminuida en músculo esquelético de ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (Figura 15c) y pacientes con MFS (n = 4; Figura 15d). Se observó variación significativa en el tamaño de las fibras y fibrosis endomisial en ambos conjuntos de muestras (Fig. 11a, Figura 15c).

Se evaluó el músculo esquelético de ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> para determinar la señalización incrementada de TGFβ mediante tinción inmunohistoquímica para Smad2/3 fosforilada (pSmad2/3). Los receptores de TGFβ activados por ligandos inducen fosforilación de Smads 2 y 3, que forman complejos heteroméricos con Smad4 que se translocan al núcleo y median respuestas de genes diana (Heldin, C. H., et al. (1997) Nature 390, 465-71). Se observó acumulación nuclear de pSmad2/3 en miofibras de ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>, en comparación con crías de la misma camada de tipo salvaje (Figura 11a, Figura 16a). No se observó tinción nuclear en secciones tisulares tratadas con fosfatasa (datos no mostrados). Otra prueba de señalización incrementada de TGFβ derivó de los análisis de la expresión de periostina, una proteína que se sabe que es inducida por TGFβ y es expresada en músculo esquelético en regeneración (Horiuchi, K. et al. (1999) J Bone Miner Res 14, 1239-49; Goetsch, S. C. et al. (2003) Physiol Genomics 14, 261-71). En contraste con ratones de tipo salvaje, los animales *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mostraron expresión sarcolemal de periostina en músculo esquelético maduro y no lesionado (Figura 11a).

Para demostrar una relación de causa y efecto entre la señalización en exceso de TGFβ y el desarrollo de miopatía en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>, se logró el antagonismo de TGFβ sistémico *in vivo* mediante inyección intraperitoneal de 1 mg/kg o 100 g/kg de anticuerpo neutralizante de TGFβ (NAb de TGFO) comenzando a las 7 semanas de edad. Además, se administraron inyecciones de placebo con 10 mg/kg de IgG de conejo a ratones de tipo salvaje y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>. Ambas isoformas 1 y 2 de TGFβ se neutralizaron *in vivo* e *in vitro* mediante este anticuerpo (Ng, C. M. et al. (2004) J Clin Invest 114, 1586-92; Neptune, E. R. et al. (2003) Nat Genet 33, 407-11).

La evaluación histológica y morfométrica reveló prevención de morfología muscular anormal en animales mutantes después de 2 meses de tratamiento con NAb de TGFβ, independientemente de la dosis usada (Figura 11a). No hubo ningún efecto sobre la morfología del músculo esquelético de tipo salvaje a cualquier dosis (datos no mostrados). Además, no se observó acumulación nuclear de pSmad2/3 ni tinción de periostina sarcolemal en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con NAb de TGFβ (Figura 11a). Estos datos demuestran una relación causal entre la señalización desregulada de TGFβ y el desarrollo de miopatía del músculo esquelético en un modelo de ratón de MFS.

La presencia de múltiples fibras atroficas y divididas en músculo esquelético de ratones deficientes en fibrilina-1 y pacientes con MFS sugiere regeneración muscular anormal y/o incompleta (Figura 11a, Figura 15d). Para investigar adicionalmente el mecanismo potencial mediante el cual TGFβ provoca el desarrollo de miopatía esquelética, se evaluó la respuesta del músculo esquelético a lesión inducida por veneno de serpiente cardiotoxina. El análisis de músculo esquelético de tipo salvaje 4 días después de la inyección de cardiotoxina reveló signos de numerosas fibras musculares regenerantes (Figura 11b). Por el contrario, el músculo esquelético de ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mostró retraso en la regeneración, y sólo fibras musculares dispersas recientemente formadas (Figura 11b).

A los 18 días después de la inyección de cardiotoxina, la regeneración muscular fue sustancial en ratones de tipo salvaje, mientras que los ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> demostraron múltiples fibras pequeñas con áreas focales de fibrosis, indicativo de una reparación muscular anormal (Figura 11b). La administración sistémica de NAb de TGFβ en el momento de la inyección de cardiotoxina, y a las dos semanas después de la inyección de cardiotoxina, mejoró significativamente la capacidad de regeneración muscular de ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>, como se muestra mediante el análisis histológico y morfométrico del músculo tibial anterior a los 4 y 18 días después de la lesión (Figura 11b). Todos los grupos de animales mostraron acumulación nuclear de pSmad2/3 y expresión sarcolemal de periostina 4 días después de la inyección de cardiotoxina. Estos hallazgos son consistentes con la observación previa de un incremento transitorio en la expresión de TGFβ1 y periostina en los primeros cinco días de regeneración muscular (Goetsch, S. C. et al. (2003) Physiol Genomics 14, 261-71). Por el contrario, la acumulación nuclear de pSmad2/3 y la expresión de periostina continuó en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> 18 días después de la lesión; esto no se observó en ratones de tipo salvaje ni en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con NAb de TGFβ (Figura 11b). Estos datos sugieren que la exageración y/o prolongación del pico fisiológico en la señalización de TGFβ que acompaña a la lesión y reparación muscular puede limitar la regeneración y culminar en miopatía.

Dada la incapacidad para repoblar suficientemente fibras musculares dañadas en respuesta a lesión, se investigó si la mayor señalización de TGFβ altera el comportamiento de células satélite, una población de células únicas del músculo esquelético. En el transcurso de la regeneración muscular, las células satélite salen de su estado en reposo normal y comienzan a proliferar. Después de varias rondas de proliferación, la mayoría de las células satélite se diferencian y se fusionan, ya sea para formar nuevas miofibras o para reparar fibras dañadas. El análisis de c-met, un marcador para células satélite en reposo, no reveló ninguna diferencia significativa en el número de células satélite en ratones de tipo salvaje (54 ± 8 células/campo) y ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (48 ± 7 células/campo) antes de la lesión (Figura 17a). Por el contrario, la evaluación inmunohistoquímica de M-cadherina (un marcador para células satélites proliferantes) a las 48 h después de la lesión inducida por toxina reveló menos células satélite teñidas positivamente en el músculo tibial anterior de ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (19 ± 4 células/campo) cuando se compara con ratones de tipo salvaje (38 ± 9 células/campo) o ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con NAb de TGFβ (36 ± 6 células/campo; p < 0,001) (Figura 17b). La expresión de miogenina, un factor regulador de miocitos que se sabe que

está implicado en la proliferación y diferenciación de células satélite (Jin, Y. et al. (2000) *Acta Neuropathol* (Berl) 99, 619-27), mostró una disminución similar en el músculo tibial anterior de ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> ( $42 \pm 7$  células/campo) 72 h después de la exposición a cardiotoxina, en comparación con ratones de tipo salvaje ( $63 \pm 7$  células/campo) o ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> tratados con NAb de TGFβ ( $59 \pm 6$  células/campo;  $p < 0,002$ ) (Figura 17b y c). Tomados en conjunto, estos hallazgos demuestran que la señalización aumentada de TGFβ provoca reparación muscular alterada al inhibir la proliferación y diferenciación de células satélite. Estos hallazgos pueden explicar tanto la miopatía congénita como la incapacidad durante toda la vida para incrementar la masa muscular en MFS.

Se investigó entonces si losartán, un antagonista del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1), que se ha mostrado que conduce a un antagonismo clínicamente relevante de TGFβ en otros estados mórbidos, incluyendo enfermedad renal crónica y cardiomiopatía (Lavoie, P. et al. (2005) *J Hypertens* 23, 1895-1903; Lim, D. S. et al. (2001) *Circulation* 103, 789-91), tiene un impacto sobre la arquitectura del estado estacionario y sobre la regeneración muscular en ratones deficientes en *Fbn1*. Losartán, un agente que se usa ampliamente para tratar hipertensión, tiene un perfil de tolerancia excepcional en todos los grupos de edad, y puede prevenir aneurisma aórtico en un modelo de ratón de MFS. El tratamiento a largo plazo (6 meses) con losartán normalizó totalmente la arquitectura muscular del estado estacionario en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (Figura 12). El rescate fenotípico se correlacionó con la abolición de la señalización de TGFβ en músculo esquelético maduro, y mejoró la función muscular *in vivo* (Figura 12, Figura 16a y b). Además, se encontró que la administración de losartán antes de la lesión inducida por cardiotoxina mejoró notablemente la regeneración muscular en ratones *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> (Figura 12).

Hay pruebas descriptivas de mayor actividad de TGFβ asociada con fibrosis en diversos trastornos musculares genéticos y adquiridos, y se ha mostrado que la administración de decorina (un antagonista de TGFβ) puede reducir la actividad de TGFβ y el contenido de colágeno en el diafragma de ratones *mdx* (Salvadori, C., et al. (2005) *Muscle Nerve* 31, 192-8; Gosselin, L. E. et al. (2004) *Muscle Nerve* 30, 645-53; Yamazaki M et al. (1994) *Am J Pathol.* 144, 221-226). Sin embargo, no se ha documentado una contribución patogenética de mayor actividad de TGFβ a regeneración muscular alterada en estas condiciones. Un mecanismo en la patogénesis de diversas miopatías degenerativas, incluyendo algunas formas de distrofia muscular, es una disminución en el comportamiento de células satélite y en la regeneración muscular a lo largo del tiempo. TGFβ surge como un mediador candidato atractivo de estos efectos. Como prueba de esto, se encontró acumulación nuclear de pSmad2/3 y expresión sarcolemal de periostina en músculo esquelético de ratones *mdx* deficientes en distrofina, un modelo de animal para distrofia muscular de Duchenne (Reimann, J. et al. (2000) *Neuromuscul Disord* 10, 276-82) (Figura 13a). Un factor complicador en la interpretación de estos datos es que la miostatina, otro miembro de la superfamilia de TGFβ, también se señala a través de la cascada de pSmad2/3 (Philip, B. et al. (2005) *Cell Signal* 17, 365-75; Zhu, X., et al. (2004) *Cytokine* 26, 262-72). Fuimos capaces de eliminar esta variable al mostrar un incremento continuado en pSmad2/3 nuclear y en la expresión de periostina en animales *nulos para miostatina/mdx* (Figura 13a). La miostatina es un regulador negativo de la actividad de las células satélites, y la pérdida de función provoca hipertrofia muscular significativa en animales y seres humanos. Se ha mostrado que el antagonismo de miostatina mejora el fenotipo muscular en ratones *mdx* deficientes en distrofina; sin embargo, en contraste con TGFβ, diversas líneas de pruebas han demostrado que la expresión de miostatina está disminuida en distrofia muscular, quizá como un componente de un intento fisiológico inadecuado de compensación. De este modo, aunque estrategias terapéuticas dirigidas al antagonismo de miostatina pueden proporcionar cierto beneficio al dirigirse a una ruta paralela, el antagonismo de TGFβ selecciona como diana una ruta que parece contribuir directamente a la patogénesis de la enfermedad.

Se ensayó el impacto de NAb de TGFβ y losartán sobre la capacidad regeneradora de ratones *mdx* de 9 meses. A los cuatro días después de la lesión, los ratones de tipo salvaje mostraron numerosas miofibras que expresan miosina neonatal, un marcador para la regeneración activa ( $689 \pm 19$  fibras positivas a miosina neonatal por músculo tibial anterior, Figura 13b). Los ratones *mdx* mostraron alteración significativa en esta respuesta, con sólo unas pocas fibras positivas a miosina neonatal ( $268 \pm 12$  fibras positivas a miosina neonatal por músculo tibial anterior) (Figura 13b). Notablemente, cuando se tratan con NAb de TGFβ o con losartán, los ratones *mdx* demostraron regeneración restaurada ( $556 \pm 22$  y  $513 \pm 14$  fibras positivas a miosina neonatal por músculo tibial anterior, respectivamente;  $p < 0,002$ ) (Figura 13b). Después de 18 días, los ratones de tipo salvaje mostraron regeneración completa, mientras que los ratones *mdx* mostraron grandes áreas de fibrosis tisular. Nuevamente, los ratones *mdx* tratados con NAb de TGFβ o con losartán mostraron reparación muscular mejorada con fibrosis reducida, como se evidencia por la expresión reducida de vimentina (Figura 13b).

A fin de demostrar que el beneficio fenotípico de la administración de losartán deriva de la inhibición de la cascada de señalización de TGFβ, se llevó a cabo un análisis inmunofluorescente de proteínas diana aguas abajo del receptor de angiotensina II tipo 1 (ATR1). Se ha mostrado recientemente que trombospondina-1 (TSP1) actúa como un mediador potente de activación de TGF-beta inducida por angiotensina II vía AT1R (Zhou Y, et al. (2006) *Biochem Biophys Res Commun.* 339, 633-641). Los ratones de tipo salvaje no expresaron cantidades significativas de TSP1 en músculo esquelético (Figura 14a). Por el contrario, se encontró una fuerte expresión sarcolemal de TSP1 en el diafragma y otros músculos de ratones *mdx*, mientras que los ratones *mdx* tratados con losartán mostraron una expresión enormemente reducida de TSP1 (Figura 14a). Además, los ratones *mdx* tratados no mostraron ninguna acumulación nuclear significativa de pSmad2 o expresión sarcolemal de periostina (Figura 14a). Se ha sugerido que la activación del receptor de AT1 induce ruptura del músculo esquelético al incrementar la

proteólisis mediada por ubiquitina y la inhibición subsiguiente de la síntesis proteica (Delafontaine P y M., A. (2006) Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 9, 220-224). Se ha mostrado que la inhibición de la actividad del proteasoma y la proteólisis mediada por ubiquitina en ratones *mdx* está asociada con mayor expresión de distrofina y otros miembros del complejo de distrofina-glicoproteína (Assereto S et al. (2006) Am J Physiol Cell Physiol. 290, C577-582). Por lo tanto, se investigó la expresión de distrofina,  $\alpha$ -dystroglicano y R-sarcoglicano en ratones *mdx* tratados con losartán y no tratados. Como se esperaba, los ratones *mdx* tratados con placebo mostraron ausencia de distrofina, y una reducción significativa de la expresión sarcolemal de  $\alpha$ -dystroglicano y R-sarcoglicano (Figura 18a). Se observaron hallazgos idénticos en ratones *mdx* tratados con losartán, sugiriendo que losartán no tiene ningún impacto sobre la proteólisis mediada por ubiquitina. Juntos, estos datos demuestran que el tratamiento con losartán inhibe la cascada de señalización de TGF $\beta$ , y no impacta sobre las rutas mediadas por proteólisis alternativas.

A continuación se determinó si el tratamiento a largo plazo con losartán tiene un impacto beneficioso sobre la arquitectura del estado estacionario y sobre la función muscular *in vivo* de ratones *mdx*. El tratamiento con losartán comenzó en ratones *mdx* a las 6 semanas de edad, un tiempo de necrosis muscular activa asociada con ciclos de degeneración y regeneración (Cohn, R. D. et al. (2002) Cell 110, 639-48). Después de 6 meses de tratamiento con losartán, el análisis de diversos grupos musculares, incluyendo el diafragma (que es el músculo esquelético más gravemente afectado en ratones *mdx*) (Salvadori, C., et al. (2005) Muscle Nerve 31, 192-8; Cohn, R. D. et al. (2002) Cell 110, 639-48) y el gastrocnemio, reveló atenuación significativa de la progresión de la enfermedad en ratones *mdx* (Figura 14b). La evaluación de fibrosis tisular en el diafragma demostró una disminución hasta  $18\% \pm 4$  fibrosis de área muscular total en ratones tratados frente a  $32\% \pm 5$  en ratones *mdx* tratados con placebo (Figura 14b,  $P < 0,03$ ). Se detectó una disminución similar en la cantidad de fibrosis tisular en el músculo gastrocnemio de ratones *mdx* tratados con losartán (Figura 14b). Además, se encontró un mayor porcentaje de fibras musculares que contienen núcleos localizados centralmente en el diafragma y gastrocnemio de ratones tratados con losartán (Figura 14b), un indicador indirecto de mayor capacidad regenerativa que puede estar debajo del fenotipo mejorado. El análisis de los niveles de creatinina cinasa (CK) en el suero, un indicador de fuga y destrucción de la membrana sarcolemal, no mostró diferencias significativas entre ratones *mdx* tratados frente a los no tratados (Figura 18b). Esto no es sorprendente ya que no se esperaba que losartán estabilizase la membrana sarcolemal o protegiese las fibras musculares del daño inducido por contracción.

Para evaluar adicionalmente el beneficio funcional del tratamiento con losartán en ratones *mdx*, se llevó a cabo el ensayo de fuerza de agarre de las extremidades anteriores y de las extremidades posteriores en ratones machos y hembras. El ensayo de fuerza de agarre en ratones se ha usado previamente como un método para monitorizar datos de función muscular *in vivo* en modelos de distrofia muscular, enfermedades de neuronas motoras (ratón wobbler, ratones deficientes en SOD-1), y síndrome de Down (Connolly AM, et al. (2001) Neuromuscul Disord. 11:703-12; Payne ET et al. (2006) Muscle Nerve. 33, 66-77; Hantai D et al. (1995) J Neurol Sci. 129, 122-126; Costa AC et al. (1999) Physiol Behav. 68, 211-220). Después de 6 meses de tratamiento, los ratones *mdx* machos y hembras tratados con losartán mostraron una mayor fuerza de agarre de las extremidades anteriores y de las extremidades posteriores cuando se comparan con ratones *mdx* no tratados (Figura 14c; Figura 18c).

Además, los ratones tratados con losartán mostraron fatiga muscular significativamente menor en respuesta a la exposición repetitiva. A fin de correlacionar nuestros hallazgos de mejora funcional con la morfología muscular, se evaluó la histología de los músculos extensor común de los dedos, sóleo y tibial anterior. Como se observa en los músculos del diafragma y gastrocnemio, los ratones *mdx* tratados con losartán presentaron una arquitectura del estado estacionario mejorada cuando se comparan con el grupo tratado con placebo (Figura 18c). La combinación de arquitectura muscular mejorada, capacidad regenerativa así como fuerza y menor fatiga en un modelo de ratón genéticamente definido de distrofia muscular de Duchenne resalta el potencial terapéutico de losartán para el tratamiento de este trastorno.

Se ha mostrado que la señalización excesiva de TGF $\beta$  lleva a patología en múltiples tejidos en el síndrome de Marfan, no obstante por mecanismos diferentes. En músculo esquelético, se muestra que la actividad creciente de TGF $\beta$  no lleva simplemente a fibrosis tardía, como se infiere previamente, sino de forma más importante, impide la respuesta fisiológica de células satélite para generar músculo en múltiples formas genéticamente definidas de miopatía, un proceso esencial para la conservación de la arquitectura y comportamiento musculares. Aunque losartán no aborda la fragilidad muscular subyacente en ratones *mdx*, las observaciones de una mejora duradera en la regeneración y función musculares en este modelo de ratón apoya la hipótesis de que losartán mejorará la calidad de vida y retrasará la muerte en pacientes con distrofia muscular de Duchenne.

### **Ejemplo 3: Losartán, un antagonista de AT1, previene aneurisma aórtico en un modelo de ratón de síndrome de Marfan**

Se buscó determinar el papel de TGF- $\beta$  en aneurisma aórtico asociado a MFS, que es la manifestación principal potencialmente mortal de síndrome de Marfan. Se estudiaron ratones heterocigotos para un alelo de *Fbn1* que codifica una sustitución de cisteína, Cys1039G1y (C1039G), en un dominio de fibrilina-1 semejante al factor de crecimiento epidérmico (*Fbn1*C1039G/+) (C. M. Ng et al. (2004) J. Clin. Invest. 114, 1586; D. P. Judge et al. (2004) J. Clin. Invest. 114, 172; K. B. Jones et al. (2005) Spine 30, 291). Este mutante representa la clase más habitual de mutación que provoca MFS. La raíz aórtica en ratones *Fbn1*C1039G/+ sufre dilatación progresiva, evidente tan pronto como 2 semanas de edad. A las 7 semanas, la raíz aórtica en los ratones mutantes es mayor que aquella en

ratones de tipo salvaje ( $1,82 \pm 0,14$  mm frente a  $1,59 \pm 0,11$  mm, respectivamente;  $P < 0,05$ ). Esta diferencia de tamaños se hace más pronunciada con la edad (raíz aórtica a los 8 meses,  $2,47 \pm 0,33$  mm frente a  $1,82 \pm 0,11$  mm;  $P < 0,0001$ ).

El análisis histológico de ratones Fbn1C1039G/+ de 14 semanas reveló engrosamiento aberrante de la media aórtica, con fragmentación y desorganización de fibras elásticas. Además, los ratones Fbn1C1039G/+ mostraron mayor deposición de colágeno, que es un marcador indirecto de la mayor señalización de TGF- $\beta$  (P. Rossi et al. (1988) Cell 52, 405; W. Schlumberger (1991) Arterioscler. Thromb. 11, 1660). La fosforilación y translocación nuclear subsiguiente de Smad2 (pSmad2), que se inducen por la señalización de TGF- $\beta$  (C. H. Heldin et al. (1997) Nature 390, 465), están notablemente incrementadas en la media aórtica de ratones Fbn1C1039G/+ con respecto a ratones de tipo salvaje. Se han observado cambios similares en muestras aórticas derivadas de pacientes con MFS (L. Loeys et al. (2005) Nat. Genet. 37, 275).

Para investigar si la señalización excesiva de TGF- $\beta$  desempeña un papel etiológico en el agrandamiento progresivo de la raíz aórtica, se trataron ratones postnatalmente con NAb de TGF- $\beta$  tras el establecimiento de aneurisma de la raíz aórtica (Figura 19). El tratamiento mediante inyección intraperitoneal se comenzó a las 7 semanas de edad, y se continuó durante 8 semanas. Los ratones recibieron NAb de TGF- $\beta$  de dosis baja (1 mg/kg de peso corporal; Figura 19, C y G), NAb de TGF- $\beta$  de dosis alta (10 mg/kg; Figura 19, D y H), o placebo (10 mg/kg de IgG de conejo; Figura 19, B y F), cada 2 semanas. Los análisis histológicos revelaron fragmentación reducida de las fibras elásticas y señalización reducida de TGF- $\beta$  en la media aórtica de ratones tratados con NAb de TGF- $\beta$ , con respecto al grupo de placebo (Figura 18A a H). En seres humanos con MFS, el diámetro y velocidad de agrandamiento de la raíz aórtica son directamente proporcionales al riesgo de disección aórtica potencialmente mortal (V. L. Gott et al. (1999) N. Engl. J. Med. 340, 1307).

Los ecocardiogramas revelaron que el diámetro de la raíz aórtica en el valor inicial en los ratones de tipo salvaje ( $1,57 \pm 0,05$  mm) fue más pequeño que aquel en los tres brazos de tratamiento de Fbn1C1039G/+ [placebo,  $1,75 \pm 0,15$  mm; NAb (10 mg/kg),  $1,80 \pm 0,11$  mm; NAb (1 mg/kg),  $1,86 \pm 0,15$  mm;  $P < 0,0001$  para cada brazo de tratamiento con respecto al tipo salvaje]. No hubo diferencia en la velocidad de crecimiento de la raíz aórtica, según se evaluó mediante ecocardiogramas llevados a cabo después de 8 semanas de tratamiento, entre ratones de tipo salvaje y cualquiera de los grupos de tratamiento con NAb de TGF- $\beta$  ( $P = 0,11$ ). Por el contrario, la velocidad de crecimiento de la raíz aórtica en los ratones tratados con placebo fue mayor que aquella en ratones de tipo salvaje ( $P < 0,0001$ ) o ratones tratados con NAb ( $P < 0,03$ , Figura 19I). Después de 8 semanas, el grosor de la pared aórtica en ratones Fbn1C1039G/+ tratados con NAb fue indistinguible de aquel en ratones de tipo salvaje no tratados ( $P = 0,91$ ) y menor que aquel en el grupo de placebo ( $P < 0,01$ , Figura 19J). La arquitectura de la pared aórtica estaba alterada en ratones Fbn1C1039G/+ con respecto a ratones de tipo salvaje ( $P < 0,0001$ ), pero mejorada en ratones mutantes tratados con NAb ( $P < 0,001$ , Figura 19K). Estos datos muestran que la señalización excesiva de TGF- $\beta$  contribuye a la formación de aneurisma aórtico en un modelo de ratón de MFS, y que el antagonismo de TGF- $\beta$  representa una estrategia de tratamiento productiva.

Nos interesamos en losartán, un antagonista del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1), no sólo debido a que reduce la tensión arterial – un efecto deseable en pacientes con aneurisma aórtico –, sino también debido a que conduce a antagonismo de TGF- $\beta$  en modelos de animales de insuficiencia renal crónica y cardiomiopatía (P. Lavoie et al. (2005) J. Hypertens. 23, 1895; D. S. Lim et al. (2001) Circulation 103, 789). Usando un protocolo de administración prenatal en nuestro modelo de ratón, se comparó la eficacia de losartán con la de propranolol, que es representativo de agentes bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos ampliamente usados en pacientes con MFS para ralentizar la velocidad de crecimiento aórtico (J. Shores (1994) N. Engl. J. Med. 330, 1335). Las dosis de losartán y propranolol se valoraron para lograr efectos hemodinámicos comparables in vivo, incluyendo una disminución de 15 a 20% en la frecuencia cardíaca y una disminución de 10 a 20% en la tensión arterial en ambos grupos.

Ratones Fbn1C1039G/+ preñados recibieron losartán (0,6 g/litro), propranolol (0,5 g/litro) o placebo en el agua de beber, comenzando a las 2 semanas de gestación. El tratamiento de las madres continuó durante la lactancia, y se mantuvo en las crías después del destete. Los ratones se sacrificaron a los 10 meses. Se observó fragmentación de fibras elásticas en ratones tratados tanto con placebo como con propranolol, pero no en ratones tratados con losartán (Figura 20, A a D). El grosor promedio de la pared aórtica para animales de tipo salvaje no tratados fue más pequeño que aquel en ratones Fbn1C1039G/+ tratados con placebo ( $P < 0,0001$ ), pero fue indistinguible de aquel en ratones Fbn1C1039G/+ tratados con losartán ( $P = 0,24$ , Figura 20E). El grosor de la pared aórtica en los ratones tratados con propranolol fue indistinguible de aquel en el grupo de placebo ( $P = 0,19$ ). Igualmente, la arquitectura de la pared aórtica se normalizó en animales Fbn1C1039G/+ tratados con losartán con respecto al grupo de placebo ( $P < 0,0001$ ) pero no se vio influido por propranolol ( $P = 0,16$ , Figura 20F). Hubo una notable dilatación aórtica en los ratones mutantes tratados con placebo y con propranolol, mientras que los ratones mutantes tratados con losartán fueron indistinguibles de las crías de camada de tipo salvaje.

Debido a que MFS se diagnostica típicamente después del nacimiento, y debido a que el uso de antagonistas de AT1 está contraindicado durante el embarazo (S. G. Spence et al. (1995) Teratology 51, 367), se investigó si losartán podría atenuar o prevenir el crecimiento anormal de la raíz aórtica si el tratamiento se iniciaba postnatalmente, después del establecimiento de aneurismas aórticos. A las 7 semanas de edad, tras la documentación



ecocardiográfica de aneurisma, los ratones Fbn1C1039G/+ recibieron placebo, propranolol (0,5 g/litro), o losartán (0,6 g/litro) en su agua de beber. Los ecocardiogramas del valor inicial no revelaron diferencias en el tamaño de la raíz aórtica entre ninguno de los grupos de tratamiento para ratones Fbn1C1039G/+ (placebo  $1,83 \pm 0,11$  mm, propranolol  $1,92 \pm 0,27$  mm, losartán  $1,84 \pm 0,08$  mm, respectivamente;  $P = 0,5$ ). Sin embargo, antes del tratamiento, el diámetro aórtico en ratones Fbn1C1039G/+ fue siempre mayor que en ratones de tipo salvaje no tratados ( $1,59 \pm 0,11$  mm;  $P < 0,002$ ).

Se obtuvieron tres medidas independientes de la raíz aórtica para cada ratón cada 2 meses durante los 6 meses de tratamiento. Los ratones se sacrificaron a los 8 meses de edad. En contraste con propranolol o placebo, el tratamiento con losartán previno la fragmentación de fibras elásticas (Figura 21, A a D), y cortó la señalización de TGF- $\beta$  en la media aórtica, como se evidencia por una acumulación nuclear reducida de pSmad2 (Figura 21, E a H). La velocidad de crecimiento de la raíz aórtica durante este período fue menor en los ratones de tipo salvaje que en los ratones Fbn1C1039G/+ tratados con placebo ( $P < 0,0001$ , Figura 21I). Aunque los ratones Fbn1C1039G/+ tratados con propranolol mostraron una velocidad más lenta de crecimiento de la raíz aórtica que lo que lo hicieron los animales tratados con placebo ( $P < 0,001$ ), esta velocidad de crecimiento siguió siendo mayor que aquella en ratones de tipo salvaje no tratados ( $P < 0,04$ ).

Por el contrario, la velocidad de crecimiento de la raíz aórtica en ratones Fbn1C1039G/+ tratados con losartán fue indistinguible de aquella en el grupo de tipo salvaje ( $P = 0,55$ , Figura 21I). Además, el diámetro absoluto de la raíz aórtica al final del tratamiento fue similar en los ratones Fbn1C1039G/+ tratados con losartán y en las crías de camada de tipo salvaje no tratadas ( $P = 0,32$ ). El propranolol no tuvo efecto discernible sobre el grosor de la pared aórtica o la arquitectura de las fibras elásticas cuando se compara con placebo; por tanto, su efecto beneficioso está limitado a la ralentización de la velocidad de crecimiento de la raíz aórtica. Por el contrario, los ratones Fbn1C1039G/+ tratados con losartán mostraron mejora en los tres parámetros comparados con los ratones tratados con placebo, con normalización total con respecto a ratones de tipo salvaje (Figura 21, I a K). Se concluye que el bloqueo  $\beta$ -adrenérgico con propranolol disminuye la velocidad de crecimiento aórtico en este modelo de MFS, pero no previene el deterioro progresivo de la arquitectura de la pared aórtica o la dilatación aórtica anormal continuada. Por el contrario, el bloqueo de AT1 con losartán parece lograr una corrección total de las anomalías fenotípicas en la pared aórtica de ratones Fbn1C1039G/+.

En un estudio previo, se demostró que una raza diferente de ratones homocigotos para alelos de Fbn1 hipomórficos mostró ensanchamiento del espacio aéreo distal debido al fallo de la tabicación alveolar (E. R. Neptune et al. (2003) Nat. Genet. 33, 407). Esta anomalía se correlacionó con una mayor señalización de TGF- $\beta$ , y se evitó mediante administración prenatal de NAb de TGF- $\beta$ . Para determinar si losartán puede mejorar este fenotipo pulmonar cuando se administra postnatalmente – un asunto de relevancia específica para pacientes con MFS –, ratones Fbn1C1039G/+ se trataron con losartán, comenzando a las 7 semanas de edad. Después de 6 meses de tratamiento, los ratones Fbn1C1039G/+ tratados con placebo mostraron ensanchamiento del espacio aéreo distal debido a tabicación alveolar alterada (intercepto lineal medio  $84,3 \pm 15$   $\mu$ m) con respecto a ratones de tipo salvaje tratados con placebo (intercepto lineal medio  $41,3 \pm 5$   $\mu$ m,  $P < 0,001$ ; Figura 22). Los ratones Fbn1C1039G/+ tratados con losartán mostraron una reducción en el calibre del espacio aéreo distal con respecto a animales Fbn1C1039G/+ tratados con placebo (intercepto lineal medio  $53,9 \pm 12$   $\mu$ m,  $P < 0,001$ ; Figura 22).

El antagonismo de AT1 puede lograr protección superior con respecto a los agentes bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos en virtud de la mayor disminución del estrés hemodinámico que se impone sobre una pared aórtica estructuralmente deficiente, en oposición a un mecanismo relevante para la señalización de TGF- $\beta$  u otros sucesos patogenéticos moleculares. Cuatro líneas de pruebas arguyen frente a esta hipótesis. En primer lugar, las dosis de losartán y propranolol se valoraron para lograr efectos hemodinámicos comparables. En segundo lugar, el antagonismo aislado de la señalización de TGF- $\beta$  con NAb proporciona protección similar. En tercer lugar, el análisis de la tinción nuclear de pSmad2 reveló que losartán antagoniza la señalización de TGF- $\beta$  en la pared aórtica de ratones Fbn1C1039G/+, un suceso observado en ratones tratados con NAb pero no en ratones tratados con propranolol (Figura 21, G y H). En cuarto lugar, se demuestra aquí que losartán puede mejorar las manifestaciones de la enfermedad en los pulmones (Figura 22), un suceso que no se puede relacionar de forma plausible con hemodinámica mejorada.

El mecanismo mediante el cual el bloqueo de AT1 antagoniza la señalización de TGF- $\beta$  sigue estando completamente sin elucidar. La señalización a través del receptor de AT1 aumenta la expresión de ligandos y receptores de TGF- $\beta$ , y también induce la expresión de trombospodina-1, un potente activador de TGF- $\beta$  (A. D. Everett (1994) Hypertension 23, 587; G. Wolf et al. (1999) J. Mol. Med. 77, 556; N. Fukuda et al. (2000) Am. J. Hypertens. 13, 191; T. Naito et al. (2004) Am. J. Physiol. Renal Physiol. 286, F278). En la pared de los vasos, la señalización de AT1 estimula la proliferación de células del músculo liso vasculares (VSMCs) y la fibrosis de la pared de los vasos (E. G. Nabel et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 10759), aunque esto puede depender del contexto. En sistemas aviares, VSMCs derivadas de la cresta neural y de mesodermo (N- y M-VSMCs, respectivamente) responden diferentemente a TGFP- $\beta$ 1, observándose proliferación celular y fibrosis en las primeras, y observándose inhibición del crecimiento en las últimas (P. F. Gadson Jr. et al. (1997) Exp. Cell Res. 230, 169; S. Topouzis et al. (1996) Dev. Biol. 178, 430). Esta respuesta diferencial puede explicar la predisposición particular de la raíz de la aorta – un segmento vascular enriquecido en N-VSMCs – a sufrir dilatación y disección en MFS. La raíz de la arteria pulmonar también está enriquecida en N-VSMCs, y muestra habitualmente dilatación en

MFS a pesar de la presión reducida en la circulación pulmonar (G. J. Nollen et al. (2002) *Heart* 87, 470).

Dado que la señalización a través del receptor de angiotensina II tipo 2 (AT2) antagoniza muchos de los efectos que son promovidos por la señalización de AT1 (E. S. Jones et al. (2004) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37, 1023), el antagonismo de AT1 específico puede ser preferible al bloqueo de AT1/AT2 dual logrado con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). Consistente con esta hipótesis, Daugherty y colegas encontraron que la formación de aneurismas aórticos abdominales inducidos por angiotensina II se podría prevenir en ratones apoE<sup>-/-</sup> mediante el tratamiento con antagonistas de AT1, pero estaba acelerado tanto en frecuencia como en gravedad con el tratamiento con un bloqueador de AT2 selectivo (A. Daugherty et al. (2001) *Br. J. Pharmacol.* 134, 865). Nagashima y colegas observaron incremento de apoptosis en explantes de pared de vasos y VSMCs cultivadas procedentes de individuos con MFS, y mostraron que el bloqueo de AT2 pero no de AT1 redujo este efecto (H. Nagashima et al. (2001) *Circulation* 104, 1282). Estos ejemplos se obtuvieron de aneurismas en el intervalo de 7 a 9 cm, mucho más allá del umbral actual para cirugía de la raíz aórtica. En nuestro modelo de ratón, no hemos detectado apoptosis potenciada en etapas tempranas e intermedias de aneurisma aórtico. La angiotensina II también estimula la señalización dependiente de Smad2 y fibrosis en VSMCs de una manera independiente de TGF- $\beta$ , y este efecto se puede prevenir mediante el bloqueo selectivo de AT1 (J. Rodríguez-Vita et al. (2005) *Circulation* 2059). De este modo, aunque la señalización dependiente de ligandos de TGF- $\beta$  parece crítica para la patogénesis de aneurisma aórtico en MFS, el antagonismo de una cascada de señalización mediada por pSmad2 paralela puede contribuir a la protección proporcionada por losartán.

La demostración de la señalización en exceso de TGF- $\beta$  en la pared aórtica de pacientes con otros síndromes de aneurisma aórtico, incluyendo síndrome de Loeys-Dietz (provocado por mutaciones en TGFBR1 o TGFBR2) y síndrome de tortuosidad arterial (provocado por mutaciones en GLUT10), sugiere que losartán puede ser de amplia relevancia en el tratamiento de vasculopatías humanas (B. L. Loeys et al. (2005) *Nat. Genet.* 37, 275).

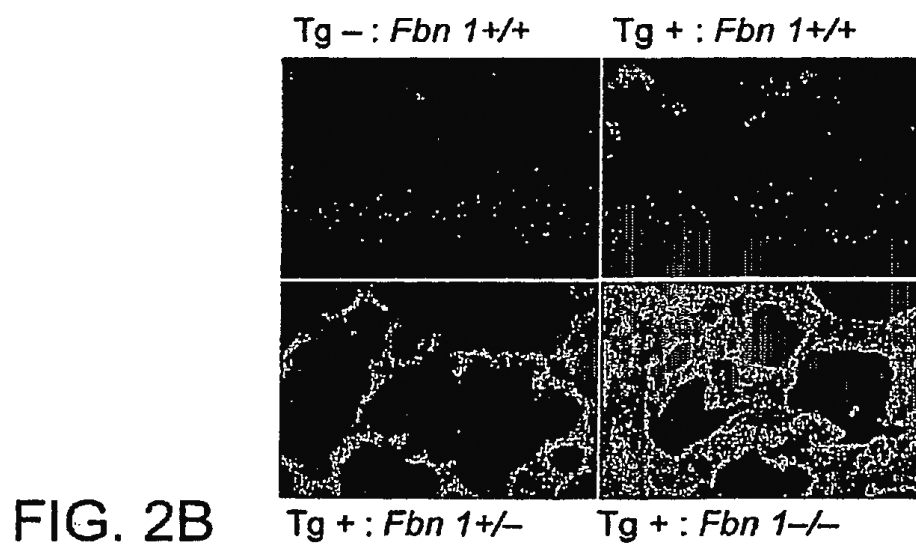
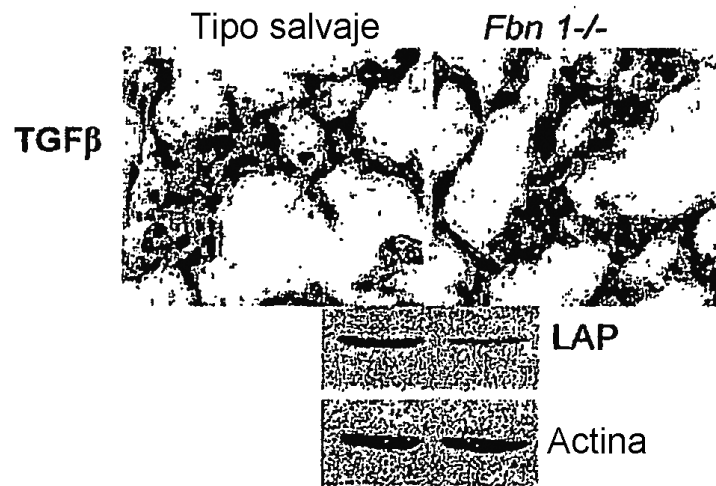
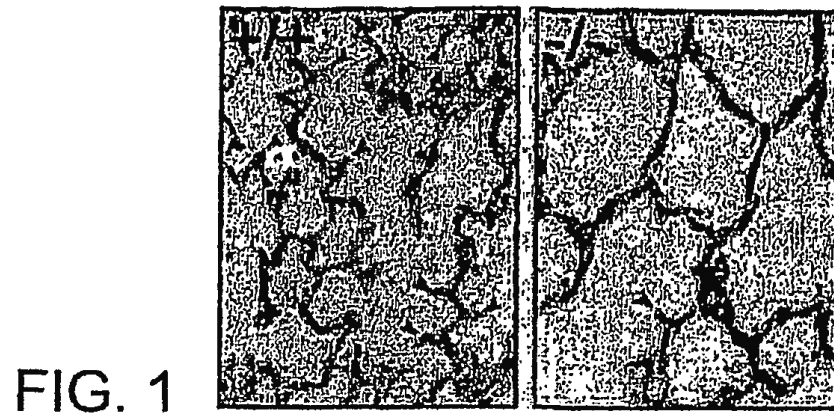
Losartán está actualmente en uso clínico ampliamente extendido para el tratamiento de hipertensión y prevención de apoplejías tanto en adultos como en niños. Dado su excepcional perfil de tolerancia en todos los grupos de edad, se concluye que se indica un ensayo clínico prospectivo en pacientes con MFS. Además, este estudio es ilustrativo de la promesa de que la identificación potenciada de genes de enfermedad en la era de secuenciación post-genómica tendrá un impacto pronunciado sobre la medicina. El descubrimiento de genes de enfermedad es más que una primera etapa obligada en el proceso de obtención de modelos de animales, interrogación de la patogénesis, y derivación de mecanismos de la enfermedad no anticipados y estrategias de tratamiento racionales.

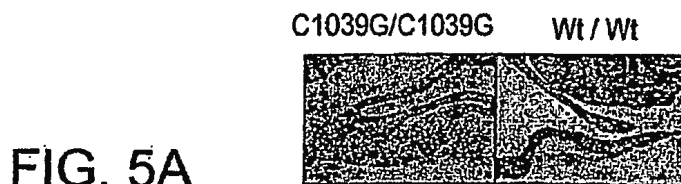
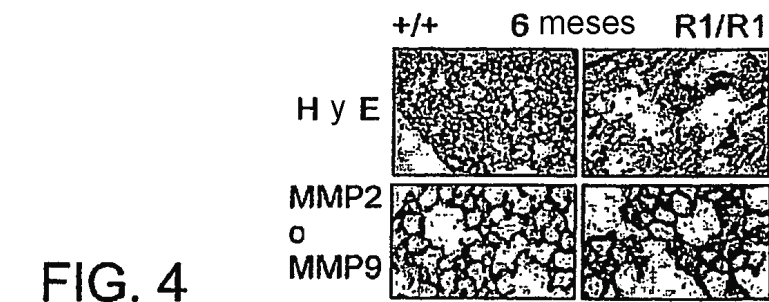
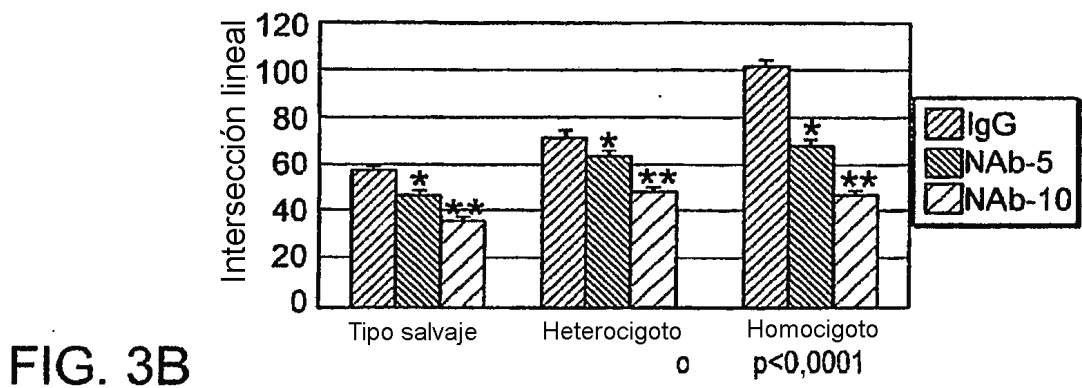
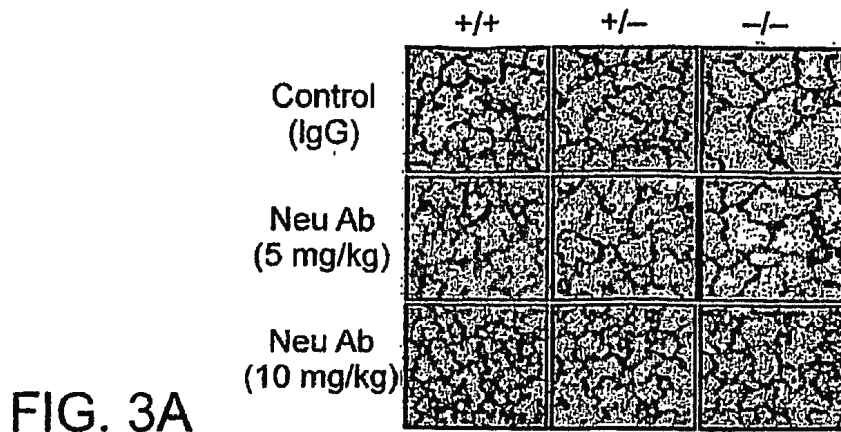
### Equivalentes

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de averiguar usando una experimentación no más allá de la habitual, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita aquí. Tales equivalentes están destinados a estar englobados por las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Losartán para uso en el tratamiento de síndrome de Marfan.
2. Losartán para uso como en la reivindicación 1, en el que se trata un aneurisma aórtico.
3. Losartán para uso como en la reivindicación 1, en el que se trata enfermedad de la válvula.
- 5 4. Losartán para uso como en la reivindicación 1, en el que se trata prolapso de la válvula mitral.
5. Losartán para uso como en la reivindicación 1, en el que se trata enfisema.
6. Losartán para uso como en la reivindicación 1, en el que se trata miopatía.
7. Losartán para uso como en la reivindicación 1, en el que se trata escoliosis.
8. Losartán para uso como en la reivindicación 1, en el que se trata enfermedad ocular.
- 10 9. Losartán para uso como en la reivindicación 1, en el que se trata tabicación alveolar.
10. Losartán para uso como en la reivindicación 1, en el que se rescatan la regeneración y arquitectura musculares.
11. Uso de losartán en la preparación de un medicamento para el tratamiento de síndrome de Marfan.





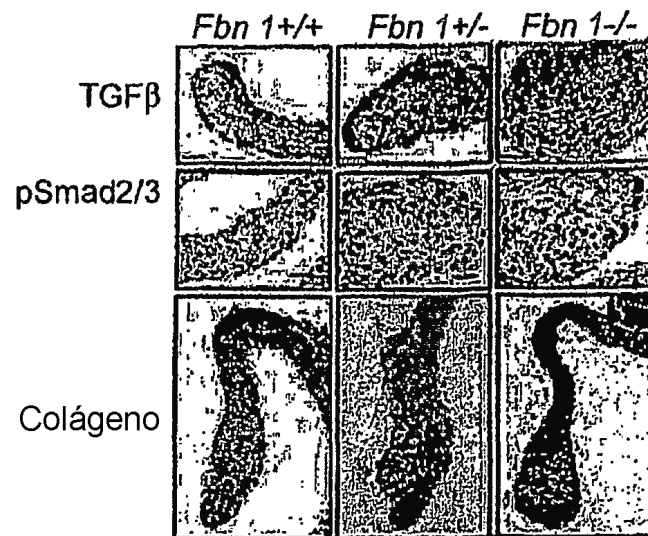


FIG. 5B

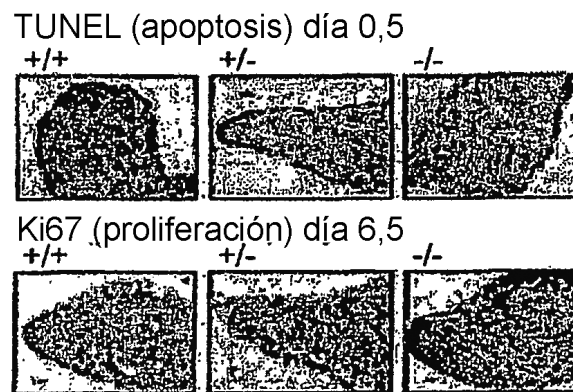


FIG. 5C

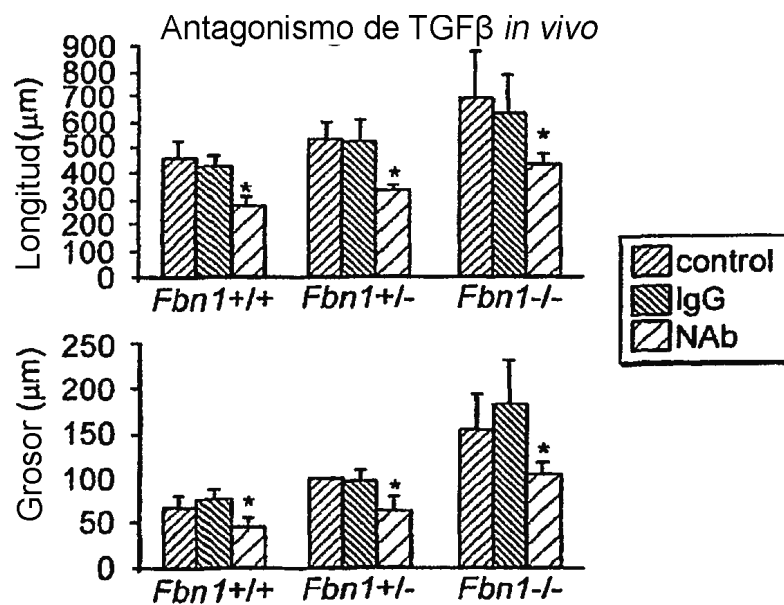
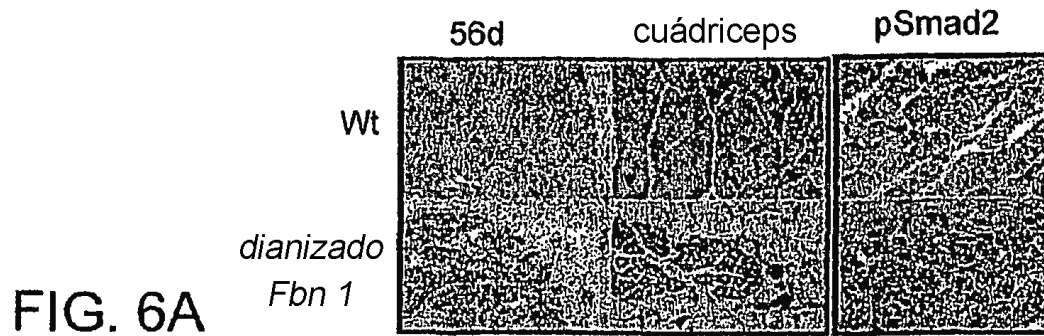
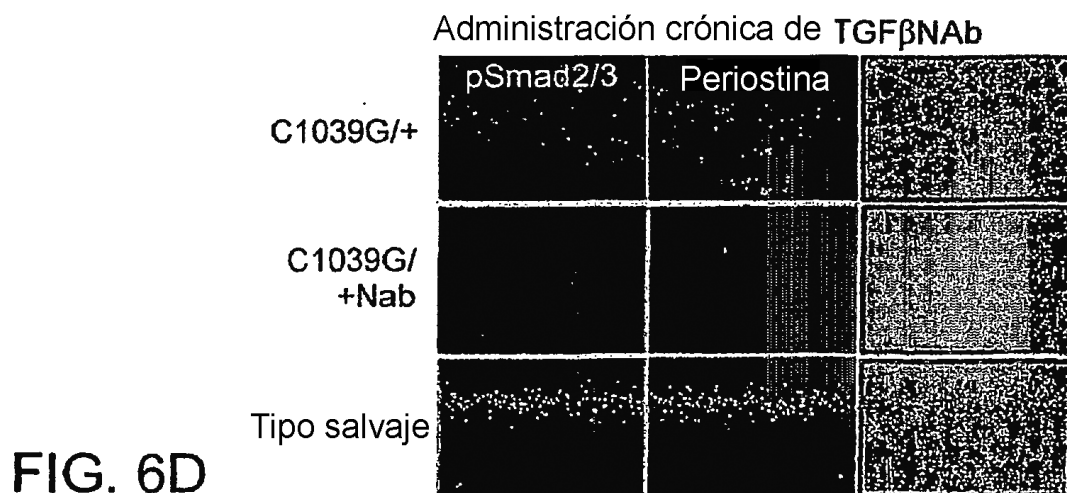
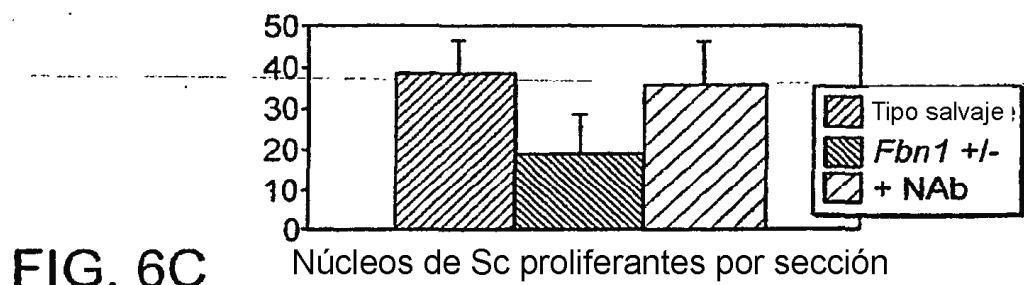
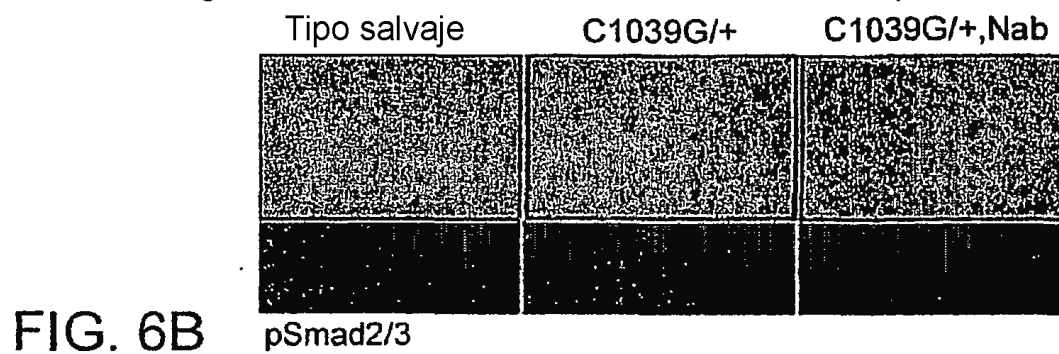


FIG. 5D



La regeneración fallida es rescatada mediante TGF $\beta$ NAb



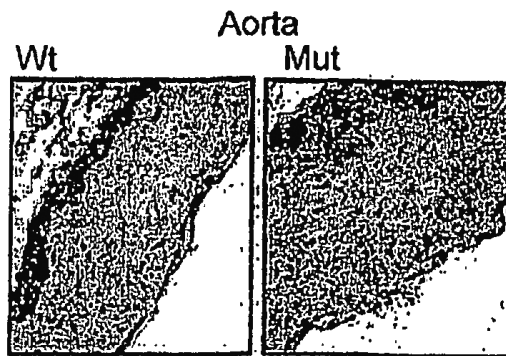


FIG. 7

Ecocardiografía a los 4 meses

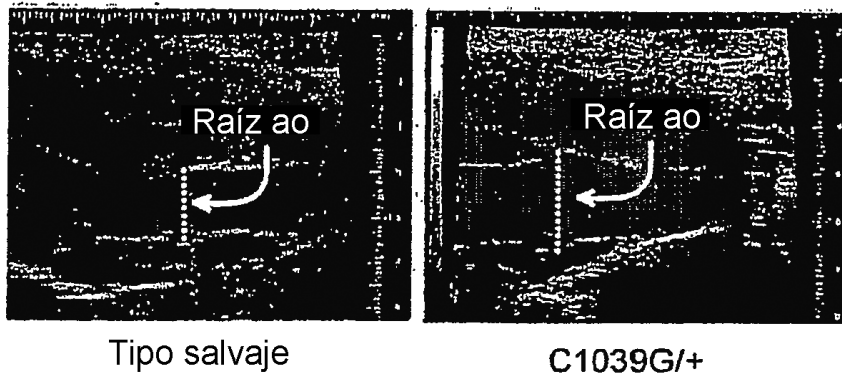


FIG. 8A

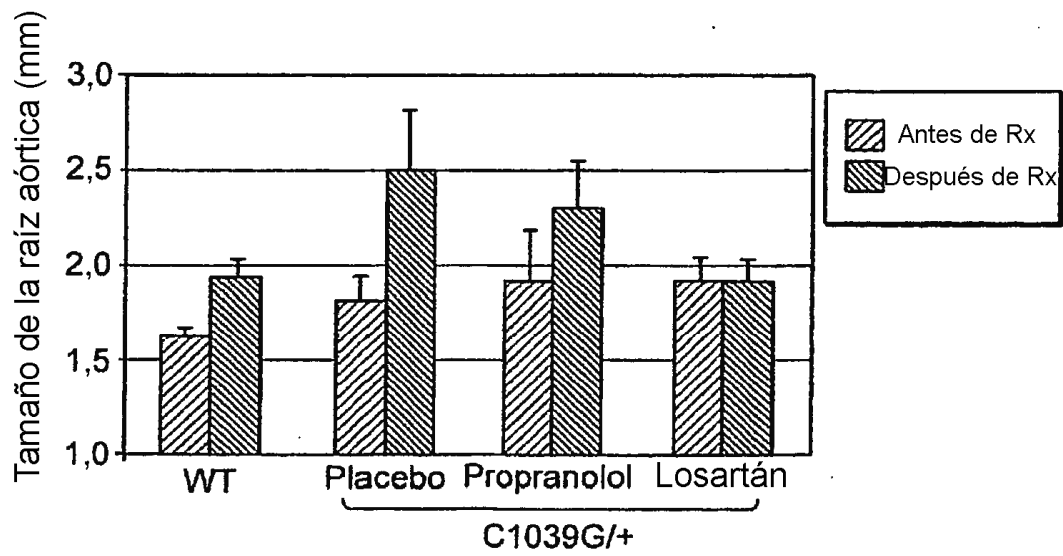


FIG. 8B



Efectos de losartán sobre la arquitectura de la pared aórtica

Tipo salvaje no tratado	C1039G/+ no tratado	C1039G/+ propranolol	C1039G/+ dosis baja losartán	C1039G/+ dosis alta losartán
----------------------------	------------------------	-------------------------	------------------------------------	------------------------------------

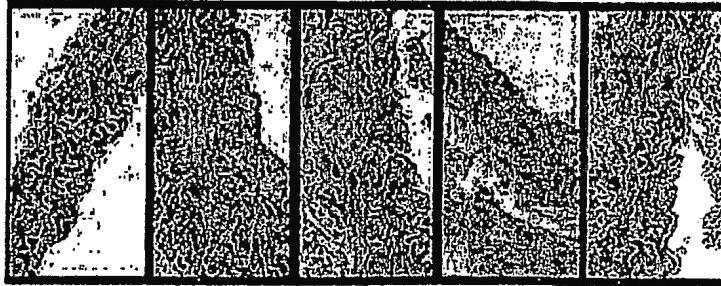


FIG. 8C

\*Dosis valoradas para que tengan efectos hemodinámicos idénticos

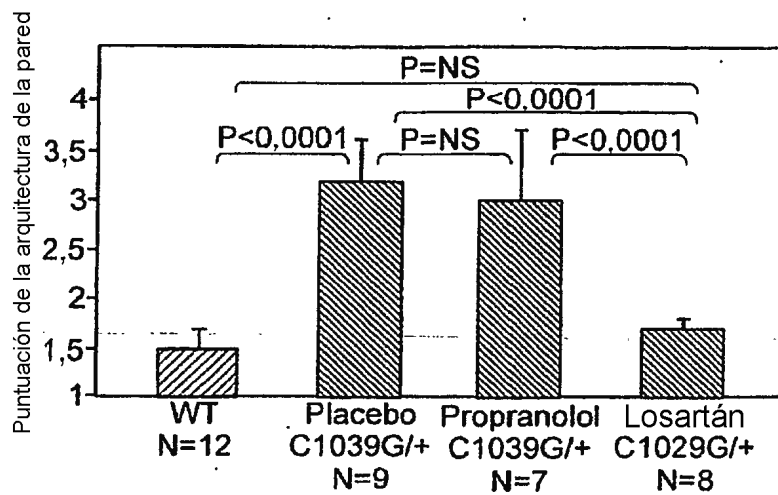


FIG. 8D

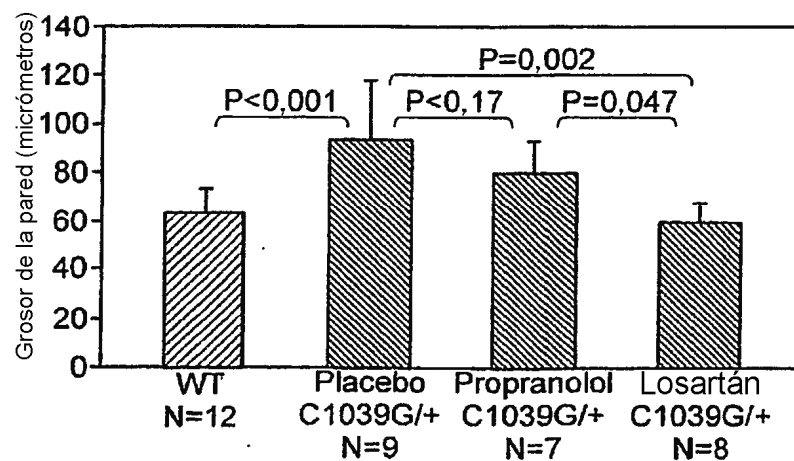
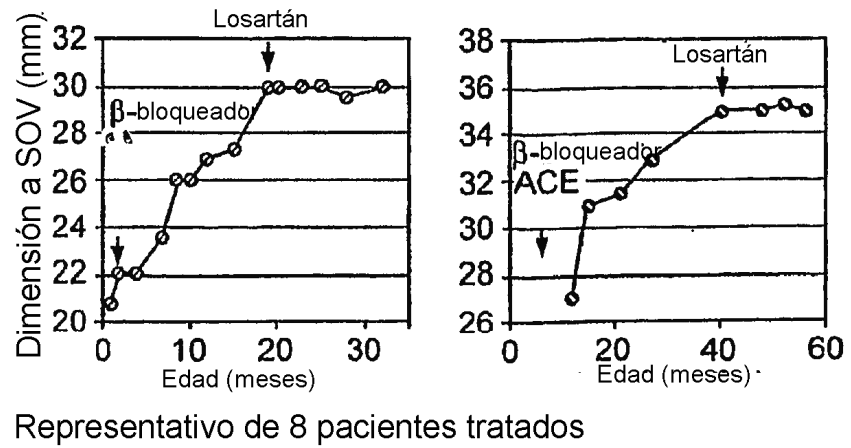


FIG. 8E

FIG. 8F



Rescate de la pared aórtica con anticuerpo neutralizante (NAb) de TGF( $\beta$ )

FIG. 8G

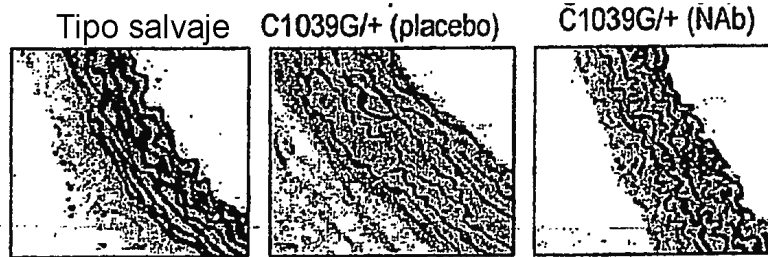
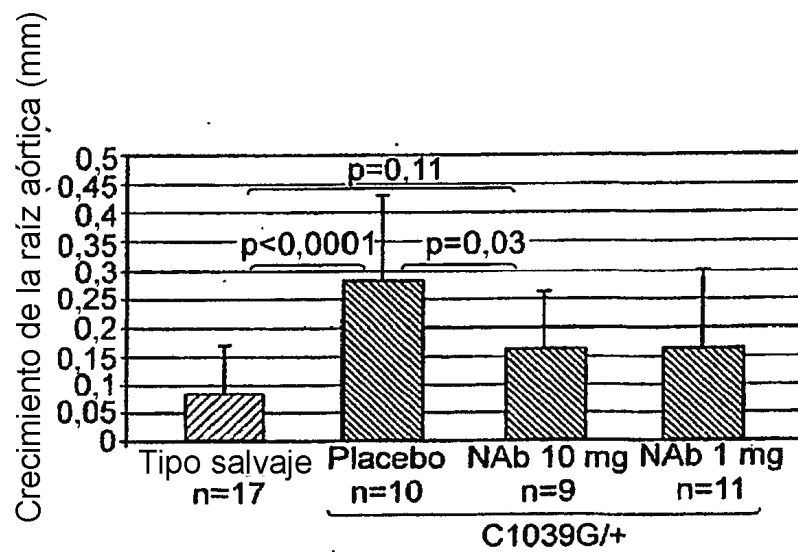


FIG. 8H



Tratamiento de enfermedad pulmonar con losartán

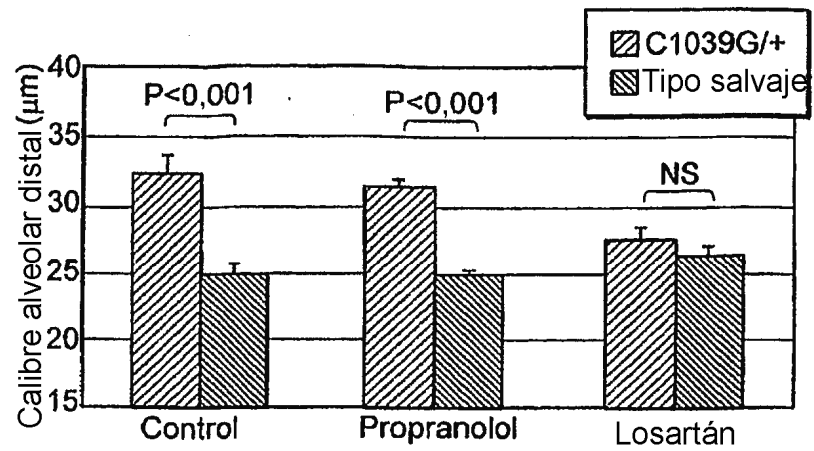


FIG. 9A

Tratamiento de miopatía con losartán  
Tipo salvaje C1039G/+ C1039G/+(Losartán)

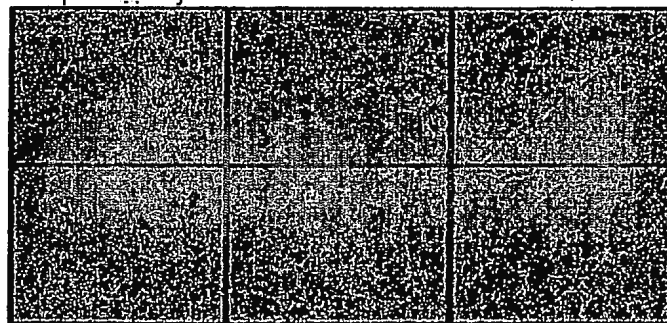


FIG. 9B

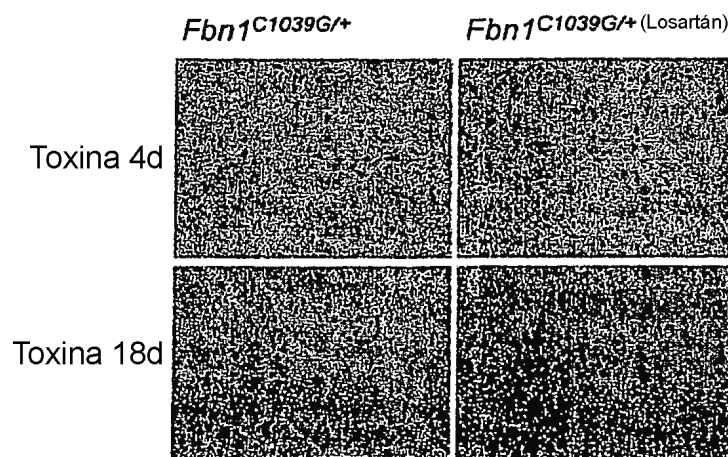
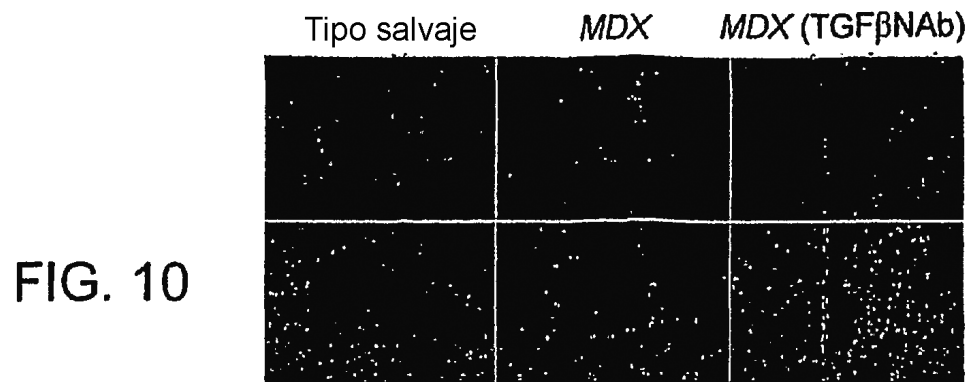


FIG. 9C



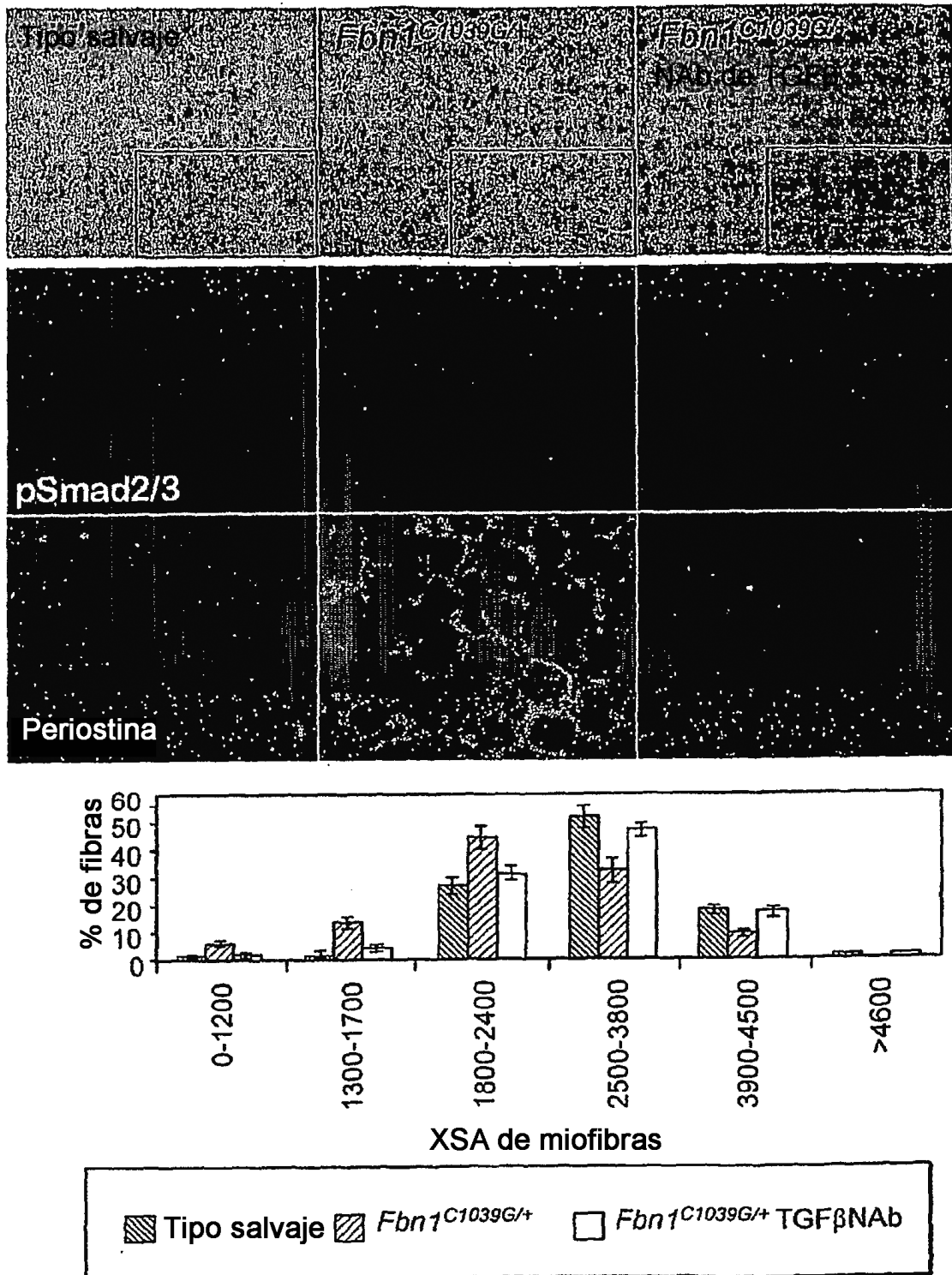


FIG. 11A

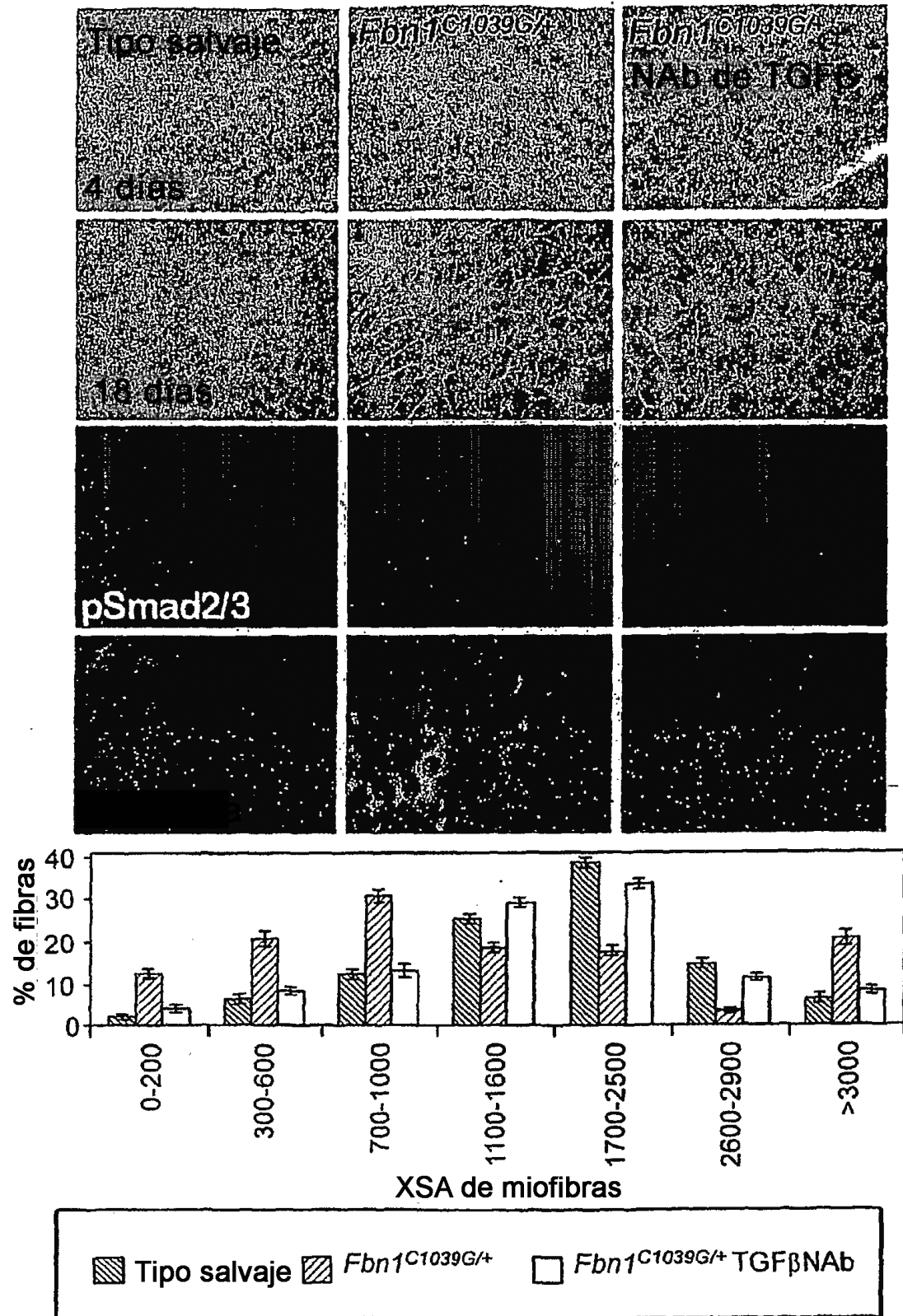


FIG. 11B

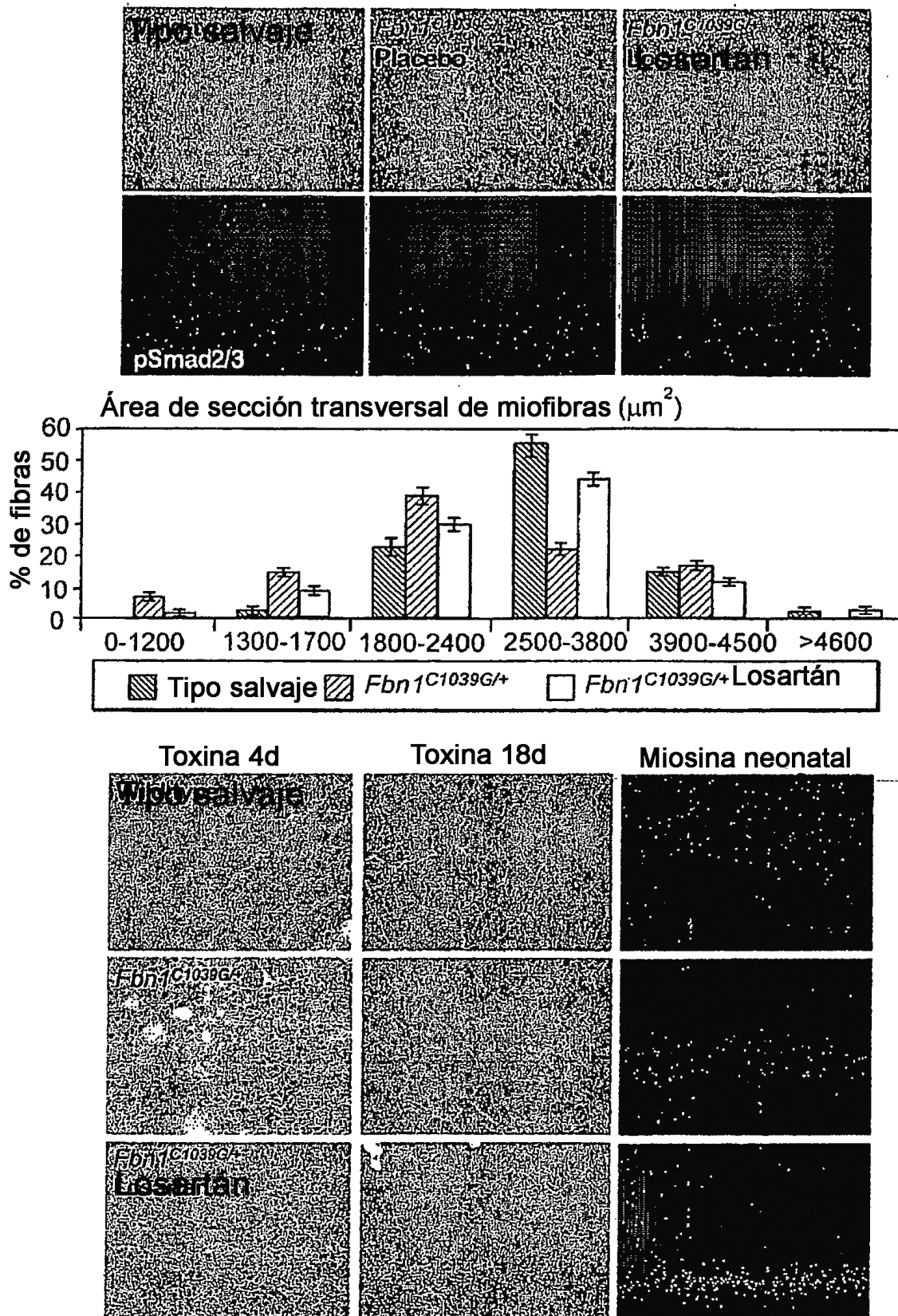


FIG. 12

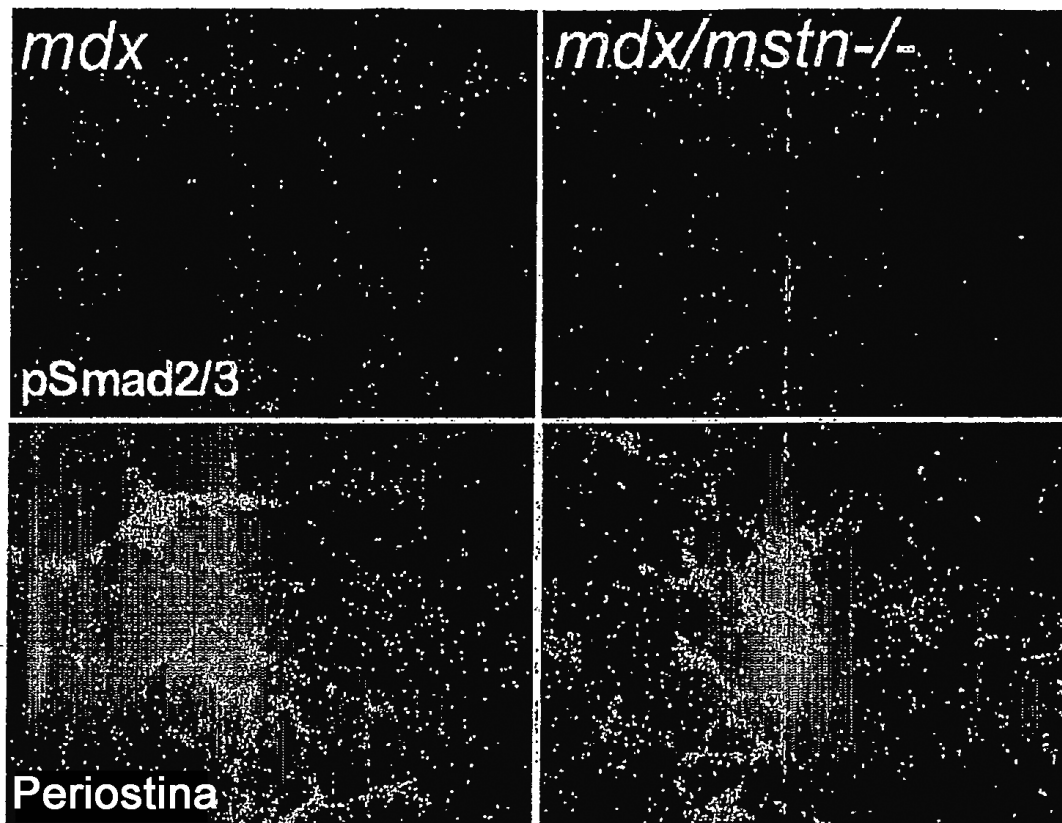


FIG. 13A



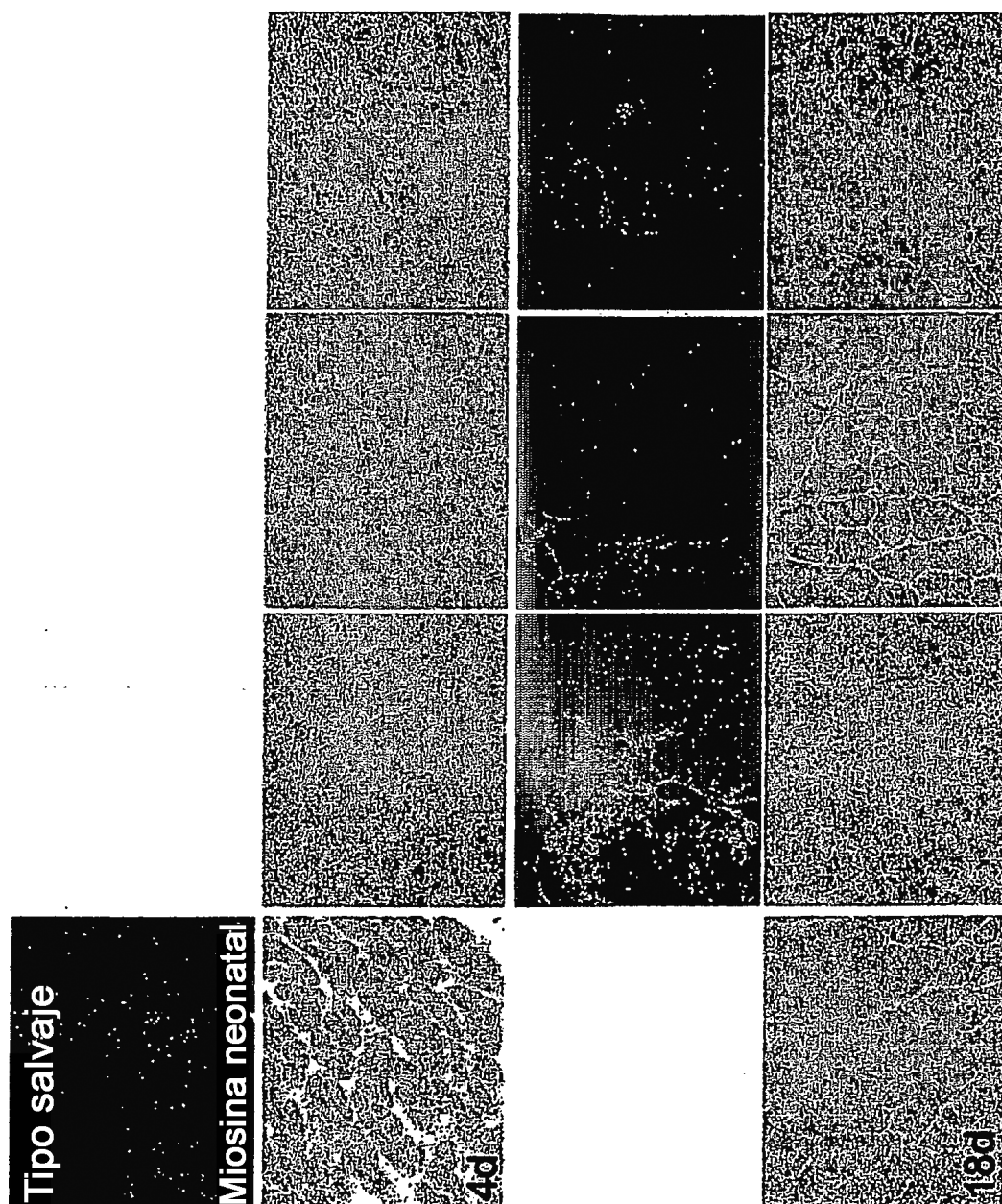


FIG. 13B

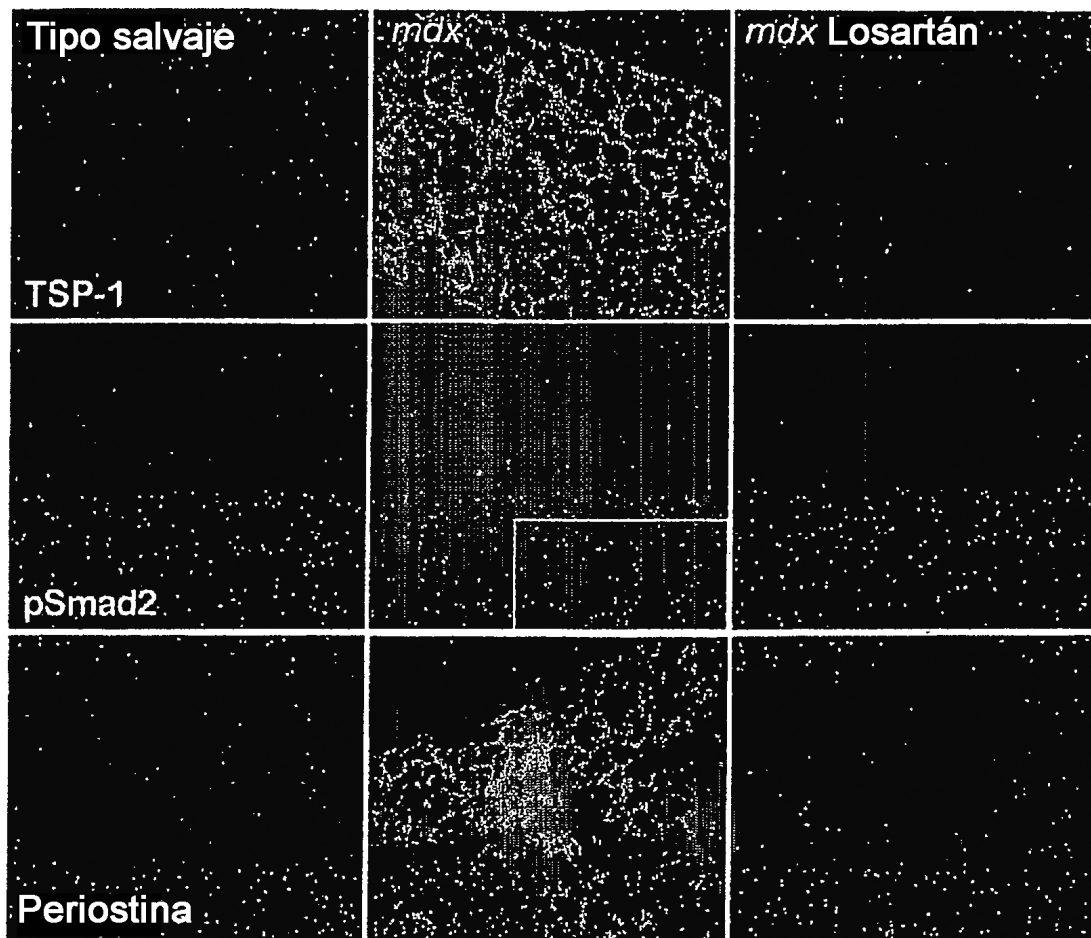


FIG. 14A

FIG. 14B-1
FIG. 14B-2

FIG. 14B

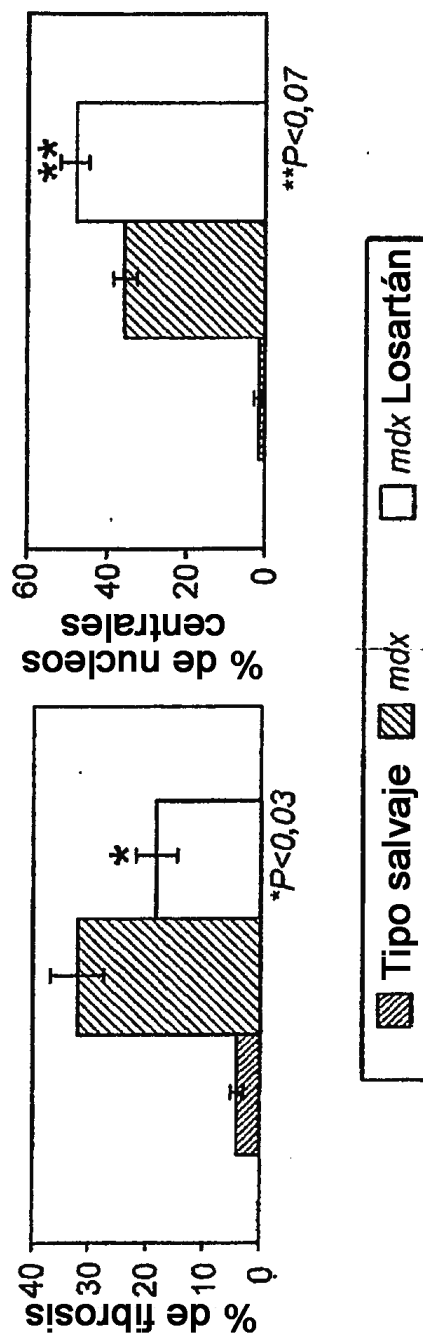


FIG. 14B-1

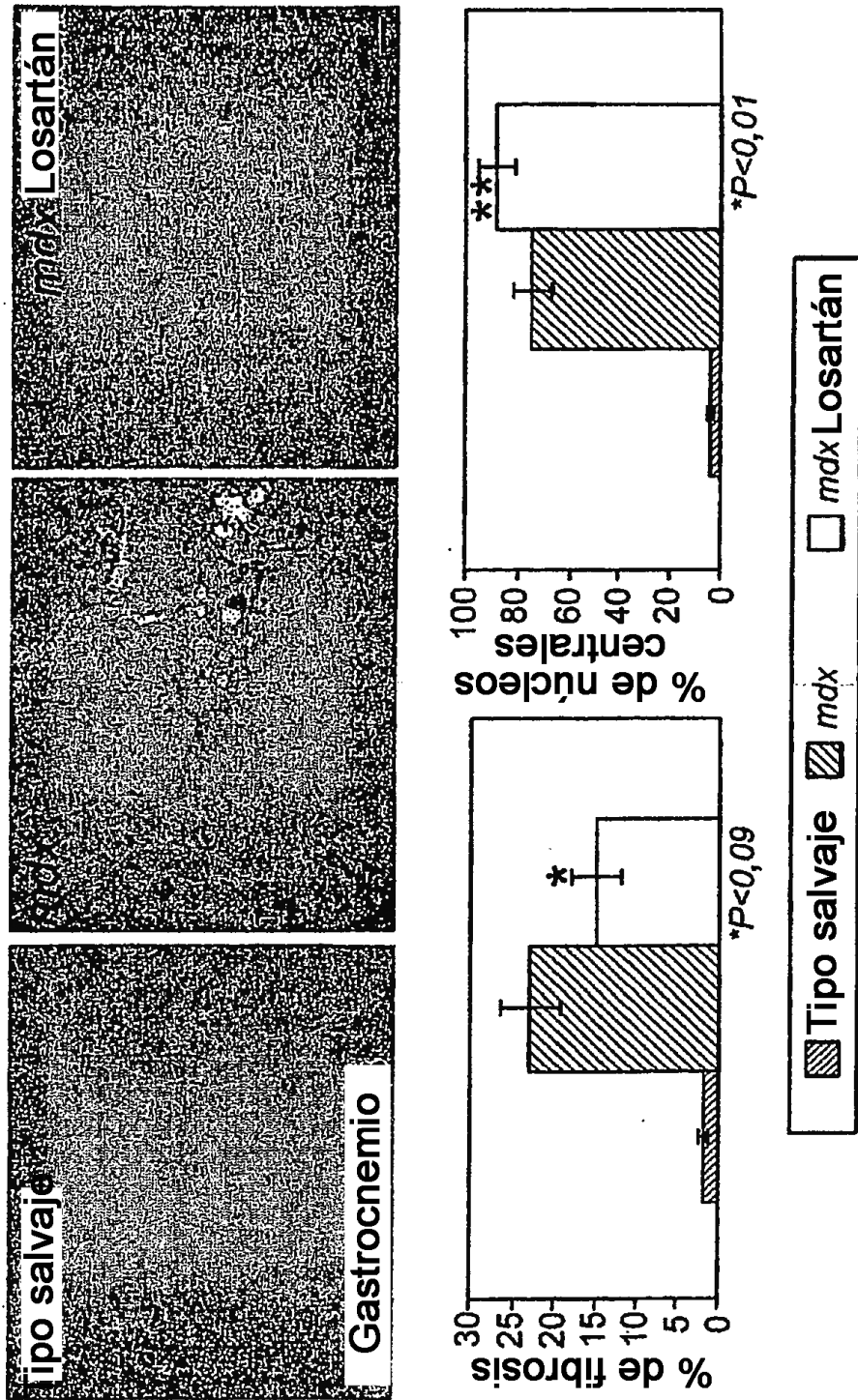


FIG. 14B-2

FIG. 14C-1
FIG. 14C-2

FIG. 14C

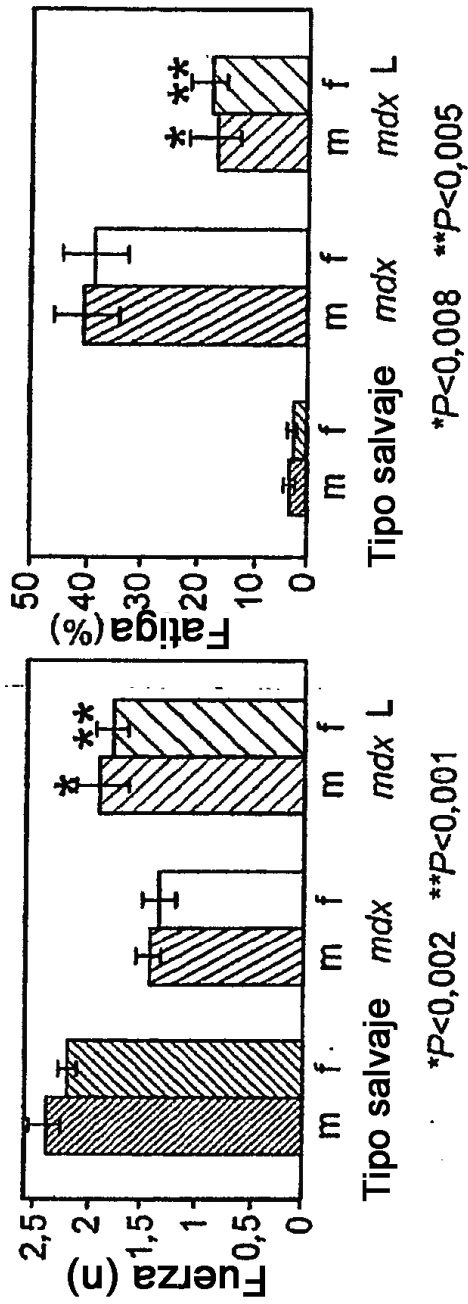


FIG. 14C-1

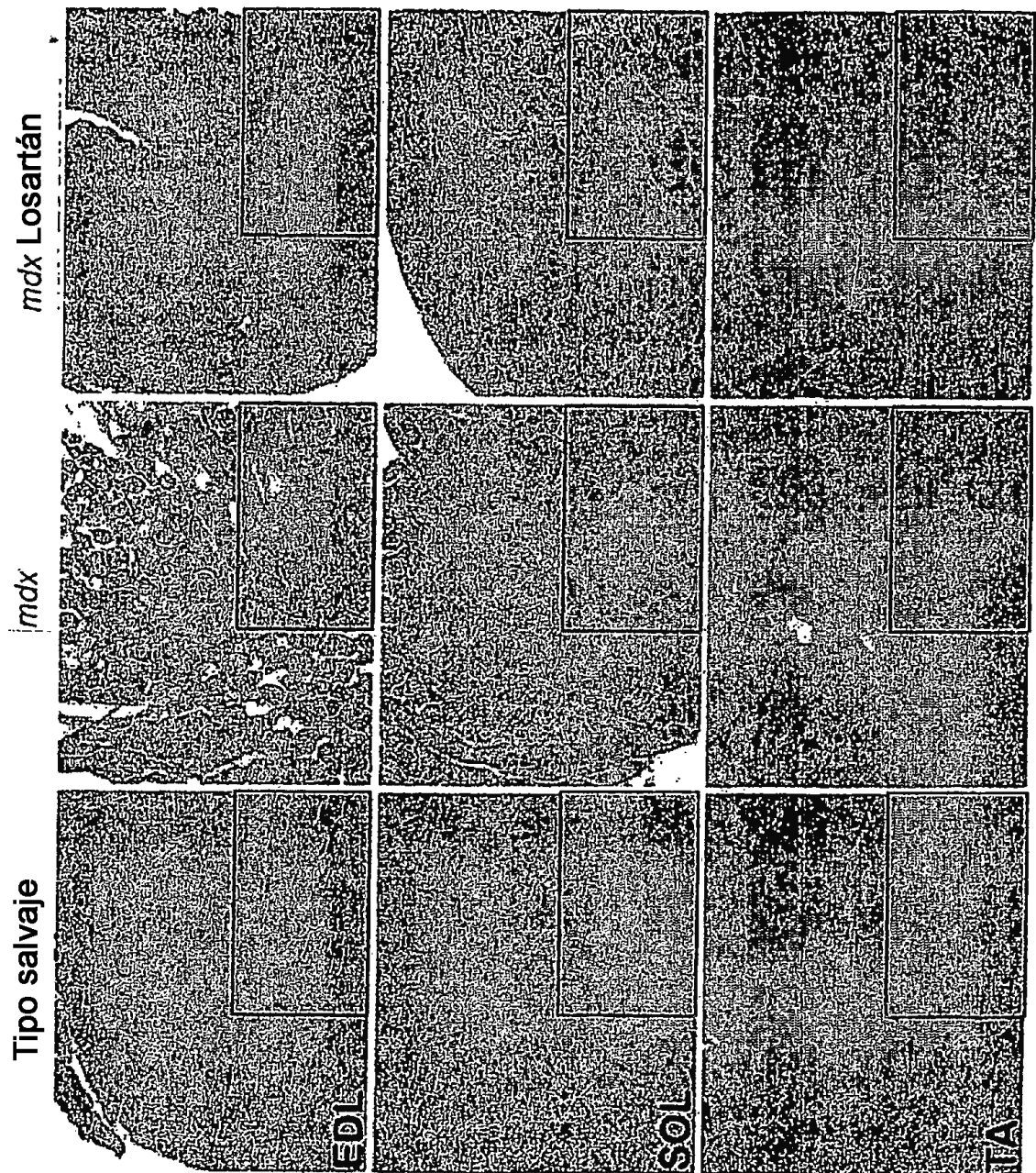


FIG. 14C-2

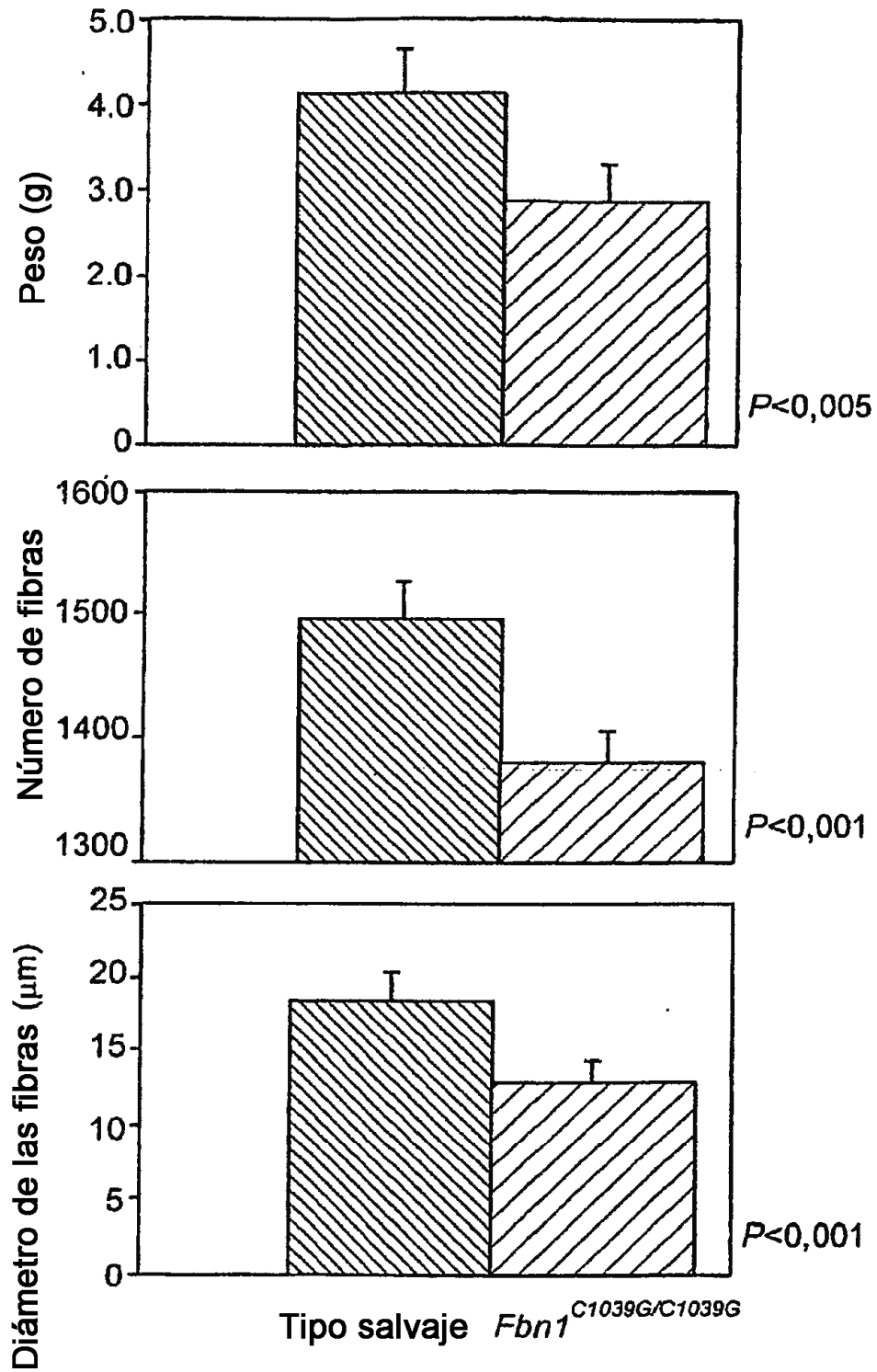


FIG. 15A

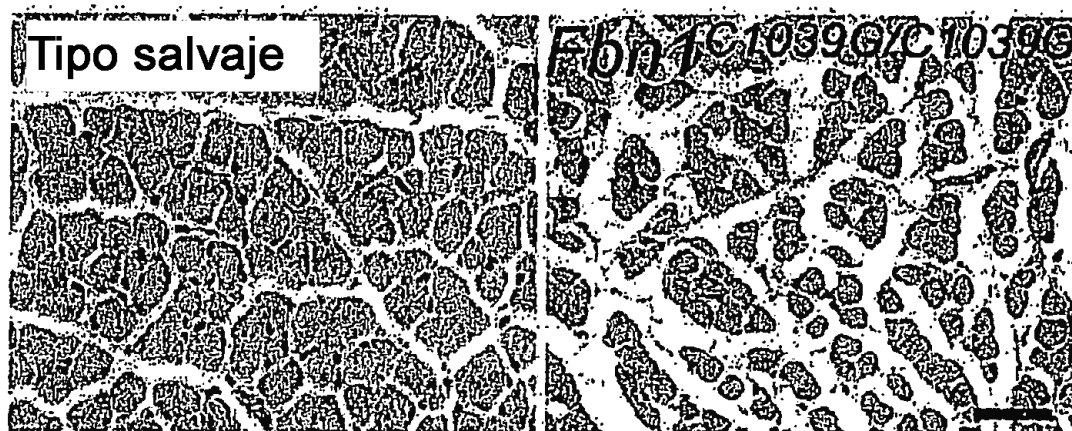


FIG. 15B

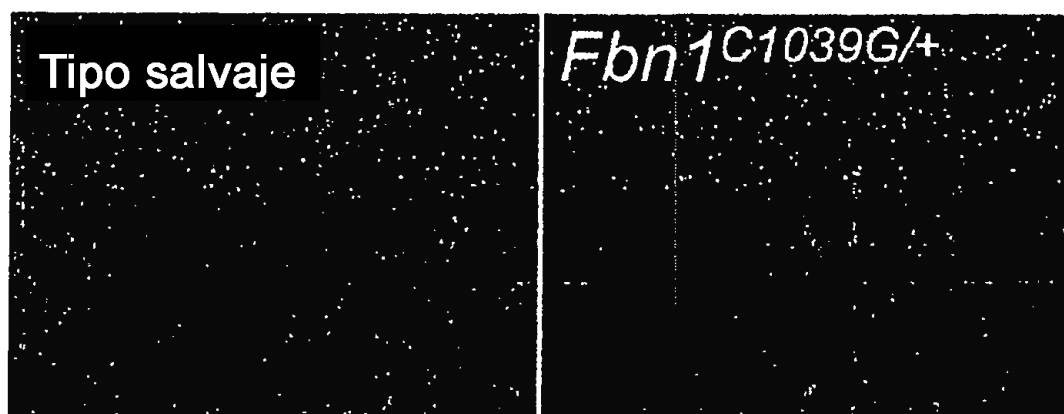


FIG. 15C



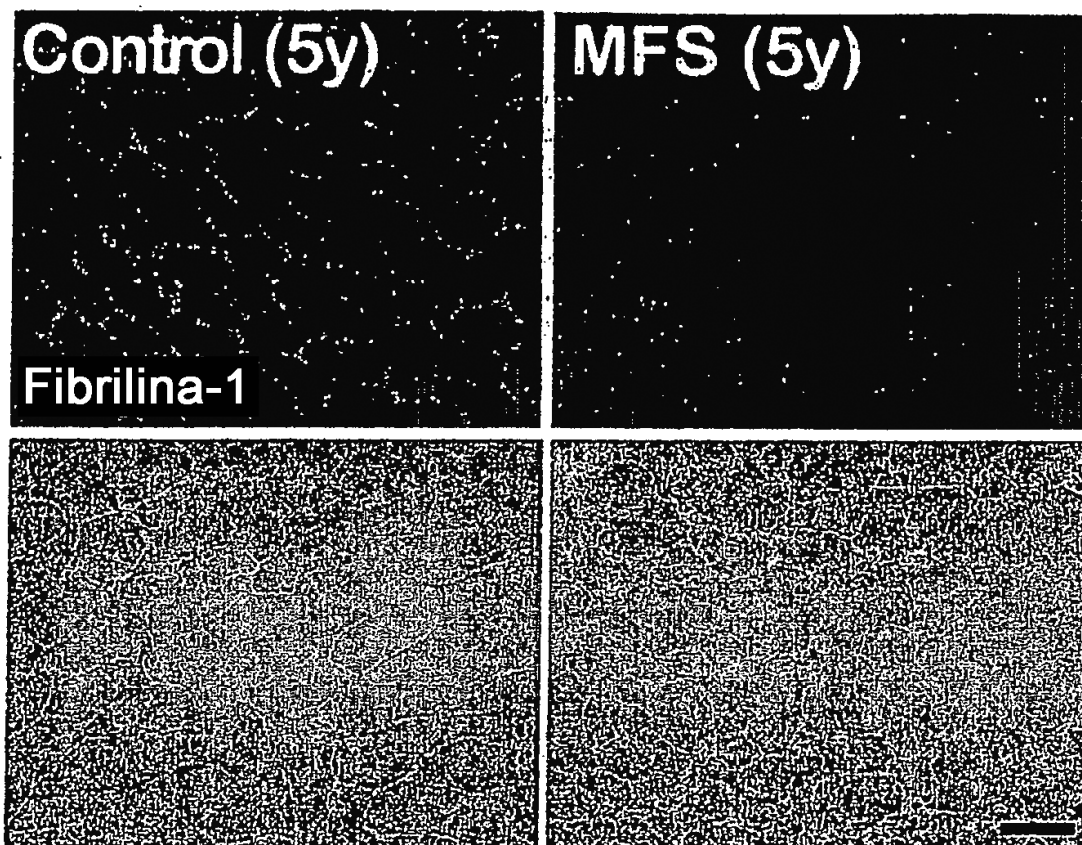


FIG. 15D

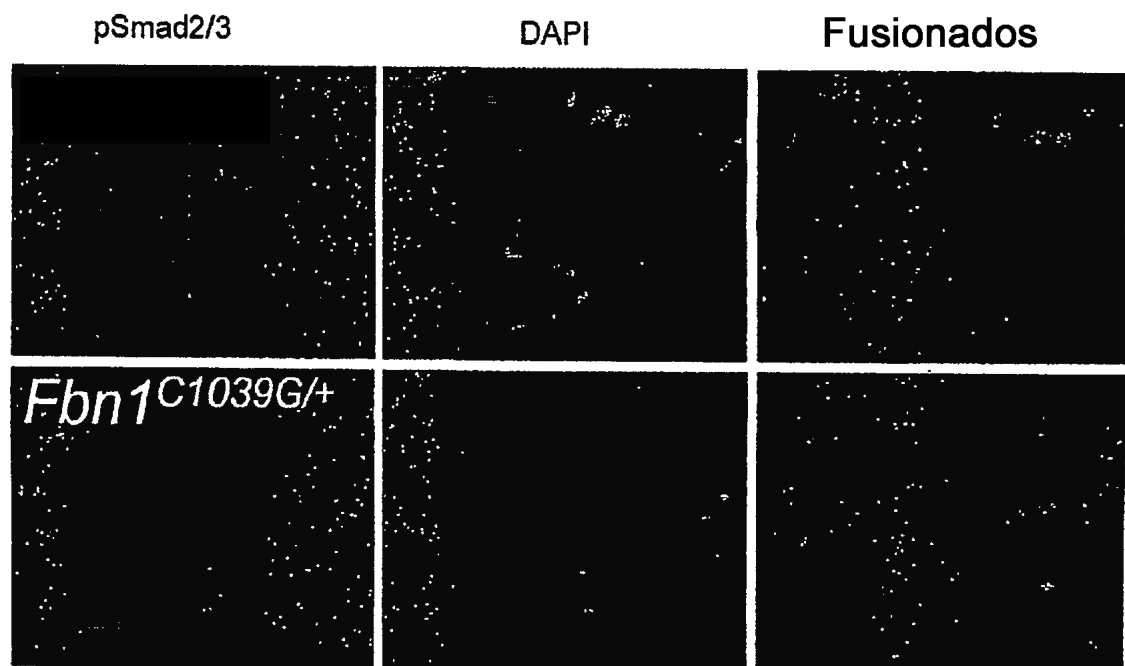


FIG. 16A

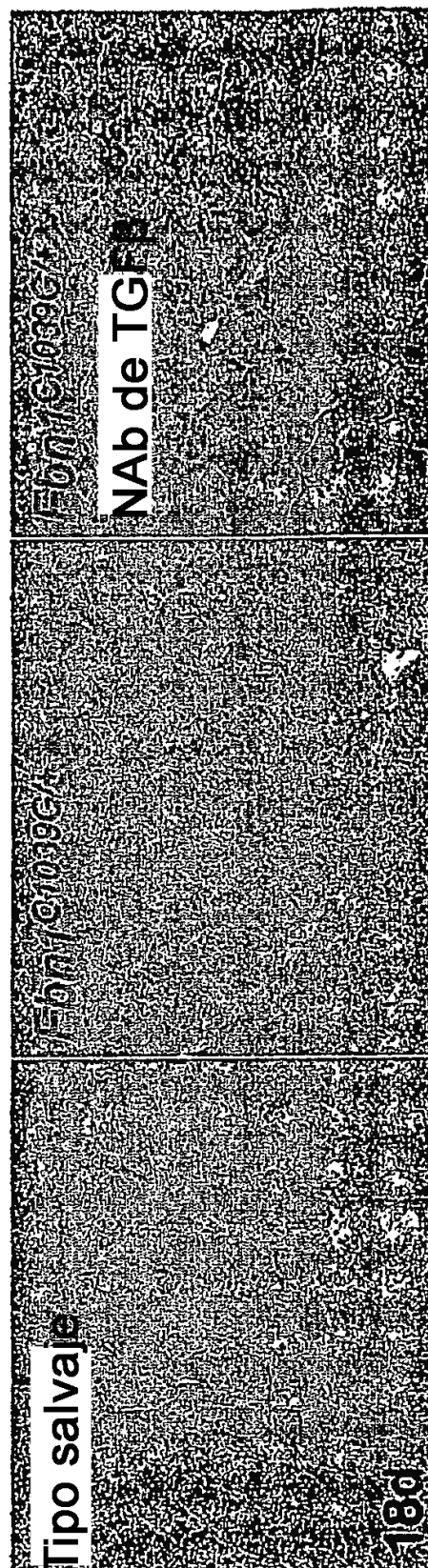


FIG. 16B

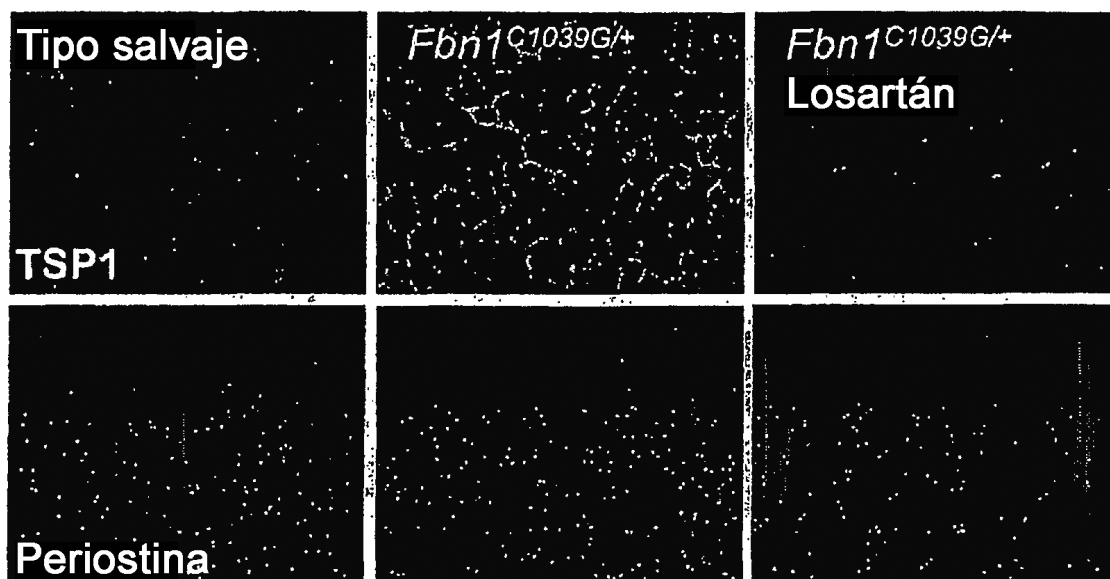


FIG. 16C

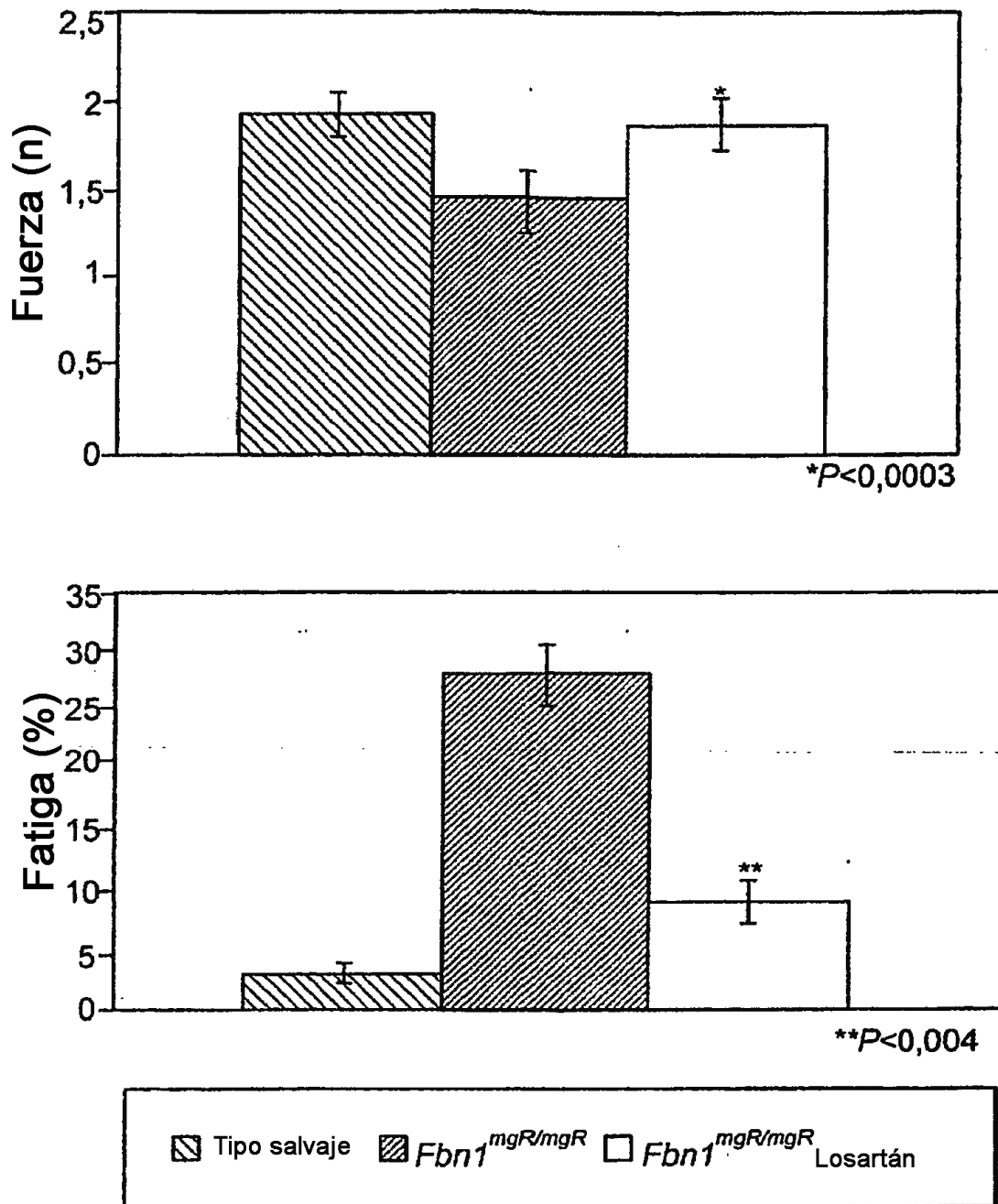


FIG. 16D

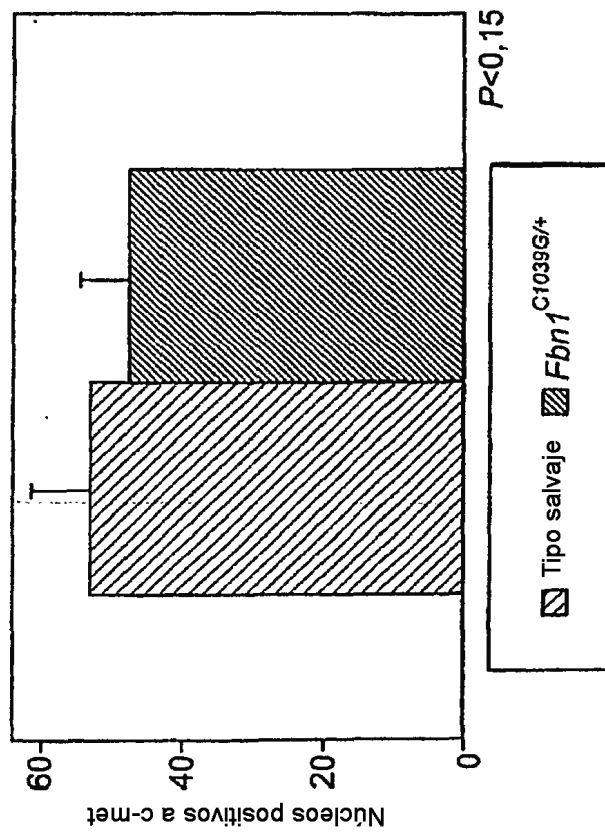
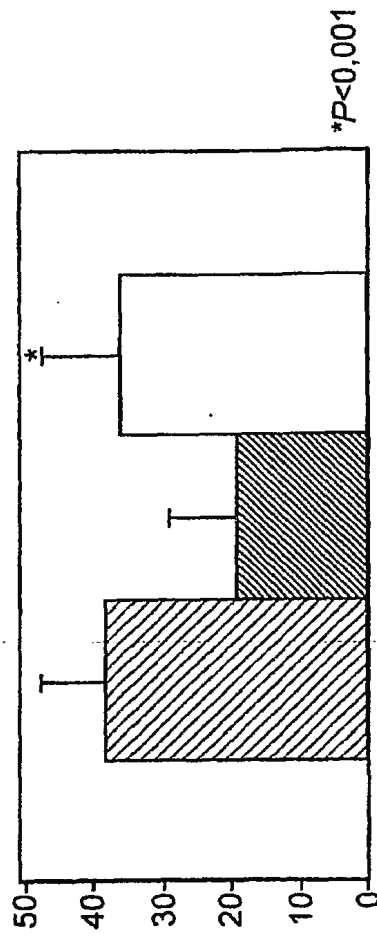
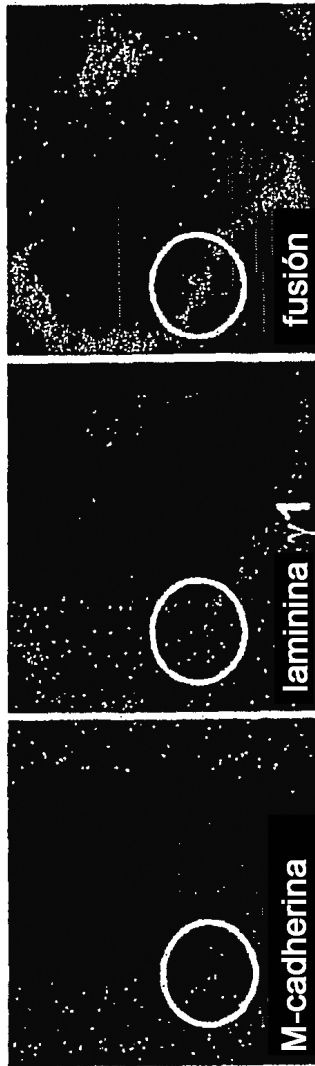


FIG. 17A

FIG. 17B-1

FIG. 17B-2

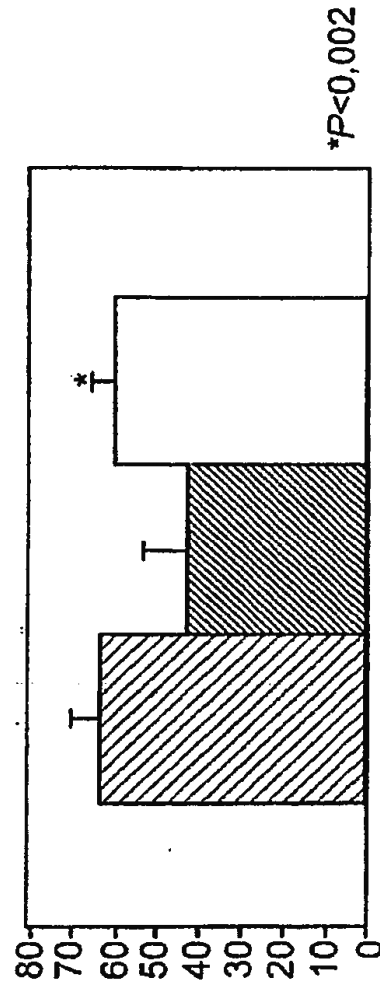
FIG. 17B



Núcleos positivos a M-cadherina tras la lesión

Tipo salvaje
  $Fbn1^{C1039G/+}$ 
 $Fbn1^{C1039G/+}$  NAb de TGF $\beta$

FIG. 17B-1



Núcleos positivos a niogenina tras la lesión

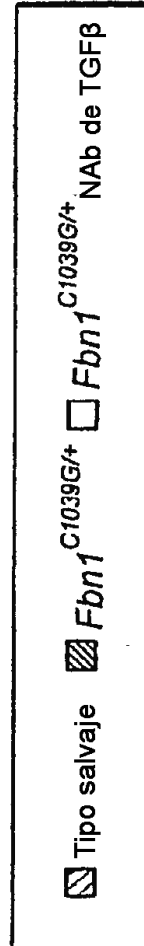


FIG. 17B-2



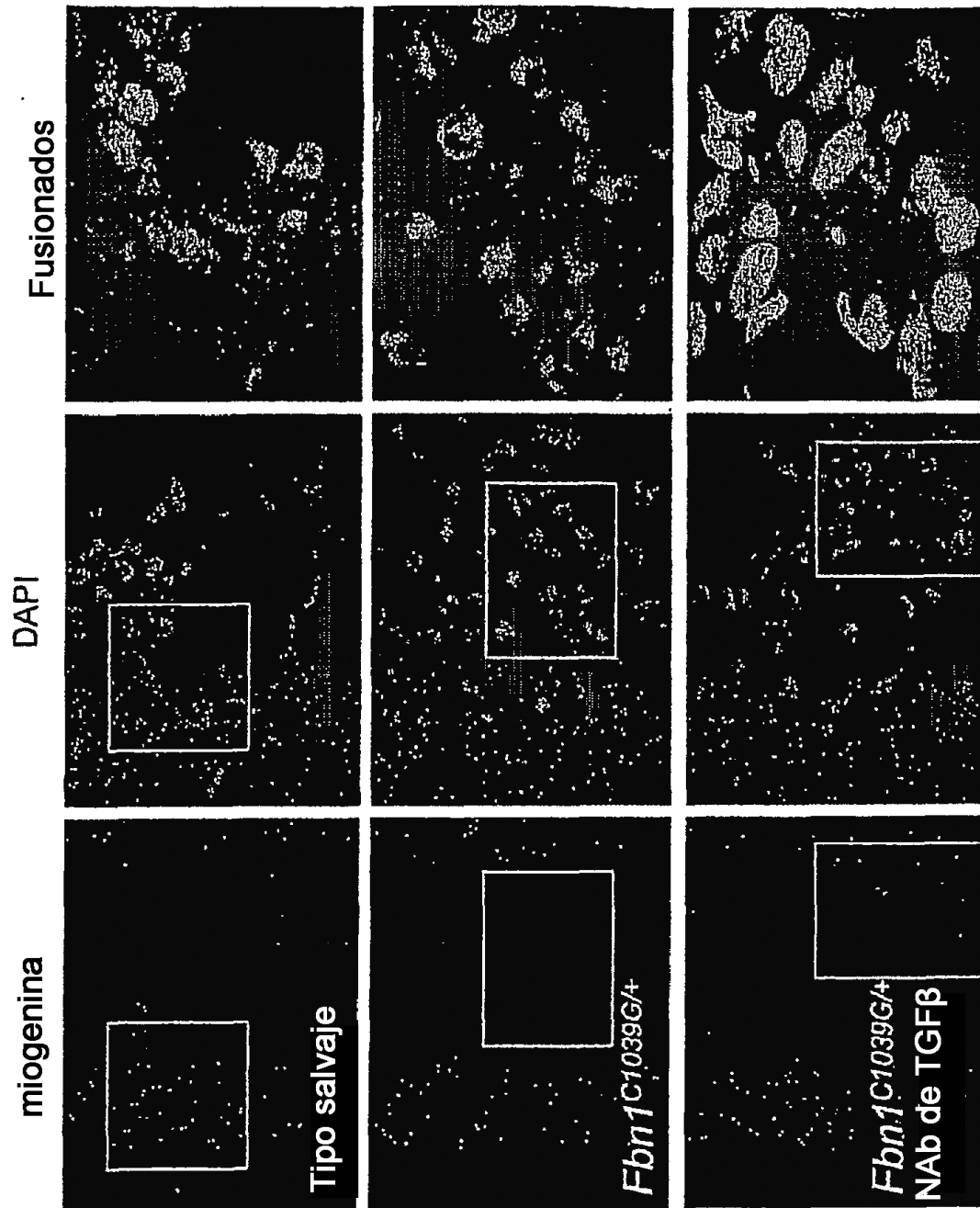


FIG. 17C

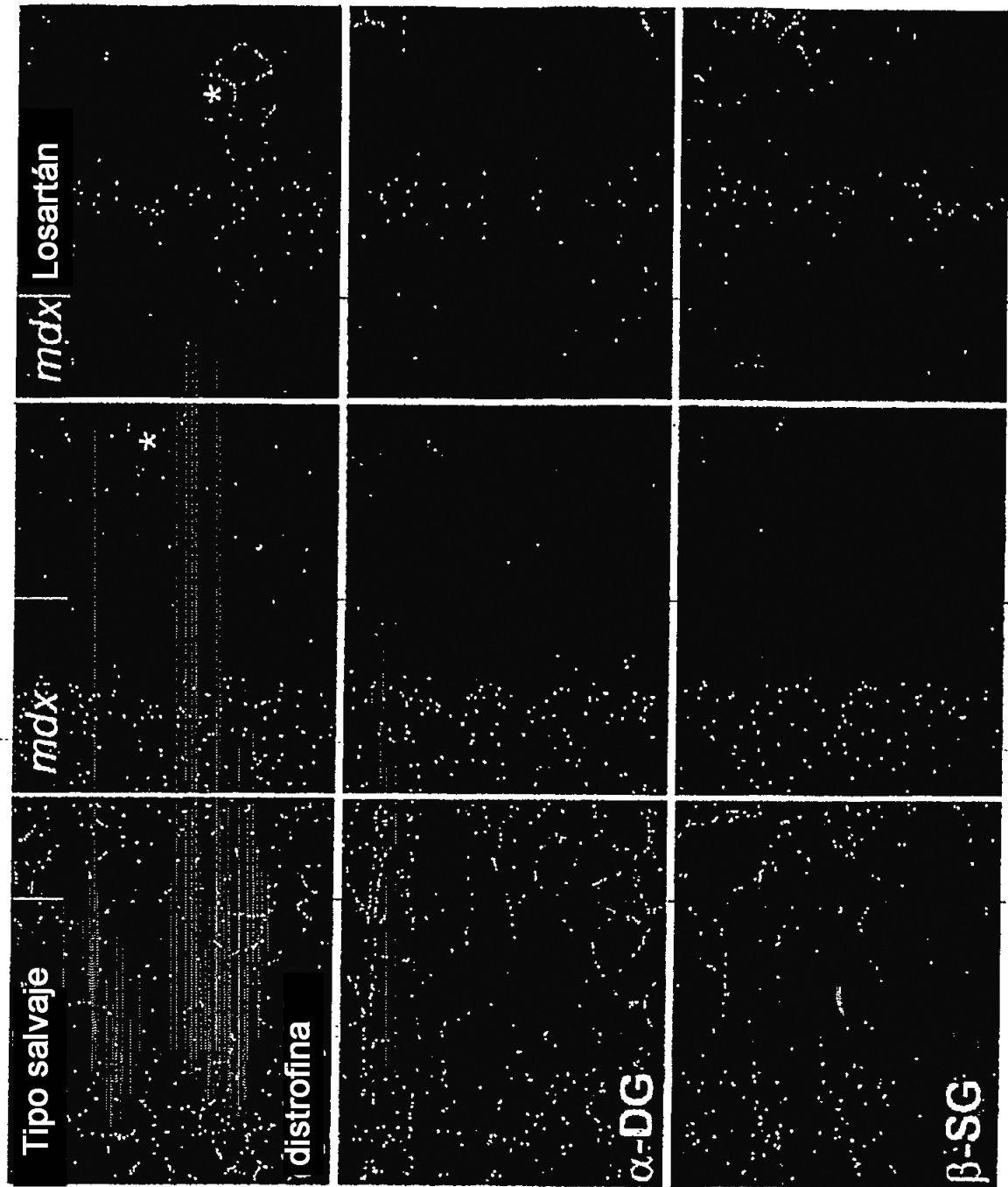


FIG. 18A

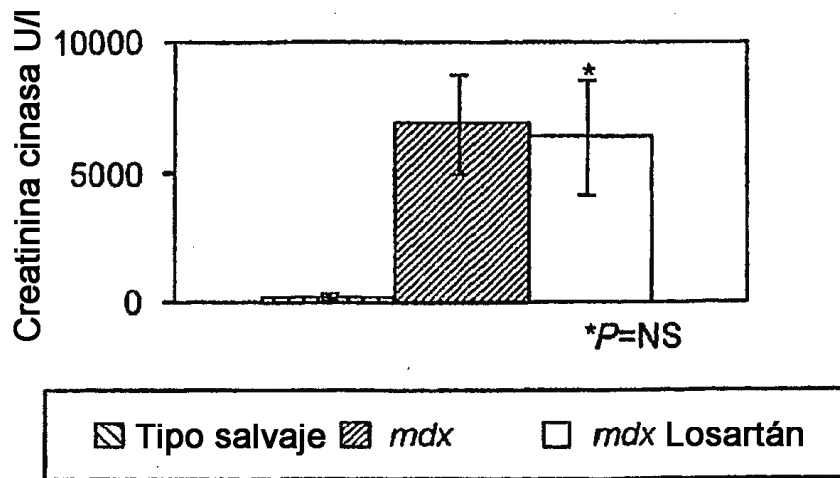


FIG. 18B

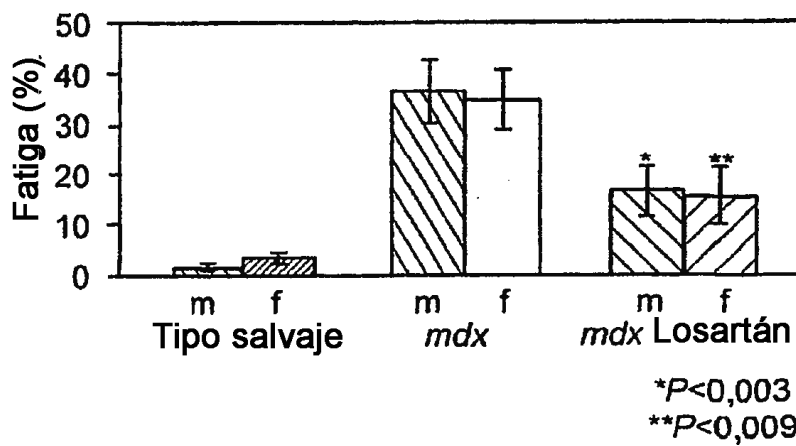
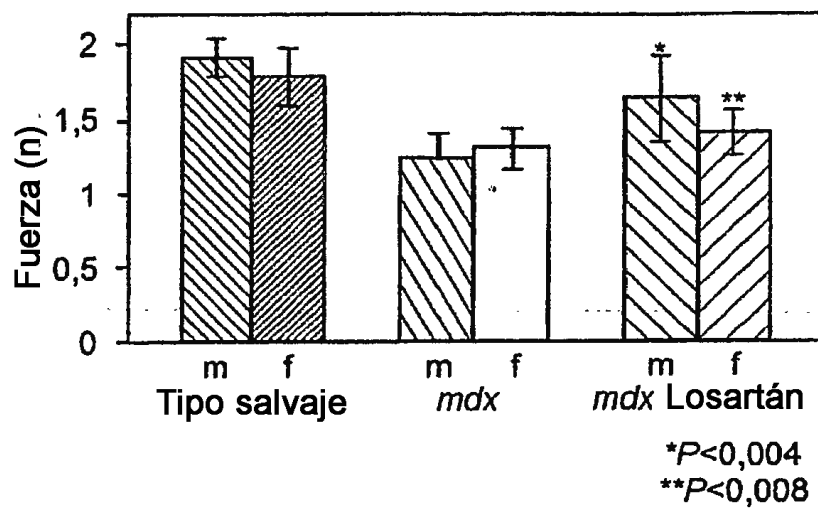


FIG. 18C

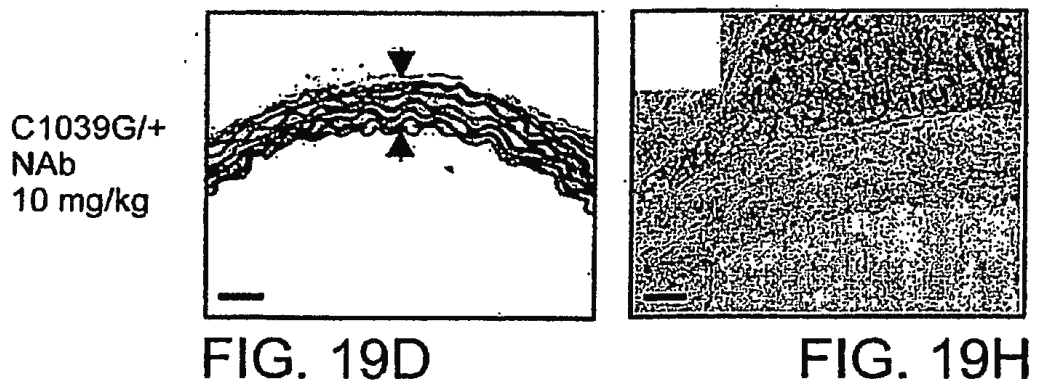
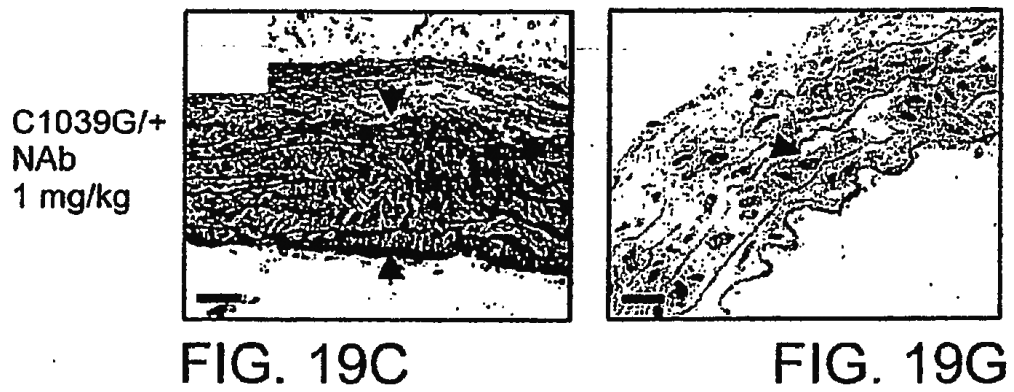
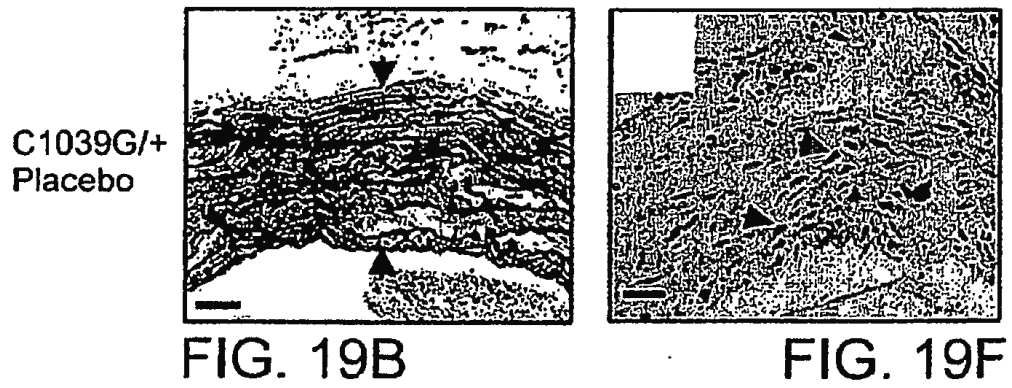
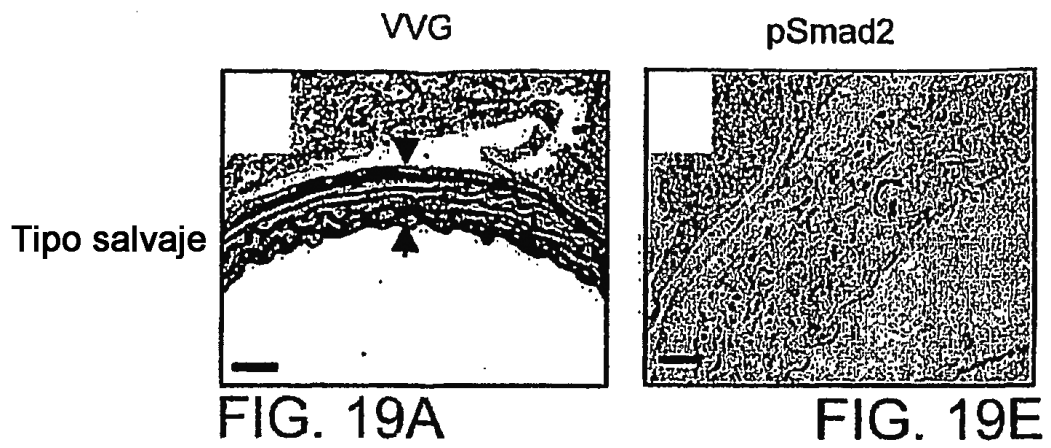


FIG. 19I

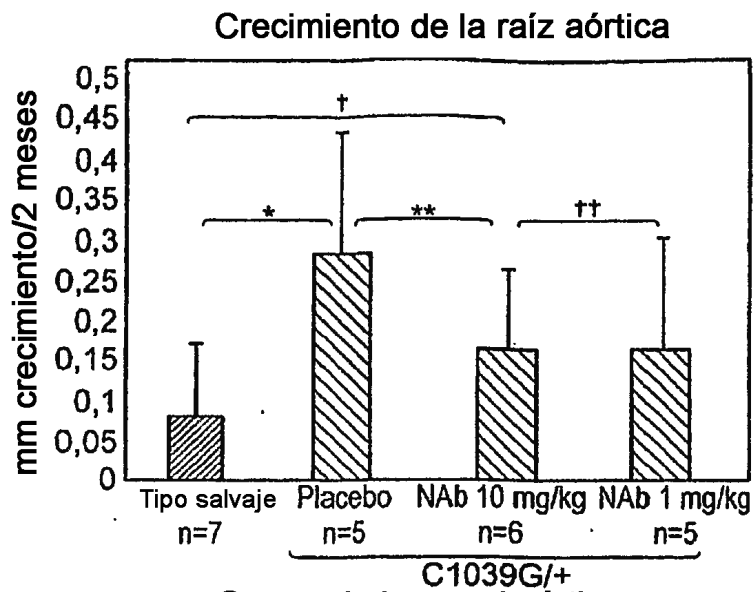


FIG. 19J

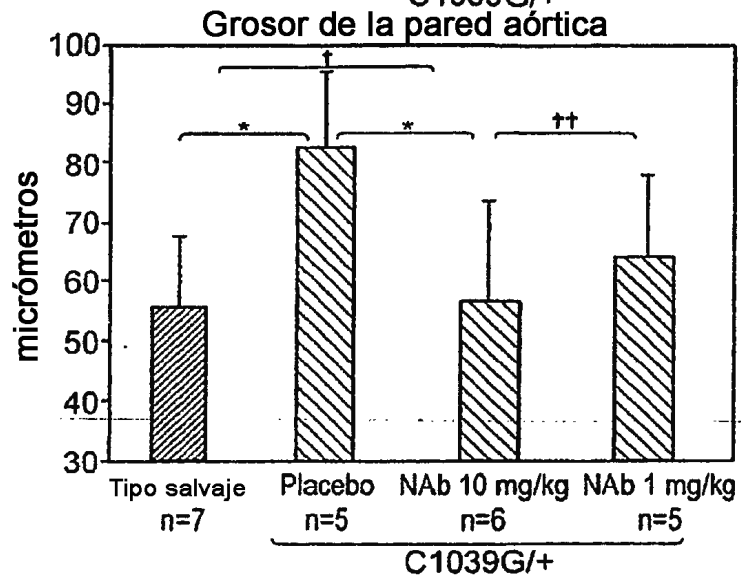
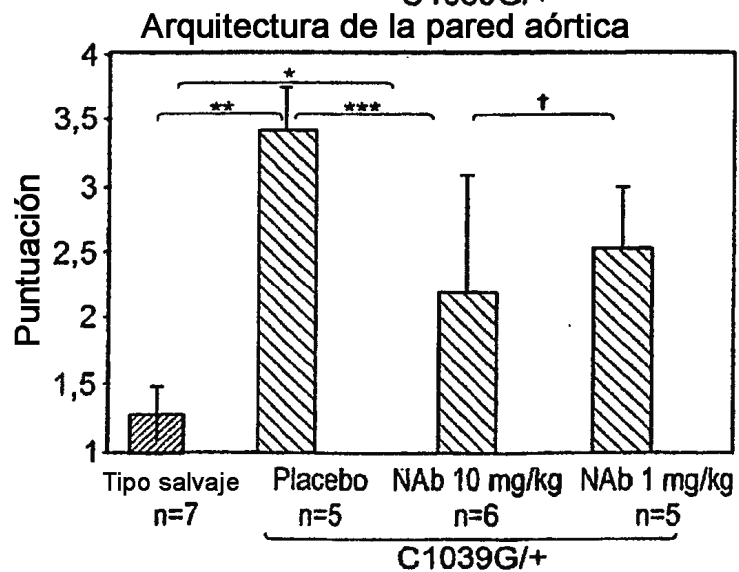


FIG. 19K



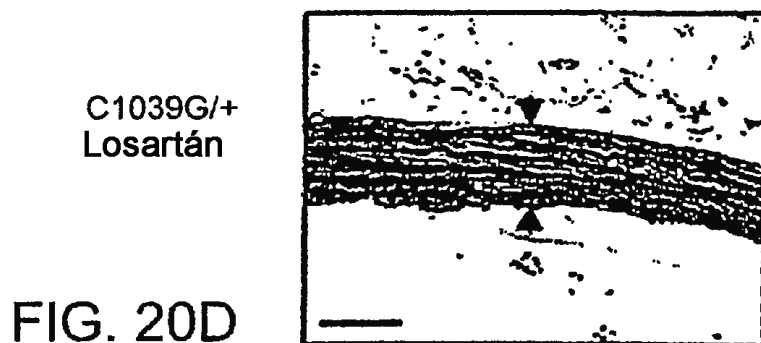
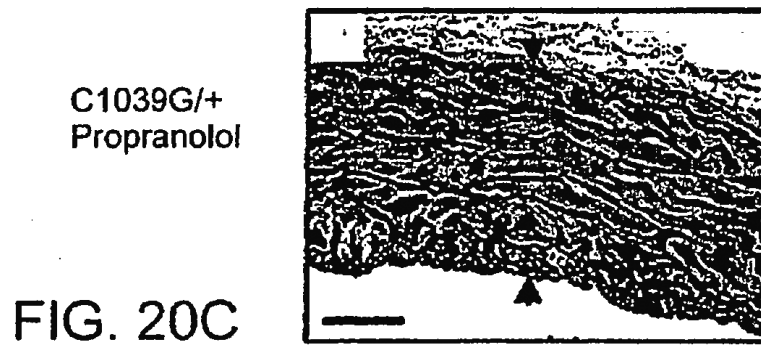
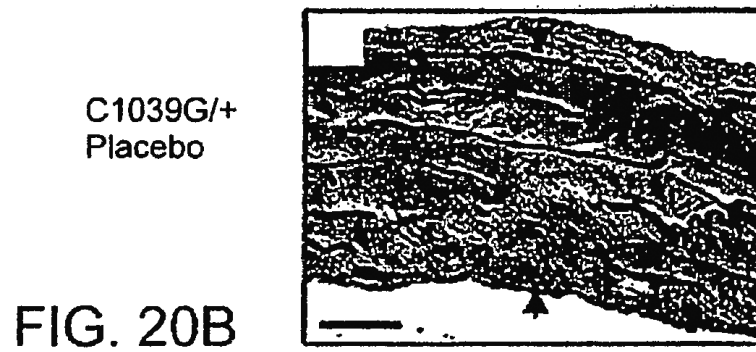
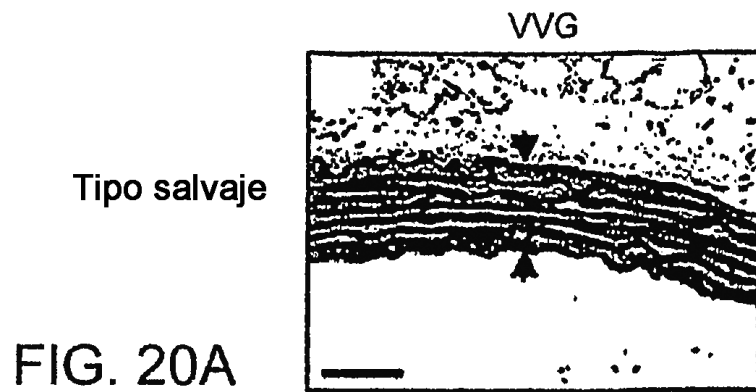


FIG. 20E

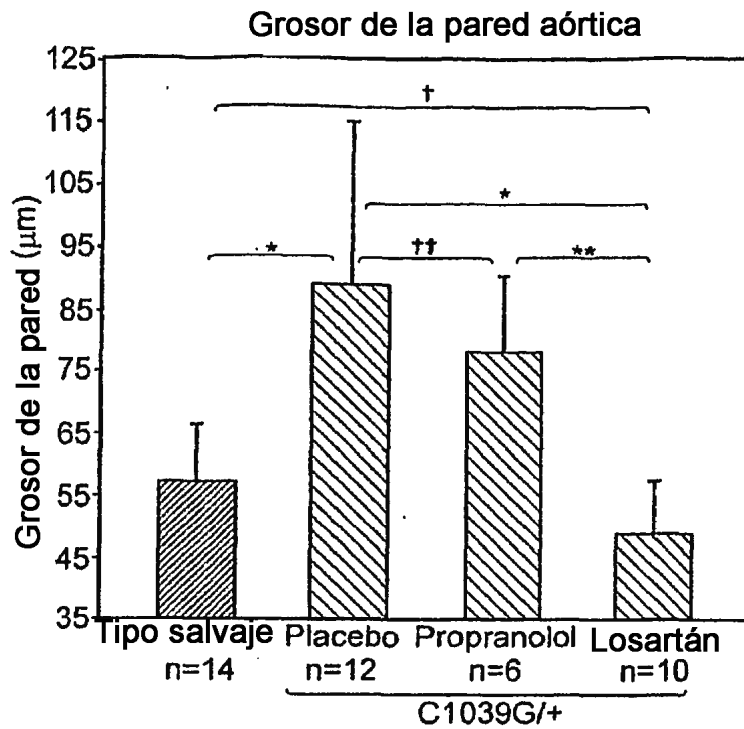
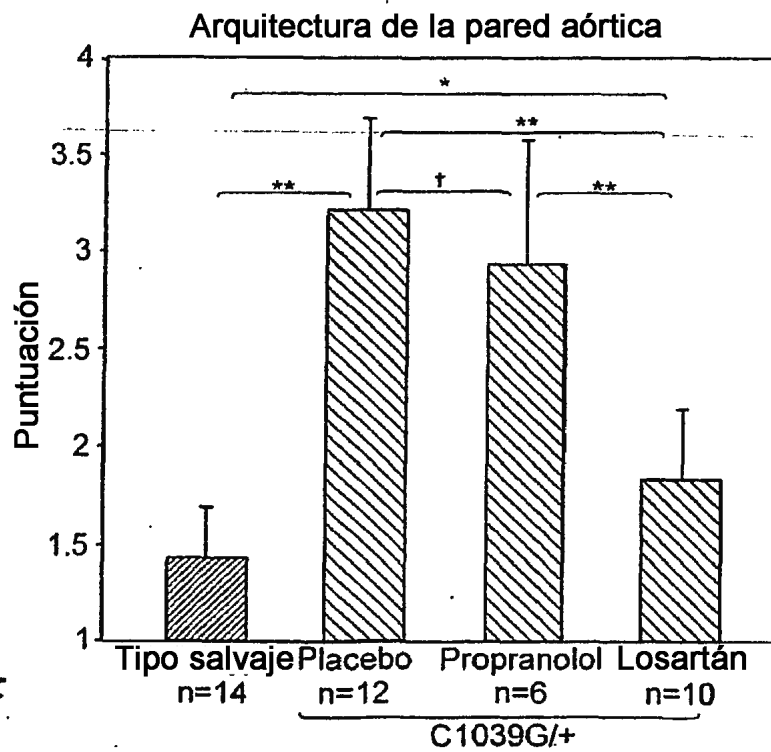
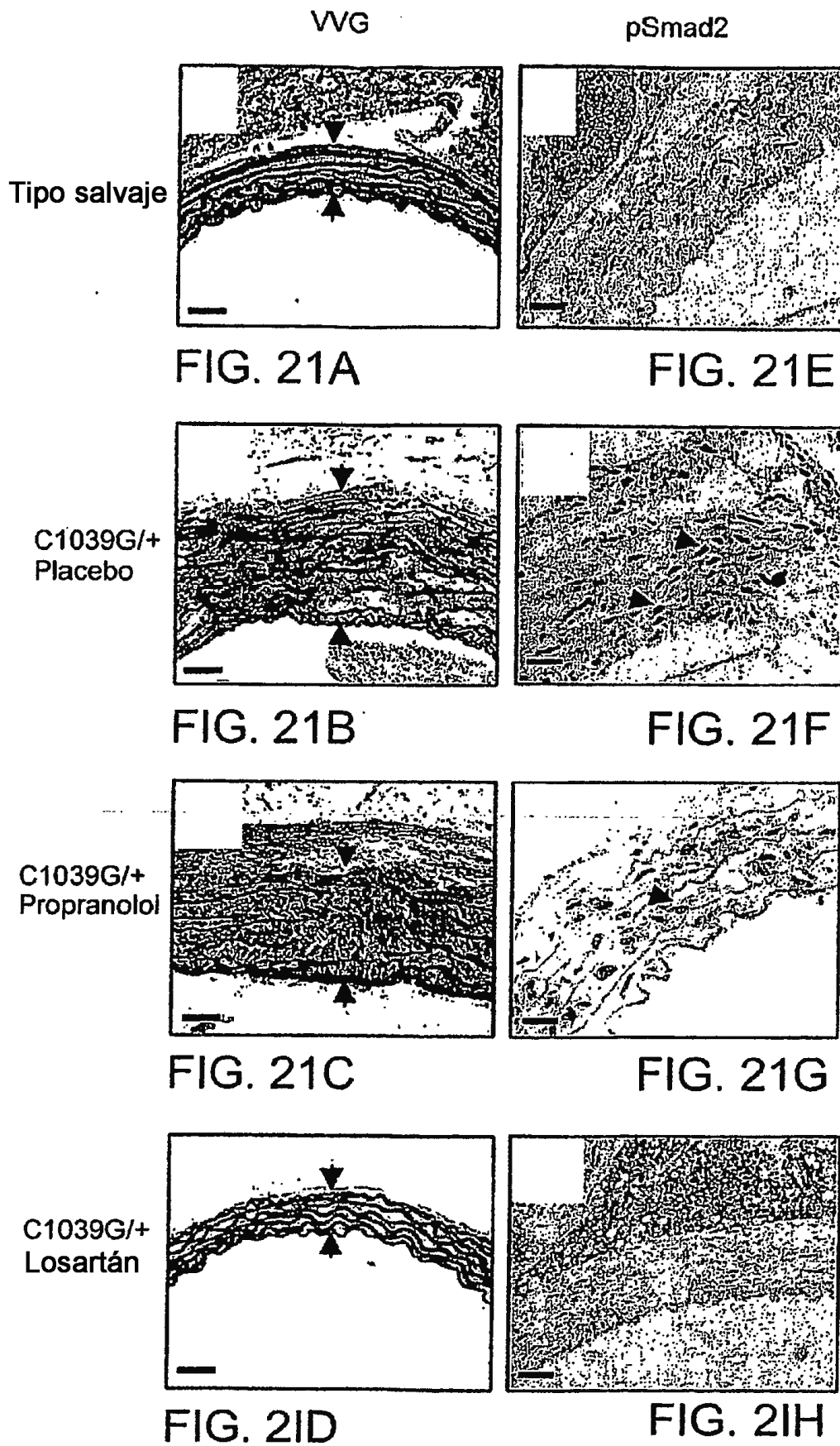
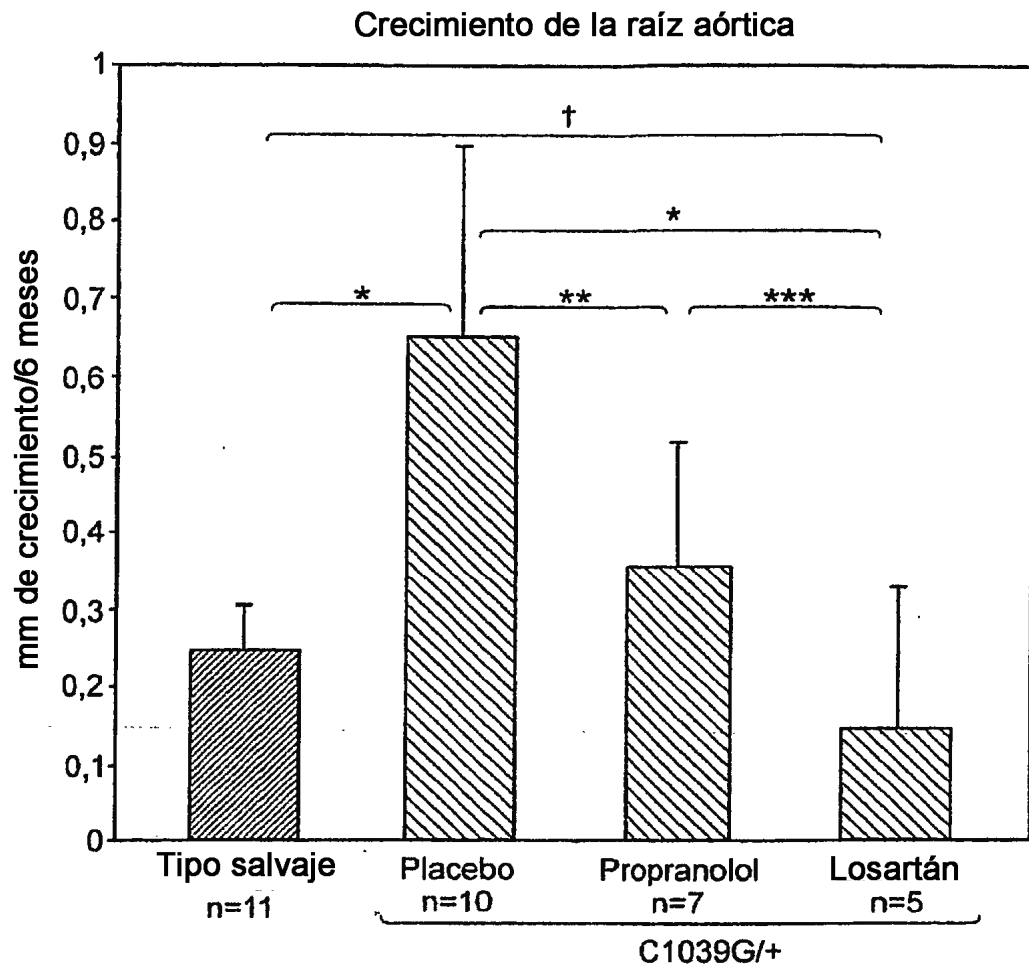


FIG. 20F

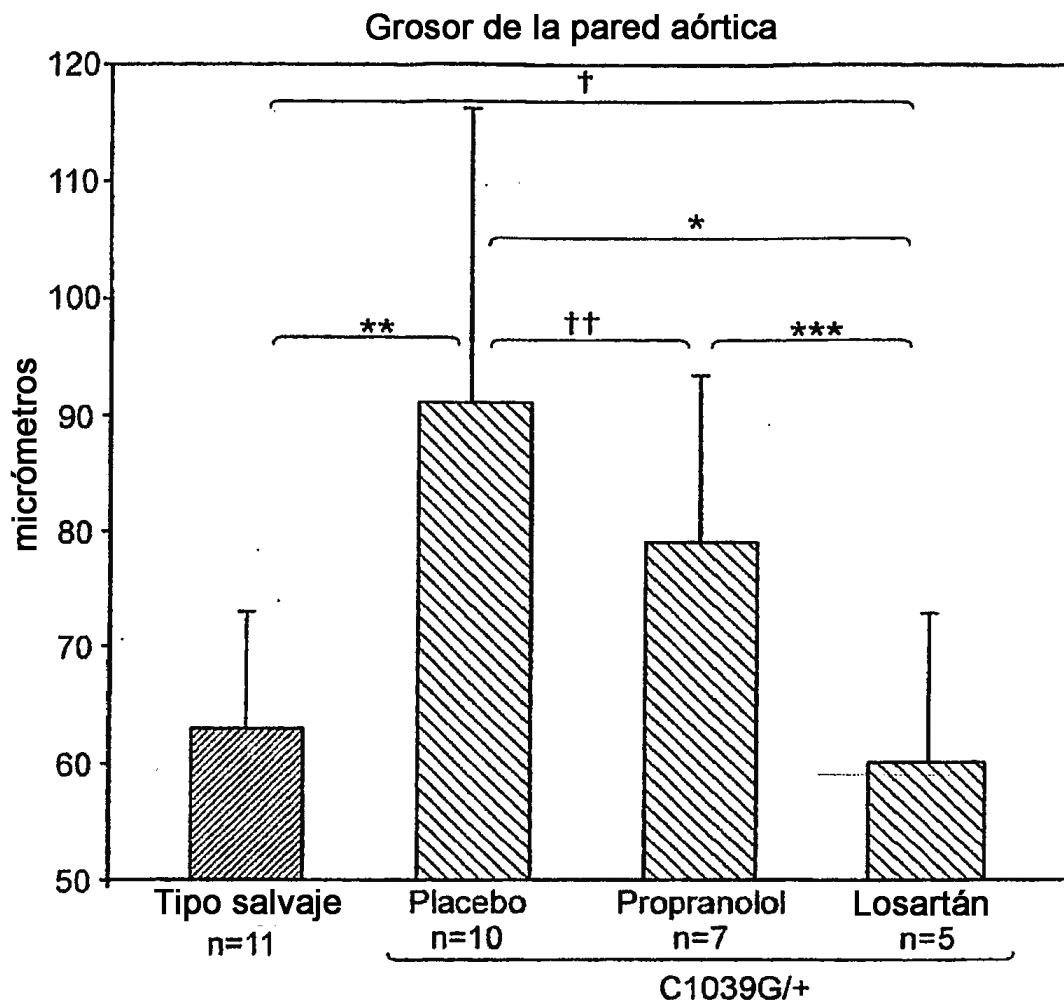




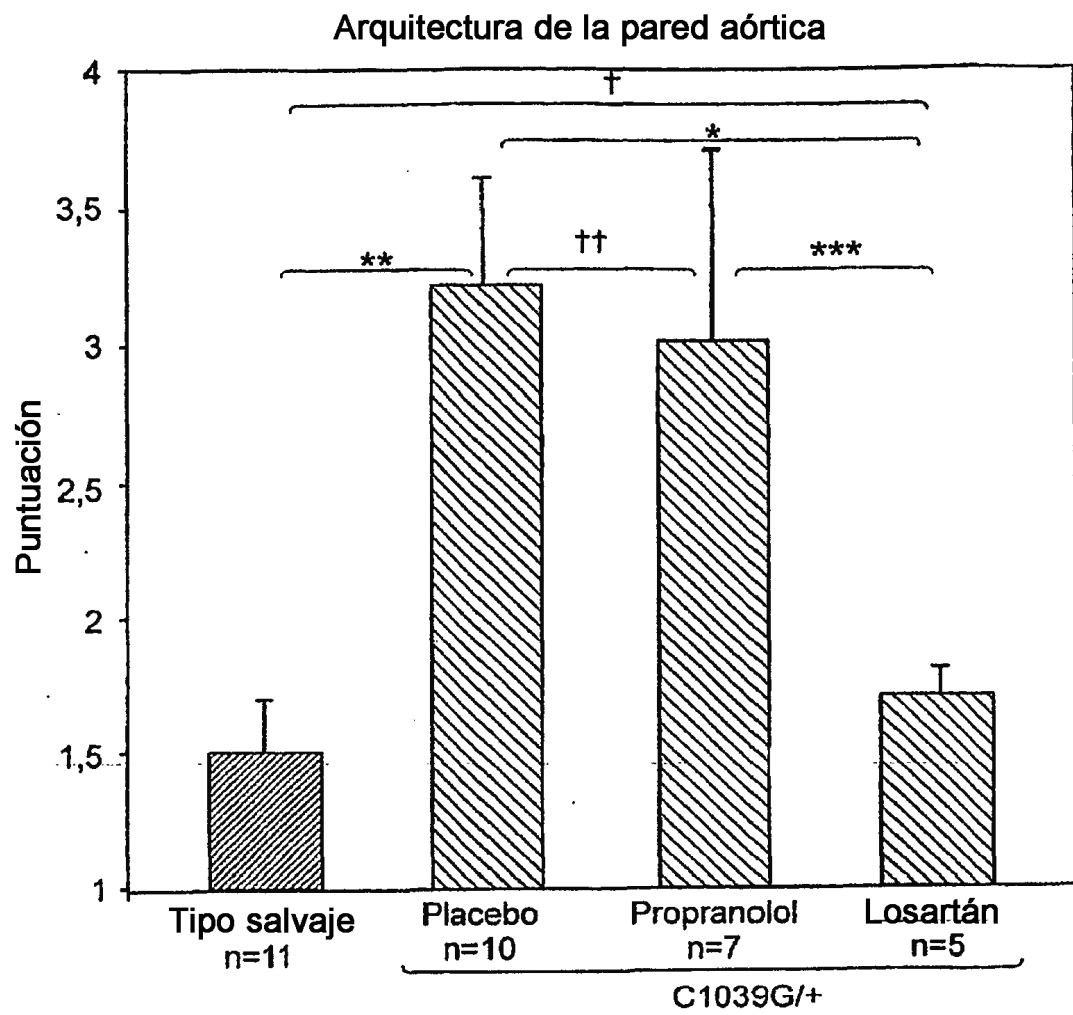




**FIG. 21I**



**FIG. 21J**



**FIG. 21K**

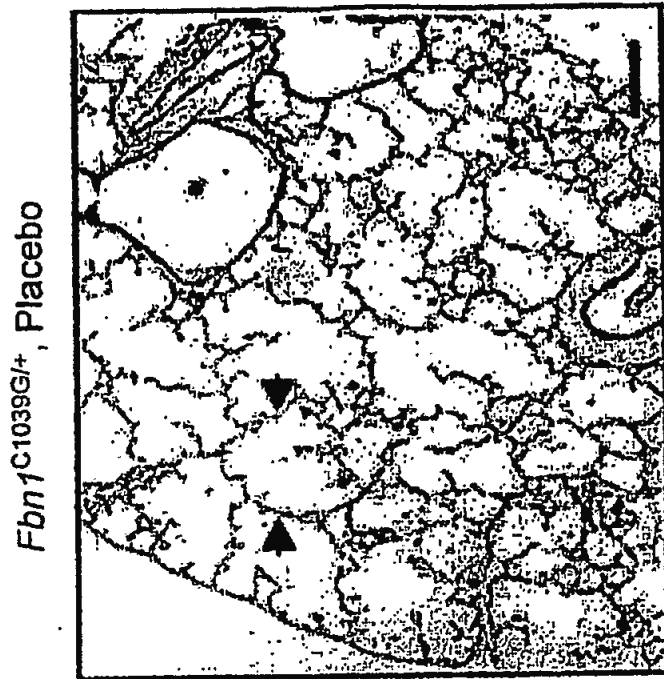


FIG. 22B

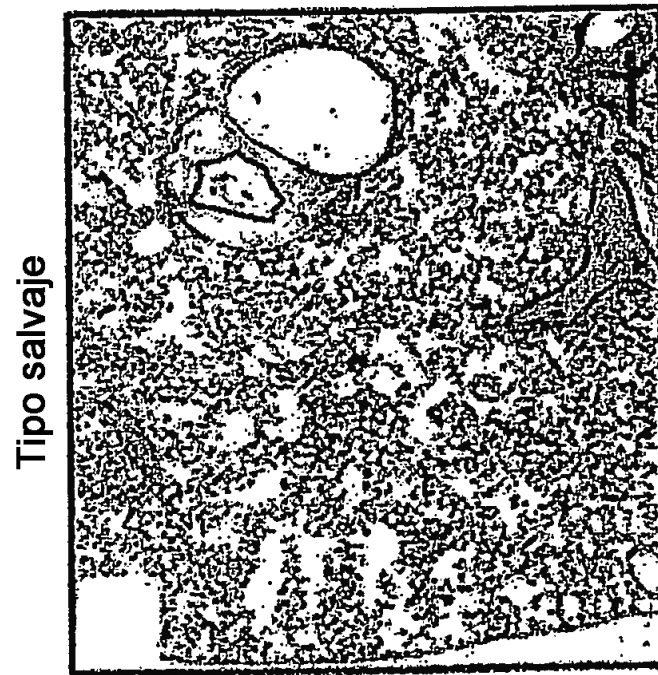


FIG. 22A

*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>, Losartán

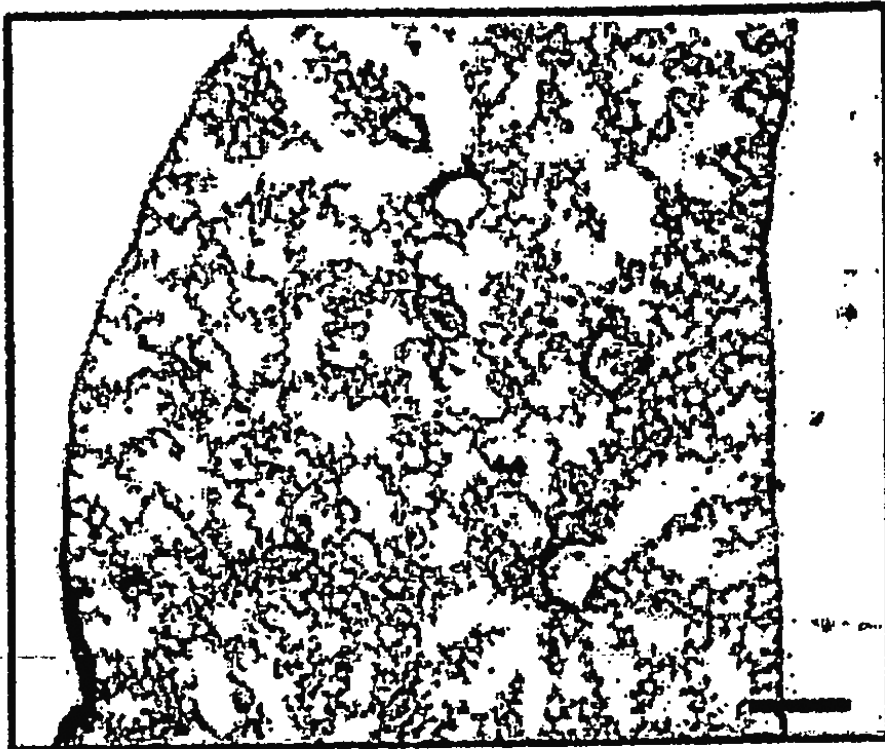


FIG. 22C

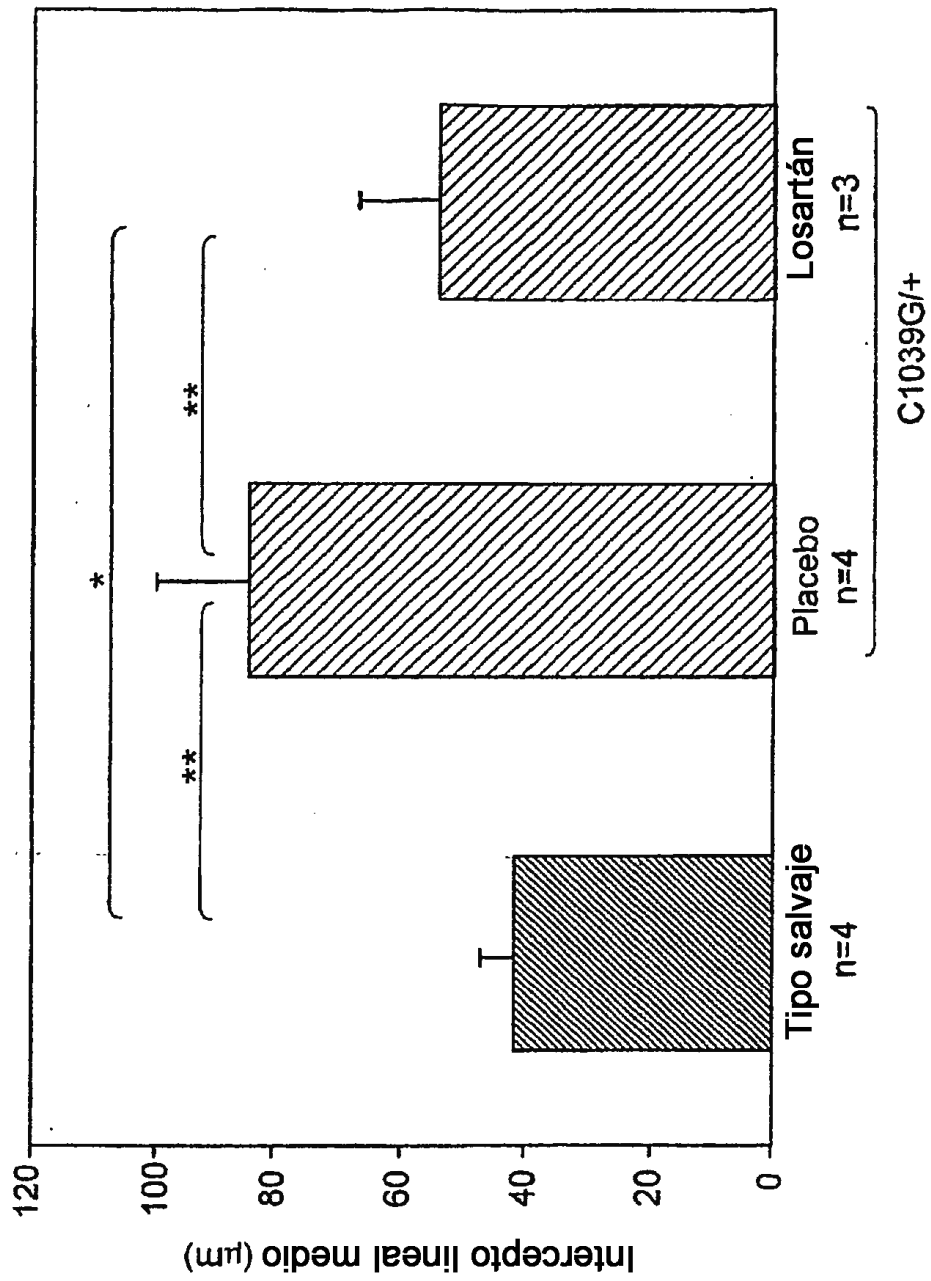


FIG. 22D

atgccgccctccgggctcgggctgctgctgctgctaccgctgctgtggctactggtg  
 ctgacgcctggccggccggcgggactatccacctgcaagactatcgacatggagctg  
 gtgaagcgggaagcgcatcgaggccatccgggccagatcctgtccaagctcgggctcggc  
 agccccgagccaggggaggtgcggccggccgctgccgagggcgtgctgcgcctg  
 tacaacagcaccgcgaccgggtggccggggagagtgagaaacccgagccgagcctgag  
 gccgactactacgcccaaggaggtcacccgctgctaagtgtggaacccacaacgaaatc  
 tatgacaagttcaagcagagtagtacacagcatatatgttcttcaacacatcagagctc  
 cgagaagcgggtacctgaacccgtgttgcttccgggagagctgcgtctgctgaggctc  
 aagttaaaagtgagcagcacgtggagctgtaccagaaatacagcaacaattcctggcga  
 tacctcagcaaacggctgctggcaccagcgactgccagagtggttatctttgatgtc  
 accggagttgtgcggcagtggttagccgtggaggggaaattgagggtttcgccttagc  
 gccactgctcctgtgacagcaggataaacacactgcaagtggacatcaacgggttcaact  
 accggccgaggtgacctggccaccattcatggcatgaacggcctttcctgctctc  
 atggccaccccgctggagagggccagcatctgcaaaactcccgccagccgagccctg  
 gacaccaactattgcttcagctccacggagaagaaactgctgcgtgcggcagctgtacatt  
 gacttccgcaaggacctcggctgggaagtggatccacgagcccaagggtaccatgccaac  
 ttctgcctcgggccctgccctacatttgagccctggacacgcagtagcaagggtccctg  
 gccctgtacaaccagcataaacccggggcctcggcggcgccgtgctgcgtgccgagggcg  
 ctggagccgctgcccathgtgtactacgtggggccgaagcccaagggtggagcagctgtcc  
 aacatgatcgtgcgctcctgcaagtgacagtga

SEC ID NO:

FIG. 23A

mppsglrllp1llp1llw1lvtgprpaaglstcktidmelmelvkrrkrieairgqilsklrla  
 spsqgevp1p1lpeav1alynstrdrvagesaepepepeadyakevtrvlmvethnei  
 ydkfkqsths1ymfntselreavpepv1lsraelr1lrlklkveqhvel1yqkysnns1wr  
 y1snr1l1apsd1spew1sfdvtg1vvrq1w1l1srggeiegr1lsahcscdsrdnt1lqvdingft  
tgrrgdlatihgmnrp1ll1matp1leragh1qssrhr1raldtn1ycfssteknccvrq1yi  
dfrkdlqwkwihepkqyhanfclgpcpyiws1dtqyskv1al1ynqhn1p1qasaapccvpqa  
lep1pi1vy1vqr1kpkveq1snm1ivrsc1kcs

SEC ID NO:2 (proteína madura subrayada)

FIG. 23B