

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 235**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07818669 .9**
96 Fecha de presentación: **04.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2074429**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2009**

54 Título: **CTGF como biomarcador , diana terapéutica y diagnóstica**

30 Prioridad:
16.10.2006 EP 06021596

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.06.2012

73 Titular/es:
**BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT
MÜLLERSTRASSE 178
13353 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:
**GOLZ, Stefan; SUMMER, Holger;
GEERTS, Andreas; BRÜGGEMEIER, Ulf;
ALBRECHT-KÜPPER, Barbara;
KLEIN, Martina; STEPPAN, Sonja;
ELLINGHAUS, Peter; D'URSO, Donatella;
SEEWALD, Michael y
MILTING, Hendrik**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 383 235 T3

DESCRIPCIÓN

CTGF como biomarcador, diana terapéutica y diagnóstica

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se encuentra en el campo de la biología molecular, más particularmente la presente invención se refiere a secuencias de ácido nucleico y a secuencias de aminoácidos de un CTGF de rata y su regulación para el tratamiento y uso diagnóstico como biomarcador de enfermedades cardiovasculares y enfermedades hematológicas en mamíferos.

Antecedentes de la invención**Tecnología TaqMan / perfil de expresión**

10 TaqMan es una técnica desarrollada recientemente en la que la liberación de un colorante indicador fluorescente a partir de una sonda de hibridación en tiempo real durante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es proporcional a la acumulación del producto de la PCR. La cuantificación se basa en la parte temprana lineal de la reacción y mediante la determinación del ciclo umbral (CU), al cual se detecta primero la fluorescencia por encima del fondo.

15 Las tecnologías de expresión génica pueden ser útiles en varias áreas del descubrimiento y desarrollo de fármacos, tales como la identificación de la diana, la optimización líder y la identificación de mecanismos de acción. La tecnología TaqMan se puede usar para comparar las diferencias entre los perfiles de expresión de tejido normal y de tejido enfermo. El perfil de expresión se ha usado en la identificación de genes, regulados por aumento o por disminución en diversas enfermedades. Una aplicación interesante del perfil de expresión es la monitorización temporal de los cambios en la expresión génica durante la progresión de la enfermedad y el tratamiento farmacológico o en pacientes frente a individuos sanos. La premisa en este enfoque es que los cambios en el patrón de expresión génica en respuesta a estímulos fisiológicos o ambientales (p. ej., fármacos) puede servir como pistas indirectas de los genes causantes de la enfermedad o como dianas del fármaco. Además, los efectos de los fármacos con una eficacia establecida sobre los patrones de la expresión génica global pueden proporcionar una guía, o una firma genérica, frente a la que se puede comparar un nuevo candidato a fármaco.

CTGF

Se puede acceder a la secuencia de nucleótidos del CTGF mediante el número de registro M92934 (ser humano) y AF120275 (rata). Las secuencias se proporcionan en la SEC ID N° 1 (ser humano) y la SEC ID N° 2 (rata). La secuencia de aminoácidos del CTGF se representa en la SEC ID N° 3 (ser humano) y la SEC ID N° 4 (rata).

30 El factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), también conocido como CCN2, es un factor de crecimiento multifuncional de 38 kDa que es miembro de la familia de CCN ([CYR61 (rico en cisteína 61) / CTGF / NOV (sobrexpresado en el nefroblastoma)] de proteínas secretadas que se caracterizan por ser proteínas matricelulares ricas en cisteína cada una de las cuales contiene cuatro dominios modulares que muestran homología con las proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (dominio 1), una repetición de tipo C del factor de von Willebran (dominio 2), una repetición de tipo 1 de la trombospondina (dominio 3) y un dominio en nudo de cisteína (dominio 4), respectivamente. [Bork y col. (1993)]. Un dominio en nudo de cisteína contiene sitios de unión a la heparina que median en la unión a los proteoglicanos de heparán sulfato de la superficie celular y de la matriz extracelular [Chen y col., (2001)]. El CTGF es un gen temprano inmediato inducido potentemente por diversos estímulos que regulan el depósito en la matriz extracelular, la remodelación tisular y la neovascularización, incluidos el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento transformante (TGF)-h, el factor de crecimiento de fibroblastos básico, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la hipoxia en fibroblastos o células endoteliales [Igarashi y col., (1993); Grotendorst y col. (1996); Shima y col. (2001); Suzuma y col., (2000)]. El CTGF exhibe un diverso abanico de funciones celulares que incluyen la adhesión celular, la estimulación de la migración celular y la potenciación de la síntesis de ADN inducida por factor de crecimiento [Takigawa y col. (2000)].

45 El CTGF interacciona con los receptores de la integrina avh3, allbh3, a6h1 y amh2 [Chen y col., (2001); Gao y col. (2004); Jedsadayamata y col., (1999); Schober y col., (2002)] y se ha comunicado que es un ligando de la proteína 1 relacionada con las lipoproteínas de alta densidad (LRP-1); interacciona con LRP-5 para inhibir la señalización Wnt [Gao y col., (2003)] y puede interaccionar directamente con varios factores de crecimiento que incluyen el TGF-h [Roostenberg y col. (2004)]. En conjunto, los últimos estudios indican que el mecanismo de acción del CTGF se refiere a su capacidad para modular y amplificar diversos procesos biológicos a través de la unión directa a factores mitogénicos, fibrogénicos y angiogénicos que son importantes en la inflamación y la fibrosis.

El CTGF está publicado (pero no solo) en las patentes WO2004075835 y WO02068579.

55 Vallon Volker y col. describen formación de CTGF cardíaco dependiente de SGK1 y fibrosis tras tratamiento con DOCA (JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, vol. 84, n° 5, 2006 páginas 396-404). Ohnishi Hiromichi y col. describen el incremento de la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo en la zona del infarto de infarto de miocardio inducido experimentalmente en ratas (JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARIOLOGY,

vol. 30, nº 11, 1998, página 2411). Además, Lee Young-Sam y col. Divulgan que la hipertensión pulmonar inducida con monocrotalina se correlaciona con la regulación por incremento de la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo en los pulmones (EXPERIMENTAL & MOLECULAR MEDICINE, vol. 37, nº 1, 2005, página 27). Rodrigue-Way y col. Describen genes sarcoméricos implicados en el remodelado inverso del corazón durante soporte con dispositivo de ayuda al ventrículo izquierdo (JOURNAL OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION, MOSBY-YEAR BOOK, INC., ST LOUIS, MO, US, vol. 24, nº 1, 2005, páginas 73-80). En los documentos WO03/024308, WO2005/070446 y US2005136502 divulgan anticuerpos, cebadores y sondas para detectar la proteína o el polinucleótido del CTGF.

Sumario de la invención

10 La invención se refiere al uso de CTGF como biomarcador de enfermedad, eficacia o criterio de valoración sustituto para una terapia de hipertensión pulmonar.

Breve descripción de las figuras

- Fig. 1 muestra la secuencia nucleotídica de un polinucleótido de CTGF humano (SEC ID Nº 1).
- Fig. 2 muestra la secuencia nucleotídica de un polinucleótido de CTGF de rata (SEC ID Nº 2).
- 15 Fig. 3 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de CTGF humano (SEC ID Nº 3).
- Fig. 4 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de CTGF de rata (SEC ID Nº 4).
- Fig. 5 muestra la secuencia nucleotídica de un cebador útil para la invención (SEC ID Nº 5).
- Fig. 6 muestra la secuencia nucleotídica de un cebador útil para la invención (SEC ID Nº 6).
- Fig. 7 muestra una secuencia nucleotídica útil como sonda para detectar proteínas de la invención (SEC ID Nº 7).
- 20 Fig. 8 muestra la secuencia nucleotídica de un cebador útil para la invención (SEC ID Nº 8).
- Fig. 9 muestra la secuencia nucleotídica de un cebador útil para la invención (SEC ID Nº 9).
- Fig. 10 muestra una secuencia nucleotídica útil como sonda para detectar proteínas de la invención (SEC ID Nº 10).
- Fig. 11 muestra los resultados de un análisis de expresión en tiempo real de CTGF en corazones de rata (DOCA). Eje X: tratamiento; eje Y: expresión relativa; S: control; B: control/placebo; C1: compuesto P/concentración 1; C2: compuesto P/concentración 2; C3: compuesto P / concentración. La expresión de CTGF está regulada por el estado de la enfermedad, el tratamiento y la dosis en el modelo animal.
- 25 Fig. 12 muestra los resultados de un análisis de expresión en tiempo real de CTGF en corazones de rata (oclusión). Eje X: tratamiento; eje Y: expresión relativa; A: control; B: control/placebo; C1: compuesto P/concentración 1; C2: compuesto P/concentración 2; C3: compuesto P / concentración. La expresión de CTGF está regulada por el estado de la enfermedad, el tratamiento y la dosis en el modelo animal.
- 30 Fig. 13 muestra los resultados de un análisis de expresión en tiempo real de CTGF en corazones de rata (monocrotalina). Eje X: tratamiento; eje Y: expresión relativa; A: control; B: control/placebo; C1: compuesto P/concentración 1; C2: compuesto P/concentración 2. La expresión de CTGF está regulada por el estado de la enfermedad, el tratamiento y la dosis en el modelo animal.
- 35 Fig. 14 muestra los resultados de un análisis de expresión en micromatriz de CTGF en corazones de rata (DOCA). Eje X: tratamiento; eje Y: expresión relativa; A: control; B: control/placebo; C: compuesto P/concentración 1; D: compuesto P/concentración 2. La expresión de CTGF está regulada por el estado de la enfermedad, el tratamiento y la dosis en el modelo animal.
- 40 Fig. 15 muestra los resultados de un análisis de expresión en micromatriz de CTGF en corazones de rata (oclusión). Eje X: tratamiento; eje Y: expresión relativa; A: control; B: control/placebo; C: compuesto P/concentración 1; D: compuesto P/concentración 2. La expresión de CTGF está regulada por el estado de la enfermedad, el tratamiento y la dosis en el modelo animal.
- 45 Fig. 16 muestra los resultados de un análisis de expresión en micromatriz de CTGF en corazones de rata (monocrotalina). Eje X: tratamiento; eje Y: expresión relativa; A: control; B: control/placebo; C: compuesto P/concentración 1; D: compuesto P/concentración 2. La expresión de CTGF está regulada por el estado de la enfermedad, el tratamiento y la dosis en el modelo animal.
- Fig. 17 muestra los resultados de un análisis de expresión en micromatriz de CTGF en corazones humanos. Eje X: estado de enfermedad; eje Y: expresión relativa; N: sin fallo; P: Pre-LVAD. La expresión de CTGF está regulada por el estado de enfermedad en corazón humano.
- 50

Descripción detallada de la invenciónDefinición de los términos

5 Un "oligonucleótido" es una tira de residuos nucleotídicos que tiene un número suficiente de bases para usar como oligómero, amplímero o sonda en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos se preparan a partir de una secuencia genómica o de ADNc y se usan para amplificar, revelar o confirmar la presencia de un ADN o ARN similar en una célula o tejido concretos. Los oligonucleótidos u oligómeros comprenden porciones de una secuencia de ADN que tiene al menos unos 10 nucleótidos y tantos como aproximadamente 35 nucleótidos, preferentemente unos 25 nucleótidos.

10 Las "sondas" pueden derivar de ácidos nucleicos mono o bicatenarios naturales o recombinantes o pueden sintetizarse químicamente. Son útiles en la detección de la presencia de secuencias idénticas o similares. Dichas sondas pueden marcarse con moléculas indicadoras utilizando traducción de mella ambulante, reacción de relleno con Klenow, PCR u otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Las sondas de ácido nucleico pueden usarse en hibridaciones de tipo Southern, Northern o in situ para determinar si el ADN o ARN que codifica una determinada proteína está presente en un tipo de célula, tejido u órgano.

15 Un "fragmento de un polinucleótido" es un ácido nucleico que comprende toda o cualquier parte de una molécula de nucleótido dada, en la que el fragmento tiene menos nucleótidos que aproximadamente 6 kb, preferentemente menos que aproximadamente 1 kb;

20 Las "moléculas indicadoras" son radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos que se asocian con una secuencia nucleotídica o aminoacídica concreta, de modo que se establece la presencia de una secuencia determinada o se permite la cuantificación de una secuencia determinada.

25 Las moléculas "quiméricas" se pueden construir mediante la introducción de toda o parte de la secuencia de nucleótidos de la presente invención en un vector que contiene una secuencia adicional de ácido nucleico que podría esperarse que cambie una cualquiera o varias de las siguientes características de CTGF: localización celular, distribución, afinidades de unión a ligando, afinidades entre cadenas, índice de degradación/recambio, señalización, etc.

"Activo" con respecto a un polipéptido de CTGF, se refiere a las formas, fragmentos o dominios de un polipéptido de CTGF que conserva la actividad biológica y/o antigénica de un polipéptido de CTGF.

30 "Polipéptido de CTGF natural" se refiere a un polipéptido producido por células no sometidas a ingeniería genética y, específicamente, contempla varios polipéptidos que surgen a partir de modificaciones postraduccionales del polipéptido, incluidas, entre otras, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación.

"Derivado" se refiere a polipéptidos que se han modificado químicamente mediante técnicas tales como ubiquitinación, marcaje (véase en lo que antecede), pegilación (derivación con polietilenglicol) e inserción o sustitución química de aminoácidos tales como ornitina que normalmente no están en las proteínas humanas.

35 "Sustituciones conservadoras de aminoácidos" son el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro de propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato o una treonina por una serina.

40 Normalmente las "inserciones" o las "deleciones" se encuentran en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse experimentalmente produciendo el péptido de forma sintética mientras que se efectúan sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos en la secuencia mediante técnicas de ADN recombinante.

Una "secuencia señal" o "secuencia líder" se puede usar, cuando se desee, para dirigir al polipéptido a través de una membrana de una célula. Tal secuencia puede estar presente de forma natural en los polipéptidos de la presente invención o puede proporcionarse a partir de fuentes heterólogas mediante técnicas de ADN recombinante.

45 Un "oligopéptido" es una tira breve de residuos de aminoácidos y puede expresarse a partir de un oligonucleótido. Los oligopéptidos comprenden una tira de residuos de aminoácidos de al menos 3, 5, 10 aminoácidos y, como máximo, 10, 15, 25 aminoácidos, normalmente de al menos 9 a 13 aminoácidos y de suficiente longitud para mostrar actividad biológica y/o antigénica.

"Inhibidor" es cualquier sustancia que retrasa o evita una reacción o respuesta química o fisiológica. Los inhibidores frecuentes incluyen, entre otros, moléculas antisentido, anticuerpos y antagonistas.

50 "Biomarcadores" son parámetros mensurables y cuantificables (p. ej., concentración enzimática específica, concentración hormonal específica, distribución del fenotipo génico específico en una población, presencia de sustancias biológicas), que sirven como índices para evaluaciones relacionadas con la salud y la fisiología, tal como riesgo de enfermedad, trastornos psiquiátricos, exposición ambiental y sus efectos, diagnóstico de la enfermedad, procesos metabólicos, abuso de sustancias, embarazo, desarrollo de línea celular, estudios epidemiológicos etc. El

parámetro que se pueden usar para identificar un efecto tóxico en un organismo individual y se puede usar en extrapolación entre especies. Indicador que señala un acontecimiento o condición en un sistema biológico o muestra y que da una medida de la exposición, el efecto o la susceptibilidad.

5 Los marcadores biológicos pueden reflejar diversas características de enfermedad, incluido el nivel de exposición a un desencadenante ambiental o genético, un elemento del propio proceso de la enfermedad, una etapa intermedia entre la exposición y el inicio de la enfermedad o un factor independiente asociado con el estado de la enfermedad pero no causante de la patogenia. Dependiendo de la característica específica se pueden usar biomarcadores para identificar el riesgo de desarrollar una enfermedad (biomarcadores de antecedentes), ayudar a la identificación de la enfermedad (biomarcadores diagnósticos) o predecir el curso futuro de la enfermedad, incluida la respuesta a la
10 terapia (biomarcadores pronósticos).

“Expresión estándar” es una medición cuantitativa o cualitativa para comparación. Se basa en un número estadísticamente adecuado de muestras normales y se crea para usar como base de comparación cuando se realizan ensayos diagnósticos, estudios clínicos o después de realizar perfiles terapéuticos de pacientes.

15 “Animal” como se usa en la presente memoria descriptiva puede definirse de modo que incluya humanos, animales domésticos (p. e., gatos, perros, etc.), agrícolas (p. ej., vacas, caballos, ovejas, etc.) o especies de experimentación (p. ej., ratón, rata, conejo etc.).

Un “polinucleótido de CTGF”, dentro del significado de la invención, deberá entenderse como una molécula de ácido nucleico seleccionada de un grupo compuesto por

- 20 (i) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3 o la SEC ID N°: 4,
- (ii) moléculas de ácido nucleico que comprende la secuencia de SEC ID N° 1 o la SEC ID N°: 2,
- (iii) moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia de SEC ID N° 1 o la SEC ID N°: 2,
- (iv) moléculas de ácido nucleico cuya hebra complementaria híbrida en condiciones estrictas con una molécula de ácido nucleico de (i), (ii) o (iii),
- 25 (v) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (iii) debido a la degeneración del código genético,
- (vi) moléculas de ácido nucleico que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%; y
- 30 (vii) en el que el polipéptido codificado por dichas moléculas de ácido nucleico de (i)-(vi) tienen actividad CTGF

Un “polinucleótido de CTGF”, dentro del significado de la invención, deberá entenderse como un polipéptido seleccionado de un grupo compuesto por

- (i) polipéptidos que tienen la secuencia de SEC ID N° 3 o 4,
- (ii) polipéptidos que comprenden la secuencia de SEC ID N° 3 o 4,
- 35 (iii) polipéptidos que están codificados en los polinucleótidos de CTGF; y
- (iv) polipéptidos que muestran una identidad de al menos 99%, 98%, 95%, 90% u 80% con un polipéptido de (i), (ii) o (iii);

en los que dicho polipéptido tiene una actividad de CTGF.

40 Las secuencias de nucleótidos que codifican un CTGF (o su complemento) tienen numerosas aplicaciones en técnicas conocidas para los expertos en la técnica de biología molecular. Estas técnicas incluyen el uso como sondas de hibridación, uso en la construcción de oligómeros para PCR, uso para cartografía de cromosomas y de genes, uso en la producción recombinante de CTGF y uso en la generación de ADN o ARN antisentido, sus análogos químicos y similares. Los usos de nucleótidos que codifican un CTGF descrito en la presente memoria descriptiva son ejemplos de técnicas conocidas y no se pretende limitar su uso en cualquier técnica conocida para
45 un experto ordinario en la técnica. Además, las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria descriptiva pueden usarse en técnicas de biología molecular que todavía no se han desarrollado, con la condición de que las técnicas nuevas dependan de propiedades de secuencias nucleotídicas actualmente conocidas, por ejemplo el código genético en tripletes, las interacciones específicas entre los pares de bases, etc.

50 Los expertos en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, se pueden producir una multitud de secuencias nucleotídicas que codifican CTGF. Algunas de ellas sólo llevarán una

homología mínima con la secuencia de nucleótidos del CTGF conocido y natural. La invención ha contemplado específicamente todas y cada una de las posibles variaciones de la secuencia nucleotídica que podrían hacerse mediante la selección de combinaciones basadas en la elección de los posibles codones. Estas combinaciones se efectúan de acuerdo con el código genético en tripletes estándar según se aplica a la secuencia nucleotídica del CTGF natural y todas estas variaciones se deben considerar como descritas específicamente.

Aunque las secuencias de nucleótidos que codifican un CTGF, sus derivados o sus variantes pueden, preferentemente, hibridar con la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de CTGF natural en condiciones estrictas, puede ser ventajoso producir secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de CTGF o sus derivados que poseen un uso de codones considerablemente diferente. Los codones se pueden seleccionar para incrementar el índice al que se produce la expresión del péptido en un huésped de expresión procariótica o eucariótica concreto de acuerdo con la frecuencia con la que el huésped utiliza determinados codones. Otras razones para alterar considerablemente la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CTGF y/o sus derivados sin alterar la secuencia de aminoácidos codificada incluyen la producción de transcritos de ARN que tengan propiedades más deseables, como una mayor semivida, que los transcritos producidos a partir de la secuencia natural.

Las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de CTGF pueden unirse a otras diversas secuencias nucleotídicas por medio de técnicas bien establecidas de ADN recombinante. Secuencias de nucleótidos útiles para unir a los polinucleótidos de CTGF incluyen una serie de vectores de clonación, tales como plásmidos, cósmicos, derivados del fago lambda, fagemidos y similares. Entre los vectores de interés se incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas, vectores de secuenciación etc. En general, los vectores de interés pueden contener un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios sensibles a endonucleasas de restricción convenientes y marcadores seleccionables para uno o más sistemas de células huésped.

Otro aspecto de la presente divulgación es proporcionar sondas de hibridación específicas de CTGF capaces de hibridar con las secuencias de nucleótidos naturales que codifican CTGF. Tales sondas también se pueden usar para la detección de secuencias que codifican proteínas similares y, preferentemente, deben mostrar una identidad nucleotídica con los polinucleótidos de CTGF de al menos un 40%. Las sondas de hibridación de la invención sujeto pueden derivar de la secuencia nucleotídica presentada como SEC ID N° 1 o de secuencias genómicas que incluyen promotor, potenciadores o intrones del gen nativo. Las sondas de hibridación pueden marcarse con diversas moléculas indicadoras usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Debe reconocerse que muchos análogos delecionales o mutacionales de los polinucleótidos de CTGF serán eficaces sondas de hibridación para polinucleótidos de CTGF. En consecuencia, la invención se refiere a secuencias de ácido nucleico que hibrida con tales secuencias de ácido nucleico que codifica CTGF en condiciones estrictas.

“Condiciones estrictas” se refiere a condiciones que permiten la hibridación de secuencias de ácido nucleico considerablemente relacionadas. Por ejemplo, tales condiciones permitirán, generalmente, la hibridación de la secuencia con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 85%, preferentemente con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 90%, más preferentemente con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 95%. Las condiciones y sondas de hibridación se pueden ajustar de modos bien caracterizados para alcanzar una hibridación selectiva de sondas derivadas de seres humanos. Las condiciones estrictas, dentro del significado de la invención, son 68 °C en un tampón que contiene 0,2 x SSC (1 x solución salina-citrato estándar = NaCl 150 mM, Tris-HCl 15 mM) [Sambrook y col., (1989)].

Las moléculas de ácido nucleico que hibridarán con los polinucleótidos de CTGF en condiciones estrictas se pueden identificar funcionalmente. Sin limitaciones, entre los ejemplos de los usos de las sondas de hibridación se incluyen: usos histoquímicos tales como identificación de tejidos que expresan CTGF; medición de niveles de ARNm, por ejemplo para identificar el tipo de tejido de una muestra o para identificar células que expresan niveles anómalos de CTGF; y detección de polimorfismos de CTGF.

La PCR proporciona usos adicionales para oligonucleótidos basados en la secuencia de nucleótidos que codifica CTGF. Dichas sondas usadas en la PCR pueden ser de origen recombinante, sintetizado químicamente o una mezcla de ambos. Los oligómeros pueden comprender pequeñas secuencias de nucleótidos empleadas en condiciones optimizadas para la identificación de CTGF en tejidos específicos o uso diagnóstico. Los mismos dos oligómeros, un grupo anidado de oligómeros, o incluso un grupo degenerado de oligómeros, pueden emplearse en condiciones menos estrictas para la identificación de ADN o ARN estrechamente relacionados.

Ahora están establecidas las normas para el diseño de cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), según lo revisado en los protocolos de PCR. Los cebadores degenerados, es decir las preparaciones de cebadores que son heterogéneos en localizaciones de secuencias dadas, se pueden diseñar para amplificar secuencias de ácido nucleico que son altamente homólogas, pero no idénticas, al CTGF. En la actualidad se dispone de estrategias que permiten requerir sólo uno de los cebadores para hibridar específicamente con una secuencia conocida. Por ejemplo, cebadores adecuados de ácido nucleico se pueden unir al ácido nucleico que se busca amplificar para proporcionar el socio de hibridación para uno de los cebadores. De este modo, sólo uno de los

cebadores tiene que estar basado en la secuencia del ácido nucleico que se busca amplificar.

Los métodos de PCR para amplificar el ácido nucleico usarán al menos dos cebadores. Uno de estos cebadores podrá hibridar con una primera hebra del ácido nucleico que se va a amplificar y cebar en una primera dirección la síntesis de ácido nucleico dirigida por enzimas. El otro podrá hibridar con la secuencia recíproca de la primera hebra (si la secuencia a amplificar es monocatenaria, esta secuencia será, inicialmente, hipotética pero se sintetizará en el primer ciclo de amplificación) y cebar la síntesis del ácido nucleico a partir de dicha hebra en la dirección opuesta a la primera dirección y hacia el punto de la hibridación del primer cebador. Las condiciones para realizar dicha amplificación, en particular en las condiciones estrictas de hibridación preferidas, son bien conocidas.

Otros medios de producir sondas específicas de hibridación para CTGF incluyen la clonación de secuencias de ácido nucleico que codifican CTGF o derivados de CTGF en vectores para la producción de sondas de ARNm. Tales vectores se conocen en la técnica, están disponibles comercialmente y pueden usarse para sintetizar sondas de ARN in Vitro por medio de la adición de la ARN polimerasa adecuada, como la ARN polimerasa T7 o SP6 y las moléculas indicadoras adecuadas.

Es posible producir una secuencia de ADN, o porciones de la misma, completamente mediante química sintética. Tras la síntesis, la secuencia de ácido nucleico puede insertarse en cualquiera de los muchos vectores de ADN disponibles y sus respectivas células huésped usando técnicas bien conocidas en la técnica. Además, la química sintética se puede usar para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos. Como alternativa, una porción de la secuencia en la que se desea una mutación se puede sintetizar y recombinar con una porción más larga de una secuencia genómica o recombinante existente.

Los polinucleótidos de CTGF se pueden usar para producir un oligo o polipéptido purificado mediante métodos bien conocidos de tecnología de ADN recombinante. El oligopéptido puede expresarse en diversas células huésped, bien procarióticas o eucarióticas. Las células huésped pueden ser de la misma especie de la derivó la secuencia nucleotídica o de una especie diferente. Las ventajas de producir un oligonucleótido mediante tecnología de ADN recombinante incluyen obtener cantidades adecuadas de la proteína para purificar y la disponibilidad de procedimientos de purificación simplificados.

Determinaciones cuantitativas de ácidos nucleicos

Una importante etapa en el análisis genético molecular de la enfermedad humana es a menudo la enumeración del número de copias de un ácido nucleico o de la expresión relativa de un gen en tejidos concretos.

En la actualidad se dispone de varios enfoques diferentes para realizar determinaciones cuantitativas de ácidos nucleicos. Técnicas basadas en cromosomas, tales como la hibridación genómica comparativa (HGC) y la hibridación in situ fluorescente (HISF) facilitan los esfuerzos para localizar citogenéticamente regiones genómicas que están alteradas en las células tumorales. Las regiones de alteración genómica se pueden estrechar más usando el análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH), en el que el ADN se analiza y se compara con el ADN normal según la pérdida de marcador polimórfico heterocigoto. Los primeros experimentos usaron polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) [Johnson, (1989)], o ADN minisatélite hipervariable [Barnes, 2000]. En los últimos años el LOH se ha realizado, principalmente, usando amplificación por PCR de los marcadores microsatélites y electroforesis de los productos de PCR radiomarcados [Jeffreys, (1985)] o marcados con fluorescencia [Weber, (1990)] y se ha comparado entre los ADN pareados normales y de enfermedad.

También se ha desarrollado una serie de otros procedimientos para cuantificar ácidos nucleicos [Gergen, (1992)]. Más recientemente se han desarrollado los procedimientos de PCR y RT-PCR, que pueden medir la cantidad de un ácido nucleico en una muestra. Por ejemplo, un enfoque mide la cantidad del producto de PCR en la fase log de la reacción antes de la formación de los equilibrios de los productos de reacción [Thomas, (1980)].

Normalmente se utiliza una secuencia génica contenida en todas las muestras a una cantidad relativamente constante para la normalización de la eficacia de la amplificación de la muestra. No obstante, este enfoque sufre varios inconvenientes. El procedimiento requiere que cada muestra tenga cantidades iguales del ácido nucleico y que la eficacia de amplificación entre las muestras es idéntica hasta el momento del análisis. Además, es difícil usar los procedimientos convencionales de cuantificación por PCR, tal como electroforesis en gel o hibridación por captura en placa, para determinar que todas las muestras de hecho se analizan durante la fase log de la reacción tal y como requiere el procedimiento.

Otro procedimiento denominado PCR competitiva cuantitativa (QC)-PCR, como el nombre indica, implica la inclusión de un competido control interno en cada reacción [Piatak, (1993), BioTechniques]. La eficacia de cada reacción se normaliza con el competidor interno. Normalmente, a cada muestra se añade una cantidad conocida del competidor interno. El producto de PCR diana desconocido se compara con el producto de PCR competidor conocido para obtener una cuantificación relativa. Una dificultad con este enfoque general reside en el desarrollo de un control interno que amplifica con la misma eficacia que la molécula diana.

Ensayos con nucleasa 5' fluorogénica

Los ensayos con nucleasa fluorogénica son un procedimiento de cuantificación en tiempo real que usa una sonda para monitorizar la formación de un producto de amplificación. La base de este procedimiento de monitorización de la formación del producto de amplificación es medir continuamente la acumulación del producto de PCR usando una sonda oligonucleotídica fluorogénica con doble marcaje, un enfoque con frecuencia denominado en la literatura simplemente como el "procedimiento TaqMan" [Piatak, (1993), Science; Heid, (1996); Gibson, (1996); Holland. (1991)].

La sonda usada en estos análisis normalmente es un oligonucleótido corto (de aproximadamente 20-25 bases) que está marcado con dos colorantes fluorescentes diferentes. El extremo 5' de la sonda está unido a un colorante indicador y el extremo 3' está unido a un colorante inactivador, aunque los colorantes también podrían estar unidos en otras localizaciones de la sonda. La sonda está diseñada para tener al menos una complementariedad sustancial de secuencia con el sitio de unión de la sonda. A la mezcla de reacción se añaden los cebadores de PCR en 5' y en 3' que se unen a las regiones adyacentes del locus. Cuando la sonda está intacta se produce transferencia de energía entre los dos fluoróforos y el inactivador inactiva la emisión desde el indicador. Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda se escinde mediante la actividad 5' nucleasa de una polimerasa de ácido nucleico tal como la Taq polimerasa, de modo que se libera el indicador del oligonucleótido-inactivador y se produce un incremento de la intensidad de la emisión del indicador, que se puede medir mediante un detector adecuado.

Un detector que está específicamente adaptado para medir las emisiones de fluorescencia tales como los creados durante un ensayo fluorogénico es ABI 7700 o 4700 HT fabricado por Applied Biosystems, Inc. en Foster City, Calif. El ABI 7700 usa fibra óptica conectada con cada pocillo en una disposición de tubos de PCR de 96 o 384 pocillos. El instrumento incluye un láser para excitar los marcajes y es capaz de medir la intensidad de los espectros de fluorescencia de cada tubo con monitorización continua durante la amplificación por PCR. Cada tubo se reanaliza cada 8,5 segundos.

El software informático proporcionado con el instrumento es capaz de registrar la intensidad de la fluorescencia de un indicador e inactivador durante la amplificación. Los valores registrados se usarán después para calcular el incremento de la intensidad de la emisión normalizada del indicador de un modo continuo. El incremento de la intensidad de la emisión se representa frente al tiempo, es decir el número de ciclos de amplificación, para producir una medida continua de la amplificación. Para cuantificar el locus en cada reacción de amplificación, el gráfico de amplificación se examina en un punto durante la fase log de la acumulación del producto. Esto se consigue mediante a asignación de un umbral de la intensidad de la fluorescencia por encima del fondo y determinando el punto en el cual cada gráfico de amplificación cruza el umbral (definido como el número de ciclo umbral o Ct). Las diferencias en el número de ciclo umbral se usan para cuantificar la cantidad relativa de la diana de PCR contenida en cada tubo. Suponiendo que cada reacción funciona con una eficacia de PCR del 100%, una diferencia de una Ct representa una diferencia del doble en la cantidad del molde de partida. El valor de fluorescencia se puede usar junto con una curva estándar para determinar la cantidad de producto de amplificación presente.

Procedimientos de detección no basados en sondas

Se dispone de diversas opciones para medir los productos de amplificación tal como se han formado. Un procedimiento usa marcadores, tales como colorantes, que sólo se unen a ADN bicatenario. En este tipo de enfoque, el producto de amplificación (que es bicatenario) se une a las moléculas colorantes en solución para formar un complejo. Con los colorantes adecuados, es posible distinguir ente moléculas colorantes libres en solución y moléculas colorantes unidas al producto de amplificación. Por ejemplo, ciertos colorantes sólo emiten fluorescencia cuando están unidos al producto de amplificación. Ejemplos de colorantes que se pueden usar en procedimientos de este tipo general incluyen, entre otros, Syber Green.TM. y Pico Green de Molecular Probes, Inc. de Eugene, Oreg., bromuro de etidio, yoduro de propicio, cromomicina, naranja acridina, Hoechst 33258, Toto-1, Yoyo-1, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol clorhidrato).

Otra técnica de detección en tiempo real mide la alteración en la transferencia de energía de fluorescencia entre los fluoróforos conjugados con los cebadores de PCR [Livak, (1995)].

Procedimientos de detección basados en sondas

Estos procedimientos de detección implican alguna alteración de la estructura o conformación de una sonda hibridada con el locus entre el par cebador de amplificación. En algunos casos, la alteración se debe a la extensión dependiente de molde catalizada por una polimerasa de ácido nucleico durante el proceso de amplificación. La alteración genera una señal detectable que es una medida indirecta de la cantidad de producto de amplificación formado.

Por ejemplo, algunos procedimientos implican la degradación o digestión de la sonda durante la reacción de extensión. Estos procedimientos son una consecuencia de la actividad 5'-3' nucleasa asociada con algunas polimerasas de ácido nucleico. Las polimerasas que tienen esta actividad escinden mononucleótidos o pequeños oligonucleótidos a partir de una sonda oligonucleotídica hibridada con su secuencia complementaria localizada dentro del locus.

El extremo 3' del cebador anterior proporciona el sitio de unión inicial para la polimerasa de ácido nucleico. Dado que la polimerasa cataliza la extensión del cebador anterior y se encuentra con la sonda unida, la polimerasa de ácido nucleico desplaza una porción del extremo 5' de la sonda y, mediante su actividad nucleasa, escinde los mononucleótidos u oligonucleótidos de la sonda.

5 El cebador anterior y la sonda se pueden diseñar de un modo tal que se hibriden con la hebra complementaria en proximidad estrecha entre sí. De hecho, el extremo 3' del cebador anterior y el extremo 5' de la sonda pueden estar colindantes uno del otro. En esta situación, no es necesaria la extensión del cebador anterior para que la polimerasa de ácido nucleico comience a escindir la sonda. En el caso en el que los nucleótidos intermedios separen el cebador anterior y la sonda, es necesaria la extensión del cebador antes de que la polimerasa de ácido nucleico se encuentre con el extremo 5' de la sonda. Una vez que se produce el contacto y la polimerización continúa, la actividad 5'—3' exonucleasa de la polimerasa de ácido nucleico comienza a escindir los mononucleótidos u oligonucleótidos desde el extremo 5' de la sonda. La digestión de la sonda continúa hasta que la porción restante de la sonda se disocia de la hebra complementaria.

15 En solución, las dos secciones terminales pueden hibridar entre sí para formar un bucle en horquilla. En esta conformación, el colorante indicador y el inactivador están en una proximidad suficiente como para que la fluorescencia del colorante indicador es inactivada de forma eficaz por el colorante inactivador. En contraste con ello, la sonda hibridada resulta en una conformación linealizada en la que la extensión de la inactivación disminuye. Por tanto, mediante la monitorización de los cambios de emisión para los dos colorantes, es posible monitorizar de forma indirecta la formación del producto de amplificación.

20 *Sondas*

La sonda marcada se selecciona de modo que su secuencia sea considerablemente complementaria a un segmento del locus de prueba o de un locus de referencia. Como se ha indicado antes el sitio del ácido nucleico al que la sonda se une deberá localizarse entre los sitios de unión del cebador para los cebadores de amplificación anterior y posterior.

25 *Cebadores*

Los cebadores usados en la amplificación se seleccionan de modo que sean capaces de hibridar con las secuencias en regiones flanqueantes del locus que es están amplificando. Los cebadores se escogen de modo que tengan una complementariedad considerable con las diferentes hebras del ácido nucleico que se está amplificando. Cuando se usa una sonda para detectar la formación de productos de amplificación, los cebadores se seleccionan de modo que flanqueen a la sonda, es decir están localizados en 5' y 3' de la sonda.

30 El cebador debe tener una longitud suficiente para que sea capaz de cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia de un agente de polimerización. La longitud y composición del cebador depende de muchos parámetros, incluidos, por ejemplo, la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción de hibridación, la proximidad del sitio de unión de la sonda al del cebador, las concentraciones relativas del cebador y la sonda y la composición concreta del ácido nucleico de la sonda. Normalmente, el cebador incluye 15-30 nucleótidos. No obstante, la longitud del cebador puede depender más o menos de la complejidad del punto de unión del cebador y los factores indicados anteriormente.

Marcadores para sondas y cebadores

40 Los marcadores usados para marcar las sondas o cebadores de la presente divulgación y que pueden proporcionar la señal correspondiente a la cantidad de producto de amplificación pueden tomar varias formas. Como se ha indicado antes en relación con el procedimiento de nucleasa 5' fluorogénica, una señal fluorescente es una señal que se puede medir. No obstante, también se pueden realizar mediciones, por ejemplo mediante monitorización de la radiactividad, colorimetría, absorción, parámetros magnéticos o actividad enzimática. Por tanto, los marcadores que se pueden emplear incluyen, entre otros, fluoróforos, cromóforos, isótopos radiactivos, reactivos electróndensos, enzimas y ligandos que tienen socios de unión específicos (p. ej., biotina-avidina).

45 La monitorización de los cambios en la fluorescencia es un modo particularmente útil para monitorizar la acumulación de los productos de amplificación. Un número de marcadores útiles para la unión a sondas o cebadores están disponibles comercialmente, incluida fluoresceína y varios derivados de fluoresceína tales como HEX, TET y JOE (todos los cuales están disponibles en Applied Biosystems, Foster City, Calif.); amarillo lucifer y derivados de cumarina.

50 Los marcadores pueden unirse a la sonda o al cebador usando varias técnicas y se pueden fijar al extremo 5' y/o al extremo 3' y/o en un nucleótido interno. El marcador también se puede fijar a brazos espaciadores de varios tamaños que están unidos a la sonda o al cebador. Estos brazos espaciadores son útiles para obtener una distancia deseada entre los múltiples marcadores unidos a la sonda o al cebador.

55 En algunos casos se puede utilizar un solo marcador; mientras que en otros casos, tales como los ensayos de nucleasa 5' fluorogénica, por ejemplo, se unen a la sonda dos o más marcadores. En los casos en los que la sonda

incluye múltiples marcadores, normalmente es aconsejable mantener un espacio entre los marcadores que sea suficiente para permitir la separación de los marcadores durante la digestión de la sonda mediante la actividad 5'-3' nucleasa de la polimerasa de ácido nucleico.

Micromatriz

5 En la presente invención se han usado las matrices de ácido nucleico son aquéllas que están disponibles comercialmente en Affymetrix (Santa Clara, Calif.) con la marca GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array.® o Rat Genome U230 plus 2.0 Array, respectivamente, que representa la cobertura completa de los conjuntos de sondas Human Genome U133 Set plus 9921 que representan aproximadamente 6.500 nuevos genes (con un total de aproximadamente 56.000 transcritos) o el Rat Genome respectivamente. La plataforma de tecnología GeneChip de Affymetrix (Santa Clara, Calif.), que consiste en micromatrices de alta densidad y herramientas que ayudan a procesar y analizar dichas matrices, incluidos ensayos y reactivos estandarizados, instrumentación y herramientas de análisis y gestión de datos.

15 Las micromatrices de GeneChip consisten en pequeños fragmentos de ADN (denominados sondas) sintetizados químicamente en localizaciones específicas sobre una superficie de cuarzo recubierta. Extrayendo y marcando ácidos nucleicos de muestras experimentales e hibridando después las muestras preparadas con la matriz, se puede monitorizar la cantidad de marcador, lo que permite una medición de la regulación génica.

Las matrices de genoma humano de GeneChip incluyen un conjunto de genes de mantenimiento humanos que facilitan la normalización y escalado de experimentos de matrices y realizan comparación de datos. Este conjunto de genes de normalización muestra niveles consistentes de expresión sobre un conjunto diverso de tejidos.

20 Pacientes que exhiben síntomas de enfermedad

Una serie de enfermedades se asocian con cambios en el número de copias de un gen determinado. Para los pacientes que presentan síntomas de una enfermedad se puede usar el procedimiento de PCR en tiempo real para determinar si el paciente tiene alteraciones en el número de copias que se sepa que están relacionadas con enfermedades asociadas con los síntomas que experimenta el paciente.

25 Expresión de CTGF

Proteínas de fusión de CTGF

30 Las proteínas de fusión son útiles para generar anticuerpos contra los polipéptidos de CTGF y para usar en varios sistemas de ensayo. Por ejemplo, las proteínas de fusión se pueden usar para identificar proteínas que interaccionan con porciones de polipéptidos de CTGF. Para este propósito se pueden usar cromatografía de afinidad proteica o los ensayos basados en bibliotecas para las interacciones proteína-proteína, tales como el híbrido de dos levaduras o los sistemas de expresión en fagos. Tales procedimientos son bien conocidos en la técnica y también se pueden usar como filtros de fármacos.

35 Una proteína de fusión de CTGF comprende dos segmentos polipeptídicos fusionados por medio de un enlace peptídico. El primer segmento polipeptídico puede comprender al menos 54, 75, 100, 125, 139, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325 o 350 aminoácidos contiguos de SEC ID N° 3 o de una variante, como los descritos anteriormente. El primer segmento polipeptídico también puede comprender el CTGF de longitud completa.

40 El segundo segmento polipeptídico puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento de la proteína. Las proteínas usadas habitualmente en la construcción de proteínas de fusión incluyen, entre otras, β-galactosidasa, β-glucuronidasa, proteína fluorescente verde (PFV), proteínas autofluorescentes, incluida la proteína fluorescente azul (PFA), glutatión-S-transferasa (GST), luciferasa, peroxidasa de rábano (HRP) y cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Además, en las construcciones de proteínas de fusión se utilizan colas de epítipo, incluidas colas de histidina (His), colas de FLAG, colas de hemaglutinina de influenza (HA), colas Myc, colas VSV-G y colas de tioredoxina (Trx). Otras construcciones de fusión pueden incluir proteína de unión a maltosa (MBP), cola-S, proteínas de fusión con dominio de unión de ADN a Lex a (DBD), proteínas de fusión del dominio de unión a ADN GAL4, proteínas de fusión BP16 del virus del herpes simple (VHS). También se puede realizar ingeniería de una proteína de fusión para que contenga un punto de escisión adyacente al CTGF.

45 *Preparación de polinucleótidos*

50 Un polinucleótido de CTGF natural se puede aislar libre de otros componentes celulares tales como componentes de membrana, proteínas y lípidos. Los polinucleótidos se pueden preparar mediante una célula y aislar usando técnicas estándar de purificación de ácido nucleico, o sintetizarse usando una técnica de amplificación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o mediante el uso de un sintetizador automático. Los procedimientos para aislar polinucleótidos son rutinarios y se conocen en la técnica. Se puede usar cualquiera de dichas técnicas para obtener un polinucleótido para obtener polinucleótidos de CTGF aislados. Por ejemplo se pueden usar enzimas de restricción y sondas para aislar fragmentos polinucleotídicos que comprenden secuencias nucleotídicas de CTGF.

55 Los polinucleótidos aislados se encuentran en preparaciones que están libres o al menos un 70, 80, o 90% libres de

otras moléculas.

5 Se pueden preparar moléculas de ADNc de CTGF con técnicas estándar de biología molecular, usando ARNm de CTGF como molde. A continuación se pueden replicar las moléculas de ADNc de CTGF usando técnicas de biología molecular conocidas en la técnica. Una técnica de amplificación, como la PCR, se puede usar para obtener copias adicionales de polinucleótido usado en la invención, usando ADN genómico o ADNc humanos como molde.

Como alternativa se pueden usar técnicas de química sintética para sintetizar polinucleótidos de CTGF. La degeneración del código genético permite sintetizar secuencias nucleotídicas alternativas, que codificarán CTGF con, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 2 o una variante biológicamente activa de la misma.

10 *Extensión de polinucleótidos*

15 Se pueden usar varios procedimientos basados en PCR para ampliar las secuencias de ácido nucleico que codifican el CTGF humano, por ejemplo para detectar secuencias anteriores del gen de CTGF, tales como promotores y elementos reguladores. Por ejemplo, la PCR de restricción-sitio usa cebadores universales para recuperar la secuencia desconocida adyacente a un locus conocido. El ADN genómico se amplifica primero en presencia de un cebador hasta una secuencia de unión y un cebador específico de la región conocida. Las secuencias amplificadas se someten a una segunda ronda de PCR con el mismo cebador de unión y otro cebador específico interno con respecto al primero. Los productos de cada ronda de PCR se transcriben con una ARN polimerasa adecuada y se secuencias usando la transcriptasa inversa.

20 La PCR inversa también se puede usar para amplificar o extender las secuencias usando cebadores divergentes basados en una región conocida. Los cebadores se pueden diseñar usando software disponible comercialmente, como OLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), de modo que tengan una longitud de 22-30 nucleótidos, un contenido de GC del 50% o más y que hibriden con la secuencia diana a temperaturas de aproximadamente 68-72°C. El procedimiento usa varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un gen. A continuación, el fragmento se circulariza mediante ligadura intramolecular y se usa como molde para la PCR.

25 Otro procedimiento que se puede usar es la PCR de captura, que implica la amplificación por PCR de fragmentos de ADN adyacentes a una secuencia conocida en ADN cromosómico artificial humano y de levadura. En este procedimiento, también se pueden usar múltiples digestiones y ligaduras con enzimas de restricción para introducir una secuencia bicatenaria sometida a ingeniería en un fragmento desconocido de la molécula de ADN antes de realizar la PCR.

30 Cuando se realiza la detección selectiva de los Hank de longitud completa, es preferible usar bibliotecas que se han seleccionado según el tamaño de modo que incluyan ADNc de mayor tamaño. Son preferibles las bibliotecas cebadas al azar porque contienen más secuencias que las que contienen en las regiones 5' de los genes. El uso de una biblioteca cebada al azar puede ser especialmente preferible para situaciones en las que una biblioteca de oligo d(T) no da ADNc de longitud completa. Las bibliotecas genómicas pueden ser útiles para la extensión de la secuencia en regiones reguladoras no transcritas en 5'.

35 Se pueden usar sistemas de electroforesis capilar disponibles comercialmente para analizar el tamaño o confirmar la secuencia de nucleótidos de la PCR o secuenciar los productos. Por ejemplo, la secuenciación capilar puede emplear polímeros circulares para la separación electroforética, cuatro colorantes fluorescentes diferentes (uno para cada nucleótido) que se activan por láser y detección de las longitudes de onda emitidas por una cámara dispositivo acoplada a carga. El gasto/intensidad de la luz se puede convertir en señal eléctrica usando un equipo y software adecuados (p. ej., GENOTYPER y Sequence NAVIGATOR, Perkin Elmer), y todo el procedimiento desde la carga de las muestras al análisis por ordenador y exposición de los datos electrónicos se puede controlar por ordenador. La electroforesis capilar es especialmente preferible para la secuenciación de pequeñas piezas de ADN que podrían estar presentes en cantidades limitadas en una muestra concreta.

Obtención de polipéptidos

El CTGF se puede obtener, por ejemplo, mediante purificación a partir de células humanas, mediante expresión de polinucleótidos de CTGF o mediante síntesis química directa.

Purificación de proteínas

50 El CTGF se puede purificar a partir de cualquier célula humana que exprese la enzima, incluidas aquellas transfeccionadas con construcciones de expresión que expresan CTGF. Un CTGF purificado se separa de los otros compuestos que normalmente están asociados con CTGF en la célula, tal como ciertas proteínas, hidratos de carbono o lípidos, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen, entre otros, cromatografía por exclusión de tamaño, fraccionamiento con sulfato amónico, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y electroforesis en gel preparativa.

55

Expresión de polinucleótidos de CTGF

Para expresar CTGF, los polinucleótidos de CTGF se pueden insertar en un vector de expresión que contenga los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Se pueden usar procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan

5 procedimientos que codifican CTGF y los elementos adecuados de control de la transcripción y la traducción. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante in Vitro, técnicas sintéticas y recombinación genética in vivo.

Se pueden utilizar varios sistemas de expresión en vector/huésped para contener y expresar secuencias que codifiquen CTGF. Estos incluyen, entre otros, microorganismos, tales como bacterias transformadas con vectores de expresión con ADN recombinante de bacteriófago, plásmido o cósmico, levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras, sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión en virus (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacteriana (p. ej., plásmidos Ti o pBR322) sistemas de células animales.

10

Los elementos control o secuencias reguladoras son las regiones no traducidas del vector, potenciadores, promotores, regiones no traducidas en 5' y 3', que interaccionan con las proteínas de las células huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Tales elementos pueden variar en su concentración y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y del huésped utilizados, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y de traducción adecuados, incluidos los promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, al clonar en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles como el promotor híbrido LacZ del fagemido BLUESCRIPT (Stratagene, LaJolla, Calif.) o el plásmido pSPORT1 (Life Technologies) y similares. En células de insectos se puede usar el promotor de la polihidrina del baculovirus. En el vector se pueden clonar promotores o potenciadores derivados de los genomas de células vegetales (p. ej., genes de las proteínas del shock térmico, RUBISCO y de almacenamiento) o de virus vegetales (p. ej., promotores víricos o secuencias líder). En los sistemas de células de mamíferos se prefieren los promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de una secuencia de nucleótidos que codifique el CTGF, los vectores basados en los virus SV40 o EBV se pueden usar con un marcador seleccionable adecuado.

15
20
25

Sistemas de expresión en bacterias y en levaduras

En los sistemas bacterianos se pueden seleccionar numerosos vectores de expresión. Por ejemplo, cuando se necesita una gran cantidad de CTGF para la inducción de anticuerpos se pueden usar vectores que dirijan la expresión de altos niveles de proteínas de fusión que se purifican con facilidad. Tales vectores incluyen, entre otros, vectores de clonación y expresión en *E. coli*, tal como BLUESCRIPT (Stratagene). En un vector BLUESCRIPT, una secuencia que codifique CTGF se puede ligar en el vector en el marco con secuencias para el aminoácido terminal Met y los siguientes 7 residuos de β -galactosidasa, de modo que se produce una proteína híbrida. Los vectores pIN o pGEX (Promega, Madison, Wis.) también se pueden usar para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse con facilidad a partir de células lisadas mediante adsorción en perlas de glutatión-agarosa, seguida por elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas hechas en tales sistemas se pueden diseñar para que incluyan heparina, trombina o puntos de escisión por la proteasa del factor Xa de modo que el polipéptido clonado de interés se puede liberar de la fracción GST a voluntad.

30
35

Sistemas de expresión en plantas e insectos

Si se usan vectores de expresión en plantas, la expresión de las secuencias que codifican CTGF puede estar dirigida por cualquiera de una serie de promotores. Por ejemplo, los promotores vitales tales como los promotores 35S y 19S del CaMV pueden usarse solos o en combinación con la secuencia líder omega del TMV. Como alternativa se pueden usar promotores vegetales, como los promotores de la subunidad pequeña de RUBISCO o del shock térmico. Estas construcciones se pueden introducir en células vegetales mediante transformación directa de ADN o mediante transfección mediada por patógenos.

40
45

También se puede usar un sistema de insectos para expresar CTGF. Por ejemplo, en uno de estos sistemas se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o de *Trichoplusia larvae*. Las secuencias que codifican CTGF se pueden clonar en una región no esencial del virus, tal como el gen de polihidrina, y se colocará bajo el control del promotor de la polihidrina. La inserción satisfactoria de CTGF inactivará el gen de polihidrina y producirá virus recombinante que carece de la proteína de recubrimiento. Los virus recombinantes se pueden usar para infectar células de *S. frugiperda* o *Trichoplusia larvae* en las que se puede expresar CTGF.

50

Sistemas de expresión en mamíferos

Para expresar el CTGF en las células huésped de mamíferos se puede usar una serie de sistemas de expresión basados en virus. Por ejemplo, si como vector de expresión se usa un adenovirus, las secuencias que codifican el CTGF se pueden ligar en un complejo de transcripción/traducción del adenovirus que comprenda el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral puede usarse para obtener un virus viable que sea capaz de expresar CTGF en células huésped infectadas [Engelhard, 1994]. Si se

55

desea, se pueden usar potenciadores de la transcripción, como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV) para incrementar la expresión en células huésped de mamífero.

También se pueden usar cromosomas humanos artificiales (CHA) para liberar fragmentos de ADN más grandes de lo que se puede contener y expresar en un plásmido. Los CHA de 6M y 10M se construyen y liberan en células a través de procedimientos de liberación convencionales (p. ej., liposomas, polímeros amino policationicos o vesículas). También se pueden usar señales de iniciación específicas para conseguir una traducción más eficaz de secuencias que codifican CTGF. Tales señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. En los casos en las que las secuencias codificadoras de CTGF, su codón de iniciación y sus secuencias anteriores se insertan en el vector de expresión adecuado, pueden no ser necesarias las señales adicionales de control de la transcripción o de la traducción. No obstante, en los casos en los que sólo se inserta la secuencia codificadora, o un fragmento de la misma, se deberán proporcionar señales exógenas de control traduccional (incluido el codón de iniciación ATG). El codón de iniciación deberá estar en el correcto marco de lectura para garantizar la traducción de todo el inserto. Los elementos exógenos traduccionales y los codones de iniciación pueden tener varios orígenes, tanto naturales como sintéticos.

15 *Células huésped*

Una cepa de célula huésped se puede escoger por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar el CTGF expresado del modo deseado. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, entre otras, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccional que escinde una forma "prepro" del polipéptido también se puede usar para facilitar la inserción, plegamiento y/o función correctas. En la Colección Americana de cultivos Tipo ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 se dispone de diferentes células huésped que tiene maquinaria células específica y mecanismos característicos para las actividades postraduccionales (p. ej., CHO, HeLa, MDCK, HEK293, y WI38) y se pueden escoger para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña.

Para la expresión a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable CTGF se pueden transformar usando vectores de expresión que pueden contener varios orígenes de replicación virales y/o elementos de expresión endógena y un gen de un marcador seleccionable en el mismo vector o en otro diferente. Tras la introducción del vector, se puede dejar que las células crezcan durante 1-2 días en medio enriquecido antes de cambiarlas a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan satisfactoriamente las secuencias de CTGF introducidas. La proliferación de clones de células transformadas de forma estable se puede realizar usando técnicas de cultivo tisular adecuadas al tipo de célula. Para recuperar las líneas celulares transformadas se puede usar cualquier número de sistemas de selección. Entre estos se incluyen los genes de la timidina cinasa [Logan, (1984)] y de la adenina fosforibosiltransferasa [Wigler, (1977)] del virus del herpes simple, que se pueden emplear en células *tk-* o *aprt-*, respectivamente. Asimismo se pueden usar la resistencia antimetabolitos, a antibióticos o a herbicidas como base de la selección. Por ejemplo, *dhfr* confiere resistencia a metotrexato [Lowy, (1980)], *npt* confiere resistencia a los aminoglucósidos, neomicina y G-418 [Wigler, (1980)], y *als* y *pat* confieren resistencia a clorosulfurón y fosfotricina acetiltransferasa, respectivamente [Colbere-Garapin, 1981]. Se han descrito genes seleccionables adicionales. Por ejemplo, *trpB* permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano, o *hisD*, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina. Se pueden usar marcadores visibles tales como antocianinas, β -glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, para identificar los transformantes y cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable atribuible a un sistema de vector específico.

Detección de la expresión de polipéptido

Aunque la presencia de expresión de un gen marcador sugiere que también está presente un polinucleótido de CTGF, puede ser necesario confirmar su presencia y expresión. Por ejemplo, si una secuencia que codifica CTGF se inserta dentro de una secuencia del gen marcador, las células transformadas que contienen secuencias que codifican CTGF se pueden identificar por la ausencia de la función del gen marcador. Como alternativa, se puede introducir un gen marcador en tándem con una secuencia que codifique CTGF bajo el control de un promotor sencillo. La expresión del gen marcador como respuesta a la inducción o selección normalmente indica la expresión del polinucleótido CTGF.

Como alternativa se pueden identificar células huésped que contienen un polinucleótido de CTGF y que expresan CTGF mediante diversos procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, entre otros, hibridaciones ADN-ADN o ADN-ARN y técnicas de bioensayos proteico o de inmunoensayo, que incluyen tecnologías de membrana, solución o basadas en chip para la detección y/o cuantificación de ácido nucleico o proteína. Por ejemplo, la presencia de una secuencia polinucleotídica que codifica CTGF se puede detectar mediante hibridación ADN-ADN o ADN-ARN o amplificación usando sondas o fragmentos o fragmentos de polinucleótidos que codifican CTGF. Los ensayos basados en amplificación de ácido nucleico implican el uso de oligonucleótidos seleccionados a partir de secuencias que codifican CTGF para detectar transformantes que contienen un polinucleótido de CTGF.

En la técnica se conocen diversos protocolos para detectar y medir la expresión de CTGF usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el polipéptido. Ejemplos incluyen ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se puede usar un inmunoensayo de dos puntos basado en anticuerpos monoclonales usando anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítomos no interferentes sobre el CTGF o un ensayo de unión competitiva.

Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación, y se pueden usar en varios ensayos con ácido nucleico y aminoácidos. Entre los medios para producir sondas de hibridación marcadas o de PCR para detectar secuencias relacionadas con polinucleótidos que codifican CTGF se incluyen oligomarcaje, traducción in mella ambulante, marcaje terminal o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Como alternativa se pueden clonar en un vector secuencias que codifican CTGF para la producción de una sonda de ARNm. Dichos vectores se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente, y se pueden usar para sintetizar sondas de -RN in Vitro mediante la adición de nucleótidos marcados y una ARN polimerasa adecuada, tal como T7, T3 o SP6. Estos procedimientos se pueden realizar usando diversos kits disponibles comercialmente (Amersham Pharmacia Biotech, Promega y US Biochemical). Entre las moléculas indicadoras o marcadores que se pueden usar para una fácil detección se incluyen radionúclidos, enzimas y agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Expresión y purificación de polipéptidos

Las células huésped transformadas con polinucleótidos de CTGF se pueden cultivar en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína a partir del cultivo celular. El polipéptido producido mediante una célula transformada puede secretarse o estar contenido en el interior de la célula dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Como entenderán los expertos en la técnica, se pueden diseñar vectores de expresión que contienen polinucleótidos de CTGF de modo que contengan secuencias señal que dirigen la secreción de CTGF soluble mediante una membrana células procariótica o eucariótica o que dirigen la inserción en la membrana de CTGF unido a la membrana.

Como se ha tratado anteriormente se pueden usar otras construcciones para unir una secuencia que codifica CTGF a una secuencia nucleotídica que codifica un dominio polipéptidos que facilitará la purificación de las proteínas solubles. Tales dominios que facilitan purificación incluyen, entre otros, péptidos quelantes de metales tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada y el dominio usado en el sistema de purificación de extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Wash.). La inclusión de secuencias gigantes escindibles tales como las específicas del Factor XA o enterocinasa (Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y CTGF también se puede usar para facilitar la purificación. Uno de estos vectores de expresión proporciona la expresión de una proteína de fusión que contiene CTGF y 6 residuos de histidina que preceden la tioredoxina o un punto de escisión para enterocinasa. Los residuos de histidina facilitan la purificación mediante IMAC (cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados) Maddox, (1983)], mientras que el punto de escisión de enterocinasa proporciona un medio de purificación de CTGF a partir de la proteína de fusión [Porath, (1992)].

Síntesis química

Las secuencias que codifican CTGF se pueden sintetizar, por completo o en parte, usando procedimientos químicos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, el propio CTGF puede producirse usando procedimientos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, tales como mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida. La síntesis de proteínas puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automática se puede conseguir, por ejemplo, usando el Sintetizador Peptídico 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer). Opcionalmente se pueden sintetizar por separado fragmentos de CTGF y combinarse usando procedimientos químicos para producir una molécula de longitud completa.

El péptido recién sintetizado se puede purificar sustancialmente mediante cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento. La composición de un CTGF sintético se puede confirmar mediante análisis o secuenciación de los aminoácidos. Además, durante la síntesis directa cualquier porción de la secuencia de aminoácidos de CTGF se puede alterar y/o combinar, mediante procedimientos químicos, con secuencias de otras proteínas, para producir una variante del polipéptido o una proteína de fusión.

Producción de polipéptidos alterados

Como los expertos en la técnica entenderá, puede ser ventajoso producir polinucleótidos de CTGF que poseen codones no naturales. Por ejemplo, se pueden seleccionar codones preferidos por un huésped procariótica o eucariótica concreto para incrementar el índice de expresión de proteínas o producir un transcrito de ARN que posee propiedades deseables tales como una semivida mayor que la de un transcrito generado a partir de la secuencia natural.

Las secuencias nucleotídicas a las que se hace referencia en la presente memoria descriptiva se pueden someter a ingeniería usando procedimientos generalmente conocidos en la técnica para alterar los polinucleótidos de CTGF

por diversas razones, incluidas, entre otras, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento y/o expresión del polipéptido o del producto del ARNm. Para realizar ingeniería de las secuencias nucleotídicas se puede usar arrastre de ADN mediante fragmentación aleatoria y reensamblaje por PCR de los fragmentos génicos y oligonucleótidos sintéticos. Por ejemplo se puede usar mutagénesis dirigida por sitio para insertar nuevos puntos de restricción, alterar patrones de glucosilación, cambiar la preferencia de codones, producir variantes de corte y empalme, introducir mutaciones, etc.

Análogos de CTGF

Una clase general de análogos de CTGF son variantes que tienen una secuencia de aminoácidos que es una mutación de la secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento. Otra clase general de análogos de CTGF se proporciona mediante anticuerpos anti-idiotipo, y fragmentos de los mismos, como se describe más adelante. Además, los anticuerpos recombinantes que comprenden dominios variables anti-idiotipo se pueden usar como análogos (véase, por ejemplo, [Monfardini y col., (1996)]). Dado que los dominios variables de los anticuerpos frente a CTGF anti-idiotipo imitan al CTGF, estos dominios pueden proporcionar actividad de CTGF. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para producir anticuerpos catalíticos antiidiotipo [Joron y col., (1992), Friboulet y col. (1994), Avallé y col., (1998)].

Otra estrategia para identificar análogos de CTGF se proporciona mediante el uso de bibliotecas combinatorias. Se proporcionan procedimientos para construir y realizar detección selectiva de expresión en fagos y otras bibliotecas combinatorias en, por ejemplo, Kay y col., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press 1996),), los documentos U.S. 5,783,384, U.S. 5,747,334 y U.S. 5,723,323.

Anticuerpos

Se puede generar cualquier tipo de anticuerpo conocido en la técnica de modo que se una específicamente a un epítipo de CTGF.

“Anticuerpo” como se usa en la presente memoria descriptiva incluye moléculas de inmunoglobulina intactas, así como fragmentos de la misma, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv, que son capaces de unirse a un epítipo de CTGF. Normalmente se requieren al menos 6, 8, 10 ó 12 contiguos para formar un epítipo. No obstante, los epítopos que implican aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo al menos 15, 25 ó 50, aminoácidos. Un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de CTGF se puede usar terapéuticamente, así como en ensayos inmunoquímicos, tales como transferencias de tipo Western, ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones, u otros ensayos inmunoquímicos conocidos en la técnica. Se pueden usar varios inmunoensayos para identificar anticuerpos que tengan la especificidad deseada. En la técnica se conocen bien numerosos protocolos para ensayos de unión competitiva o inmunoradiométricos. Tales inmunoensayos normalmente implican la medición de la formación de complejo entre un inmunógeno y un anticuerpo que se une específicamente al inmunógeno de CTGF.

Normalmente, un anticuerpo que se une específicamente al CTGF proporciona una señal de detección al menos 5, 10 ó 20 veces mayor que una señal de detección proporcionada con otras proteínas cuando se usa en un ensayo inmunoquímico. Preferentemente, los anticuerpos que se unen específicamente a CTGF no detectan otras proteínas en los ensayos inmunoquímicos y pueden inmunoprecipitar CTGF a partir de la solución.

El CTGF se puede usar para inmunizar un mamífero, como un ratón, una rata, un conejo, una cobaya, un mono o un ser humano, para producir anticuerpos policlonales. Si se desea, el CTGF se puede conjugar con una proteína transportadora, como seroalbúmina bovina, tiroglobulina y hemocianina de lapa californiana. Dependiendo de la especie huésped se puede usar varios adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Entre dichos adyuvantes se incluyen adyuvante de Freund, geles minerales (p. ej., hidróxido de aluminio) y sustancias de superficie activa (p. ej., lisolecitina, polioles plurónicas, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol). Entre los adyuvantes usados en seres humanos, el BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son especialmente útiles.

Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a CTGF se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen, entre otras, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma con células B humanas y la técnica del hibridoma-EBV [Roberge, (1995)].

Además se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos”, el corte y empalme de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con la especificidad antigénica y la actividad biológica adecuadas. Anticuerpos monoclonales y otros se pueden también “humanizar” para prevenir que un paciente monte una respuesta inmunitaria frente al anticuerpo cuando éste se usa terapéuticamente. Dichos anticuerpos pueden tener una secuencia suficientemente similar a la de los anticuerpos humanos de modo que se usen directamente en terapia o puedan requerir la alteración de pocos residuos clave. Las diferencias en la secuencia entre anticuerpos de roedores y secuencias humanas se pueden minimizar sustituyendo los residuos que difieren de los de las secuencias humanas mediante mutagénesis dirigida por sitio de residuos individuales o mediante el injerto de todas las regiones determinantes de la complementariedad. Los anticuerpos

que se unen específicamente a CTGF pueden contener sitios de unión al antígeno, que se humanizan parcial o completamente, tal y como se describe en el documento U.S. 5.565.332.

- 5 Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla se pueden adaptar usando procedimientos conocidos en la técnica para producir anticuerpos de cadena sencilla que se unen específicamente a CTGF. Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero de distinta composición idiotípica, se pueden generar mediante arrastre de cadena a partir de las bibliotecas aleatorias combinatorias de inmunoglobulina. Los anticuerpos de cadena sencilla también se pueden construir usando un procedimiento de amplificación de ADN, tal como PCR, usando el ADNc del hibridoma como molde. Los anticuerpos de cadena sencilla pueden ser mono o biespecíficos y pueden ser bivalentes o tetravalentes. Se enseña la construcción de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos y tetravalentes- Se puede construir una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de cadena sencilla usando síntesis de nucleótidos manual o automática, clonación en una construcción de expresión usando procedimientos estándar de ADN recombinante e introducción en una célula para expresar la secuencia codificadora, tal y como se describe más adelante. Como alternativa se pueden producir anticuerpos de cadena sencilla directamente usando, por ejemplo tecnología de fago filamentosos.
- 10 También se pueden producir anticuerpos que se unen específicamente a CTGF mediante inducción de la producción in vivo de la población de linfocitos o mediante la detección selectiva de bibliotecas de inmunoglobulinas o paneles de reactivos de unión altamente específicos. En los procedimientos de la invención se pueden construir y usar terapéuticamente otros tipos de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden construir anticuerpos quiméricos tal y como se ha descrito en el documento WO 93/03151. También se pueden preparar proteínas de unión derivadas de inmunoglobulinas y que son multivalentes y multiespecíficas, tales como los "diacuerpos" descritos en el documento WO 94/13804.
- 15
- 20

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden purificar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden purificar por afinidad mediante pase por una columna a la que está unido el CTGF. Después, los anticuerpos unidos se pueden eluir de la columna usando un tampón con una concentración de sal elevada.

25

Oligonucleótidos antisentido

Los oligonucleótidos antisentido son secuencias de nucleótidos que son complementarias de una secuencia específica de ADN o ARN. Una vez que se han introducido en una célula, los nucleótidos complementarios se combinan con las secuencias naturales producidas por la célula, para formar complejos y bloquear la transcripción o la traducción. Preferentemente, un oligonucleótido antisentido tiene una longitud de al menos 11 nucleótidos, pero puede tener una longitud de al menos 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 o más. También se pueden usar secuencias más largas. Las moléculas de oligonucleótidos antisentido se pueden proporcionar en un constructo de ADN e introducir en una célula tal y como se ha descrito antes, para disminuir el nivel de los productos del gen de CTGF en la célula.

30

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o una combinación de ambos. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar manualmente o a través de un sintetizador automático mediante la unión covalente del extremo 5' de un nucleótido con el extremo 3' de otro nucleótido con enlaces internucleotídicos que no son fosfodiéster tales como alquilfosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, alquilfosfonotioatos, alquilfosfonatos, fosforoamidatos, ésteres fosfato, carbamatos, acetamidato, ésteres carboximetílicos, carbonatos y triésteres de fosfato.

35

40

Se pueden obtener modificaciones de la expresión génica de CRFG mediante el diseño de oligonucleótidos antisentido que formarán dúplex del control, 5' o regiones reguladoras del gen CTGF. Se prefieren los oligonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la transcripción, por ejemplo entre las posiciones -10 y +10 desde el sitio de inicio. De igual forma se puede conseguir la inhibición usando metodología de apareamiento de bases en "triple hélice". El apareamiento en triple hélice es útil porque causa inhibición de la capacidad de la doble hélice para abrir suficientemente para la unión de las polimerasas, factores de transcripción o chaperones. En la literatura se han descrito avances terapéuticos usando ADN de triple hélice [Nicholls, (1993)]. También se puede diseñar un oligonucleótido antisentido para bloquear la traducción del ARNm mediante la prevención de la unión del transcrito a los ribosomas.

45

No se necesita una complementariedad precisa para la formación con éxito del complejo entre un oligonucleótido antisentido y la secuencia complementaria de un polinucleótido de CTGF. Los oligonucleótidos antisentido que comprenden, por ejemplo, 2, 3, 4, ó 5 o más tiras de nucleótidos contiguos que son exactamente complementarios a un polinucleótido de CTGF, cada uno separado por una tira de nucleótidos contiguos que no son complementarios a los nucleótidos de CTGF adyacentes, puede proporcionar suficiente especificidad diana para ARNm de CTGF. Preferentemente, cada tira de nucleótidos contiguos complementarios tiene una longitud de al menos 4, 5, 6, 7 ó 8 o más nucleótidos. Las secuencias intermedias no complementarias tienen una longitud de, preferentemente, 1, 2, 3 ó 4 nucleótidos. Un experto en la técnica puede usar fácilmente el punto de fusión calculado de una par antisentido- sentido para determinar el grado de falta de coincidencia que será tolerado entre un oligonucleótido antisentido concreto y una secuencia polinucleotídica de CTGF concreta. Los oligonucleótidos antisentido se pueden modificar

50

55

sin que ello afecte a su capacidad para hibridar a un polinucleótido de CTGF. Estas modificaciones pueden ser internas o en uno o ambos extremos de la molécula antisentido. Por ejemplo, los enlaces fosfato entre nucleósidos se pueden modificar mediante la adición de restos colesterilo o diamina con un número variable de residuos de carbono entre los grupos amino y la ribosa terminal. Las bases y/o azúcares modificados, como arabinosa en lugar de ribosa, o un oligonucleótido sustituido en 3', 5' en el que el grupo 3'hidroxilo o el grupo 5'fosfato están sustituidos, también se pueden emplear en un oligonucleótido antisentido modificado. Estos oligonucleótidos modificados se pueden preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Ribozimas

Las ribozimas son moléculas de ARN con actividad catalítica [Uhlmann, (1987)]. Las ribozimas se pueden usar para inhibir la función génica mediante la escisión de una secuencia de ARN tal y como se conoce en la técnica. El mecanismo de la acción de las ribozimas implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima al ARN diana complementario, seguida por escisión endonucleolítica. Entre los ejemplos se incluyen moléculas de ribozima con motivo en cabeza de martillo sometidas a ingeniería, que se pueden catalizar específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de secuencias nucleotídicas específicas. La secuencia codificadora de un polinucleótido de DRD3 se puede usar para generar ribozimas que se unirán específicamente al ARNm transcrito a partir de un polinucleótido de CTGF. En la técnica se han desarrollado y descrito procedimientos para diseñar u construir ribozimas que pueden escindir otras moléculas de ARN en trans de un modo altamente específico de secuencia. Por ejemplo la actividad de escisión de las ribozimas puede dirigirse a ARN específicos mediante ingeniería de una pequeña región de "hibridación" en la ribozima. La región de hibridación contiene una secuencia complementaria al ARN diana y, por tanto, hibrida específicamente con el ARN diana.

Se pueden identificar sitios específicos de escisión por ribozima dentro de un ARN de CTGF diana mediante barrido de la molécula diana para buscar sitios de escisión por ribozimas que incluyan las secuencias siguientes: GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, las cortas secuencias de ARN de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región de ARN diana que contiene el sitio de escisión se pueden evaluar para determinar características estructurales secundarias que pueden convertir la diana en inoperable. La idoneidad de los ARN de CTGF diana también se puede evaluar mediante el análisis de accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios usando ensayos de protección de ribonucleasa. Las secuencias nucleotídicas que se muestran en la SEC ID Nº 1 y su complementaria proporcionan fuentes de secuencias con regiones de hibridación adecuadas. Las secuencias de complementariedad más largas se pueden usar para incrementar la afinidad de la secuencia de hibridación para la diana. Las regiones de hibridación y de escisión de la ribozima pueden estar íntegramente relacionadas de modo que, tras la hibridación al ARN diana mediante las regiones complementarias, la región catalítica de la ribozima puede escindir la diana.

Las ribozimas se pueden introducir en células como parte de una construcción de ADN. Los procedimientos mecánicos, como microinyección, transfección mediada por liposomas, electroporación o precipitación con fosfato cálcico, se pueden usar para introducir una construcción de ADN que contenga ribozima en las células en las que se desea disminuir la expresión de CTGF. Como alternativa, si se desea que las células conserven de forma estable la construcción de ADN, la construcción se puede suministrar en un plásmido y mantener como elemento separado o integrado en el genoma de las células, como se conoce en la técnica. Una construcción de ADN codificador de ribozima puede incluir elementos reguladores de la transcripción, como un elemento promotor, un potenciador o elemento UAS y una señal de terminación de la transcripción, para controlar la transcripción de ribozimas en las células (documento U.S. 5.641.673). Las ribozimas también se pueden someter a ingeniería para proporcionar un nivel adicional de regulación, de modo que la destrucción de ARNm sólo se produzca cuando en las células se induzcan el gen de una ribozima como de una diana.

Ensayos para CTGF y bioactividad de CTGF

La presencia de ARN/ARN/proteína de CTGF en tejido y líquidos corporales se determina mediante tecnologías de inmunoensayo convencionales como ELISA, RIA etc. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT PCR).

CTGF ELISA: Niveles de CTGF en sobrenadantes en cultivo, plasma sanguíneo y orina se miden usando un ELISA de tipo sándwich que detecta CTGF entero y el fragmento terminal de NH₂ del CTGF que persiste en los fluidos corporales y los sobrenadantes de los cultivos celulares tras la escisión proteolítica del dominio bisagra.

PCR en tiempo real de CTGF: Para la confirmación de la expresión del ARNm del CTGF se usa qRT-PCR. El ADNc obtenido mediante transcripción inversa del ARN total tratado con ADNasa de cada muestra usando cebado de hexámeros aleatorio en reacciones de 50 microlitros de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (kit de reactivo de transcripción inversa TaqMan; Applied Biosystems, Foster City, CA). La qRT-PCR procede usando el sistema de detección Prism 7900HT de Applied Biosystems. Los valores de expresión se normalizan con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana. Los cebadores para la qRT-PCR se diseñan usando Primer Express versión 2.0.0 (Applied Biosystems) y se analizan para confirmar el tamaño adecuado del producto y las concentraciones óptimas.

Unión de CTGF a alfa frente a beta 3: Las plaquetas se diluyen en tampón de unión (consistente en HEPES 0,05M, pH 7,4 y MnCl_2 5 mM) a una concentración de $1,5 \times 10^6$ plaquetas humanas o 5×10^6 plaquetas de rata/100 μl . Las plaquetas (100 μl) se incuban con concentraciones crecientes de CTGF marcado con ^{125}I en un volumen total de 250 μl de tampón de unión. Tras una incubación de 90 minutos a temperatura ambiente, las muestras se filtran en 34
5 papel de fibra de vidrio (Schleicher & Schuell, Keene, NH), después se lavan tres veces con 3 ml de Tris-HCl 0,05M, pH 7,4 y NaCl 0,154M en un cosechador celular Brandel de 30 pocillos (Gaithersburg, MD). Los filtros se empapan previamente durante 1 hora en tampón de lavado que contiene leche desgrasada seca al 5 % (Carnation, Nestlé, Don Mills, Ontario, Canadá) para reducir la adsorción inespecífica. La radioactividad se cuenta en un contador gamma con una eficiencia del 80 %. Las curvas de competición se analizan mediante la ecuación de Hill. En estas
10 condiciones se obtiene de forma consistente una señal de 5.000 a 15.000 cpm para la unión específica. La unión inespecífica se mide en presencia de EDTA 10Mm y fue menos del 0,4 % de la radiactividad total.

Unión de CTGF a LPR: Una preparación de membranas celulares en bruto-células BMS2 se cultivan hasta la confluencia en frascos rotatorios y después se disocian con EDTA 5 mM en PBS de Dulbecco sin calcio y magnesio. Los precipitados celulares se recogen mediante centrifugación y se lavan. Las células se suspenden en tampón
15 fosfato hipotónico (NaPO_4 7,5 Mm, a pH 7,2) y se incuban 10 minutos en hielo. Las membranas se rompen mediante sonicación y los núcleos se estabilizaron en tampón que contiene NaPO_4 10 mM, a pH 7,2, NaCl 10 mM y MgCl_2 3 mM. Los núcleos y las células enteras se eliminan mediante centrifugación durante 5 minutos a 800 x g y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se centrifuga sobre un cojín de sacarosa al 45 % en PBS de Dulbecco, a pH 7,2,
20 durante 1 hora a 24.000 x g. La fracción de membrana localizada en la interfaz de sacarosa/PBS se recoge cuidadosamente, se diluye y se concentra mediante centrifugación a 100.000 x g durante 15 minutos. El precipitado en la membrana se resuspende en PBS de Dulbecco y el contenido proteico se estima con el reactivo de Pierce BCA contra un patrón de albúmina (Pierce Chemical Co.). A partir de una preparación de 109 células estimadas, con frecuencia se obtienen 10-20 mg de proteína de membrana en bruto.

Las preparaciones de proteína de membrana (5 μg cada una) se solubilizan en TritonTM X-100 al 0,2 %, glicerol al 20 % en PBS de Dulbecco (Tampón A) y el material insoluble se elimina mediante centrifugación (14.0000 x g) durante 10 minutos a 4 °C. Las fracciones de la columna de afinidad se usan directamente en el ensayo de unión en solución (10 μl /fracción). Las muestras se incuban con ^{125}I -rhCTGF 0,2 nM durante 3-4 horas. El reticulador, BS3, se
25 añade hasta una concentración final de 0,5 mM y la reacción procedió a temperatura ambiente durante 15 minutos. El tampón de muestra en gel se añade a cada muestra, después, las muestras se calientan durante 2 minutos a 100 °C y se aplica a SDS-PAGE al 5 %. Tras la electroforesis, los geles se secan y analizan mediante autorradiografía.

Indicaciones terapéuticas y procedimientos

El presente solicitante ha descubierto que el CTGF se expresa en diversos tejidos humanos.

Enfermedades cardiovasculares

El CTGF humano o de rata tiene una expresión elevada en los siguientes tejidos cardiovasculares relacionados: La expresión en los tejidos mencionados anteriormente demuestra que el CTGF humano o el ARNm se pueden usar
35 para diagnóstica enfermedades cardiovasculares. Además, la actividad del CTGF humano se puede modular para tratar las enfermedades cardiovasculares.

Insuficiencia cardíaca se define como un estado fisiopatológico en el que una anomalía de la función cardíaca es responsable del fallo de bombeo de sangre del corazón a una velocidad proporcionar a lo que requiere el tejido
40 metabolizante. Incluye todas las formas de fallos de bombeo, tales como gasto cardíaco elevado y gasto cardíaco bajo, agudo y crónico, lateral derecho o lateral izquierdo, sistólico o diastólico, independiente de la causa subyacente.

Generalmente, el infarto de miocardio (IM) está causado por una brusca disminución del flujo de sangre coronaria que sigue a una oclusión trombótica de una arteria coronaria previamente estrechada por arterioesclerosis. Se
45 incluye la profilaxis de IM (prevención primaria y secundaria), así como el tratamiento agudo del IM y la prevención de complicaciones.

Las enfermedades isquémicas son afecciones en las que el flujo coronario está restringido, lo que tiene como resultado una perfusión inadecuada para cumplir el requisito miocárdico de oxígeno. Este grupo de enfermedades incluye angina estable, angina inestable e isquemia asintomática.

En arritmias se incluyen todas las formas de taquiarritmias auriculares y ventriculares, taquicardia auricular, aleteo auricular, fibrilación auricular, taquicardia de reentrada auriculoventricular, síndrome de preexcitación, taquicardia ventricular, aleteo ventricular, fibrilación ventricular, así como formas bradicárdicas de arritmias.

Las enfermedades vasculares de hipertensión incluyen hipertensión arterial primaria, así como todos los tipos de hipertensión arterial secundaria, renales, endocrinas, neurogénicas, o de otro tipo. Los genes se pueden usar como
55 dianas farmacológicas para el tratamiento de la hipertensión, así como para la prevención de todas las complicaciones que surgen por enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades vasculares periféricas se definen como enfermedades vasculares en las que el flujo arterial y/o venoso se reduce, lo que tiene como resultado un desequilibrio entre el suministro de sangre y la demanda de oxígeno del tejido. Incluye enfermedad oclusiva arterial periférica crónica (EOAP), trombosis arterial aguda y embolia, trastornos vasculares inflamatorias, fenómeno de Raynaud y trastornos venosos.

- 5 La aterosclerosis es una enfermedad cardiovascular en la que la pared vascular se remodela, lo que compromete la luz del vaso. El proceso de remodelado aterosclerótico implica la acumulación de células, tanto células de músculo liso como células inflamatorias monocitos/macrófagos, en la íntima de la pared vascular. Estas células captan líquido, probablemente de la circulación, para formar una lesión aterosclerótica madura. Aunque la formación de estas lesiones es un proceso crónico que se produce durante décadas de la vida de un dulto humano, la mayoría de la morbilidad asociada con la aterosclerosis se produce cuando una lesión se rompe y libera residuos trombogénicos que ocluye rápidamente la arteria. Cuando se produce dicho acontecimiento agudo en la arteria coronaria se puede provocar infarto de miocardio y, en el peor caso, puede dar lugar a la muerte del paciente.

- 15 Se puede considerar que la formación de la lesión aterosclerótica se produce en cinco etapas solapantes, tales como migración, acumulación de lípidos, reclutamiento de células inflamatorias, proliferación de células de músculo liso vascular y depósito de matriz extracelular. Se puede demostrar que cada uno de estos procesos se produce en modelos de ser humano y animales de aterosclerosis, pero la contribución relativa de cada uno a la patología y el significado clínico de la lesión no están claros.

Por tanto, existe la necesidad de procedimientos y agentes terapéuticos para tratar las patologías cardiovasculares, tales como aterosclerosis y otras afecciones relacionadas con la enfermedad de las arterias coronarias.

- 20 Las enfermedades cardiovasculares incluyen, entre otras, trastornos del corazón y del sistema vascular, como insuficiencia congestiva cardíaca, infarto de miocardio, enfermedades isquémicas del corazón, todos los tipos de arritmias auriculares y ventriculares, enfermedades vasculares de hipertensión, enfermedades vasculares periféricas y aterosclerosis.

- 25 Niveles demasiado altos o demasiado bajos de grasas en la circulación sanguínea, especialmente colesterol, pueden producir problemas a largo plazo. El riesgo de desarrollar aterosclerosis y enfermedad de las arterias coronarias o de las arterias carótidas (y, por tanto, el riesgo de tener un ataque cardíaco o ictus) aumenta cuando lo hace el nivel de colesterol total. No obstante, los niveles extremadamente bajos de colesterol pueden no ser sanos. Ejemplos de trastornos del metabolismo de los lípidos son hiperlipidemia (niveles anormalmente altos de grasas (colesterol, triglicéridos o ambos) en sangre, se pueden deber a antecedentes familiares de hiperlipidemia, obesidad, una dieta rica en grasa, falta de ejercicio, consumo de alcohol moderado o alto, tabaquismo, diabetes mal controlada y glándula tiroidea hipoactiva), hiperlipidemias hereditarias (hiperlipoproteinemia de tipo I (hiperquilomicronemia familiar), hiperlipoproteinemia de tipo II (hipercolesterolemia familiar), hiperlipoproteinemia de tipo III, hiperlipoproteinemia de tipo IV o hiperlipoproteinemia de tipo V), hipolipoproteinemia, lipidosis (producida por anomalías en las enzimas que metabolizan las grasas), enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann Pick, enfermedad de Fabry, enfermedad de Wolman, xantomatosis cerebrotendinosa, sitosterolemia, enfermedad de Refsum o enfermedad de Tay Sachs.

- 40 Los trastornos renales pueden producir hiper o hipotensión. Ejemplos de problemas renales que posiblemente conducen a hipertensión son estenosis de las arterias renales, pielonefritis, glomerulonefritis, tumores renales, enfermedad renal poliquística, lesión en el riñón o radioterapia que afecta al riñón. Una micción excesiva puede conducir a hipotensión.

Aplicaciones

La presente invención proporciona CTGF para procedimiento diagnósticos de hipertensión pulmonar.

Diagnósticos

- 45 Un ejemplo describe el CTGF como biomarcador para uso diagnóstico de la hipertensión pulmonar. El uso de CTGF como biomarcador en diagnósticos se basa en la comparación de los niveles de CTGF en una muestra biológica de un mamífero enfermo con el nivel de CTGF en una muestra control de un mamífero sano o normal. Si el nivel de CTGF en el mamífero enfermo difiere el nivel de CTGF en un mamífero normal o sano, se diagnostica al mamífero enfermo una enfermedad asociada con un nivel de CTGF alterado. Además, la comparación de los niveles de CTGF de una muestra biológica de un mamífero enfermo con los niveles de CTGF de las muestras control de mamíferos con una enfermedad asociada con CTGF diagnosticado diferentes etapas o gravedad de dicha enfermedad permite el diagnóstico de una enfermedad asociada con CTGF de dicho primer mamífero enfermo y especificando la gravedad de la enfermedad asociada con CTGF. La muestra biológica se toma del tejido análogo o fluido corporal que la muestra control.

- 55 Los valores normales o estándar de la expresión de CTGF se establecen usando muestras control de sujetos mamífero sanos o enfermos. Se puede obtener una muestra control recogiendo fluidos corporales separados o combinados o extractos celulares tomados de sujetos mamífero sanos, preferentemente seres humanos, y se alcanzan cifras estadísticas relevantes. Para obtener el nivel de CTGF normal o estándar de las muestras control,

- las muestras se sometieron a procedimientos de detección adecuados para detectar polipéptido, polinucleótido o actividad de CTGF. La determinación de los niveles de CTGF en un mamífero sometido a diagnóstico se realiza de forma análoga recogiendo una muestra biológica de dicho mamífero. Las cantidades de niveles de CTGF en muestras biológicas de un mamífero sometido a diagnóstico se comparan con los valores normales o estándar medidos de una muestra control. La desviación entre el valor estándar (determinado de la muestra control) y el valor sujeto (determinado de la muestra biológica) establece los parámetros para diagnosticar la enfermedad. La cuantificación absoluta de los niveles de CTGF medidos de muestras biológicas o control se puede realizar comparando dichos valores con los valores obtenidos de un experimento en el que se usa una cantidad conocida de un polipéptido sustancialmente purificado.
- Los anticuerpos que se unen específicamente a CTGF se pueden usar para el diagnóstico de trastornos caracterizados por la expresión del biomarcador CTGF, o en ensayos diagnósticos para monitorizar los pacientes en tratamiento que alcanzan guía para terapia por dicha enfermedad. Tal tratamiento incluye medicación adecuada para tratar dicha enfermedad y el tratamiento con polipéptidos o polinucleótidos de CTGF o agonistas, antagonistas e inhibidores de CTGF. Los anticuerpos útiles para fines diagnósticos se pueden preparar del mismo modo que el descrito anteriormente para terapéutica. Entre los ensayos diagnósticos para CTGF se incluyen procedimientos que usan el anticuerpo y un marcador para detectar CTGF en fluidos del cuerpo humano o extractos de células o tejidos. Los anticuerpos se pueden usar con o sin modificaciones y se pueden marcar mediante unión covalente o no covalente con una molécula indicadora. En la técnica se conocen una amplia diversidad de moléculas indicadoras, alguna de las cuales ya se han descrito anteriormente, y se pueden usar.
- En la técnica se conocen varios protocolos para medir CTGF, incluidos ELISA, RIA, tecnología de guía de onda planar y FACS, y proporcionan la base del diagnóstico de niveles alterados o anómalos de expresión de CTGF. Los bioensayos de tecnología de guía de onda planar están diseñados para realizar ensayos de hibridación de ácido nucleico multiplexados, reacciones de inmunoafinidad y ensayos basados en receptores de membrana con elevada sensibilidad y selectividad. Los elementos de reconocimiento específico para los analitos de interés están unidos sobre la superficie en pequeñas manchas discretas; la transferencia de los elementos de reconocimiento sobre la superficie se realiza usando una tecnología de aplicación puntual adecuada, que solo requiere cantidades mínimas de elementos de reconocimiento. Dicha disposición de diferentes elementos de reconocimiento en un formato de matriz permite la detección y la cuantificación simultáneas de cientos a miles de diferentes analitos por muestra, incluidos duplicados.
- Las reacciones en micromatrices normalmente siguen un esquema típico:
- Los elementos de reconocimiento (p. ej., oligonucleótidos, ADN o anticuerpos) se aplican sobre la superficie de guía planar químicamente modificada con diámetros de aplicación típicas de 100-200 μm . Los sitios de unión libres restantes sobre la superficie están siendo bloqueados para reducir o eliminar la unión inespecífica. En una etapa siguiente, la muestra (p. ej., complejo ADNc marcado con fluorescencia o analito preincubado/anticuerpo marcado con fluorescencia) se transfiere a la superficie para incubación. El tiempo de incubación en el que se produce un reconocimiento selectivo y la unión entre elementos de reconocimiento y las correspondientes moléculas diana (p. ej., hibridación ADN-ADN o interacción antígeno-anticuerpo) depende de la afinidad entre los analitos y los elementos de reconocimiento inmovilizados. Los puntos fluorescentes resultantes se pueden detectar después durante la lectura.
- Debido a las imágenes resueltas lateralmente de las señales de fluorescencia de los puntos individuales tomadas con una cámara CCD se puede cuantificar simultáneamente una gran variedad de diferentes analitos, que normalmente requiere volúmenes de muestras en el intervalo de 15 μl . Los puntos de calibración y de referencia permiten la cuantificación precisa de analitos usando solo un chip y permiten el establecimiento de respuestas a la dosis y perfiles de actividad dependientes del tiempo [Pawlak (2002), Duveneck (2002)].
- Los valores normales o estándar de la expresión de CTGF se establecen usando muestras control de sujetos mamífero sanos o enfermos. Se puede obtener una muestra control recogiendo fluidos corporales separados o combinados o extractos celulares tomados de sujetos mamífero sanos, preferentemente seres humanos, y se alcanzan cifras estadísticas relevantes. Para obtener valores normales o estándar, las muestras control se combinan con un anticuerpo frente a CTGF en condiciones adecuadas para la formación del complejo. La cantidad de formación de complejo estándar se puede cuantificar mediante diversos procedimientos, preferentemente por medios fotométricos. La determinación de los niveles de CTGF en un mamífero sometido a diagnóstico se realiza de forma análoga recogiendo una muestra biológica de dicho mamífero, combinando dicha muestra con un anticuerpo frente a CTGF y la determinación de la formación del complejo. Las cantidades de CTGF expresados en muestras biológicas de un mamífero sometido a diagnóstico se comparan con los valores normales o estándar medidos de una muestra control. La desviación entre el valor estándar (determinado de la muestra control) y el valor sujeto (determinado de la muestra biológica) establece los parámetros para diagnosticar la enfermedad. La cuantificación absoluta de los niveles de CTGF medidos de muestras biológicas o control se puede realizar comparando dichos valores con los valores obtenidos de un experimento en el que se usa una cantidad conocida de un polipéptido sustancialmente purificado.

En otro ejemplo, los polinucleótidos que codifican CTGF pueden usarse con fines diagnósticos. Los polinucleótidos que pueden usarse incluyen secuencias oligonucleotídicas, moléculas complementarias de ARN y ADN y PNA. Los polinucleótidos pueden usarse para detectar y cuantificar la expresión génica en muestras control y biológicas en las que la expresión de CTGF puede correlacionarse con la enfermedad. El ensayo diagnóstico puede usarse para distinguir entre ausencia, presencia y exceso de expresión de CTGF y para monitorizar la regulación de los niveles de CTGF durante la intervención terapéutica.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican CTGF pueden usarse para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares y enfermedades hematológicas, asociadas con la expresión de CTGF. Las secuencias polinucleotídicas que codifican CTGF pueden usarse en análisis tipo Southern, Northern o de transferencia puntual u otras tecnologías basadas en membrana; en tecnologías de PCR; en ensayos con tira reactiva, aguja y ELISA; tecnología de ADNb (tecnología de ADN ramificado) y de guía de onda planar; y en microensayos que usan una muestra biológica de mamíferos enfermos fluidos para detectar alteración de la expresión de CTGF. Tales procedimientos cualitativos o cuantitativos son bien conocidos en la técnica.

En un aspecto concreto, las secuencias polinucleotídicas que codifican CTGF pueden ser útiles en ensayos que detectan la presencia de trastornos asociados, particularmente los mencionados en lo que antecede. Las secuencias polinucleotídicas que codifican CTGF pueden marcarse mediante procedimientos convencionales y añadirse a una muestra biológica de mamíferos enfermos en condiciones adecuadas para la formación de complejos de hibridación. Tras un período de incubación adecuado, la muestra se lava y la señal se cuantifica y compara con un valor estándar. Si la cantidad de señal en la muestra del paciente está alterada de la de una muestra control comparable, las secuencias nucleotídicas han hibridado con las secuencias nucleotídicas de la muestra y la presencia de niveles alterados de las secuencias nucleotídicas que codifican CTGF en la muestra indica la presencia del trastorno asociado. Dichos ensayos también se pueden usar para evaluar la eficacia de un régimen terapéutico concreto en estudios con animales, en ensayos clínicos o en la monitorización del tratamiento de un paciente individual.

Con el fin de proporcionar una base para el diagnóstico de las enfermedades cardiovasculares y enfermedades hematológicas asociadas con la expresión de CTGF, se establece un perfil de expresión normal o estándar. Esto se puede conseguir combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con una secuencia, o un fragmento de la misma, que codifica CTGF, en condiciones adecuadas para la hibridación o amplificación. La cuantificación de los niveles de CTGF medidos de muestras biológicas o control se puede realizar comparando dichos valores con los valores obtenidos de un experimento en el que se usa una cantidad conocida de un polinucleótido sustancialmente purificado. Los valores obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de pacientes sintomáticos para un trastorno. La desviación de los valores estándar se usa para establecer la presencia de un trastorno.

Biomarcador

Uso de CTGF como biomarcador

Un experto en la técnica conoce varios procedimientos y dispositivos para la detección y análisis de los marcadores de la presente invención. Con respecto a los polipéptidos o las proteínas en muestras de ensayo de pacientes a menudo se usan dispositivos y procedimientos de inmunoensayo. Estos dispositivos y procedimientos pueden usar moléculas marcadas en varios formatos de ensayo de tipo sándwich, competitivo o no competitivo, para generar una señal que está relacionada con la presencia o la cantidad de un analito de interés. Adicionalmente, ciertos dispositivos y procedimientos, tales como biosensores e inmunoensayos ópticos, se pueden usar para determinar la presencia o la cantidad de analitos sin la necesidad de una molécula marcada.

Preferentemente, los marcadores se analizan usando un inmunoensayo, aunque los expertos en la técnica conocen bien otros procedimientos (por ejemplo, la medición de los niveles de ARN marcador). La presencia o cantidad de un marcador se determina, en general, usando anticuerpos específicos de cada marcador y detectando la unión específica. Se puede usar cualquier inmunoensayo adecuado, por ejemplo inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayos de unión competitiva, tecnología de guía de onda planar y similares. La unión inmunológica específica del anticuerpo al marcador se puede detectar directa o indirectamente. Los marcadores directos incluyen marcas fluorescentes o luminiscentes, metales, pigmentos, radionúclidos y similares, unidas al anticuerpo. Los marcadores indirectos incluyen diversas enzimas bien conocidas en la técnica, tales como fosfatasa alcalina, peroxidada de rábano y similares. Para un ejemplo de cómo se lleva a cabo este procedimiento en una máquina, se puede usar el dispositivo biomédico RAMP, denominado Clinical Reader sup™, que usa el procedimiento de la marca fluorescente, aunque el experto en la técnica conocerá muchas máquinas y protocolos manuales diferentes para realizar el mismo ensayo. En el pocillo de muestras se aplica sangre entera diluida. Los glóbulos rojos se retienen en elemento de la muestra y el plasma separado migra a lo largo de la tira. Las partículas de látex pigmentadas fluorescentes se unen al analito y se inmovilizan en la zona de detección. Partículas adicionales se inmovilizan en la zona de control interno. La fluorescencia de las zonas de detección y de control interno se miden en el RAMP Clinical Reader sup™ y se calcula la proporción entre estos valores. Esta proporción se usa para determinar la concentración de analitos mediante interpolación a partir de una curva estándar específica de lote suministrada por el fabricante en cada kit de prueba para cada ensayo.

El uso de anticuerpos inmovilizados específicos para los marcadores también se contempla en la presente invención y es bien conocido por un experto en la técnica. Los anticuerpos podrían inmovilizarse sobre diversos soportes sólidos, tales como partículas de matrices magnéticas o cromatográficas, la superficie de un lugar de ensayo (tal como pocillos de microtitulación), piezas de un material sustrato sólido (tal como plástico, nylon, papel) y similares. Se podría preparar una tira de ensayo recubriendo el anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos en una matriz sobre soporte sólido. Esta tira podría sumergirse después en la muestra de ensayo y después procesarse rápidamente a través de etapas de lavado y detección para generar una señal mensurable, tal como un punto coloreado.

El análisis de una pluralidad de marcadores se puede llevar a cabo por separado o simultáneamente con una muestra de ensayo.

Varios marcadores se pueden combinar en una prueba para un procesamiento eficiente de múltiples muestras. Además, un experto en la técnica reconocería el valor de analizar múltiples muestras (por ejemplo, a puntos de tiempo sucesivos) del mismo individuo. Dichas pruebas de muestras en serie permitirán la identificación de cambios en los niveles del marcador en el tiempo. Incrementos o disminuciones de los niveles del marcador, así como la ausencia de cambios en los niveles del marcador, proporcionarían información útil sobre el estado de enfermedad que incluye, entre otros, identificar el tiempo aproximado desde el inicio del acontecimiento, la presencia y la cantidad de tejido que se puede salvar, la idoneidad de las terapias farmacológicas, la eficacia de varias terapias, la identificación de la gravedad de la enfermedad y la identificación del resultado del paciente, incluido el riesgo de futuros acontecimientos.

Se puede construir un ensayo que consiste en una combinación de los marcadores a los que se hace referencia en la presente invención para proporcionar información relevante relacionada con el diagnóstico diferencial. Tal panel se puede construir usando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más de los marcadores individuales. El análisis de un único marcador o subpoblaciones de marcadores que comprenden un panel de marcadores más grande se podría llevar a cabo con procedimientos descritos en la presente invención para optimizar la sensibilidad o especificidad clínicas en varios contextos clínicos.

El análisis de los marcadores podría llevarse a cabo también en diversos formatos físicos. Por ejemplo, el uso de placas de microtitulación o automatización se podría emplear para facilitar el procesamiento de un número grande de muestras de ensayo. Como alternativa, se podrían desarrollar formatos sencillos para muestras, para facilitar el tratamiento y diagnóstico inmediatos de forma rápida, por ejemplo en situaciones de transporte ambulatorio o en urgencias. Formatos físicos particularmente útiles comprenden superficies que tienen una pluralidad de localizaciones abordables pequeñas para la detección de una pluralidad de diferentes analitos. Dichos formatos incluyen micromatrices de proteínas o "circuitos de proteínas" y dispositivos capilares.

Los marcadores cardíacos desempeñan un papel importante en la detección precoz y monitorización de enfermedad cardiovascular. Normalmente, los marcadores de enfermedad son sustancias que se encuentran en una muestra corporal que se pueden medir fácilmente. La cantidad medida puede correlacionar con la fisiopatología de la enfermedad subyacente, la presencia o ausencia de un acontecimiento cardíaco actual o inminente, la probabilidad de un acontecimiento cardíaco en el futuro. En pacientes que reciben tratamiento para su afección, la cantidad medida también se correlacionará con la capacidad de respuesta a la terapia. Los marcadores pueden incluir niveles elevados de presión arterial, colesterol, azúcar en sangre, homocisteína y proteína C reactiva (CRP). No obstante, los marcadores actuales, incluso en combinación con otras mediciones o factores de riesgo, no identifican adecuadamente pacientes e riesgo, detectan con precisión acontecimientos (es decir, ataques cardíacos) o se correlacionan con terapia. Por ejemplo, la mitad de los pacientes no tienen niveles elevados de colesterol en suero u otros factores de riesgo tradicionales.

El uso de marcadores en diagnóstico de afecciones cardíacas se describe en, por ejemplo, Alpert y col. (2000); Newby y col. (2001); de Lemos y col. (2002); Boersma y col. (2002); Christenson y col. (2001).

Biomarcador cardiovascular

BNP (como ejemplo para biomarcadores cardiovasculares)

El péptido natriurético de tipo B (BNP), también denominado péptido natriurético de tipo cerebral, es un péptido de 4 kDa de 32 aminoácidos que está implicado en el sistema de natriuresis para regular la presión arterial y el equilibrio de los líquidos. El precursor del BNP se sintetiza como una molécula de 108 aminoácidos, denominada "pre pro BNP" que se procesa proteolíticamente en un péptido N-terminal de 76 aminoácidos (aminoácidos 1-76), denominado "NT pro BNP" y la hormona madura de 32 aminoácidos, denominada BNP o BNP 32 (aminoácidos 77-108). Se ha sugerido que cada una de estas especies NT pro-BNP, BNP-32 y el pre pro BNP pueden circular en plasma humano. Las dos formas, pre pro BNP y NT pro BNP, y los péptidos que derivan de BNP, pre pro BNP y T pro BNP y que están presentes en la sangre como resultado de la proteólisis de BNP, NT pro BNP y pre pro BNP, se describen, en conjunto, como marcadores relacionados o asociados con BNP. La degradación proteolítica de BNP y de los péptidos relacionados con BNP también se han descrito en la literatura y estos fragmentos proteolíticos también están dentro del término "péptidos relacionados con BNP". BNP y péptidos relacionados con BNP se encuentran predominantemente en los gránulos secretores de los ventrículos cardíacos y se liberan desde el

corazón en respuesta a la expansión del volumen ventricular y a la sobrecarga de presión. Las elevaciones de los niveles de BNP se asocian con elevación de las presiones auriculares y de enclavamiento pulmonar, función diastólica y sistólica ventricular reducida, hipertrofia del ventrículo izquierdo e infarto de miocardio [Sagnella, (1998)]. Además, hay numerosos informes de concentración elevada de BNP asociada con insuficiencia congestiva cardíaca e insuficiencia renal. Aunque es probable que el BNP y los péptidos relacionados con BNP no sean específicos del SCA, pueden ser marcadores sensibles del SCA porque pueden indicar no solo daño celular por isquemia, sino también una perturbación del sistema natriurético asociado con SCA. El término "BNP", como se usa en el presente documento, se refiere a la propia molécula de BNP de 32 aminoácidos. No obstante, un experto en la técnica reconocerá otros marcadores relacionados con el BNP también pueden servir como indicadores diagnósticos o pronósticos en pacientes con SCA. Por ejemplo, el BNP se sintetiza como una molécula pre pro-BNP de 108 aminoácidos que se procesa proteolíticamente y se convierte en una molécula "NT pro BNP" de 76 aminoácidos y la molécula de BNP de 32 aminoácidos. Dada su relación con el BNP, la concentración de la molécula NT pro-BNP también puede proporcionar información diagnóstica o pronóstica de los pacientes. La frase "marcador relacionado con BNP o con el péptido relacionado con BNP" se refiere a cualquier polipéptido que se origina a partir de la molécula pre pro-BNP, aparte de la propia molécula de BNP de 32 aminoácidos. Por tanto, un marcador relacionado o asociado con BNP incluye la molécula NT pro-BNP, el prodominio, un fragmento de BNP que es más pequeño que la totalidad de la secuencia de 32 aminoácidos, un fragmento de pre pro-BNP distinto a BNP y un fragmento del prodominio.

Clases de biomarcadores

El CTGF podría usarse como biomarcador de enfermedades cardiovasculares y enfermedades hematológicas en diferentes clases:

Biomarcador de enfermedad: biomarcador que hace referencia a un desenlace clínico o medida de enfermedad.

Biomarcador de eficacia: biomarcador que refleja el efecto beneficioso de un tratamiento dado.

Biomarcador de estadificación: biomarcador que distingue entre diferentes etapas de un trastorno crónico.

Biomarcador sustituto: biomarcador que se considera un sustituto válido de una medida de desenlaces clínicos.

Biomarcador de toxicidad: Biomarcador que indica un efecto toxicológico de un fármaco en un sistema *in vitro* o *in vivo*.

Biomarcador de mecanismo: biomarcador que indica un efecto posterior de un fármaco.

Biomarcador diana: biomarcador que indica interacción del fármaco con su diana.

Se divulga un procedimiento de uso del CTGF como biomarcador de una enfermedad, que comprende:

(a) obtención de una muestra biológica de un mamífero,

(b) medición del nivel de CTGF en la muestra biológica,

(c) obtención de una muestra control de un mamífero,

(d) medición del nivel de CTGF en la muestra control,

(e) comparación del nivel de CTGF en la muestra biológica con el nivel de CTGF en una muestra control, y

(f) diagnóstico de una enfermedad basada en el nivel de CTGF de una muestra biológica en comparación con la muestra control.

La muestra biológica de la etapa (a) de los procedimientos es, en un ejemplo preferido, una muestra biológica comprendida en un grupo de muestras compuestas por una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de tejido, una muestra de mucosa oral, una muestra de saliva, una muestra de líquido intersticial o una muestra de orina. La muestra de sangre es, por ejemplo, una muestra de sangre entera, una muestra de sangre fraccionada, una muestra de plaquetas, una muestra de neutrófilos, una muestra de leucocitos, una muestra de glóbulos blancos, una muestra de monocitos, una muestra de glóbulos rojos, una muestra de granulocitos y una muestra de eritrocitos. Una muestra de tejido es, por ejemplo, una muestra recogida de músculo, tejido adiposo, corazón o piel.

En una divulgación, el CTGF se usa como biomarcador de diagnóstico de una enfermedad que se asocia con niveles alterados de CTGF. En otra divulgación, el CTGF se usa como biomarcador para identificar un riesgo individual de desarrollar una enfermedad o de predecir un resultado adverso en un paciente en el que se ha diagnosticado una enfermedad.

5 El uso de CTGF como biomarcador de enfermedad en diagnósticos se basa en la comparación de los niveles de CTGF en una muestra biológica de un mamífero enfermo con el nivel de CTGF en una muestra control de un mamífero sano o normal o un grupo de mamíferos sanos o normales. Si el nivel de CTGF en el mamífero enfermo difiere el nivel de CTGF en un mamífero normal o sano, se diagnostica al mamífero enfermo una enfermedad asociada con un nivel de CTGF alterado.

Además, usando el CTGF como biomarcador de estadificación, los niveles de CTGF de un mamífero enfermo se comparan con los niveles de CTGF de un mamífero con una enfermedad asociada con CTGF diagnosticado con diferentes etapas o gravedad de dicha enfermedad, permite el diagnóstico de dicho primer mamífero enfermo especificando la gravedad de la enfermedad asociada con CTGF.

10 Una muestra control puede ser una muestra tomada de un mamífero. Una muestra control puede ser una muestra obtenida previamente de un mamífero, como un nivel de CTGF en una muestra control puede ser un nivel predeterminado de CTGF medido en una muestra obtenida previamente. El nivel de CTGF en una muestra control o en una muestra biológica se puede determinar como, por ejemplo, un valor relativo y como un valor absoluto. Un nivel de CTGF medido previamente de una muestra control puede, por ejemplo, almacenarse en una base de datos,
 15 en una publicación de Internet, en forma accesible por vía electrónica, en una publicación. Comparando el nivel de CTGF de una muestra biológica con una muestra control puede realizarse comparando los valores relativos con los valores cuantificados absolutos.

Otra realización es un procedimiento de uso de CTGF como biomarcador de enfermedad, eficacia o criterio de valoración sustituto para una terapia de hipertensión pulmonar de acuerdo con la reivindicación 1.

20 El uso de CTGF como biomarcador de enfermedad, de eficacia y criterio de valoración sustituto diagnósticos se basa en la comparación de los niveles de CTGF en una muestra biológica de un mamífero enfermo antes del tratamiento (nivel en la muestra basal) con el nivel de CTGF en muestras posteriores de dicho mamífero que está recibiendo un tratamiento para la enfermedad. Si el nivel de CTGF en la muestra basal difiere del nivel de CTGF en las muestras posteriores, la terapia se puede considerar un éxito. Si el nivel de CTGF en la muestra basal no difiere
 25 o lo hace ligeramente del nivel de CTGF en las muestras posteriores, la terapia no se puede considerar un éxito. Si la terapia no se considera un éxito, se puede considerar incrementar las dosis de la misma terapia, repetir la misma terapia o administrar un tratamiento alternativo diferente de la primera terapia.

La muestra biológica en la etapa (a) de los procedimientos se obtiene del corazón.

En una realización preferida, el nivel de CTGF se determina determinando el nivel del polinucleótido de CTGF.

30 En otra realización preferida, el nivel de CTGF se determina determinando el nivel del polipéptido de CTGF.

En una realización preferida más, el nivel de CTGF se determina determinando el nivel de actividad de CTGF.

En una divulgación, la enfermedad asociada con CTGF está compuesta por un grupo de enfermedades consistentes en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, enfermedades respiratorias, enfermedades gastroenterológicas y enfermedades urológicas. En un ejemplo más preferido, la
 35 enfermedad cardiovascular asociada con el CTGF está comprendida en un grupo de enfermedades que consisten en insuficiencia congestiva cardíaca, hipertensión pulmonar, disfunción del ventrículo izquierdo y disfunción del ventrículo derecho, infarto de miocardio, oclusión coronaria, enfermedad cardíaca isquémica, trastorno de hipertrofia cardíaca, trastornos de fibrosis cardíaca.

En una realización preferida de la invención, el mamífero es un ser humano.

40 En una realización preferida de la invención, el nivel de CTGF de la muestra biológica es elevado en comparación con el de la muestra control.

Otra realización de la presente invención prefiere el uso de CTGF en combinación con el uso de uno o más biomarcadores, más preferentemente con biomarcadores usados en el diagnóstico de enfermedades asociadas con el CTGF.

45 En una realización preferida de la invención, el uso de CTGF se combina con el uso de uno o más biomarcadores que están comprendidos en un grupo de biomarcadores compuestos por CRTAC, PRSS23, FN1, LTBP2, TGFB2, NPR3, BNP, ANP, Troponina, CRP, Mioglobina, CK-MB y metabolitos.

En una realización preferida adicional, el uso de CTGF se combina con el uso de uno o más biomarcadores clínicos que están comprendidos en un grupo de biomarcadores compuestos por presión arterial, frecuencia cardíaca,
 50 presión arterial pulmonar o resistencia vascular sistémica.

En una realización preferida adicional, el uso de CTGF se combina con el uso de uno o más procedimientos de imagen diagnósticos que están comprendidos en un grupo de procedimientos consistentes en PET (tomografía de emisión de positrones), TAC (tomografía computerizada), ultrasonidos, EPCT (tomografía computerizada por emisión de un solo fotón), ecocardiografía o cardiografía por impedancia.

En una realización preferida adicional, el uso de CTGF se combina con el uso de uno o más procedimientos de imagen diagnósticos que están comprendidos en un grupo de procedimientos consistentes en PET (tomografía de emisión de positrones), TAC (tomografía computerizada), ultrasonidos, EPCT (tomografía computerizada por emisión de un solo fotón), ecocardiografía o cardiografía por impedancia, presión arterial, frecuencia cardíaca, presión en la arteria pulmonar, resistencia vascular sistémica, CRTAC, PRSS23, FN1, LTBP2, TGFB2, NPR3, BNP, ANP, Troponina CRP, Mioglobina CK-MB, y metabolitos.

También se divulga un kit para identificar un riesgo individual de desarrollar una enfermedad, para predecir una enfermedad o un resultado adverso en un paciente con diagnóstico de enfermedad o para guiar una terapia en un paciente con una enfermedad, en el que el kit comprende uno o más anticuerpos que se unen específicamente a CTGF, medios de detección, uno o más contenedores para recoger o retener la muestra biológica y una instrucción para su uso.

Se divulga un kit para identificar un riesgo individual de desarrollar una enfermedad, para predecir una enfermedad o un resultado adverso en un paciente con diagnóstico de enfermedad o para guiar una terapia en un paciente con una enfermedad, en el que el kit comprende una o más sondas o cebadores para detectar ARNm de CTGF, medios de detección, uno o más contenedores para recoger o retener la muestra biológica y una instrucción para su uso.

Se divulga un kit para identificar un riesgo individual de desarrollar una enfermedad, para predecir una enfermedad o un resultado adverso en un paciente con diagnóstico de enfermedad o para guiar una terapia en un paciente con una enfermedad, en el que el kit comprende uno o más sustratos para detectar ARNm de CTGF, medios de detección, uno o más contenedores para recoger o retener la muestra biológica y una instrucción para su uso.

Determinación de una dosis terapéuticamente eficaz

La determinación de una dosis terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de ingrediente activo que incrementa o disminuye la actividad de CTGF en relación con la actividad de CTGF que se produce en ausencia de la dosis terapéuticamente eficaz. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente bien en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentraciones adecuado y la vía de administración. Tal información se puede usar después para determinar dosis útiles y vías de administración en seres humanos.

La eficacia terapéutica y la toxicidad, p. ej., DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales. El cociente entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse en forma del cociente DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren las composiciones farmacéuticas que exhiben índices terapéuticos grandes. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios animales se usan en la formulación de un intervalo de dosificación para uso humano. La dosificación contenida en dichas composiciones está, preferentemente, dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración. El médico determinará la dosificación exacta a la luz de los factores relacionados con el sujeto que requiere el tratamiento. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del ingrediente activo o para mantener el efecto deseado. Entre los factores que se pueden tener en cuenta se incluyen la gravedad de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, la hora y la frecuencia de administración, la(s) combinaciones de fármacos, las sensibilidades de la reacción y la tolerancia/respuesta al tratamiento. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y el índice de aclaramiento de la formulación concreta.

Las cantidades de dosificación normales pueden variar de 0,1 microgramos a 100.000 microgramos, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, en función de la vía de administración. En la literatura se proporcionan guías sobre las dosificaciones y procedimientos de liberación concretos y, en general, están disponibles para los facultativos en la técnica. Los expertos en la técnica emplearán diferentes formulaciones para nucleótidos que para proteínas o sus inhibidores. De igual forma, la liberación de polinucleótidos o polipéptidos será específica de células, condiciones, localizaciones etc. particulares. Si el reactivo es un anticuerpo de cadena sencilla, se pueden construir polinucleótidos que codifican el anticuerpo e introducir en una célula *ex vivo* o *in vivo* usando técnicas bien establecidas, incluidas, entre otras, transferencia de ADN mediada por transferrina-polycatió, transfección con ácidos nucleicos desnudos o encapsulados, fusión celular mediada por liposomas, transporte intracelular de perlas de látex recubiertas por ADN, fusión de protoplastos, infección viral, electroporación, "disparo de gen" y transfección mediada por fosfato cálcico o DEAE.

Si el producto de expresión es ARNm, el reactivo es, preferentemente un oligonucleótido antisentido o un ribozima. Los polinucleótidos que expresan oligonucleótidos antisentido o ribozimas pueden introducirse en las células mediante diversos procedimientos, tal y como se ha descrito en lo que antecede. Preferentemente, un reactivo reduce la expresión del gen de CTGF o la actividad de CTGF en al menos un 10%, preferentemente aproximadamente 50%, más preferentemente aproximadamente 75, 90, o 100%, en relación con la ausencia del

reactivo. La eficacia del mecanismo escogido para disminuir el nivel de expresión del gen de CTGF o la actividad de CTGF se puede evaluar usando procedimientos bien conocidos en la técnica, como hibridación de sondas nucleotídicas con ARNm específico de CTGF, RT-PCR cuantitativa, detección inmunológica de CTGF o medición de la actividad de CTGF.

- 5 En cualquiera de las formas de realización descritas en lo que antecede, cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la invención se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos adecuados. Un experto ordinario en la técnica puede realizar la selección de los agentes adecuados para usar en terapia de combinación, de acuerdo con principios farmacéuticos convencionales. La combinación de agentes terapéuticos puede actuar sinérgicamente para efectuar el tratamiento o la prevención de los diversos trastornos descritos en lo que antecede. Usando este enfoque, se puede conseguir eficacia terapéutica con dosificaciones menores de cada agente, de modo que se reduce el potencial de efectos secundarios adversos. Cualquiera de los procedimientos terapéuticos descritos en lo que antecede pueden aplicarse a cualquier sujeto que necesite tal terapia incluidos, por ejemplo, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos y, más preferentemente, seres humanos.
- 10 Las moléculas de ácido nucleico divulgadas en la invención son las moléculas de ácido nucleico que están contenidas en un grupo de moléculas de ácido nucleico que consisten en (i) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 3 o la SEC ID N° 4, (ii) moléculas de ácido nucleico que comprende la secuencia de SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2, (iii) moléculas de ácido nucleico que tiene la secuencia de SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2, (iv) moléculas de ácido nucleico cuya hebra complementaria hibrida en condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico de (i), (ii) o (iii), (v) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (iii) debido a la degeneración del código genético, (vi) moléculas de ácido nucleico que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%; e (vii) en el que el polipéptido codificado por dichas moléculas de ácido nucleico de (i)-(vi) tienen actividad CTGF.
- 15 Los polipéptidos divulgados son los polipéptidos contenidos en un grupo de polipéptidos que consiste en (i) polipéptidos que tienen la secuencia de SEC ID N° 3 O 4, (ii) polipéptidos que comprenden la secuencia de SEC ID N° 3 o 4, (iii) polipéptidos codificados por moléculas de ácido nucleico de la invención y (iv) polipéptidos que muestran una identidad de al menos 99%, 98%, 95%, 90% u 80% con un polipéptido de i), (ii) o (iii).
- 20 Otra divulgación es un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consisten en enfermedades cardiovasculares y enfermedades hematológicas en un mamífero, que comprende las etapas de (i) determinar la cantidad de polinucleótido de CTGF en una muestra tomada de dicho mamífero, (ii) determinar la cantidad de polinucleótido de CTGF en un mamífero sano y/o enfermo. Una enfermedad se diagnostica, por ejemplo, si existe una similitud considerable en la cantidad de polinucleótido de CTGF en dicho mamífero en comparación con un mamífero enfermo.
- 25 Los usos, procedimientos o composiciones de la invención son útiles para cada enfermedad individual comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en cardiovasculares y enfermedades hematológicas.
- 30 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención sujeto. Estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no están incluidos con el fin de limitar la invención.

Ejemplos

40 **Ejemplo 1:** Búsqueda de secuencias homólogas en las bases de datos de secuencias públicas

El grado de homología puede calcularse fácilmente mediante procedimientos conocidos. Se diseñan procedimientos preferidos para determinar la homología para dar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los procedimientos para determinar la homología se codifican en programas de ordenador públicamente disponibles tales como BestFit, BLASTP, BLASTN, y FASTA. Los programas BLAST están disponibles públicamente del NCBI y otras fuentes de Internet.

Para el CTGF, se identificaron los siguientes blancos de secuencias conocidas usando el algoritmo BLAST Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ; Nucleic Acids Res 1997 Sep 1; 25(17) 3389-402] y el siguiente grupo de parámetros: matriz= BLOSUM62 y filtro de baja complejidad. Se buscó en las siguientes bases de datos: NCBI (base de datos no redundantes) y la base de datos de patentes DERWENT (Geneseq).

50 Se encontraron los siguientes blancos:

>dbj|DD288037.1| GENES ENDOTELIALES LINFÁTICOS, Longitud= 7017, Puntos = 1,391e+04 bits (7017), Prev = 0,0 Identidades = 7017/7017 (100%)

>gb|S82451.1| proteína 2 de unión al factor beta transformante de crecimiento latente [línea de células fibroblastos, humana CC102, ARNm, 7017, Longitud= 7017, Puntos = 1,391e+04 bits (7017), Prev = 0,0 Identidades = 7017/7017 (100%)

55

- >ref|NM_000428.2| proteína 2 de unión al factor beta transformante de crecimiento (CTGF) latente de Homo sapiens, ARNm, Longitud= 8568, Puntos = 1,384e+04 bits (6982), Prev = 0,0 Identidades = 6982/7017 (100%)
- 5 >dbj|DD018049.1| Un marcador de insuficiencia cardíaca y su uso Longitud = 8657 Puntos = 1,76e+04 bits (6940), Prev = 0,0 Identidades = 6967/697,2 (99%), Huecos = 3/6972 (0%)
- >emb|CQ874661.1| Secuencia 21 de la patente WO2004075835, Longitud = 7000 Puntos = 1,369e+04 bits (6906), Prev = 0,0 Identidades = 6954/6966 (99%), Huecos = 3/6966 (0%)
- 10 >emb|Z37976.1|HSCTGFMR ARNm de H.sapiens para la proteína de unión al factor beta transformante de crecimiento latente (LTBP-2). Longitud = 7000 Puntos = 1,369e+04 bits (6906), Prev = 0,0 Identidades = 6954/6966 (99%), Huecos = 3/6966 (0%)
- >gb|BC078659.1| ARNm de H.sapiens para la proteína 2 de unión al factor beta transformante de crecimiento (clon de ADNc MGC: 87426 IMAGE:30343778), cds completa, Longitud = 6901 Puntos = 1,361e+04 bits (6867), Prev = 0,0 Identidades = 6897/6905 (99%), Huecos = 4/6905 (0%)
- 15 >dbj|AB209865.1| ARNm de la variante proteica de la proteína 2 de unión al factor beta transformante de crecimiento latente de Homo sapiens, Longitud= 7803, Puntos = 1,232e+04 bits (6216), Prev = 0,0 Identidades = 6228/6232 (99%)

Ejemplo 2: Análisis antisentido

El conocimiento de la secuencia de ADNc completa y correcta que codifica CTGF permite su uso como herramienta para la tecnología antisentido en la investigación de la función génica. Los oligonucleótidos, ADNc o fragmentos genómicos que comprenden la hebra antisentido de un polinucleótido que codifica CTGF se usan in Vitro o in vivo para inhibir la traducción del ARNm. Tal tecnología es en la actualidad bien conocida en la técnica y las moléculas antisentido se pueden diseñar en varias localizaciones a lo largo de las secuencias nucleotídicas. Mediante el tratamiento de células o de los animales experimentales completos con tales secuencias antisentido, el gen de interés se apaga de forma eficaz. Con frecuencia, la función del gen se establece mediante la observación de la conducta a nivel intracelular, celular, tisular o del organismo (p. ej., letalidad, pérdida de función diferenciada, cambios en la morfología, etc.).

Además de usar secuencias construidas para interrumpir la transcripción de un determinado marco de lectura abierto, se obtienen modificaciones de la expresión génica mediante el diseño de secuencias antisentido de regiones intrónicas, elementos promotor/potenciador o, incluso, de genes reguladores de transacción.

30 **Ejemplo 3:** Expresión de CTGF

La expresión de CTGF se consigue mediante la subclonación de ADNc en los adecuados vectores de expresión y la transfección de los vectores en huéspedes de expresión tales como, por ejemplo, *E. coli*. En un caso concreto, el vector se somete a ingeniería de modo que contiene un promotor para la β -galactosidasa, en dirección 5' del sitio de clonación, seguido por la secuencia que contiene el amino terminal metionina y los posteriores siete residuos de la β -galactosidasa. Inmediatamente después de estos ocho residuos hay un promotor del bacteriófago sometido a ingeniería útil para el cebado artificial y la transcripción y para proporcionar una serie de sitios únicos para las endonucleasas de restricción para clonación.

La inducción de la cepa bacteriana transfeccionada aislada con isopropil-b-D-tiogalactopiranosido (IPTG) usando procedimientos estándar produce una proteína de fusión correspondiente a los primeros siete residuos de β -galactosidasa, aproximadamente 15 residuos de "ligante" y el péptido codificado en el ADNc. Dado que los insertos de clones de ADN se generan mediante procedimientos esencialmente aleatorios, existe una probabilidad del 33% de que el ADNc incluido se encuentre en el marco de lectura correcto para su adecuada traducción. Si el ADNc no está en el marco de lectura adecuado, se obtiene mediante delección o inserción del número adecuado de bases usando procedimientos bien conocidos, incluidos mutagénesis in Vitro, digestión con exonucleasa III o nucleasa mung bean o la inclusión de un ligante de oligonucleótidos de la longitud adecuada.

El ADNc de CTGF se arrastra a los otros vectores que se sabe que son útiles para la expresión de proteínas en huéspedes específicos. Los cebadores de oligonucleótidos que contienen sitios de clonación, así como un segmento de ADN (aproximadamente 25 bases) suficiente para hibridar con tiras en ambos extremos del ADNc diana se sintetizan químicamente mediante procedimientos estándar. Estos cebadores se usan a continuación para amplificar el segmento génico deseado mediante PCR. El segmento génico resultante se digiere con las enzimas de restricción adecuadas en condiciones estándar y se aísla mediante electroforesis en gel. Como alternativa se producen segmentos génicos similares mediante digestión del ADNc con las enzimas de restricción adecuadas. Usando cebadores adecuados, se ligan los segmentos de la secuencia codificadora de más de un gen y se clonan en vectores adecuados. Es posible optimizar la expresión mediante construcción de tales secuencias químicas.

55

Entre los huéspedes de expresión para tales moléculas quiméricas se incluye células de mamífero como células de ovario de hámster chino (CHO) y 293 humanas, células de insecto como las células Sf9, células de levadura como *Saccharomyces cerevisiae* y células bacterianas tales como *E. coli*. Para cada uno de estos sistemas, un vector de expresión útil también incluye un origen de replicación que permita su propagación en las bacterias y un marcador seleccionable tal como el gen de resistencia antibiótica a β -lactamasa para permitir la selección del plásmido en la bacteria. Además, el vector puede incluir un segundo marcador seleccionable tal como el gen de neomicina fosfotransferasa, para permitir la selección en células huésped eucarióticas transfeccionadas. Los vectores para usar en huéspedes de expresión eucarióticos requieren elementos para procesar ARN, tales como secuencias de 3' poliadenilación, si estos no forman parte del ADNc de interés.

Además, el vector contiene promotores o potenciadores que incrementan la expresión génica. Tales promotores son específicos del huésped e incluyen promotores de MMTV, SV40 y metalotionina para las células CHO; promotores trp, lac, tac y T7 para huéspedes bacterianos; y factor alfa, alcohol oxidasa y promotores PGH para levaduras. Potenciadores de la transcripción, como el potenciador del virus del sarcoma de Rous, se usan en células huésped de mamíferos. Una vez que se han obtenido cultivos homogéneos de células recombinantes mediante procedimientos estándar de cultivo, se recuperan cantidades grandes de CTGF producido de forma recombinante a partir del medio condicionado y se analizan usando procedimientos cromatográficos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el CTGF se puede clonar en el vector de expresión pcDNA2, como se ilustra en la presente memoria descriptiva. Este producto se puede usar para transformar, por ejemplo, HEK293 o COS mediante metodología estándar en la técnica. Específicamente, por ejemplo, usando transferencia génica mediada por lipofectamina (Gibco BRL n° de catálogo 18324-020).

Ejemplo 4: Aislamiento de CTGF recombinante

El CTGF se expresa en forma de una proteína quimérica con uno o más dominios polipeptídicos adicionales añadidos para facilitar la purificación de proteínas. Tales dominios que facilitan purificación incluyen, entre otros, péptidos quelantes de metales tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados [Appa Rao, (1997)] y el dominio usado en el sistema de purificación de extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Washington.). La inclusión de una secuencia ligante escindible tal como Factor Xa o enteroquinasa (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) entre el dominio de purificación y la secuencia de CTGF es útil para facilitar la expresión de CTGF.

El ejemplo siguiente proporciona un procedimiento para purificar CTGF.

El CTGF se genera usando el sistema de expresión en baculovirus BAC-TO-BAC (GIBCO BRL) basado en la infección por el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) de células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (células Sf9).

El ADNc que codifica proteínas clonadas en el plásmido donante pFASTBAC1 o pFASTBAC-HT que contienen un elemento de transposición mini-Tn7. El plásmido recombinante se transforma en células competentes DH10BAC que contiene el báculo parental bMON14272 (ADN infeccioso de AcNPV) y un plásmido auxiliar. El elemento mini-Tn7 del donante pFASTBAC puede transponerse al sitio de unión attTn7 en el báculo, de modo que se introduce el gen en el genoma viral. Las colonias que contienen los báculos recombinantes se identifican rompiendo el gen *lacZ*. A continuación, la construcción del báculo puede aislarse e infectarse en células de insecto (células Sf9), lo que tiene como resultado la producción de partículas de baculovirus recombinantes infecciosas y la expresión de la enzima recombinante sin condensar (pFastbac1) o la proteína de fusión CTGF-His (pFastbacHT).

Las células se recolectaron y los extractos se prepararon 24, 48 y 72 horas después de la transfección. La expresión de CTGF se confirma mediante tinción con azul de coomassie tras electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) y transferencia Western sobre una membrana de PVDF de una SDS-PAGE sin teñir. La proteína de fusión proteína-His se detecta debido a la interacción entre el conjugado Ni-NTA HRP y la marca con His que se fusiona con CTGF.

Ejemplo 5: Producción de anticuerpos específicos para CTGF

Se utilizan dos enfoques para elevar el nivel de anticuerpos frente a CTGF, y cada enfoque es Alti para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. En un enfoque, la proteína desnaturalizada de separación HPLC de fase inversa se obtiene en cantidades de hasta 75 mg. Esta proteína desnaturalizada se usa para inmunizar ratones o conejos usando protocolos estándar; unos 100 μ g son adecuados para la inmunización de un ratón, mientras que hasta 1 mg podría usarse para inmunizar un conejo. Para identificar hibridomas de ratón, la proteína desnaturalizada está radioyodada y se usa para la detección selectiva de posibles hibridomas de células B murinas para los que producen anticuerpos. Este procedimiento sólo requiere cantidades pequeñas de proteína, de modo que 20 mg sea suficiente para marcar y seleccionar varios miles de clones.

En el segundo enfoque, la secuencia de aminoácidos de un dominio de CTGF adecuado, tal y como se deduce de la traducción del ADNc, se analiza para determinar las regiones de alta antigenicidad. Los oligopéptidos que comprenden regiones hidrofílicas adecuadas se sintetiza y usan en protocolos de inmunización adecuados para generar anticuerpos. Las secuencias de aminoácidos óptimas para la inmunización normalmente están en el

extremo C, el extremo N y los lugares intermedios, regiones hidrofílicas del polipéptido con una probabilidad mayor de exponerse al ambiente externo cuando la proteína se encuentra en su conformación natural.

Normalmente, péptidos seleccionados, de una longitud de aproximadamente 15 residuos, se sintetizan usando Applied Biosystems Peptide Synthesizer Model 431A mediante química fmoc y acoplados a hemocianina de lapa californiana (KLH; Sigma, St. Louis, MO) mediante la reacción con éster de M-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida, MBS. Si es necesario, se introducirá una cisteína en el extremo N del péptido para permitir el coplamiento a KLH. Los conejos se inmunizan con el complejo péptido-KLH en adyuvante completo de Freund. Los antisueros resultantes son analizados para determinar la actividad antipeptídica mediante la unión del péptido a plástico, el bloqueo con 1% de seroalbúmina bovina, la reacción con antisuero, el lavado y la reacción con anti-IgG de conejo de cabra específica, purificada por afinidad y marcada (radiactiva o fluorescente).

Los hibridomas se preparan y someten a detección selectiva usando técnicas estándar. Los hibridomas de interés se detectan mediante detección selectiva con CTGF marcador para identificar las proteínas de fusión que producen el anticuerpo monoclonal con la especificidad deseada. En un protocolo típico, pocillos de placas (FAST; Becton-Dickinson, Palo Alto, CA) se revisten durante la incubación con anticuerpos de conejo anti-ratón (o anti-especies adecuadas 1 g) específicos y purificados por afinidad a 10 mg/ml. Los pocillos revestidos se bloquean con 1% de seroalbúmina bovina (BSA), se lavaron y se incubaron con sobrenadantes procedentes de hibridomas. Después de lavar, los pocillos se incuban con CTGF marcado a 1 mg/ml. Los sobrenadantes con anticuerpos específicos se unen a más CTGF marcado de lo que se detecta en el fondo. A continuación, los clones que producen anticuerpos específicos se expanden y someten a dos ciclos de clonación a dilución límite. Los hibridomas clonados se inyectan en ratones tratados con pristano para producir ascitis y el anticuerpo monoclonal se purifica a partir del fluido ascítico del ratón mediante cromatografía de afinidad en la proteína A. Los anticuerpos monoclonales con afinidades de al menos 10^8 M^{-1} , preferentemente 10^9 a 10^{10} M^{-1} o más fuerte, se preparan, normalmente mediante procedimientos estándar.

Ejemplo 6: Prueba diagnóstica usando anticuerpos específicos de CTGF

Determinados anticuerpos frente a CTGF son útiles para investigar la transducción de señal y el diagnóstico de enfermedades infecciosas o hereditarias que se caracterizan por diferencias en la cantidad o distribución de CTGF o productos posteriores (en 3') de una cascada de señalización activa.

Entre las pruebas diagnósticas para CTGF se incluyen procedimientos que usan anticuerpos y un marcador para detectar CTGF en fluidos del cuerpo humano, membranas, células, tejidos o extractos de tales. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se usan con o sin modificación. Con frecuencia, los polipéptidos y anticuerpos se marcan uniéndoles, bien covalente o no covalentemente, una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y se han publicado extensamente en la literatura científica y de patentes. Entre los marcadores adecuados se incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, partículas magnéticas y similares.

En la técnica se conocen diversos protocolos para medir CTGF soluble o unido a membrana, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para la proteína. Ejemplos incluyen ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se prefiere un inmunoensayo de dos puntos basado en anticuerpos monoclonales usando anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítomos no interferentes sobre el CTGF, pero se puede emplear un ensayo de unión competitiva.

Ejemplo 7: Purificación de CTGF nativo usando anticuerpos específicos

El CTGF nativo o recombinante se purifica mediante cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos de CTGF. En general, una columna de inmunoafinidad se construye mediante acoplamiento covalente del anticuerpo anti-TRH a una resina cromatográfica activada.

Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de suero inmunitario bien mediante precipitación con sulfato amónico bien mediante purificación en proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway N.J.). Asimismo, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de fluido de ascitis de ratón mediante precipitación en sulfato amónico o cromatografía en proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada está unida covalentemente a una resina cromatográfica tal como Sefarosa activada por CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo está acoplado a la resina, la resina está bloqueada y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dichas columnas de inmunoafinidad se usan en la purificación de CTGF preparando una fracción a partir de células que contienen CTGF en una forma soluble. Esta preparación deriva mediante solubilización de células enteras o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial (con o sin la adición de detergente) o mediante otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, el CTGF soluble que contiene una secuencia de señal se secreta en una cantidad útil en el medio en el que crecen las células.

Una preparación que contiene CTGF soluble se pasa por la columna de inmunoafinidad y la columna se lava en condiciones que permitan la absorción preferencial de CTGF (p. ej., tampones de elevada fuerza iónica en presencia de detergente). A continuación, la columna eluye en condiciones que alteran la unión anticuerpo/proteína (p. ej., un tampón de pH 2-3 o una concentración elevada de un caotropo tal como urea o ion tiocianato) y se recoge el CTGF.

Ejemplo 8: Detección selectiva del fármaco

Esta invención es particularmente útil para la detección selectiva de compuestos terapéuticos mediante el uso de CTGF o de fragmentos del mismo en cualquiera de una variedad de técnicas de detección selectiva de fármacos.

El ejemplo siguiente proporciona un sistema de detección selectiva de fármacos midiendo el CTGF.

La proteína de fusión proteína recombinante-His se puede purificar a partir del lisado bruto mediante cromatografía por afinidad metálica usando agarosa Ni-NTA. Esto permite la retención específica del material recombinante (dado que está fusionado con la marca His), mientras que se eliminan las proteínas de insecto endógenas. El material recombinante se eluye después mediante competición con imidazol.

La expresión de la proteína de CTGF en tejidos, homogeneizados de tejido y fluidos corporales, incluyendo plasma y suero, se puede medir mediante estrategias basadas en anticuerpos, por ejemplo mediante tecnología de ELISA o transferencia Western/Inmunofluorescencia. En la literatura se ha descrito un anticuerpo policlonal generado contra el CTGF de longitud total [Vehvilainen y col. (2003)].

Ejemplo 9: Diseño racional de fármaco

El objetivo del diseño racional de un fármaco es producir análogos estructurales de polipéptidos de interés biológicamente activos o de moléculas pequeñas con las que interaccionan, agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos se usan para crear fármacos que sean más activos o formas estables del polipéptido o que potencian o interfieren con la función de un polipéptido in vivo.

En un enfoque, la estructura tridimensional de una proteína de interés, o de un complejo proteína-inhibidor, se determina mediante cristalografía por rayos x, modelización por ordenador o, más normalmente, mediante una combinación de los dos enfoques. Deben establecerse tanto la forma como las cargas del polipéptido para elucidar la estructura y determinar los sitio(s) activos de la molécula. Con menos frecuencia, se obtiene información útil sobre la estructura de un polipéptido mediante modelización basada en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos se usa información estructural relevante para diseñar inhibidores eficaces. Entre los ejemplos útiles de diseño racional de fármacos se incluyen moléculas que tienen mejor actividad o estabilidad o que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos.

También es posible aislar un anticuerpo específico de diana seleccionado mediante ensayo funcional, tal y como se ha descrito en lo que antecede, y, después, resolver su estructura de cristal. Este enfoque, en principio, da un núcleo de fármaco en el que se basa el posterior diseño del fármaco. Es posible eludir la cristalografía de proteínas totalmente generando anticuerpos antiidiotípicos (anti-ids) frente a un anticuerpo funcional farmacológicamente activo. Como imagen especular de una imagen especular, cabe esperar que el sitio de unión del anti-ids sea un análogo del receptor original. A continuación, el anti-ids se usa para identificar y aislar péptidos a partir de bancos de péptidos producidos química o biológicamente. Los péptidos aislados actúan después como el núcleo del fármaco.

En virtud de la presente invención, está disponible suficiente cantidad de polipéptido para realizar tales estudios analíticos como la cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos de CTGF proporcionada en la presente memoria descriptiva proporciona guías para los que emplean técnicas de modelización en lugar de o además de cristalografía de rayos X.

Ejemplo 10: Identificación de otros miembros del complejo de transducción de señal

El CTGF marcado es útil como reactivo para la purificación de moléculas con las que interacciona. En una forma de realización de purificación por afinidad, el CTGF está acoplado covalentemente a una columna de cromatografía. El extracto sin células derivado de células sinoviales o de posibles células diana se pasa por la columna y las moléculas con la afinidad adecuada se unen al CTGF. El complejo CTGF se recupera de la columna y el ligando de unión a CTGF se disocia y se somete a secuenciación proteínica en el extremo N. La información sobre la secuencia de aminoácidos se usa para identificar la molécula capturada o diseñar sondas oligonucleotídicas degeneradas para la clonación del gen relevante a partir de una biblioteca adecuada de ADNc. En un procedimiento alternativo se generan anticuerpos frente a CTGF, específicamente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se someten a detección selectiva para identificar aquéllos que inhiben la unión del CTGF marcado. A continuación, estos anticuerpos monoclonales se usan terapéuticamente.

Ejemplo 11: Uso y administración de anticuerpos, inhibidores o antagonistas

Anticuerpos, inhibidores o antagonistas de CTGF u otros tratamientos y compuestos limitantes de la transducción de

señal (LTS) proporcionan diferentes efectos cuando se administran terapéuticamente. Los LTS se formulan en un medio transportador acuoso no tóxico, inerte y farmacéuticamente aceptable, preferentemente a un pH de aproximadamente 5 a 8, más preferentemente de 6 a 8, aunque el pH puede variar de acuerdo con las características del anticuerpo, inhibidor o antagonista que se está formulando y la afección que se va a tratar. Las características de los LTS incluyen solubilidad de la molécula, su semivida y antigenicidad/inmunogenicidad. Éstas y otras características ayudan a definir un transportador eficaz. Las proteínas humanas nativas se prefieren como LTS, pero las moléculas orgánicas o sintéticas resultantes de detecciones selectivas de fármacos son igualmente eficaces en situaciones concretas.

Los LTS se liberan mediante vías de administración conocidas, incluidas, entre otras, cremas y geles tópicos; pulverizador y aerosol transmucosos; parches y vendas transdérmicas; formulaciones inyectables, intravenosas y de lavado; y líquidos y píldoras de administración oral formuladas particularmente para que resistan el ácido y las enzimas del estómago. La formulación concreta, la dosificación exacta y la vía de administración lo determina el médico que atiende al paciente y varían de acuerdo con cada situación específica.

Tales determinaciones se realizan considerando múltiples variables, como la afección que se va a tratar, los LTS que se van a administrar y el perfil farmacocinético de un LTS concreto. Factores adicionales que se toman en cuenta incluyen la gravedad de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, la hora y la frecuencia de administración, del LTS, la posible combinación con fármacos, las sensibilidades de la reacción y la tolerancia/respuesta al tratamiento. Las composiciones LTS de acción prolongada podrían administrarse cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y el índice de aclaramiento del LTS concreto.

Las cantidades de dosificación normales varían de 0,1 μg a $10^3 \mu\text{g}$, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, en función de la vía de administración.

En la literatura se proporcionan guías sobre dosificaciones y procedimientos de liberación concretos, véanse las patentes de EE.UU. nº 4,657,760, 5,206,344 o 5,225,212. Los expertos en la técnica emplean diferentes formulaciones para diferentes LTS. La administración a células tal como células nerviosas necesita la liberación de un modo diferente a otras células tales como células endoteliales vasculares.

Se contempla que transducción anómala de la señal, traumatismos o enfermedades que desencadenan la actividad de CTGF se pueden tratar con LTS. Estas afecciones o enfermedades se diagnostican específicamente mediante las pruebas tratadas en lo que antecede y tales pruebas se realizarán en los casos con sospecha de infección vírica, bacteriana o fúngica, respuestas alérgicas, lesiones mecánicas asociadas con traumatismos, enfermedades hereditarias, linfoma o carcinoma, u otras afecciones que activan los genes de los tejidos linfoides o neuronal.

Ejemplo 12: Producción de animales transgénicos no humanos

Se producen sistemas con modelos de animales que provocan los papeles fisiológico y conductual del CTGF mediante la creación de animales transgénicos no humanos en los que la actividad de CTGF se incrementa o disminuye o la secuencia de aminoácidos del CTGF expresado está alterada, mediante diversas técnicas. Ejemplos de estas técnicas incluyen, entre otras: 1) inserción de versiones normal o mutante del ADN que codifica CTGF, mediante microinyección, electroporación, transfección retroviral u otros medios bien conocidos para los expertos en la técnica, en embriones fertilizados adecuadamente con el fin de producir un animal transgénico o 2) recombinación homóloga de versiones mutantes o normales, humanas o animales de estos genes con el locus del gen nativo en animales transgénicos para alterar la regulación de la expresión de la estructura de estas secuencias de CTGF. La técnica de recombinación homóloga es bien conocida en la técnica. Sustituye el gen nativo con el gen insertado y, por tanto, es útil para producir un animal que no puede expresar los CTGF nativos, pero sí expresa, por ejemplo un mutante de CTGF insertado, que ha sustituido el CTGF nativo en el genoma del animal por recombinación, resultante en la subexpresión del transportador. La microinyección añade genes al genoma, pero no los elimina, y la técnica es útil para producir un animal que exprese su propio y añadido CTGF, que tiene como resultado la sobreexpresión del CTGF.

Otro medio disponible para producir un animal transgénico, con un ratón como ejemplo, es el siguiente: Ratones hembra se aparean y los huevos fertilizados resultantes se sacan de los oviductos. Los huevos se almacenan en un medio adecuado, tal como medio con cloruro de cesio 2M. El ADN o ADNc que codifica CTGF se purifica a partir de un vector mediante procedimientos bien conocidos para el experto en la técnica. Los promotores inducibles pueden condensarse con la región codificadora del ADN para proporcionar un medio experimental para regular la expresión del transgen. Como alternativa, o además de, elementos reguladores específicos de tejido se pueden condensar con la región codificadora para permitir la expresión específica de tejido del transgen. El ADN, en una solución adecuadamente taponada, se coloca en una aguja de microinyección (que puede estar hecha de tubo capilar usando un asa) y el huevo a inyectar se coloca en un portaobjetos con depresión. La aguja se inserta en el pronúcleo del huevo y se inyecta la solución de ADN. A continuación, el huevo inyectado se transfiere al oviducto de un ratón seudopreñado, que es un ratón estimulado con las hormonas adecuadas con el fin de mantener una falsa gestación, en el que procede al útero, se implanta y se desarrolla hasta término. Como se ha indicado antes, la microinyección no es el único procedimiento para la inserción de ADN en el huevo, pero se usa únicamente con fines

ilustrativos.

Ejemplo 13: Uso de CTGF como biomarcador, diana terapéutica y diagnóstica en enfermedades cardiovasculares (DOCA)

El modelo de rata hipertensa con sal-DOCA es un modelo bien establecido de hipertrofia de ventrículo izquierdo.

- 5 Ratas Sprague-Dawley macho sin nefrectomizar y de 300-350 g de peso recibieron NaCl al 1 % en el agua de bebida e inyecciones subcutáneas de acetato de desoxicorticosterona (DOCA, 30 mg/kg una vez a la semana) durante cuatro semanas. Las ratas sin tratar sin nefrectomizar sirvieron como ratas control.

Tras cuatro semanas, las ratas con sal-DOCA mostraron un incremento significativo de la masa ventricular izquierda corregida-longitud de la tibia (sal-DOCA: $25,87 \pm 25$; $0,84$ mg/mm frente al control: $21,03 \pm 25$; $0,60$ mg/mm). En este punto de tiempo, se extrajeron muestras de corazón y plasma con Li-heparina para el análisis de la expresión.

10 El ARN celular total se aisló con el protocolo del reactivo Trizol de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Invitrogen; EE.UU.). El ARN total preparado mediante el protocolo de tres reactivos se trató con ADNasa I para eliminar la contaminación con ADN genómico.

15 Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de CTGF, el ARN total de cada muestra se sometió primero a transcripción inversa. $1 \mu\text{g}$ del ARN total se sometió a transcripción inversa usando el sistema ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, USA) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. El volumen final se ajustó hasta $200 \mu\text{l}$ con agua.

20 Para la cuantificación relativa de la distribución del ARNm de CTGF se usó el sistema de detección de secuencias Applied Bioscience ABI 7900HT de acuerdo con las especificaciones y protocolos del fabricante. Las reacciones de PCR se fijaron para cuantificar el CTGF y el gen doméstico L32. Se diseñaron cebadores directos e inversos y sondas para CTGF usando el software de Applied Bioscience ABI Primer Express™ y fueron sintetizados por Eurogentec (Bélgica). La secuencia del cebador directo de CTGF fue: Cebador 1 (SEC ID N° 5). El cebador inverso de CTGF fue el Cebador 2 (SEC ID N° 7). Sonda 1 (SEC ID N° 6), marcada con FAM (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) como colorante indicador y TAMTA (carboxitetrametilrodamina) como inactivador, se usa como sonda para CTGF. Los siguientes reactivos se prepararon en un total de $20 \mu\text{l}$: $1 \times$ qPCR-MasterMix (Eurogentec; Bélgica) y la Sonda 1 (SEC ID N° 6), cebadores directos e inversos de CTGF cada uno a 200 nM , 200 nM de sonda para CTGF marcada con FAM/TAMRA y $5 \mu\text{l}$ de ADNc molde. Los parámetros para la ciclación térmica fueron 2 min a 50°C , seguidos por 10 min a 95°C , seguidos por 40 ciclos de fusión a 95°C durante 15 s e hibridación/extensión a 60°C durante 1 min .

30 Cálculo de la expresión relativa

El valor CU (ciclo umbral) se calcula como se describe en la sección "Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos".

$$\text{deltaCT} = \text{CTCTGF} - \text{CT132}$$

$$\text{expresión relativa} = 2^{-(15 - \text{deltaCT})}$$

- 35 Los resultados de la cuantificación de ARNm (perfil de expresión) se muestran en la Figura 11.

Ejemplo 14: Uso de CTGF como biomarcador, diana terapéutica y diagnóstica en enfermedades cardiovasculares (oclusión)

40 En el modelo de infarto de miocardio crónico en ratas [Pfeffer y col., (1979)] se efectuaba ligadura de la arteria coronaria izquierda con anestesia con isoflurano. Tras una toracotomía izquierda en el cuarto espacio intercostal, se abre el pericardio y el corazón queda expuesto al exterior brevemente. La arteria coronaria izquierda (LAD) está ligada crónicamente. En animales operados de forma ficticia la LAD permanece abierta. El tórax se cierra y se retira a los animales el respirador y se introducen en jaulas con acceso libre a alimentos y agua. Una semana después de la oclusión en la LAD, se inicia aplicación de los compuestos de ensayo. Las muestras de plasma y de tejido cardiaco se analizan 9 semanas tras la inducción del infarto para detectar marcadores plasmáticos y perfiles de expresión.

45 El ARN celular total se aisló con el protocolo del reactivo Trizol de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Invitrogen; EE.UU.). El ARN total preparado mediante el protocolo de tres reactivos se trató con ADNasa I para eliminar la contaminación con ADN genómico.

50 Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de CTGF, el ARN total de cada muestra se sometió primero a transcripción inversa. $1 \mu\text{g}$ del ARN total se sometió a transcripción inversa usando el sistema ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, USA) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. El volumen final se ajustó hasta $200 \mu\text{l}$ con agua.

Para la cuantificación relativa de la distribución del ARNm de CTGF se usó el sistema de detección de secuencias Applied Bioscience ABI 7900HT de acuerdo con las especificaciones y protocolos del fabricante. Las reacciones de PCR se fijaron para cuantificar el CTGF y el gen doméstico L32. Se diseñaron cebadores directos e inversos y sondas para CTGF usando el software de Applied Bioscience ABI Primer Express™ y fueron sintetizados por Eurogentec (Bélgica). La secuencia del cebador directo de CTGF fue: Cebador 1 (SEC ID N° 5). El cebador inverso de CTGF fue el Cebador 2 (SEC ID N° 7). Sonda 1 (SEC ID N° 6), marcada con FAM (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) como colorante indicador y TAMRA (carboxitetrametilrodamina) como inactivador, se usa como sonda para CTGF. Los siguientes reactivos se prepararon en un total de 20 µl: 1 x qPCR-MasterMix (Eurogentec; Bélgica) y la Sonda 1 (SEC ID N° 6), cebadores directos e inversos de CTGF cada uno a 200 nM, 200 nM de sonda para CTGF marcada con FAM/TAMRA y 5 µl de ADNc molde. Los parámetros para la ciclación térmica fueron 2 min a 50°C, seguidos por 10 min a 95°C, seguidos por 40 ciclos de fusión a 95°C durante 15 s e hibridación/extensión a 60°C durante 1 min.

Cálculo de la expresión relativa

El valor CU (ciclo umbral) se calcula como se describe en la sección "Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos".

$$\text{deltaCT} = \text{CTCTGF} - \text{CT132}$$

$$\text{expresión relativa} = 2^{-(15 - \text{deltaCT})}$$

Los resultados de la cuantificación de ARNm (perfil de expresión) se muestran en la Figura 12.

Ejemplo 15: Uso de CTGF como biomarcador, diana terapéutica y diagnóstica en enfermedades cardiovasculares (monocrotalina)

Ratas Sprague-Dawley macho adultas de 250-300 g de peso recibieron una única inyección subcutánea de 60 mg/kg de monocrotalina o vehículo.

La rata tratada con monocrotalina (MCT) es un modelo animal ampliamente usado para la hipertensión arterial pulmonar. Tras la inyección subcutánea, el alcaloide de pirrolizidina MCT se activa en el hígado en el pirrol MCT tóxico, que produce daños endoteliales en la vasculatura pulmonar en unos días, con el consiguiente remodelado de las arterias pulmonares pequeñas (muscularización de novo e hipertrofia medial). En el presente estudio, MCT indujo hipertensión pulmonar grave y progresiva en todos los animales.

Cuatro semanas después de una única inyección de MCT, las ratas mostraron elevación de la presión sistólica ventricular derecha umbral (MCT placebo: $77,62 \pm 4,17$ mmHg frente al control: $26,4 \pm 1,12$ mmHg; mean \pm sem), acompañada de una reducción de la presión arterial sistémica, el índice cardíaco, la oxigenación arterial y la saturación de oxígeno venoso central. De acuerdo con estos resultados se observó una hipertrofia cardíaca derecha impresionante (proporción ventrículo derecho/ventrículo izquierdo + tabique, placebo MCT: $0,62 \pm 0,03$ frente al control: $0,26 \pm 0,01$).

Se obtuvieron muestras de corazón y de plasma Li-Heparán para el análisis de la expresión cuatro semanas después de la inyección de MCT.

El ARN celular total se aisló con el protocolo del reactivo Trizol de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Invitrogen; EE.UU.). El ARN total preparado mediante el protocolo de tres reactivos se trató con ADNasa I para eliminar la contaminación con ADN genómico.

Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de CTGF, el ARN total de cada muestra se sometió primero a transcripción inversa. 1 µg del ARN total se sometió a transcripción inversa usando el sistema ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, USA) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. El volumen final se ajustó hasta 200 µl con agua.

Para la cuantificación relativa de la distribución del ARNm de CTGF se usó el sistema de detección de secuencias Applied Bioscience ABI 7900HT de acuerdo con las especificaciones y protocolos del fabricante. Las reacciones de PCR se fijaron para cuantificar el CTGF y el gen doméstico L32. Se diseñaron cebadores directos e inversos y sondas para CTGF usando el software de Applied Bioscience ABI Primer Express™ y fueron sintetizados por Eurogentec (Bélgica). La secuencia del cebador directo de CTGF fue: Cebador 1 (SEC ID N° 5). El cebador inverso de CTGF fue el Cebador 2 (SEC ID N° 7). Sonda 1 (SEC ID N° 6), marcada con FAM (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) como colorante indicador y TAMRA (carboxitetrametilrodamina) como inactivador, se usa como sonda para CTGF. Los siguientes reactivos se prepararon en un total de 20 µl: 1 x qPCR-MasterMix (Eurogentec; Bélgica) y la Sonda 1 (SEC ID N° 6), cebadores directos e inversos de CTGF cada uno a 200 nM, 200 nM de sonda para CTGF marcada con FAM/TAMRA y 5 µl de ADNc molde. Los parámetros para la ciclación térmica fueron 2 min a 50°C, seguidos por 10 min a 95°C, seguidos por 40 ciclos de fusión a 95°C durante 15 s e hibridación/extensión a 60°C durante 1 min.

Cálculo de la expresión relativa

El valor CU (ciclo umbral) se calcula como se describe en la sección "Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos".

$$\text{deltaCT} = \text{CTCTGF} - \text{CT132}$$

$$5 \quad \text{expresión relativa} = 2^{-(15 - \text{deltaCT})}$$

Los resultados de la cuantificación de ARNm (perfil de expresión) se muestran en la Figura 13.

Ejemplo 16: Experimentos en micromatriz

El ARN total se extrajo del tejido cardíaco y se purificó usando una columna en resina de afinidad (RNeasy; Qiagen, Hilden, Alemania), se cuantificó mediante espectrofotometría (absorbancia 260 nm) y la calidad del ARN se evaluó mediante separación electroforética en microfluidos con un Bioanalizador (Agilent Technologies, Palo Alto, EE.UU.). El ARN total purificado (1 µg) se convirtió en ADNc usando el kit de síntesis de ADNc Superscript Choice (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), que incorpora un cebador T7-(dT)₂₄. Después, el ADNc bicatenario se purificó mediante columna en resina de afinidad (Clean up Kit, Qiagen, Hilden, Alemania) con extracción de etanol. El ADNc purificado se usó como molde para la reacción de transcripción in Vitro para la síntesis de ADNc biotilado usando un kit de marcaje de transcripción de ARN de alto rendimiento Enzo BioArray (Affymetrix, Santa Clara, CA), y se purificó adicionalmente usando una columna de resina de afinidad (Clean up Kit, Qiagen, Hilden, Alemania). Tras la purificación, el ARNc in Vitro se fragmentó en tampón que contiene magnesio a 95 °C durante 35 minutos. El ARNc fragmentado se hibridó sobre la matriz Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array. En pocas palabras, se añadieron 15 µg del ARNc fragmentado junto con el ARNc control (BioB, BioC, y BioD), ADN de esperma de arenque (10 mg/ml), DMSO al 10 % y BSA acetilado (50 mg/ml) al tampón de hibridación. La mezcla de hibridación se calentó a 99 °C durante 5 minutos, se incubó a 45 °C durante 5 minutos, se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm y se inyectó en la micromatriz. Tras la hibridación a 45 °C durante 16n horas en rotación a 60 rpm, la matriz se lavó y se tiñó con Affymetrix Fluidics Protocols-amplificación de anticuerpos para dianas eucarióticas y se escaneó usando un escáner de micromatrices Affymetrix microarray (sistema GeneChip Scanner 3000 7G) a 570 nm.

Ejemplo 17: Datos de expresión en micromatriz de corazón humano de pacientes con ICC con dispositivos de asistencia ventricular izquierda.

La implantación de los dispositivos de asistencia ventricular izquierda (LVAD) a menudo es el único medio posible para el soporte de pacientes con insuficiencia cardíaca terminal en forma de puente hasta el trasplante (véase, [Clegg y col. (2005)], para una revisión). Como el corazón, el LVAD es una bomba. Un extremo se engancha al ventrículo izquierdo, es decir la cámara del corazón que bombea sangre desde los pulmones hacia el cuerpo. El otro extremo se engancha a la aorta, la principal arteria del cuerpo humano. Un tubo pasa desde el dispositivo a través de la piel. La parte externa del tubo está cubierta por un material especial para ayudar en la cicatrización y permitir que vuelva a crecer la piel. El LVAD se implanta durante cirugía a corazón abierto. Los informes recientes demuestran que el soporte con LVAD puede estar asociado con remodelado adaptativo del miocardio ventricular, incluida la reducción de la masa del VI, el espesor de la pared y el diámetro de los miocitos, cambios en las relaciones presión-volumen del VI [Li y col. (2001)].

Se recogieron muestras de miocardio del ventrículo izquierdo durante la cirugía cardíaca de 32 pacientes con insuficiencia cardíaca en el momento del trasplante cardíaco o inserción de un dispositivo de ayuda mecánica. Las correspondientes muestras de miocardio están diseñadas como muestras pre y post-LVAD. Todos los procedimientos que implican uso de tejido humano fueron aprobados por los comités de revisión institucional del Heart- and Diabetes-Center North Rhine Westphalia, Bad Oeynhausen, Alemania. Se obtuvo el consentimiento de todos los pacientes antes de la recolección de tejido. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se pulverizaron usando un mortero y su mano. El ARN total se aisló de acuerdo con procedimientos estándar.

Ejemplo 18: Análisis de datos de los experimentos en micromatriz

Se realizaron análisis y escalado de los datos brutos en el software Microarray Suite 5.0 software (Affymetrix) y para la normalización y el análisis posterior se usó expressionist Pro 3.0 (Genedata). Los resultados de las matrices HG-U133 Plus 2.0 se sometieron a escalado global con una intensidad diana de 100.

Se calcularon logaritmos en base 2 para todos los valores de expresión y se utilizaron para el análisis estadístico posterior. Para analizar la expresión diferencial entre los dos grupos, corazones sin insuficiencia (N) y corazones antes de la operación (P) se aplicó una prueba de Student de dos colas a los valores de expresión bajo la suposición de varianzas iguales. Un valor p resultante inferior o igual a 0,05 se tomó como indicador para una expresión diferencial significativa.

55 Referencias

Documento EP 1.069.188
 Documento EP 1.275.733
 Documento EP 1.308.459
 Documento EP 1.560.025
 5 Documento EP 1.612.281
 Documento US 4.522.811
 Documento U.S. 5,057,414
 Documento US 5.283.317
 Documento US 5.565.332
 10 Documento US 5.723.323
 Documento US 5.747.334
 Documento US 5.783.384
 Documento US 5.885.814
 Documento US 5.985.629
 15 Documento WO 84/03564
 Documento WO 3/03151
 Documento WO 94/13804
 Documento WO 00/47750
 Documento WO 02/06492
 20 Documento WO 02/26958
 Documento WO 02/47670
 Documento WO 03/051370
 Documento WO 02/081745
 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ; *Nucleic Acids Res* 1997 Sep 1;
 25 25 (17): 3389-402
 Appa Rao y col., 1997, *Protein Expr Purif* Nov, 11(2): 201-8
 Alpert, J. S., y col. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 36:959-69
 Avalle y col., *Ann. N Y Acad.Sci.* 864:118 (1998)).
 Barnes, 2000, *Chest*, 117:10S14S
 30 Barrett y col., (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Academic Press Inc. 1998).
 Barrett (Ed.), *Methods in Enzymology, Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases* (Academic Press
 Inc. 1994)
 Boersma, E., y col. *Lancet* 2002; 359:189-98
 Bork P. , 1993, *FEBS Lett*;327:125-30.
 35 Botstein y col., 1980, *Am J Hum Genet.* 32: 314-31
 Clegg y col. 2005, *Health Technol Assess.* Nov; 9(45):1-148
 Colbere-Garapin y col., 1981, *J. Mol. Biol.* 150, 1-14
 Chen CC, Chen N, Lau LF., 2001, *J Biol Chem*;276:10443-52.
 Christenson, R. H., y col., *Clin. Chem.* 2001; 47:464-470
 40 Cunningham and Wells, *J. Mol. Biol.* 234:554 (1993).
 DesGroseillers y col. (2001), *DNA Cell Biol.* Aug;20(8):493-8.
 de Lemos, J. A., y col. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 40:238-44
 Engelhard y col., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 3224-3227
 Friboulet y col., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47:229 (1994)
 45 Gao R, Brigstock DR., *Hepato Res* 2003;27:214-20.
 Gao R, Brigstock DR., *J Biol Chem* 2004;279:8848-55.
 Gergen and Weiss , 1992, *Am Rev Respir Dis* 146:823-824
 Gibson y col., 1996, *Genome Research* 6: 995-1001
 Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N., *Cell Growth Differ* 1996;7:469-80.
 50 Haseloff y col., 1988 , *Nature* 334, 585-591
 Heid y col., 1996, *Genome Research* 6: 986-994
 Holland y col., 1991, *PNAS* 88: 7276-7280
 Ifon y col. 2005, *Cancer Cell Int.* Jun 22;5:19.
 Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR., 1993, *Mol Biol Cell*;4:637-45. Jedsadayamata A, Chen
 55 CC,
 Kireeva ML, Lau LF, Lam SC., *J Biol Chem* 1999;274:24321-7.
 Jeffreys y col., 1985, *Nature* 316: 76-9
 Johnson y col., 1989, *Endoc. Rev.* 10, 317-331
 Joron y col., *Ann. N Y Acad. Sci.* 672:216 (1992)
 60 Karlsson, *Immunol. Methods* 145:229 (1991)
 Kellogg y col., 1990, *Anal. Biochem.* 189:202-208
 Lam , 1997, *Anticancer Drug Res.* 12(3):145-67
 Li y col. 2001, *Circulation.* Sep 4;104(10):1147-52
 Livak y col., 1995 , *PCR Methods and Applications* 357-362
 65 Logan, Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655-3659
 Lowy y col., 1980, *Cell* 22, 817-23

Maddox y col., 1983, J. Exp. Med. 158, 1211-1216
 McConnell y col., 1992, Science 257, 1906-1912
 Mercurio S, Latinkic B, Itasaki N, Krumlauf R, Smith JC., Development 2004;131:2137-47.
 Monfardini y col., Proc. Assoc. Am. Physicians 108:420 (1996)
 5 Nicholls y col., 1993, J. Immunol. Meth. 165, 81-91
 Newby, L. K., y col. Circulation 2001:103; 1832-7
 Pentecost y col. 2005, Mol Cell Endocrinol. Jun 30;238(1-2):9-25.
 Piatak y col., 1993, BioTechniques 14:70-81
 Piatak y col., 1993, Science 259:1749-1754
 10 Porath y col., 1992, Prot. Exp. Purif. 3, 263-281
 Pfeffer y col., Circ Res. 1979 Apr;44(4):503-12.
 Roberge y col., 1995, Science 269, 202-204
 Roestenberg P, van Nieuwenhoven FA, Wieten L, y col., Diabetes Care 2004;5:1164-70.
 Sagnella, G. A., Clinical Science 95:519-529, 1998
 15 Schober JM, Chen N, Grzeszkiewicz TM, y col., Blood 2002;99:4457-65.
 Scott and Smith (1990) Science 249:386-390
 Segarini PR, Nesbitt JE, Li D, Hays LG, Yates JR III, Carmichael DF., J Biol Chem 2001; 276:40659-67.
 Shimo T, Kubota S, Kondo S, y col., Cancer Lett 2001; 174:57-64.
 Sjolander, Urbaniczky, 1991, Anal. Chem. 63, 2338-2345
 20 Suzuma K, Naruse K, Suzuma I, y col., Chem 2000;275:40725-31.
 Szabo y col., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699-705
 Takigawa M., Drug News Perspect 2003;16:11-21.
 Thomas, 1980, Proc. Nat. Acad. Sci., 77:5201-5205
 Uhlmann y col., 1987, Tetrahedron. Lett. 215, 3539-3542
 25 Weber y col., 1990, Genomics 7: 524-30
 Wigler y col., 1977, Cell 11, 223-32
 Wigler y col., 1980, Proc. Natl. Acad Sci. 77, 3567-70

Listado de secuencias

<110> Bayer HealthCare AG
 30
 <120> CTGF como biomarcador, diana terapéutica y diagnóstica
 <130> BHC 06 1 150
 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.3
 35 <210> 1
 <211> 2312
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 40

ES 2 383 235 T3

```

tccagtgacg gagccgcccg gccgacagcc ccgagacgac agcccggcgc gtcccgggtcc      60
ccacctccga ccaccgccag cgctccaggc cccgcgctcc ccgctcgccg ccaccgcgcc      120
ctccgctccg cccgcagtgc caaccatgac cgccgccagt atgggccccg tccgcgctcg      180
cttcgtggtc ctctcgccc tctgcagccg gccggccgtc ggccagaact gcagcgggccc      240
gtgccgggtgc ccggacgagc cggcgcccg      ctgcccggcg ggcgtagacc tcgtgctgga      300
cggctgcggc tgctgcccgc tctgcgcaa gcagctgggc gagctgtgca ccgagcgcga      360
ccccctcgac ccgcacaagg gcctcttctg tgacttcggc tcccggcca accgcaagat      420
cggcgtgtgc accgcaaaag atggtgctcc ctgcatcttc ggtggtacgg tgtaccgcag      480
cggagagtcc ttccagagca gctgcaagta ccagtgcacg tgcctggacg gggcggtggg      540
ctgcatgccc ctgtgcagca tggacgttcg tctgcccagc cctgactgcc cttcccag      600
gagggtcaag ctgcccggga aatgctgcga ggagtgggtg tgtgacgagc ccaaggacca      660
aaccgtggtt gggcctgccc tcgcggtta dcgactggaa gacacgtttg gccagaccc      720
aactatgatt agagccaact gcctggtcca gaccacagag tggagcgctt gttccaagac      780
ctgtgggatg ggcatctcca cccgggttac caatgacaac gcctcctgca ggctagagaa      840
gcagagccgc ctgtgcatgg tcaggccttg cgaagctgac ctggaagaga acattaagaa      900
gggcaaaaag tgcacccgta ctcccaaaat ctccaagcct atcaagtttg agctttctgg      960
ctgcaccagc atgaagacat accgagctaa attctgtgga gtatgtaccg acggccgatg     1020
ctgcaccccc cacagaacca ccacctgcc ggtggagttc aagtgcctg acggcgaggt     1080
catgaagaag aacatgatgt tcatcaagac ctgtgcctgc cattacaact gtcccggaga     1140
caatgacatc tttgaatcgc tgtactacag gaagatgtac ggagacatgg catgaagcca     1200
gagagtgaga gacattaact cattagactg gaacttgaac tgattcacat ctcatTTTTc     1260
cgtaaaaatg atttcagtag cacaagttat ttaaactctg ttttctaact gggggaaaag     1320
attcccaccc aattcaaac attgtgccc      gtcaaaaaa tagtctatct tcccagaca     1380
ctggtttgaa gaatgttaag acttgacagt ggaactacat tagtacacag caccagaatg     1440
tatattaagg tgtggcttta ggagcagtg      gagggtacca gcagaaagg      tagtatcatc     1500
agatagctct tatacgagta atatgcctgc tatttgaagt gtaattgaga aggaaaattt     1560
tagcgtgctc actgacctgc ctgtagcccc agtgacagct aggatgtgca ttctccagcc     1620
atcaagagac tgagtcaagt tgttccttaa gtcagaacag cagactcagc tctgacattc     1680
tgattcgaat gacactgttc aggaatcgga atcctgtcga ttagactgga cagcttgtgg     1740
caagtgaatt tcctgtaaca agccagattt tttaaaattt atattgtaaa tattgtgtgt     1800
gtgtgtgtgt gtgtatatat atatatatat gtacagttat ctaagttaat ttaaagttgt     1860
ttgtgccttt ttatttttgt ttttaatgct ttgatatttc aatgttagcc tcaatttctg     1920
aacaccatag gtagaatgta aagcttgtct gatcgtcaa agcatgaaat ggatacttat     1980
atggaaattc tctcagatag aatgacagtc cgtcaaaaca gattgtttgc aaaggggagg     2040
catcagtgtc cttggcaggc tgatttctag gtaggaaatg tggtagctca cgctcacttt     2100
taatgaaca atggccttta ttaaaaactg agtgactcta tatagctgat cagttttttc     2160
acctggaagc atttgtttct actttgatat gactgttttt cggacagttt atttgttgag     2220

      agtgtgacca aaagttacat gtttgacct ttctagttga aaataaagta tattttttct     2280
      aaaaaaaaa aaaaacgaca gcaacggaat tc                                     2312

```

5 <210> 2
 <211> 2349
 <212> ADN
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 2

ES 2 383 235 T3

```

cacagctctt ctctccaaga agactcagcc agaccactc cagctccgac cctaggagac      60
cgacctctc cagacggcag cagccccagc ccagtggaca accccaggag ccaccacctg      120
gagcgtccgg acaccaacct ccgccccgag accgagtcca ggctccggcc gcgcccctcg      180
tcgectctgc accccgctgt gcgtcctcct gccgcgcccc gaccatgctc gcctccgctg      240
cgggtcccgtagcctcgcc ttgggtgctc tcctctgca cggcctgccc accggccagg      300
actgcagcgc gcagtgtcag tgcgcagctg aagcggcgcc gcgctgcccc gccggcgtga      360
gcctgggtgt ggacggctgc ggctgctgcc gcgtctgcgc caagcagctg ggagaactgt      420
gcacggagcg tgatccctgc gaccacaca agggctctct ctgcgacttc ggctcccccg      480
ccaaccgcaa gattggcgtg tgcactgcca aagatggtgc accctgtgtc ttcggtgggt      540
ccgtgtaccg cagcggcgag tccttccaaa gcagttgcaa ataccagtgc acttgctctg      600
atggggccgt gggtgtgtg cccctgtgca gcatggacgt gcgcctgccc agccctgact      660
gcccctccc gagaagggtc aagctgcccg ggaatgctg tgaggagtgg gtgtgtgatg      720
agcccaagga ccgcacagtg gttggccctg ccctagctgc ctaccgactg gaagacacat      780
ttggccctga cccaactatg atgcgagcca actgcctggc ccagaccaca gagtggagcg      840
cctgttctaa gacctgtggg atgggcatct ccaccgggt taccaatgac aataccttct      900
gcaggtgga gaagcagagt cgtctctgca tggtcaggcc ctgtgaagct gacctagagg      960
aaaacattaa gaagggcaaa aagtgcctcc ggacgcctaa aattgccaag cctgtcaagt     1020
ttgagctttc tggctgcacc agtgtgaaga cctaccgggc taagtctctg ggggtgtgca     1080
cggacggccg ctgctgcaca ccgcacagaa ccaccacact gccggtggag ttcaagtgcc     1140
ccgatggcga gatcatgaaa aagaacatga tttcatcaa gacctgtgcc tgccattaca     1200
actgtcccgg ggacaatgac atctttgagt ccttgacta caggaagatg tatggagaca     1260
tggcgtaaag ccagggagta agggacacga actcatttag actataactt gaactgagtt     1320
acatctcatt ttcttctgta aaaaaacaaa aaggattaca gtagcacatt aatttaaate     1380
tgggttcccta actgctgtgg gagaaaacac cccaccgaag tgagaaccgt gtgtcattgt     1440
catgcaata gcctgtcaat ctcagacact ggtttcgaga cagtttagac ttgacagttg     1500
ttcactagcg cacagtgaca gaacgcacac taaggtgagc ctctggaag agtggagatg     1560
ccaggagaaa gacaggctact agctgaggtc attttaaag cagcgatatg cctacttttt     1620
ggagtgtgac aggggagggg cattatagct tgcttgaga cagacctgct ctagcaagag     1680
ctgggtgtgt gtcctccact cgggtaggct gaagccagct attctttcag taagaacagc     1740
agtttcagcg ctgacattct gattccagtg acactggctg ggagtcagaa ccttgtctat     1800
tagactggac agcttgtggc aagtgaattt gccggtaaca agccagattt ttatggatct     1860
tgtaaatatt gtggataaat atatatatt gtacagttat ctaagttaat ttaaagacgt     1920
ttgtgcctat tgttcttgtt ttaagtgtt ttggaatttt taaactgata gcctcaact     1980
ccaaacacca tcgataggac ataaagcttg tctgtgatc aaaacaaagg agatactgca     2040
gtggaaactg taacctgagt gactgtctgt cagaacatat ggtacgtaga cggtaaagca     2100
atggatcaga agtcagattt ctagtaggaa atgtaaaatc actgttggcg aacaaatggc     2160
ctttattaag aatggcctg ctcagggtaa ctggtcagat tccacgagg aagtgttgc     2220
tgcttctttg actatgactg gtttgggagg cagtttattt gttgagagtg tgacaaaag     2280
ttacatgttt gcaccttct agttgaaat aaagtatata tattttttat atgaaaaaa     2340
aaaaaaaaa

```

<210> 3
 <211> 349
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 3

ES 2 383 235 T3

Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val Arg Val Ala Phe Val Val Leu
1 5 10 15

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

Cys Arg Cys Pro Asp Glu Pro Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly Val Ser
35 40 45

Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu
50 55 60

Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys Gly Leu
65 70 75 80

Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr
85 90 95

Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe Gly Gly Thr Val Tyr Arg Ser
100 105 110

Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp
115 120 125

Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro
130 135 140

Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys
145 150 155 160

Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Gln Thr Val Val Gly
165 170 175

Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro
180 185 190

Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala
195 200 205

Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp
210 215 220

Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg
225 230 235 240

Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys

ES 2 383 235 T3

Met Leu Ala Ser Val Ala Gly Pro Val Ser Leu Ala Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

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

Cys Ala Ala Glu Ala Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly Val Ser Leu Val
 35 40 45

Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu Gly Glu
50 55 60

Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys Gly Leu Phe Cys
65 70 75 80

Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr Ala Lys
 85 90 95

Asp Gly Ala Pro Cys Val Phe Gly Gly Ser Val Tyr Arg Ser Gly Glu
 100 105 110

Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp Gly Ala
 115 120 125

Val Gly Cys Val Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro Ser Pro

ES 2 383 235 T3

130	135	140	
Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys Cys Glu			
145	150	155	160
Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Arg Thr Val Val Gly Pro Ala			
	165	170	175
Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro Thr Met			
	180	185	190
Met Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala Cys Ser			
	195	200	205
Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp Asn Thr			
210	215	220	
Phe Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys			
225	230	235	240
Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys Ile Arg			
	245	250	255
Thr Pro Lys Ile Ala Lys Pro Val Lys Phe Glu Leu Ser Gly Cys Thr			
	260	265	270
Ser Val Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr Asp Gly			
	275	280	285
Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu Phe Lys			
290	295	300	
Cys Pro Asp Gly Glu Ile Met Lys Lys Asn Met Met Phe Ile Lys Thr			
305	310	315	320
Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe Glu Ser			
	325	330	335
Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala			
	340	345	

<210> 5
 <211> 18
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador 1

 10 <400> 5
 gagcccaagg accaaacc 18

ES 2 383 235 T3

5 <210> 6
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador 2
<400> 6
ggccaaacgt gtctcca 18

10 <210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
15 <223> sonda 1
<400> 7
ctgccctcgc ggcttacga c 21

20 <210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador 3
25 <400> 8
gtgtgtgatg agcccaagg 19

30 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador 4
35 <400> 9
gtcaggcca aatgtgtctt 20

40 <210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> sonda 2
<400> 10
ctgccctagc tgctaccga ctgg 24

45

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de uso de CTGF como biomarcador de enfermedad, eficacia o criterio de valoración sustituto para una terapia de hipertensión pulmonar que comprende:
- 5 i) obtener un nivel basal de CTGF en una muestra biológica de un mamífero enfermo,
 - ii) medir el nivel de CTGF en una o más muestras biológicas posteriores tomadas del mamífero enfermo que está recibiendo tratamiento para la enfermedad,
 - iii) comparar el nivel de CTGF en la una o más muestras biológicas posteriores con la muestra basal, y
 - 10 iv) determinar si se necesitan dosis mayores, tratamientos adicionales o alternativos en base a los niveles de CRGF obtenidos de una o más muestras biológicas posteriores en comparación con el nivel basal de CTGF,
- en el que la muestra es una muestra de tejido cardíaco.
2. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el nivel de CTGF se determina determinando el nivel del polinucleótido de CTGF.
- 15 3. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el nivel de CTGF se determina determinando el nivel del polipéptido de CTGF.
4. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el nivel de CTGF se determina determinando el nivel de actividad de CTGF.
5. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el mamífero es un ser humano.
- 20 6. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el uso de CTGF se combina con el uso de uno o más biomarcadores.
7. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el uso de CTGF se combina con el uso de uno o más biomarcadores que están comprendidos en un grupo de biomarcadores que consiste en CRTAC, PRSS23, FN1, LTBP2, TGFB2 y NPR3.
- 25 8. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el uso de CTGF se combina con el uso de uno o más biomarcadores que están comprendidos en un grupo de biomarcadores que consiste en BNP, ANP, Troponina, CRP, Mioglobina, CK-MB o metabolitos.
9. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el uso de CTGF se combina con el uso de uno o más biomarcadores clínicos que están comprendidos en un grupo de biomarcadores que consiste en presión arterial, frecuencia cardíaca, presión arterial pulmonar o resistencia vascular sistémica.

Figuras

Fig. 1

SEC ID Nº 1

TCCAGTGACGGAGCCGCCCGCCGACAGCCCCGAGACGACAGCCCCGGCGCGTCCCCGGTCCC
CACCTCCGACCACCGCCAGCGCTCCAGGCCCGCGCTCCCCGCTCGCCGCCACCGCGCCCT
CCGCTCCGCCCGCAGTGCCAACCATGACCGCCGCCAGTATGGGCCCGTCCGCGTGCCTT
CGTGGTCCCTCCTCGCCCTCTGCAGCCGGCCGGCCGTCGGCCAGAACTGCAGCGGGCCGTGC
CGGTGCCCCGACGAGCCGGCGCCGCGCTGCCCGGGCGGTGAGCCTCGTGCTGGACGGCT
GCGGCTGCTGCCGCGTCTGCGCCAAGCAGCTGGGCGAGCTGTGCACCGAGCGGACCCCTG
CGACCCGCACAAGGGCCTCTTCTGTGACTTCGGCTCCCCGGCCAACCGCAAGATCGGCGTG
TGCACCGCCAAGATGGTGCTCCCTGCATCTTCGGTGGTACGGTGTACCGCAGCGGAGAGT
CCTTCCAGAGCAGCTGCAAGTACCAGTGCACGTGCCTGGACGGGGCGGTGGGCTGCATGCC
CCTGTGCAGCATGGACGTTTCGTCTGCCAGCCCTGACTGCCCCCTTCCCGAGGAGGGTCAAG
CTGCCCGGAAATGCTGCGAGGAGTGGGTGTGTGACGAGCCCAAGGACCAACCGTGGTTG
GGCCTGCCCTCGCGGCTTACCGACTGGAAGACACGTTTGGCCAGACCCAACATGATTAG
AGCCAACCTGCCTGGTCCAGACCACAGAGTGGAGCGCCTGTTCCAAGACCTGTGGGATGGGC
ATCTCCACCCGGGTACCAATGACAACGCCTCCTGCAGGCTAGAGAAGCAGAGCCGCCTGT
GCATGGTCAGGCCTTGCGAAGCTGACCTGGAAGAGAACATTAAGAAGGGCAAAAAGTGCAT
CCGTACTCCAAAATCTCCAAGCCTATCAAGTTTGAGCTTCTGGCTGCACCAGCATGAAG
ACATACCGAGCTAAATTCTGTGGAGTATGTACCGACGGCCGATGCTGCACCCCCACAGAA
CCACCACCCTGCCGGTGGAGTTCAAGTGCCCTGACGGCGAGGTCATGAAGAAGAACATGAT
GTTTCATCAAGACCTGTGCCTGCCATTACAACCTGTCCCGGAGACAATGACATCTTTGAATCG
CTGTACTACAGGAAGATGTACGGAGACATGGCATGAAGCCAGAGAGTGAGAGACATTAAC
CATTAGACTGGAACCTTGAACGATTCACATCTCATTTTTCCGTAAAAATGATTTAGTAGC
ACAAGTTATTTAAATCTGTTTTTCTAACTGGGGGAAAAGATTCCCACCCAATTCAAACAT
TGTGCCATGTCAAACAAATAGTCTATCTTCCCAGACACTGGTTTGAAGAATGTTAAGACT
TGACAGTGGAACCTACATTAGTACACAGCACCAGAATGTATATTAAGGTGTGGCTTTAGGAG
CAGTGGGAGGGTACCAGCAGAAAGGTTAGTATCATCAGATAGCTCTTATACGAGTAATATG
CCTGCTATTTGAAGTGTAATTGAGAAGGAAAATTTTAGCGTGCTCACTGACCTGCCTGTAG
CCCCAGTGACAGCTAGGATGTGCATTCTCCAGCCATCAAGAGACTGAGTCAAGTTGTTCCCT
TAAGTCAGAACAGCAGACTCAGCTCTGACATTCTGATTCGAATGACACTGTTTCAGGAATCG
GAATCCTGTCGATTAGACTGGACAGCTTGTGGCAAGTGAATTTCCCTGTAACAAGCCAGATT
TTTTAAATTTATATTGTAAATATTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATATATATATATATAT
GTACAGTTATCTAAGTTAATTTAAAGTTGTTTGTGCCTTTTTATTTTTGTTTTAATGCTT
TGATATTTCAATGTTAGCCTCAATTTCTGAACACCATAGGTAGAATGTAAAGCTTGTCTGA

TCGTTCAAAGCATGAAATGGATACTTATATGGAAATTCTCTCAGATAGAATGACAGTCCGT
CAAAACAGATTGTTTGCAAAGGGGAGGCATCAGTGTCCCTTGGCAGGCTGATTTCTAGGTAG
GAAATGTGGTAGCTCACGCTCACTTTAATGAACAAATGGCCTTTATTA AAAACTGAGTGA
CTCTATATAGCTGATCAGTTTTTTCACCTGGAAGCATTGTTTCTACTTTGATATGACTGT
TTTTCGGACAGTTTATTTGTTGAGAGTGTGACCAAAGTTACATGTTTGCACCTTTCTAGT
TGAAAATAAAGTATATTTTTTCTAAAAAAAAAAAAAAAAACGACAGCAACGGAATTC

Fig. 2

SEC ID N° 2

CACAGCTCTTCTCTCCAAGAAGACTCAGCCAGACCCACTCCAGCTCCGACCCTAGGAGACC
 GACCTCTCCAGACGGCAGCAGCCCCAGCCCAGTGGACAACCCAGGAGCCACCACCTGGA
 GCGTCCGGACACCAACCTCCGCCCCGAGACCGAGTCCAGGCTCCGGCCGCGCCCCCTCGTCG
 CCTCTGCACCCCCTGTGCGTCTCCTGCCGCGCCCCGACCATGCTCGCCTCCGTGCGGGG
 TCCCGTTAGCCTCGCCTTGGTGTCTCCTCTGCACCCGGCCTGCCACCGGCCAGGACTGC
 AGCGCGCAGTGTGAGTGCAGCTGAAGCGGCGCCGCGCTGCCCGCCGGCGTGAGCCTGG
 TGCTGGACGGCTGCGGCTGCTGCCGCGTCTGCGCCAAGCAGCTGGGAGAAGTGTGCACGGA
 GCGTGATCCCTGCGACCCACACAAGGGTCTCTTCTGCGACTTCGGCTCCCCGCCAACCGC
 AAGATTGGCGTGTGCACTGCCAAAGATGGTGCACCCGTGTGTCTTCGGTGGGTCCGTGTACC
 GCAGCGGCGAGTCTTCCAAAGCAGTTGCAAATACCAGTGCCTTGCCTGGATGGGGCCGT
 GGGCTGTGTGCCCTGTGCAGCATGGACGTGCGCCTGCCAGCCCTGACTGCCCTTCCCG
 AGAAGGGTCAAGCTGCCCCGGGAAATGCTGTGAGGAGTGGGTGTGTGATGAGCCCAAGGACC
 GCACAGTGGTTGGCCCTGCCCTAGCTGCCTACCGACTGGAAGACACATTTGGCCCTGACCC
 AACTATGATGCGAGCCAACTGCCTGGTCCAGACCACAGAGTGGAGCGCCTGTTCTAAGACC
 TGTGGGATGGGCATCTCCACCCGGGTACCAATGACAATACCTTCTGCAGGCTGGAGAAGC
 AGAGTCGTCTCTGCATGGTCAGGCCCTGTGAAGCTGACCTAGAGGAAAACATTAAGAAGGG
 CAAAAGTGCATCCGGACGCCTAAAATTGCCAAGCCTGTCAAGTTTGAGCTTCTGGCTGC
 ACCAGTGTGAAGACCTACCGGGCTAAGTTCTGTGGGGTGTGCACGGACGGCCGCTGCTGCA
 CACCGCACAGAACCACCACACTGCCGGTGGAGTTCAAGTGCCCCGATGGCGAGATCATGAA
 AAAGAACATGATGTTTCATCAAGACCTGTGCCTGCCATTACAAGTGTCCCGGGGACAATGAC
 ATCTTTGAGTCCTTGTACTACAGGAAGATGTATGGAGACATGGCGTAAAGCCAGGGAGTAA
 GGGACACGAACTCATTTAGACTATAACTTGAAGTGAAGTTACATCTCATTTTCTTCTGTAAA
 AAAACAAAAGGATTACAGTAGCACATTAATTTAAATCTGGGTTCCTAAGTGTGTGGGAG
 AAAACACCCACCGAAGTGAGAACCGTGTGTTCATTGTCATGCAAATAGCCTGTCAATCTCA
 GACTTGGTTTCGAGACAGTTTAGACTTGACAGTTGTTCACTAGCGCACAGTGACAGAACG
 CACTAAGGTGAGCCTCCTGGAAGAGTGGAGATGCCAGGAGAAAGACAGGTAAGTACTGAGTGA
 GGTCAATTTTAAAAGCAGCGATATGCCTACTTTTTGGAGTGTGACAGGGGAGGGACATTATA
 GCTTGCTTGCAGACAGACCTGCTCTAGCAAGAGCTGGGTGTGTGTCTCCACTCGGTGAGG
 CTGAAGCCAGCTATTCTTTCAGTAAGAACAGCAGTTTCAGCGCTGACATTCTGATTCCAGT
 GACTTGGTTCGGGAGTCAGAACCTTGTCTATTAGACTGGACAGCTTGTGGCAAGTGAATTT
 GCCGGTAAACAAGCCAGATTTTTATGGATCTTGTAAATATTGTGGATAAATATATATATTTG
 TACAGTTATCTAAGTTAATTTAAAGACGTTTGTGCCTATTGTTCTTGTTTAAGTGCTTTT
 GGAATTTTAAACTGATAGCCTCAAACCCAAACACCATCGATAGGACATAAAGCTTGTCT
 GTGATTCAAACAAGGAGATACTGCAGTGGAACTGTAACCTGAGTACTGTCTGTCAGA

ACATATGGTACGTAGACGGTAAAGCAATGGATCAGAAGTCAGATTTCTAGTAGGAAATGTA
AAATCACTGTTGGCGAACAAATGGCCTTTATTAAGAAATGGCTTGCTCAGGGTAACTGGTC
AGATTTCCACGAGGAAGTGTGCTGCTTCTTTGACTATGACTGGTTTGGGAGGCAGTTTA
TTTGTTGAGAGTGTGACCAAAAGTTACATGTTTGCACCTTTCTAGTTGAAAATAAAGTATA
TATATTTTTTATATGAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 3

SEC ID N° 3

MTAASMGPVRVAFVLLALCSRPAVGQNCSPCRCPDEPAPRCPAGVSLVLDGC
GCCRVCAKQLGELCTERDPCDPHKGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPCIFGGTV
YRSGESFQSSCKYQCTCLDGA VGC MPLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLPGKCCEEW
VCDEPKDQTVVGPALAAAYRLEDTFGPDPTMIRANCLVQTTEWSACSKTCGMGIST
RVTNDNASCRLEKQSRLCMVRPCEADLEENIKKGKCCIRTPKISKPIKFELSGCTSM
KTYRAKFCGVCTDGRCCPHRTTTL PVEFKCPDGEVMKKNMMFIKTCACHYNCP
GDNDIFESLYYRKM YGDMA

Fig. 4

SEC ID N° 4

MLASVAGPVSLALVLLLCTRPATGQDCSAQCQCAAEAAPRCPAGVSLVLDGCGCC
RVCAKQLGELCTERDPCDPHKGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPCVFGGSVYRS
GESFQSSCKYQCTCLDGA VGC VPLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLPGKCCEEWVCD
EPKDRTV VGPALAAAYRLEDTFGPDPTMMRANCLVQTTEWSACSKTCGMGISTRV
TNDNTFCRLEKQSRLCMVRPCEADLEENIKKGKCCIRTPKIAKPVKFELSGCTSVKT
YRAKFCGVCTDGRCCPHRTTTL PVEFKCPDGEIMKKNMMFIKTCACHYNCPGDN
DIFESLYYRKM YGDMA

Fig. 5

SEC ID N° 5

5' GAGCCCAAGGACCAAACC 3'

Fig. 6

SEC ID N° 6

5' GGCCAAACGTGTCTTCCA 3'

Fig. 7

SEC ID N° 7

5' CTGCCCTCGCGGCTTACCGAC 3'

Fig. 8

SEC ID N° 8

5' GTGTGTGATGAGCCCAAGG 3'

Fig. 9

SEC ID N° 9

5' GTCAGGGCCAAATGTGTCTT 3'

Fig. 10

SEC ID N° 10

5' CTGCCCTAGCTGCCTACCGACTGG 3'

Fig. 11

Datos de expresión en tiempo real de CTGF en corazón de rata (modelo DOCA)

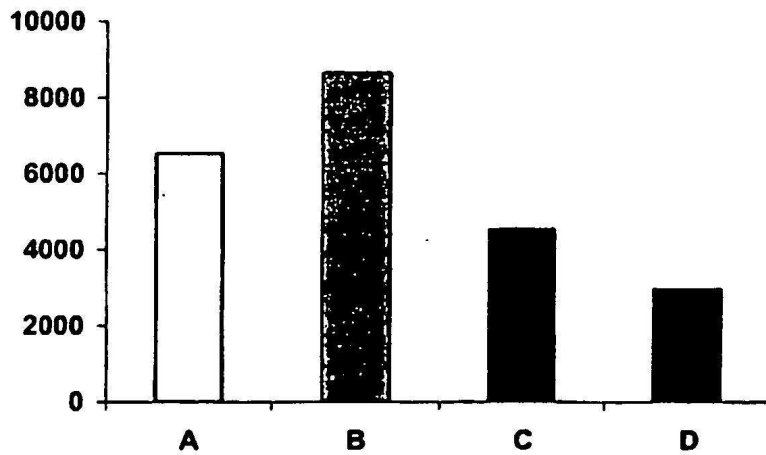


Fig. 12

Datos de expresión en tiempo real de CTGF en corazón de rata (modelo de oclusión)

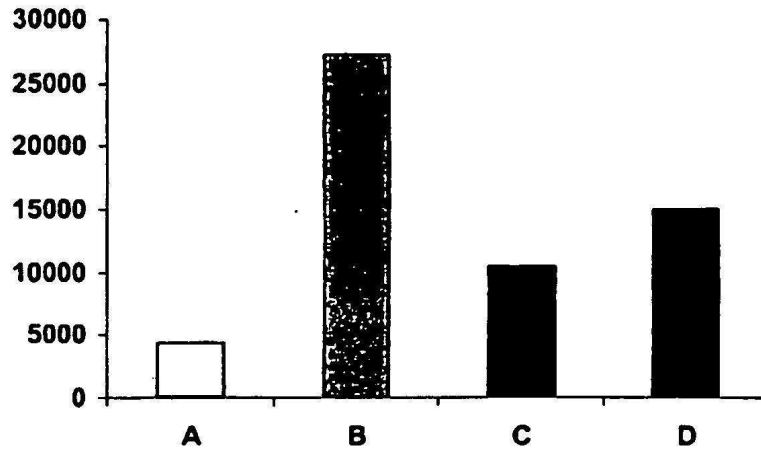


Fig. 13

Datos de expresión en tiempo real de CTGF en corazón de rata (monocrotalina)

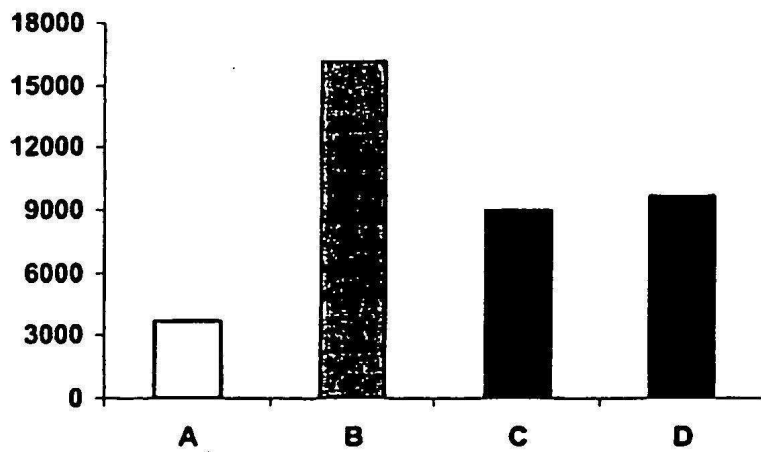


Fig. 14

Datos de expresión en micromatriz de CTGF en corazón de rata (modelo DOCA)

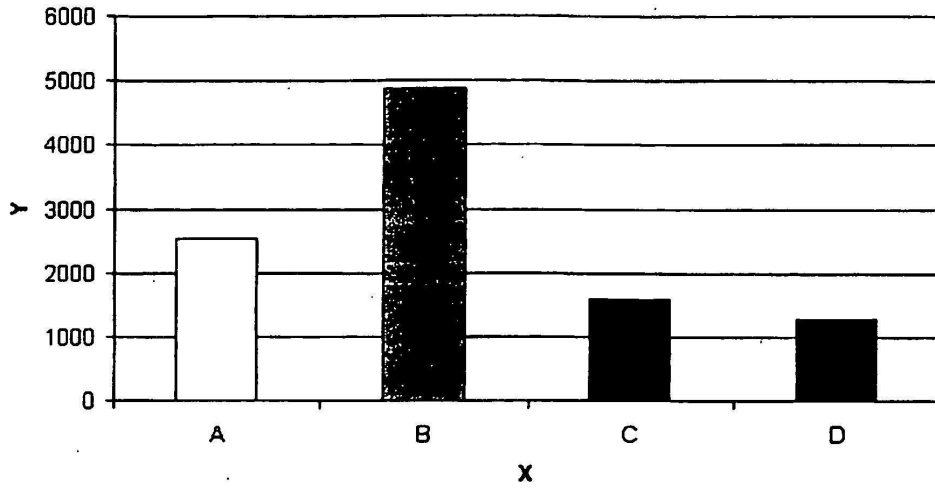


Fig. 15

Datos de expresión en micromatriz de CTGF en corazón de rata (modelo de oclusión)

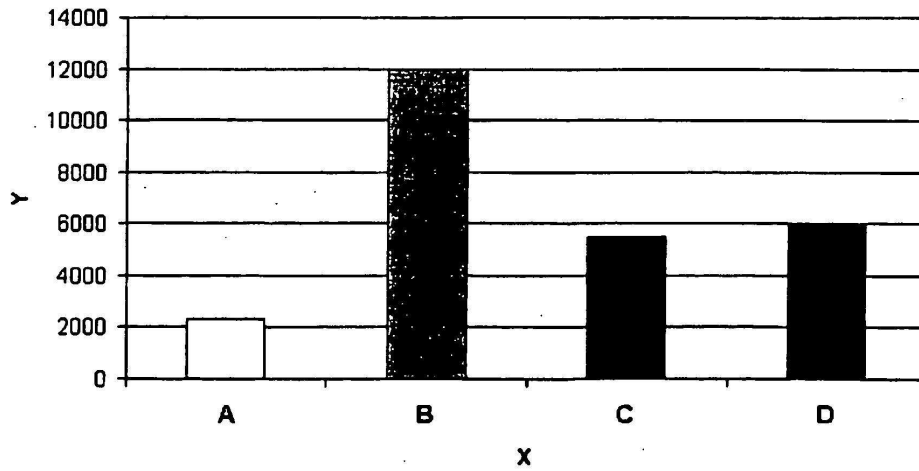


Fig. 16

Datos de expresión en micromatriz de CTGF en corazón de rata (monocrotalina)

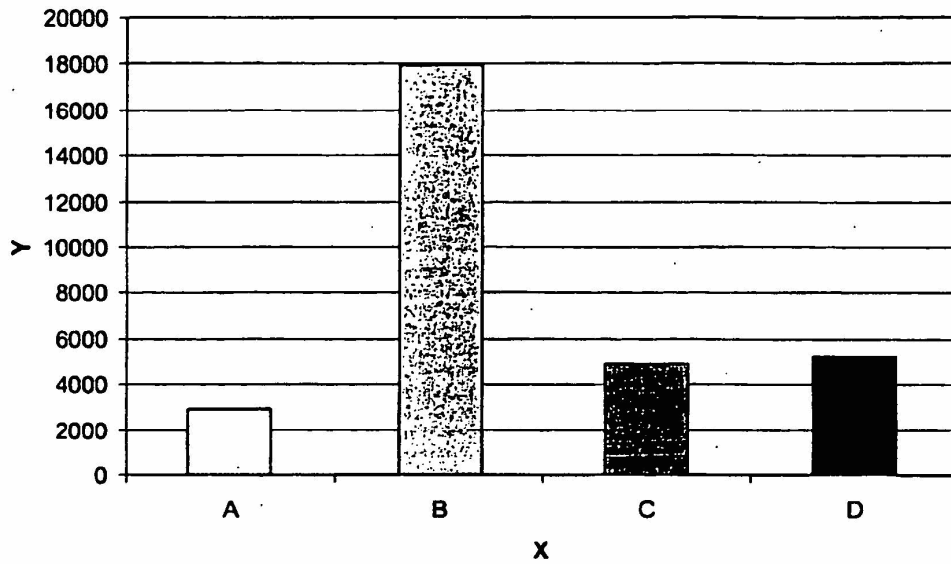


Fig. 17

Datos de expresión en micromatriz de CTGF en corazón humano

