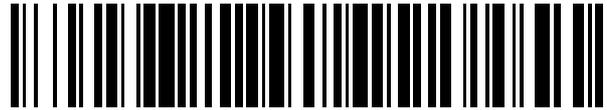


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 260**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2006 E 06717966 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **10.10.2007 EP 1841316**

54 Título: **Proteína CCN3 para su utilización en el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades renales**

30 Prioridad:

10.01.2005 US 642728 P

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

11.02.2013

73 Titular/es:

**ROSALIND FRANKLIN UNIVERSITY OF
MEDICINE AND SCIENCE (100.0%)
3333 GREEN BAY ROAD
NORTH CHICAGO, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

**RISER, BRUCE L. y
PERBAL, BERNARD**

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 260 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Campo de la Invención:

[0001] La presente invención es definida en la reivindicaciones 1-18. La CCN3 puede ser una proteína CCN3 de longitud total o un fragmento de la misma, o una isoforma de la CCN3 de longitud completa, o una combinación de las mismas. La CCN3 aislada y purificada puede ser potencialmente usada en el tratamiento de estas enfermedades regulando la expresión y/o actividad de la proteína CCN2. El nivel de CCN3 en tejido o fluidos corporales puede ser también utilizado para predecir, diagnosticar y/o seguir la progresión de las enfermedades así como para determinar la eficacia de la intervención terapéutica.

La Familia CCN de Genes y Proteínas.

[0002] La familia de genes de CCN actualmente consiste de seis elementos distintos que codifican proteínas que participan en procesos biológicos fundamentales tales como la proliferación celular, unión, migración, diferenciación, cicatrización de heridas, angiogénesis, y diversas enfermedades incluyendo fibrosis y tumorigénesis. Las proteínas codificadas por los elementos de la familia génica de CNN son proteínas de 30-40 kDa extremadamente ricas en cisteína (10% en masa) (Perbal B., NOV and the CCN family of genes: structural and functional issues. Molecular Pathology 54: 57-79, 2001). más recientemente, ha sido informado que algunas formas de las proteínas CCN (CCN3 incluidas) están en el orden de 35-55 kDa. Son designadas como proteínas 61 ricas en cisteína (CYR-61), proteínas de factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), proteínas sobreexpresadas en nefroblastoma (NOV), proteínas-1 segregadas inducida por Wnt (WISP-1), proteínas-2 segregadas inducidas por Wnt (WISP-2), y proteínas-3 segregadas inducidas por Wnt (WISP-3). más recientemente, ha sido propuesta una nueva nomenclatura para esta familia de genes y proteínas (ver la Tabla 1).

Tabla 1: Nombres Propuestos y Nombres Usados Actualmente y Previamente para la Familia CCN de Genes y Proteínas

| Nombre Propuesto | Nombres usados actualmente o previamente |
|------------------|---|
| CCN1 | CYR61 (humano, ratón, xenopus), CEF10 (pollo), IGFBPrP4 (humano), β IG-M1 (ratón), CTGF-2, IGFBP10 (humano), angiopro |
| CCN2 | CTGF (humano, ratón, pollo, xenopus), β IG-M2 (ratón), FISP12 (ratón), IGFBP-rP2 (humano), Hsc24 (humano), IGFBP8 (humano), HBGF-0.8, ecogenin (humano) |
| CCN3 | NOV (humano, rata, pollo, ratón, codorniz), IGFBP-rP3 (humano), IGFBP9 (humano), NOVH (humano), NOVm, mNOV (ratón), xNOV (xenopus) |
| CCN4 | WISP-1 (humano), ELM-1 |
| CCN5 | WISP-2 (humano), CTGF-L, CTGF-3, HICP, rCOP-1 (rata) |
| CCN6 | WISP-3 (humano) |

[0003] La FIG. 1 muestra la estructura modular de las proteínas CCN. Aunque tienen una organización multimodular muy conservada, con cuatro módulos compartiendo identidad con las proteínas de unión de factor de crecimiento tipo insulina (IGFBPs), el factor Von Willebrand (VWC), trombospondina-1 (TSP1), y una familia de reguladores de crecimiento conteniendo nudo de cisteína (CT), las proteínas CCN tienen propiedades biológicas distintivas y son reguladas de manera diferencial. Su implicación ha sido mostrada en múltiples sistemas orgánicos. Un órgano que ha sido el foco de un gran número de estudios es el riñón. Los mecanismos subyacentes de la acción de las proteínas CCN son todavía mal interpretados. Los intentos para identificar receptores transductores de señales únicas y específicas de alta afinidad no han aportado ningún fruto. (Brigstock D. R. Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor. FEBS Letters 327: 125-130, 2003).

El Gen CCN2 y su Proteína Codificada

[0004] De los seis elementos de la familia CCN, la CCN2 ha emergido como una importante jugadora en sus papeles en la regulación de ciertas funciones celulares importantes en el crecimiento esquelético y angiogénesis placentaria, así como sus papeles en ciertas enfermedades incluyendo la fibrosis (fibrosis renal y asociada con la diabetes) y quizás la tumorigénesis.

[0005] Estudios con el sistema renal han proporcionado pruebas del papel de CCN2 como un importante factor patogénico en la fibrosis/esclerosis en un número de modelos de nefropatía crónica (CKD). Informes tempranos sugirieron un posible papel interactivo con los factores de crecimiento transformantes beta (CTGF- β) en fibrosis dérmica y esclerodermia (Bradham DM et al, Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to SCR-induced immediate early gene product CEF-10. *Journal of Cell Biology*, 114:1285-1294, 1991).

[0006] La formación de esclerosis o fibrosis en el riñón es una respuesta común para formas crónicas o severas de lesión. Al menos en enfermedades crónicas renales (CKD), parece haber tres factores causales predominantes: metabólico, genético, y hemodinámico. Todos estos factores pueden interactuar, particularmente en la nefropatía diabética (DN), para conducir la progresión. CCN2 parece ahora ser un mediador central, posterior de los efectos de estos tres elementos. Por ejemplo, la fuerza tangencial o de estiramiento patológica que resulta de la hipertensión intraglomerular parece estimular la producción de citoquinas incluyendo CCN2. Esta misma fuerza resulta ser responsable de la permeabilidad vascular aumentada llevando tanto a la proteinuria como a una producción incrementada de hormonas vasoactivas tales como la angiotensina (AG) II y endotelina, la cuales a su vez también elevan CCN2 y además aumentan la fuerza mecánica. La acumulación anormal de productos finales de glicosilación mejorada (AGEs) que sucede con el metabolismo alterado de glucosa en DN puede también funcionar tanto para aumentar directamente la reticulación y la acumulación de la matriz extracelular (ECM), como para aumentar CCN2. Los antecedentes genéticos del individuo pueden influir en los elementos de hemodinámica y metabolismo, y a su vez las vías resultantes como se ha descrito. Adicionalmente existe una probable influencia de la genética sobre la actividad de la proteína quinasa C (PKC) y producción de hormonas vasoactivas. En todos los casos, la regulación creciente crónica de la actividad de CCN2 es probable que de lugar a un movimiento alterado de ECM y acumulación creciente de ECM, produciendo fibrosis o esclerosis. Estos hallazgos apoyan el postulado de que CCN2 es un elemento central aguas abajo en la progresión de la fibrosis renal, y como tal proporciona un objetivo razonable y novedoso para fines tanto diagnósticos como terapéuticos.

[0007] CCN2 es estrógeno-inducible y sobreexpresada en tumores uterinos o de mama dependientes de esteroides (Tsai et al., Expression and function of Cyr61, an angiogenic factor, in breast cancer cell lines and tumor biopsies. *Cancer Research* 60: 5602-5607, 2000; Tsai et al., Expression and regulation of Cyr61 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 21: 964-974, 2000; Sampath et al. Cyr61, a member of the CCN family, is required for MCF-7 cell proliferation: regulation by 17 beta-estradiol and overexpression in human breast cancer. *Endocrinology* 142: 2540-2548, 2001; Sampath et al., Aberrant expression of Cyr 61, a member of the CCN family (i.e. CCN1), and dysregulation by 17 beta-estradiol and basic fibroblast growth factor in human uterine leiomyomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86: 1707-1715, 2001; Sampath et al, The angiogenic factor Cyr61 is induced by progestin R5020 and is necessary for mammary adenocarcinoma cell growth. *Endocrine*, 18: 147-150, 2002; Xie et al., Breast cancer, Cyr61 is overexpressed, estrogen-inducible, and associated with more advanced disease. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 14187-14194, 2001; Xie et al., Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and Cyr61 in primary breast cancers associated with more advanced features. *Cancer Research*, 61: 8917-8923, 2002). CCN2 y otros elementos de la familia de CCN son importantes mediadores aguas abajo del crecimiento celular regulado por progesterona y estrógeno. La CCN2 y otras proteínas CCN pueden también impactar otras vías reguladoras de crecimiento celular en células de cáncer mamario. La CCN2 uterina es regulada tanto por el estrógeno como la progesterona y parece ser importante para el mantenimiento y remodelación de la ECM estromal (Rageh et al., Steroidal regulation of connective tissue growth factor (CCN2; CTGF) synthesis in the rat uterus. *Molecular Pathology*, 56: 80-85, 2001; Cheon et al., A genomic approach to identify novel progesterone receptor regulated pathways in the uterus during implantation. *Molecular Endocrinology*, 16: 2853-2871, 2002). En el ovario, CCN2 es regulado por gonadotropinas o factor transformante de crecimiento beta (CTGF- β) y se asocia con reclutamiento y mitosis de células tecales, y mantenimiento del corpus luteum (Wandji et al., Messenger ribonucleic acids for MAC25 and connective tissue growth factor (CTGF) are inversely regulated during folliculogenesis and early luteogenesis. *Kidney International*, 60: 96-105, 2000; Slee et al., Differentiation-dependent expression of connective tissue growth factor and lysyl oxidase messenger ribonucleic acids in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 142: 1082-1089, 2001; Harlow & Hillar, Connective tissue growth factor in the ovarian paracrine system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187: 23-27, 2002; Harlow et al., FSH and TGF β superfamily members regulate granulosa cell connective tissue growth factor gene expression in vitro and in vivo. *Endocrinology*, 143: 3316-3325, 2002; Liu et al., Gonadotrophins inhibit the expression of insulin-like growth binding protein-related protein-2 mRNA in cultured human granulosa-luteal cells. *Molecular Human Reproduction*, 8: 136-141; 2002).

[0008] La solicitud de Patente Estadounidense número US20040224360 por Riser y DeNichilo revela el papel de la CCN2 en la producción de matriz extracelular (ECM), así como los métodos para diagnosticar la presencia y progresión de las enfermedades caracterizadas por una acumulación de componentes de ECM midiendo el nivel de CCN2 en una muestra. El método está dirigido a diagnosticar fibrosis de riñón y trastornos renales asociados, en concreto,

complicaciones asociadas con diabetes, hiperglucemia, e hipertensión.

El Gen CCN3 y sus Proteínas Codificadas.

[0009] CCN3 es otro elemento de la familia CCN. Ha sido informado que la CCN3 existe en varias formas. En un estudio para construir recombinantes competentes retrovirales ovinos, ha sido demostrado que la proteína CCN3 puede ser expresada bien como una proteína de longitud total con un peso molecular de alrededor de 50 kDa o como una proteína más pequeña truncada, que es un fragmento de la proteína de longitud completa (Perbal B., J. Clin. Pathol: Mol Pathol. 54: 57-79, 2001). Otras formas de proteína CCN3 han sido también informadas. Por ejemplo, una proteína relacionada con CCN3 ha sido detectada en la envoltura nuclear de las células NCI-H295R y otra proteína relacionada con CCN3 se une con el promotor de inhibidor de tipo 2 de activador plasminógeno humano PAI-2) (Perbal B., J. Clin. Pathol: Mol Pathol, 54: 57-79, 2001). El anticuerpo K19M-AF dirigido contra el péptido aminoácido-19 C-terminal de CCN3 reveló al menos dos estados conformacionales de la proteína nativa CCN3 (Kyurkchiev S. et al., Potential cellular conformations of the CCN3 (NOV) protein. Cellular Communication and Signaling, 2: 9-18, 2004). La CCN3 citoplasmática y unida a la membrana celular tiene un termino C expuesto mientras que la CCN3 segregada tiene un termino C secuestrado lo cual podría ser debido a la interacción con otras proteínas o consigo misma (dimerización).

[0010] Las secuencias aminoácidas de las proteínas CCN3 de longitud total de diversas especies, incluyendo la humana, han sido completamente caracterizadas y son reveladas por Li et al. (Li, C. L. et al., A role for CCN3 (NOV) in calcium signaling. Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology, 55: 250-261, 2002).

[0011] Estos y otros aspectos y atributos de la presente invención serán tratados con referencia a los siguientes dibujos y especificación acompañantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS:

[0012]

La FIG. 1 muestra la estructura multimodular de las proteínas CCN. CT, familia conteniendo nudo de cisteína del dominio tipo reguladores de crecimiento; IGFBP, dominio tipo proteína de unión del factor de crecimiento tipo insulina; TSP1, dominio tipo trombospondina; y VWC, dominio tipo factor Von Willebrand;

La FIG. 2 es un análisis con la técnica de Western Blot (inmunoblot) para las proteínas reactivas CCN3, mostrando múltiples bandas en la orina de un paciente con nefropatía diabética con la muestra siendo tanto no diluida como diluida 1:10. Un medio acondicionado de una línea celular (NCI) produciendo cantidades elevadas de CCN3 fue tomado como un control positivo (los 2 carriles izquierdos). Los pesos moleculares aproximados en kDa (marcados en el carril M) son mostrados numéricamente a la izquierda de la figura;

La FIG. 3 es un análisis con la técnica de Western Blot (inmunoblot) de fluidos de orina de ratón y dializado peritoneal humano (PD) usando un anticuerpo específico de CCN3. Los fluidos humanos PD mostraron dos bandas definitivas de CCN3 en aproximadamente 50 y 65-70 kDa, comparado con un medio acondicionado conteniendo una alta concentración de CCN3 (GST-NOV, carril lejano izquierdo). CCN3 de orina de ratón apareció como 3 bandas en aproximadamente 50, 60, y 70 kDa, así como una sola banda de tinte más intenso en aproximadamente 15-20 kDa. Las últimas bandas de 15-20 kDa pueden representar un fragmento de un cuarto de las moléculas de longitud completa;

La FIG. 4 es un Western Blot o inmunoblot (cuatro geles ensayados al mismo tiempo bajo las mismas condiciones) de fluidos de diálisis recogidos de pacientes sometidos a diálisis satisfactorias (es decir sin el desarrollo obvio de fibrosis de la membrana peritoneal, como determinado por la ultrafiltración adecuada por la membrana) y demostró la presencia de moléculas CCN3 inmunoreactivas. Aunque la mayoría de los pacientes manifestaron dos bandas prominente yendo de 50-65 de kDa (determinadas por comparación con estándares de peso molecular sobre el gel original), algunos pacientes manifestaron poco tinte mientras otros manifestaron tinte intenso, y unas pocas muestras mostraron la presencia de tamaños alternativos incluyendo una banda en aproximadamente 20 kDa. El carril marcado (+) contenía medio de cultivo enriquecido en CCN3 como un control positivo, y manifestó 2 bandas intensas con una banda fuerte en aproximadamente 50-55 kDa, y otra banda fuerte en aproximadamente 20 kDa. Se piensa que la banda de 20 kDa representa un fragmento de la molécula de CCN3 escindida en el centro. Una tercera banda más ligera apareció en 60-65 kDa, equivalente en tamaño a una banda fuerte vista en la mayoría de fluidos de pacientes;

FIG. 5 es un análisis Western Blot de muestras de orina de ratones diabéticos (db/db) (carriles 1-16) y no diabéticos (db/m) (carriles 17-32) demostrando la presencia de una banda CCN3 tenue en un animal no diabético (carril 20), y banda(s) de CCN3 fuertes en la mayoría de animales diabéticos con enfermedad renal "estática". M=estándares de peso molecular;

La FIG. 6 es el resultado de PCR de transcripción reversa usando las secuencias iniciadoras específicas, manifestando bajos niveles de ARNm CCN3 en el riñón (principalmente cortex renal) de ratones de control saludables no diabéticos (db/m, 17-32, figura superior, bandas inferiores) a aproximadamente 8 meses de edad. La expresión de CCN3 fue marcadamente incrementada después de 7 meses de diabetes y 8 meses de edad (db/db, 1-16, panel superior, bandas superiores), cuando los animales están en un "condición de enfermedad, estática" y la progresión se ha estabilizado. La cantidad de los correspondientes niveles de beta actina (housekeeping gen) eran parecidos en ambos grupos de

animales (panel inferior);

La FIG. 7 es el resultado del PCR de transcripción reversa usando secuencias iniciadoras específicas de CCN2, demostrando los correspondientes niveles de ARNm en CCN2 en el riñón (principalmente cortex renal) de ratones no diabéticos saludables de control db/m m) en aproximadamente 8 meses (cuadrante arriba a la izquierda de la figura). La expresión de CCN2 volvió a ser normal tras 7 meses de diabetes en los ratones db/db, cuando los animales estaban en una condición "estática" sin progresión adicional de la enfermedad (cuadrante en la parte de arriba derecha). La expresión de niveles correspondientes de beta actina se muestran en la mitad inferior del carril de la figura, un gen housekeeping). Cada banda en una figura representa los resultados de un animal individual;

La FIG. 8 muestra el resultado del PCR de transcripción reversa usando secuencias iniciadoras específicas de CCN3 o de colágeno de tipo I, demostrando que la sobreexpresión específica del gen CCN3 humano después de transfección in vitro de células mesangiales dió lugar a una regulación hacia abajo marcada de expresión de gen de colágeno tipo I. Células mesangiales de rata fueron transfectadas con un constructo de gen CCN3 (+), o un constructo de gen Lac-Z de control (-);

La FIG. 9 muestra la medición por ELISA de secreción de proteína CCN2 en células mesangiales transfectadas, demostrando que la transfección y sobreexpresión posterior de los genes CCN3 dio como resultado una reducción marcada en la CCN2 secretada;

La FIG. 10 muestra la medición por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de secreción de la proteína de colágeno de tipo I en células mesangiales transfectadas, y demostró que la sobreexpresión específica del gen CCN3 en células mesangiales da como resultado un bloqueo de colágeno producido y/o acumulado;

La FIG. 11 muestra la medición por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de secreción de proteína de trombospondina 1 (TSP- 1) en células mesangiales, y demostró que la sobreexpresión específica del gen de CCN3 resultó en la reducción sustancial de la secreción de TSP-1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0013] Mientras que esta invención es susceptible de realización en formas muy diferentes, se muestra en el dibujo, y será descrito aquí en detalle, realizaciones específicas de la misma en el entendimiento de que la presente revelación tiene que ser considerada como un ejemplo de los principios de la invención y no se tiene intención de limitar la invención a las realizaciones específicas ilustradas.

[0014] La presente invención se define en la reivindicaciones 1-18. La CCN3 puede ser una proteína CCN3 de longitud total con un peso molecular de alrededor de 50 kD o un fragmento de la misma, o una isoforma de la CCN3 de longitud total, o un complejo comprendiendo una o más formas de CCN3, o una combinación de los mismos. Lo que se quiere decir con el término "isoforma" en la presente revelación es que cada isoforma es inmunoreactiva a uno o más anticuerpos contra la molécula CCN3 de longitud completa, pero puede no parecerse exactamente a la forma de longitud completa como previamente se informa, en términos de peso molecular, secuencia aminoácida, configuración tridimensional, o modificación(es) post translacional(es). La CCN3 aislada y purificada puede potencialmente usarse en el tratamiento de estas enfermedades regulando la expresión y/o actividad de la proteína CCN2. El nivel de CCN3 en tejido o fluidos corporales puede ser también usado para predecir, diagnosticar y/o seguir la progresión de enfermedades así como determinar la eficacia de la intervención terapéutica.

[0015] El término "fibrosis" usado en la presente revelación se usa de forma intercambiable con el término "esclerosis" puesto que son procesos similares involucrados en el crecimiento excesivo de tejido fibroso o de tipo fibrosis y/o la deposición incrementada de moléculas de matriz extracelular tal como colágeno, y ambos han mostrado tener CCN2 como al menos un factor causal. El término "fibrosis" en la presente revelación incluye fibrosis y/o esclerosis.

[0016] Se ha mostrado ahora que la CCN2 es un factor causal en fibrosis renal, y parece que actúa de modo similar en otras enfermedades fibróticas, incluyendo las que suceden en el hígado, pulmones, corazón, piel, vasculatura, peritoneo, etc (Dean R.G., Balding L., Candido R., Burns W.C., Cao Z., Twigg S.M., Burrell L.M. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 53(10):1245-56, 2005; Shi-wen X., Pennington D., Holmes A., Leask A., Bradham D., Beauchamp J.R., Fonseca C., du Bois R.M., Martin G.R., Black C.M., Abraham D.J. Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis. *Experimental Cell Research*. 259(1):213-24, 2000; Ozaki S., Sato Y., Yasoshima M., Harada K., Nakanuma Y. Diffuse expression of heparan sulfate proteoglycan and connective tissue growth factor in fibrous septa with many mast cells relate to unresolving hepatic fibrosis of congenital hepatic fibrosis. *Liver International*. 25(4):817-28, 2005; Sakamoto N., Sugimura K., Kawashima H., Tsuchida K., Takemoto Y., Naganuma T., Tatsumi S., Nakatani T. Influence of glucose and inflammatory cytokines on TGF-beta1 and CTGF ARNm expressions in humano peritoneal mesothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 15(6):907-11, 2005; Zarrinkalam K.H., Stanley J.M., Gray J., Oliver N., Faull R.J. Connective tissue growth factor and its regulation in the peritoneal cavity of peritoneal dialysis patients. *Kidney International*. 64(1):331-8, 2003.). Cuando expresada en cantidades incrementadas, la CCN2 regulada hacia arriba, por ejemplo, por el factor transformante de crecimiento β (TGF- β), altas concentraciones de glucosa, estrés mecánico, productos finales de glucosilación avanzada (AGEs), provoca (entre otras cosas) la sobreacumulación de moléculas de matriz extracelular (ECM) (por ejemplo, formas de colágeno y trombospondina (TSP)), dando lugar a

cicatrices y fibrosis/esclerosis. CCN3 tiene suficientes similitudes en estructura para ser reconocida como perteneciente a la familia de genes CCN. No se ha informado que CCN3, a diferencia de CCN2, esté implicada en la regulación de colágeno, trombospondina o fibrosis, y de hecho, se ha informado que la mayoría de los elementos de la familia CCN, en la mayor parte, diferentes actividades biológicas.

5 Excreción de CCN3 en orinas de pacientes con diabetes y con fibrosis renal.

[0017] Para mostrar un papel de la CCN3 en fibrosis, y en particular fibrosis renal en la enfermedad de diabetes, pacientes diabéticos en diferentes etapas de enfermedad renal fueron examinados respecto a su excreción de CCN3 en la orina. Los paciente diabéticos pueden servir también como un modelo para muchas otras formas de fibrosis/esclerosis tanto renal como extra-renal, incluyendo enfermedad renal crónica (CKD). Ha sido mostrado previamente que los pacientes con CKD tienen cantidades aumentadas de CCN2 presente en el riñón, y también excretan CCN2 en la orina. El nivel de CCN2 parece estar relacionado con la progresión de la enfermedad, guardando correlación las cantidades incrementadas con la progresión incrementada de la enfermedad (ver la Solicitud de la Patente Estadounidense N°. US2004-0224360 por Riser and DeNichilo). Mostramos en la solicitud actual, por primera vez, que sujetos humanos saludables sin historial de enfermedades renales (referido más adelante como "sujetos humanos saludables" o "sujetos saludables") también excretan CCN3 en su orina. Esto fue determinado por primera vez en este estudio por ELISA, usando un anticuerpo específico de CCN3. La cantidad de CCN3 en sujetos humanos saludables fue aproximadamente de 280 (+/-377) µg/mmol de creatinina. Esta es mucho más elevada, en promedio, que los niveles de CCN2 en los sujetos humanos saludables, que es aproximadamente 2.0 (+/- 2.0) µg/mmol de creatinina. En pacientes diabéticos sin historial clínico de enfermedad renal (pacientes normoalbuminúricos), los niveles medios de CCN3, en 350 (+/- 574) µg/mmol de creatinina, eran similares a los niveles de CCN3 del grupo saludable de control. En pacientes en la etapa más temprana de enfermedad renal (por ejemplo pacientes albuminúricos), los niveles de CCN3 como grupo se incrementaron al nivel medio de 3,048 (+/- 6,599) µg/mmol de creatinina. Individualmente, siete de los 13 pacientes albuminúricos en el grupo tenían niveles de CCN3 elevados por encima de lo que era considerado como normal, para personas saludables. En pacientes con enfermedad renal clínica avanzada (por ejemplo pacientes proteinúricos) los niveles se incrementaron más y en gran manera hasta una media de 27,526 (+/- 65,301) µg/mmol de creatinina, o en términos de mg, 27.5 mg/mmol de creatinina. En contraste, los niveles urinarios de CCN2 en sujetos saludables y pacientes diabéticos sin enfermedad renal tenían niveles comparativamente bajos (2.0 y 2.4 (+/-2.3 y 6.8) µg/mmol de creatinina) o aproximadamente 100 veces menos CCN2 que CCN3. Los pacientes que desarrollan enfermedad renal siguieron un curso de expresión algo diferente que pareció, en la última etapa, ser una respuesta a CCN3. Por ejemplo, la expresión de CCN2 se incrementó pronto en un número limitado de pacientes, es decir antes de albuminuria pero la media permanece como la de sujetos no renales o sanos (1.1 +/- 1.6 ng/mmol de creatinina). En el grupo proteinúrico la media ascendió a 18.7 ng/mmol de creatinina, pero entonces parece caer con el tiempo hacia la línea base, mientras los valores de CCN3 aumentan. Esto indicó que CCN3 está implicada en la progresión de la enfermedad, posiblemente como un inhibido endógeno de CCN2. (un factor causal conocido en la progresión de la enfermedad). Esto sugería que CCN3 puede proporcionar un elemento regulador negativo para CCN2, y que los niveles en orina pueden servir para predecir, o representar, la progresión del paciente hacia el fallo renal. Estos datos también indican que el CCN3 puede ser aislada y purificada a partir de la orina de sujetos humanos. Particularmente, los pacientes con diversas enfermedades renales en los que CCN3 está sobreexpresada proporcionan una excelente fuente para obtener CCN3 en grandes cantidades. Resultará obvio a partir de los estudios abajo descritos que CCN3 puede ser encontrada en otros fluidos corporales o tejidos de sujetos humanos y otras especies animales que pueden también servir como fuentes excelentes para el aislamiento y purificación de la proteína CCN3.

[0018] Los análisis de inmunoblot de las muestras de orina confirmaron la presencia de CCN3 en la orina e identificaron la presencia de múltiples formas moleculares (isoformas) de CCN3 en pacientes con enfermedad diabética. Las muestras de orina de sujetos saludables mostraron solamente una banda única equivalente a la CCN3 de longitud completa producida naturalmente con un peso molecular de alrededor de 50 kDa. Las muestras de orina de pacientes diabéticos mostraron, además de la CCN3 de longitud completa, formas de CCN3 inmunoreactiva de peso molecular tanto inferior como superior (FIG. 2, carriles derechos) sugiriendo que estas formas alternativas, que incluyen fragmentos, isoformas, o combinaciones comprendiendo una o más formas de la molécula de CCN3 o sus fragmentos o sus isoformas, pueden ser importantes en la progresión de la enfermedad. Lo que se quiere decir con el término "isoformas" en la presente revelación es que cada isoforma es inmunoreactiva a uno o más anticuerpos contra la molécula de CCN3 de longitud completa, pero puede que no se asemeje exactamente a la forma de longitud completa como previamente se informa, en términos de peso molecular, secuencia aminoácida, configuraciones tridimensionales, y modificación(es) post translacional(es).

55 CCN3 en los fluidos de diálisis de pacientes sometidos con éxito a diálisis peritoneal.

[0019] Con el fin de que los pacientes con enfermedad renal terminal (ESRD) sobrevivan cuando los riñones fallen, pueden elegir entre 3 tipos disponibles de terapia de sustitución renal. Esto es también verdad en pacientes con una variedad de otras enfermedades renales, incluyendo fallo renal agudo. Una terapia de sustitución es un trasplante renal, pero no es aceptable o disponible para muchos pacientes. Una segundo tipo de terapia es hemodiálisis, la cual requiere de largas y físicamente exigentes sesiones (lo más comúnmente tres veces a la semana) en una clínica de diálisis. El tercer tipo de terapia es diálisis peritoneal, y lo más a menudo puede ser hecha por el paciente en casa. Por

tanto, la diálisis peritoneal es la mejor opción para muchos. Uno de los grandes impedimentos a ésta como terapia exitosa a largo plazo es la tendencia de muchos pacientes a desarrollar, con el paso del tiempo, fibrosis de la membrana peritoneal con pérdida eventual de la capacidad de transportar el fluido de diálisis necesario para la eliminación de subproductos tóxicos del metabolismo de la sangre. No existen tratamientos disponibles para este tipo de fibrosis, y actualmente no existe modo de predecir cuánto tiempo será capaz el paciente de usar este tipo de diálisis.

[0020] Examinamos los fluidos de diálisis peritoneal (también conocidos como muestras de dializado) de pacientes sometidos a diálisis con éxito (por ejemplo, sin el desarrollo obvio de fibrosis de la membrana peritoneal, como se determina por ultrafiltración inadecuada a través de la membrana) para la presencia de CCN3, y para la comparación de los niveles de CCN2. En los 51 pacientes ensayados por ELISA, sorprendentemente, fue descubierto que la mayoría de estos pacientes ensayados tenía niveles de CCN3 en los fluidos de diálisis en el rango de 6-28 ng/ml. En contraste, la mayoría de los clientes ensayados no tenía niveles detectables de CCN2 (es decir, por debajo de 2 ng/ml). Solamente dos de los 51 pacientes ensayados tenían niveles elevados de CCN2 (18,6 y 18,5 ng/ml, respectivamente). Esto sugiere que CCN3, o un fragmento o isoforma molecular de CCN3 puede jugar un papel en la fibrosis peritoneal, pero a diferencia de CCN2, ella, o un fragmento o isoforma molecular, puede actuar como un inhibidor de la fibrosis.

[0021] Los análisis por Western Blot de fluidos de diálisis humana peritoneal (PD) (también conocidos como muestras de dializado) de diálisis peritoneales con éxito (es decir, sin desarrollar fibrosis de la membrana peritoneal) usando anticuerpo específico de CCN3 (ver FIG. 3) demostraron dos bandas definitivas de CCN3 en aproximadamente 50 y 65-70 kDa cuando se compararon con un estándar de peso molecular. En contraste, aparecía CCN3 de orina (en este caso ratón) como 3 bandas en aproximadamente 50, 60, y 70 kDa, así como una sola banda en aproximadamente 15 kDa. La última banda en 15 kDa puede representar un cuarto de fragmento de la molécula de longitud completa. Como se muestra en la FIG. 4, cuando muestras de dializado de pacientes que reciben con éxito diálisis peritoneal fueron examinadas por análisis de Western Blot, la mayoría de los pacientes manifestaron dos bandas destacadas del orden de 50-65 kDa. Sin embargo algunos pacientes manifestaron tinte ligero para estas bandas mientras que unas pocas muestras mostraron la presencia de tamaños alternativo de molécula reactiva de CCN3, incluyendo una banda en aproximadamente 20 kDa.

[0022] Estos resultados demostraron por primera vez la presencia, no solamente de CCN3 en fluidos PD de pacientes diabéticos con diálisis peritoneal exitosa, sino también de isoformas únicas. Esto sugiere, entre otras cosas, que pacientes con altos niveles de CCN3 peritoneal (o fragmentos o isoformas de CCN3 o una combinación de los mismos) pueden protegerse contra fibrosis en esta localización, al menos en parte controlando (o regulando hacia abajo) CCN2 (y posiblemente otros factores profibroticos, incluyendo algunos otros elementos de la familia de CCN). Los pacientes con altos niveles iniciales de CCN3 pueden ser los más resistentes al desarrollo de fibrosis peritoneal y a la pérdida de capacidad de ultrafiltración por tratamiento con diálisis continuado, y por tanto los más adecuados para terapia PD de larga duración. Esto proporciona también prueba de que CCN3 puede usarse para tratar o proteger pacientes diabéticos contra el desarrollo de fibrosis, y o la pérdida de capacidad de ultrafiltración en diálisis (sean diabéticos o no) particularmente en aquellos pacientes que tienen niveles iniciales bajos, o aquellos que tienen niveles reducidos después de diálisis peritoneal. Como se usa en la presente revelación, CCN3 incluye pero no está limitada a, la proteína CCN3 de longitud completa, un fragmento de la misma, una isoforma de la proteína CCN3 de longitud completa, un recombinante de la proteína CCN3, un mimético molecular de CCN3, o un complejo comprendiendo una de las formas de CCN3, o cualquier combinación de una o más formas de CCN3. Lo que se quiere decir con "isoforma" es que la molécula es inmunoreactiva a uno o más anticuerpos específicos del CCN3 de longitud completa. Pueden ser administrados a un paciente por cualquier vía tradicional adecuadas para suministrar macromoléculas, tal como intravenosa, intramuscular, nasal, tópica, transdérmica, por inhalación, oral, y similares. Estas vías de administración son bien conocidas para los entendidos en la materia. Un método de administración de a terapia basada en CCN3 para evitar o revertir fibrosis peritoneal en pacientes sometidos a diálisis peritoneal sería la adición de CCN3 a soluciones de diálisis para ser usadas por los pacientes sometidos a diálisis peritoneal.

Datos de un modelo animal de diabetes tipo 2 y enfermedad renal.

[0023] El modelo de ratón db/db de diabetes tipo 2 fue también usado para establecer un papel para CCN3 en enfermedades renales y fibróticas. El ratón db/db se vuelve obeso rápidamente y desarrolla hiperglucemia a aproximadamente un mes de edad. Durante los 3-4 meses posteriores, los ratones desarrollan fibrosis glomerular renal característica de la enfermedad renal humana. Sin embargo, la enfermedad, a diferencia de lo visto en humanos, no continúa progresando a esclerosis glomerular avanzada, y/o enfermedad intersticial, ni menos fallo renal posterior, sino que parece permanecer en un "estado de enfermedad tipo estática". Los miembros de la camada db/m de control son idénticos a los ratones db/db excepto que no expresan el fenotipo mutacional, y no se vuelven obesos, desarrollan diabetes, o enfermedad renal. Como en el caso de pacientes humanos, se encontró por ELISA que ratones que se hicieron diabéticos contenían CCN2 en orina (Riser, B. L. et al., Urinary CCN2 (CTGF) a possible predictor of diabetic nephropathy: Preliminary report. *Kidney International*. 64: 451-458, 2003). En la presente revelación, se encontró que los ratones no diabéticos de control tenían niveles de CCN3 en la orina de aproximadamente 204 µg /mmol de creatinina urinaria. La creatinina urinaria fue medida y usada como un medio para normalizar las muestras, ya que los pacientes diabéticos y animales orinan más frecuentemente produciendo orina más diluida. A diferencia de los animales de control, aquellos con diabetes incrementaron sus niveles de CCN3 urinaria 6 veces, hasta 1,244 µg CCN3/mmol de creatinina dentro de las 4 semanas desde volverse diabéticos. A los dos meses de diabetes los valores volvieron a 334 µg CCN3/mmol de creatinina, y se mantuvieron bajos a los 3 meses (31.2 µg CCN3/mmol de creatinina) y 6 meses

(27.5 µg CCN3/mmol de creatinina en animales diabéticos, y 28.3 en animales no diabéticos de control), ultimo periodo examinado. En resumen, en el modelo db/db de diabetes tipo 2, CCN3 aumentó enormemente al mes de diabetes, medida en la orina. Luego, con el paso del tiempo, los niveles de CCN3 decrecieron al de los animales no enfermos, de control. Esto apoya la idea de que CCN3 está involucrada en diabetes y enfermedad renal. CCN3 ya en altos niveles en animales saludables (es decir relativo a CCN2) puede actuar para mantener niveles constitutivos de CCN2 bajo, como un regulador negativo. CCN2 aumenta luego después del comienzo de diabetes como una respuesta a lesión (respuesta de cicatrización de herida), o un suceso de estrés metabólico, superando la regulación hacia abajo de la CCN3 presente. Dado que este estrés metabólico es crónico, la señal para CCN2 aumentada permanece presente. El método normal para retroalimentación negativa de esta señal parecería ser CCN3 a partir de estos datos. Por tanto, la regulación hacia arriba observada en CCN3 sería una respuesta al temprano, pero de alguna manera de larga duración, aumento de CCN2, siendo CCN3 entonces un regulador negativo de la expresión de CCN2, controlando la expresión y o actividad de la última. Este mecanismo de reparación global permitiría una respuesta necesitada de CCN2 a lesión aguda, pero cuando crónica, necesitaría ser apagado. Si no se apaga apropiadamente, la fibrosis se haría, y se hace, continua.

[0024] Se usó inmunoblot para determinar la identidad de la forma molecular de CCN3 presente (es decir, un ensayo cualitativo, más que cuantitativo). La orina de ratones db/m de control mostró solamente una sola banda de CCN3, y estaba presente en uno de 6 ratones (FIG. 5). Sin embargo, los ratones db/db manifestaron múltiples bandas de CCN3 que estaban presentes en casi todos los ratones enfermos. Este resultado apoya el hallazgo descrito arriba para el ensayo cuantitativo ELISA, pero además demuestra que en animales enfermos, no hay solamente niveles incrementados de CCN3, sino múltiples isoformas, fragmentos, o multicomplejos. El aislamiento y caracterización de estas formas únicas de la orina (y/o fluidos PD) podrían ser usados para determinar, moléculas, o formas moleculares que tienen potencial terapéutico único, o máximo, para usarse como extraídas, y/o purificadas o producidas en una forma recombinante en una célula, tejido, u otro sistema.

[0025] La PCR de transcripción reversa para ARNm de CCN3 (FIG. 6) demostró que los niveles de ARNm de CCN3 estaban espectacularmente regulados hacia arriba en el riñón a los 6 meses de la enfermedad (el único periodo examinado). El ARNm de CCN2 renal es pronto muy regulado hacia arriba (a los 4-5 meses como se muestra en estudios previos (Riser B. L., et al, Urinary connective tissue growth factor (CTGF): a possible predictor of diabetic nephropathy (DN): J Am Soc Nephrol, 11:121A, 2000). En el periodo de 6 meses usado en el estudio actual CCN2 sólo se eleva ligeramente (ver FIG. 7). Esto apoya la idea de que cuando CCN3 es expresado en cantidades elevadas, puede actuar para reducir la expresión y/o actividad de CCN2. Esto puede explicar el estado "estático" de la enfermedad en estos animales que no progresan más. El ARNm del CCN3 incrementado en el tejido renal también proporciona prueba de que las células renales son al menos una fuente de la CCN3 observada en orina. Además, también hemos descubierto, usando inmunotecnología para CCN3, que la proteína CCN3 estaba también presente en secciones renales de ratón de estos ratones diabéticos.

Datos de un modelo invitro de enfermedad renal y fibrosis

[0026] Las células mesangiales renales juegan un papel clave en muchas enfermedades renales, incluyendo CKD, y que implican diabetes. Esta célula a la vez produce y responde a muchas citoquinas y factores de crecimiento y es importante para mediar la lesión común de fibrosis /esclerosis mesangial. Como es el caso in vivo, las células mesangiales renales en cultivo responden a TGF-β (una citoquina bien establecida pro-fibrótica/esclerótica) aumentando la CCN2, y a su vez el colágeno (una molécula de matriz extracelular importante en fibrosis). Esto proporciona un modelo in vitro para fibrosis en el riñón (y otros órganos también) En este modelo, CCN2 es producida por estas células a bajos niveles, pero se incrementa significativamente después de exposición a TGF-β (2 ng/ml). TGF-β es un bien conocido estimulador o regulador positivo de CCN2 en muchos otros tipos de células también.

[0027] Examinamos si las células mesangiales eran capaces o no de producir CCN3 y si era así la respuesta a TGF-β. En nuestros experimentos, se encontró que las células mesangiales cultivadas segregaban niveles relativamente altos, aproximadamente 6.7 ng CCN3 /100,000 células). Cuando las células eran expuestas a TGF-β (2 ng/ml), el nivel de CCN3 se reducía significativamente a 2.2 ng, es decir una reducción cercana al 70%, mientras que al mismo tiempo la acumulación de CCN2, y colágeno aumentó en una cantidad similar. Esto apoya la idea de regulación inversa (o negativa) de CCN2 y CCN3, y papeles inversos en fibrosis/esclerosis. Cuando los niveles de CCN3 disminuyen, los niveles (actividad) de CCN2 aumentan, y se acumula ECM. Para determinar si niveles elevados de CCN3 actúan entonces para reducir la producción o actividad de CCN2 y resultan en una prevención o inversión de esclerosis/fibrosis, se realizaron dos juegos de experimentos. Primero, se trataron células mesangiales con TGF-β en la presencia o ausencia de medio de cultivo acondicionado enriquecido en CCN3. La acumulación de CCN2 y colágeno de tipo I en células mesangiales mejorada por TGF-β es un modelo in vitro bien aceptado para el desarrollo y progresión de la fibrosis. Este medio acondicionado era de una línea celular tumoral humana llamada NCI. Se había mostrado que estas células segregan niveles marcados de CCN3. Los resultados demostraron que las producciones mejoradas de CCN2 y colágeno (normalmente estimuladas por TGF-β) eran ambas marcadamente inhibidas en la presencia de medio acondicionado NCI. Puesto que este medio acondicionado contiene, además de CCN3, otras proteínas liberadas para las células, se realizó un segundo juego de experimentos para verificar un efecto específico de CCN3. Para lograr esto, clonamos y transfectamos el gen para CCN3 dentro de células mesangiales, con las células de control recibiendo el gen lac Z. Las líneas celulares resultantes mostraron una elevación marcada de expresión constitutiva de ARNm de CCN3 (línea CCN3+) en las que recibieron el gen CCN3, mientras que las que recibieron el gen lac Z (línea CCN3-)

permanecieron inalteradas (FIG. 8). Como hipotetizado, se mostró que esta regulación creciente específica en la expresión de ARNm de CCN3 daba lugar a la reducción concomitante y sustancial de los niveles de ARNm de tipo I de colágeno (FIG. 8). El análisis de la proteína mostró que esta regulación creciente en la expresión del gen de CCN3 resultó en una reducción sustancial de CCN2 segregada (FIG. 9), y resultó una inhibición casi total (97%) de colágeno de tipo I (FIG. 10). Una segunda proteína de matriz extracelular y un factor profibrótico, TSP-1, se redujeron también en gran manera como un resultado de la expresión incrementada de CCN3 (FIG. 11). Aunque se ha informado que el CCN2 juega un papel en la regulación hacia arriba de TSP-1 (Wang S. Denichilo M. Brubaker C. Hirschberg R. Connective tissue growth factor in tubulointerstitial injury of diabetic nephropathy. *Kidney International*. 60(1):96-105, 2001) y la regulación hacia arriba de CCN2 por CCN3 es probablemente un mecanismo para que CCN3 reduzca la formación de TSP-1 en este estudio, los presentes datos no descartan que la CCN3 juegue un papel directo en inhibir la secreción de TSP-1

Orina y/o lavados peritoneales (fluidos de diálisis) de pacientes de diálisis peritoneal como una fuente de proteína CCN3 biológicamente activa (nov)

Proteínas CCN3 en el fluido de Diálisis Peritoneal (PD) y suero de pacientes

[0028] Encontramos que la mayoría de los pacientes de diálisis peritoneal tenían niveles de proteínas CCN3 (NOV) en los fluidos PD del orden de 20 ng/ml o más. En contraste, la mayoría de los pacientes no tenían niveles detectables de proteínas CCN2 (CTGF) en el fluido PD. Solamente unos pocos pacientes tenían valores medibles de CCN2. El suero de sujetos saludables mostraba aproximadamente 700 ng/ml de CCN3 usando ELISA indirecto con anticuerpo específico de CCN3 (NOV) usado para esta medición. El Western Blot confirmó que (en un gran número de pacientes de PD) los fluidos PD contenían proteína CCN3 y que la cantidad y forma molecular de CCN3 varía entre pacientes (FIG. 4). Estos datos también dan prueba de que los fluidos PD, junto con la orina tratada antes, es una fuente excelente para aislar y purificar la proteína CCN3, o sus fragmentos de la misma, o sus isoformas, o cualquier combinación de las mismas. Se contempla que la proteína CCN3, fragmentos activos, isoformas, o combinaciones de las mismas, pueden ser también aisladas y purificadas de otros fluidos corporales (por ejemplo, sangre) y tejidos (por ejemplo, células renales).

[0029] Estas moléculas pueden ser aisladas y purificadas de las fuentes mencionadas anteriormente por cualquier técnica estándar de bioseparación, o una combinación de pasos de bioseparación, los cuales son bien conocidos para los expertos en la técnica. Ejemplo de técnicas bien conocidas de bioseparación incluyen pero no se limitan a diálisis, cromatografía de exclusión por tamaño molecular, inmunoadsorción, cromatografía por afinidad, electroforesis de gel (unia dimensional o bidimensional), isoelectroenfoque, cromatografía de líquido de alto rendimiento, cromatografía de gradiente de pH, cromatografía de gradiente de fuerza iónica, cromatografía en contracorriente, cromatografía de iones, etc.

[0030] La proteína CCN3 aislada y purificada o sus fragmentos o isoformas (o combinaciones) de CCN3 pueden ser potencialmente usadas en el tratamiento de enfermedades asociadas con niveles atípicos de CCN2 regulando la expresión y/o actividad de la proteína CCN2. El nivel de CCN3 en tejido o fluidos corporales puede ser también usado para predecir, diagnosticar y/o seguir la progresión de enfermedades así como determinar la eficacia de intervención terapéutica.

[0031] La presente invención, por tanto, revela regular el nivel de actividad de CCN2 en un sujeto regulando el nivel de actividad de CCN3 del sujeto. El sujeto puede ser de cualquier especie tal como la mamífera (por ejemplo, humano, roedores etc.) o sujetos aviares. En una realización preferida, el sujeto es humano. Lo que se quiere decir con "CCN3" es la proteína CCN3 de longitud completa, por ejemplo una molécula de la proteína CCN3 recombinante. En una realización, la actividad CCN3 es medida por la inmunoreactividad a uno o más anticuerpos contra las moléculas de proteína CCN3 de longitud completa (y en algunos casos un anticuerpo monoclonal específico para secuencias cortas y/o epítomos únicos de CCN3) usando técnicas estándar de inmunoensayo tales como ELISA o Western Blot.

[0032] En una realización preferida, el nivel de actividad de CCN3 en el sujeto puede ser incrementado administrando la molécula CCN3 de longitud completa, por ejemplo una CCN3 recombinante. Un ejemplo de una cantidad efectiva de CCN3 es una cantidad para proporcionar un nivel de CCN3 de longitud completa en suero de alrededor de 900 ng/ml o mayor. Otro ejemplo de una cantidad efectiva de CCN3 es administrar una o más dosis de CCN3 al sujeto para proporcionar un nivel de CCN3 urinario de alrededor de 280 µg/mmol de creatina o mayor. Se contempla que la regulación de CCN2 por CCN3 puede ser usada para tratar la enfermedad renal crónica.

[0033] El término "fibrosis" usado en la presente revelación incluye fibrosis y/o esclerosis puesto que son procesos similares y se ha mostrado que ambos tienen CCN2 como al menos un factor causal. En la presente revelación, "fibrosis" y "esclerosis" pueden usarse indistintamente. La fibrosis puede estar asociada con el riñón. La fibrosis puede ser también el resultado de una de las condiciones patológicas tal como enfermedades renales, y trasplantes de órganos, y adherencias de órgano o tejido postquirúrgicas no deseadas. La fibrosis puede estar también asociada con la proliferación celular incrementada, por ejemplo, la enfermedad proliferativa glomerular.

[0034] La presente invención está relacionada con proteínas CCN3 de longitud completa para usarse en el tratamiento de enfermedad renal en un sujeto. Un ejemplo de una cantidad efectiva de CCN3 es administrar una o más dosis de CCN3 de longitud completa al sujeto para proporcionar un nivel en suero de 900 ng/ml o mayor. Otro ejemplo de una

5 dosis efectiva de CCN3 de longitud completa es una cantidad suficiente para proporcionar un nivel urinario de CCN3 de alrededor de 280 µg/mmol de creatina o mayor. Para los pacientes sometidos a diálisis peritoneal con un fluido de diálisis, la CCN3 puede ser administrada al sujeto añadiendo la CCN3 a la solución de diálisis para usarse por el paciente sometido a diálisis peritoneal. En esta realización, un ejemplo de una cantidad efectiva de CCN3 de longitud completa es una concentración de la proteína CCN3 de longitud completa de 100 ng/ml de solución de diálisis o mayor, tal como 500 ng/ml o mayor, o 1000 ng/ml o mayor.

10 **[0035]** La presente invención puede ser usada para diagnosticar enfermedad renal en un sujeto. El método comprende: (a) obtener una muestra de tejido o fluido corporal del sujeto, (b) detectar el nivel de actividad de CCN3 en la muestra, y (c) comparar el nivel de actividad de CCN3 en la muestra con un nivel normal, en donde un nivel incrementado de actividad CCN3 es indicativo de la presencia de la enfermedad. En una realización, la presencia o ausencia de una isoforma única de CCN3 puede ser usada para ser indicativa de una enfermedad. La muestra puede ser un tejido o un fluido corporal, tal como la orina, sangre (incluyendo plasma y suero), o lavado peritoneal. En una realización preferida, el nivel de actividad de CCN3 se detecta por un inmunoensayo.

15 **[0036]** La presente invención además se refiere a un kit diagnóstico para uso en diagnosticar enfermedad renal en un sujeto mamífero. El kit comprende un anticuerpo específico para CCN3. El anticuerpo puede ser anticuerpo monoclonal o policlonal.

20 **[0037]** La práctica de la presente invención empleará e incorporará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, microbiología, ingeniería genética, e inmunología, las cuales están dentro del conocimiento de la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Proteína CCN3 de longitud completa para uso en tratar una enfermedad renal en un sujeto.
2. Proteína CCN3 de longitud completa para uso según la reivindicación 1 en donde la enfermedad renal es enfermedad crónica renal, fibrosis renal o esclerosis renal.
- 5 3. Proteína CCN3 de longitud completa para uso según la reivindicación 1 o 2 en donde el sujeto es un sujeto humano.
4. Proteína CCN3 de longitud completa para uso según a la Reivindicación 1 en donde el sujeto ha sido diagnosticado de enfermedad renal detectando el nivel o actividad de CCN3 en una muestra de tejido o fluido corporal del sujeto y comparando el nivel o actividad de CCN3 en la muestra con un nivel o actividad normal de CCN3 en un sujeto sano.
- 10 5. Proteína CCN3 de longitud completa para uso según la reivindicación 4, en donde el sujeto es diagnosticado de enfermedad renal detectando el nivel o actividad de CCN2 en una muestra de tejido o fluido corporal del sujeto y comparando el nivel o actividad de CCN2 en la muestra con un nivel o actividad normal de CCN2 en un sujeto sano.
6. Proteína CCN3 de longitud completa para uso según la reivindicación 1, en donde el nivel o actividad de CCN3 en una muestra de tejido o fluido corporal del sujeto es usada para seguir la progresión de la enfermedad renal, o para determinar la eficacia de la intervención terapéutica, en el sujeto.
- 15 7. Proteína CCN3 de longitud completa para uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde la muestra de fluido corporal es orina, sangre, suero, plasma o lavado peritoneal.
8. Proteína CCN3 de longitud completa para uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en donde el nivel de CCN3 o CCN2 es detectado por un inmunoensayo.
- 20 9. Proteína CCN3 de longitud completa para uso según la reivindicación 2, en donde la fibrosis renal o esclerosis renal está asociada con proliferación celular incrementada.
10. Proteína CCN3 de longitud completa para uso según la reivindicación 9, en donde la proliferación celular da lugar a enfermedad proliferativa glomerular.
- 25 11. Proteína CCN3 de longitud completa para uso según la reivindicación 1, en donde el sujeto se somete a diálisis peritoneal con una solución de diálisis, y la proteína CCN3 de longitud completa se formula para la administración al sujeto en la solución de diálisis.
12. Un método para diagnosticar enfermedad renal en un sujeto, el metodo comprendiendo: detectar el nivel o actividad de CCN3 en una muestra de tejido o fluido corporal del sujeto y comparando el nivel o actividad de CCN3 en la muestra con un nivel o actividad normal de CCN3 en un sujeto sano.
13. El método de la reivindicación 12, en donde la muestra es orina, sangre, suero, plasma o lavado peritoneal.
- 30 14. El método de la reivindicación 12, en donde el nivel de actividad CCN3 es detectado por un inmunoensayo.
15. El método de la reivindicación 14 en donde el inmunoensayo utiliza un anticuerpo específico para CCN3.
16. El método de la reivindicación 15 en donde el anticuerpo es seleccionado de anticuerpos monoclonales o policlonales.
- 35 17. Proteína CCN3 de longitud completa para uso según la reivindicación 1, en donde la proteína CCN3 de longitud completa se formula para la administración al sujeto por administración intramuscular, intravenosa, oral, nasal, tópica o transdérmica, o por inhalación.
18. Un método para diagnosticar enfermedad renal en un sujeto, el método comprendiendo comparar un nivel o actividad de CCN3 con CCN2 en una muestra de tejido o fluido corporal del sujeto para diagnosticar la enfermedad renal.

40

FIG. 1

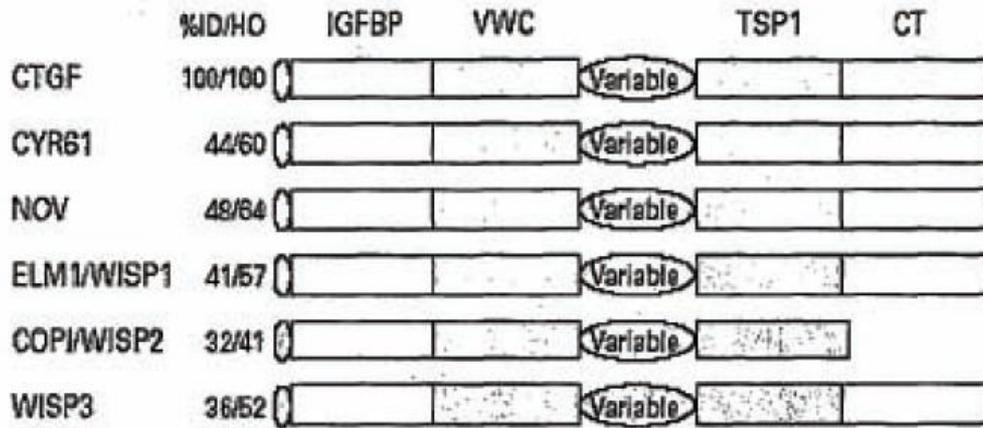


FIG. 2

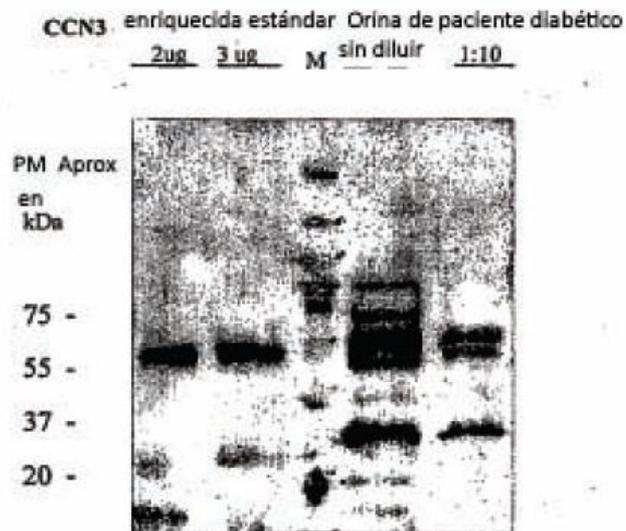


FIG. 3

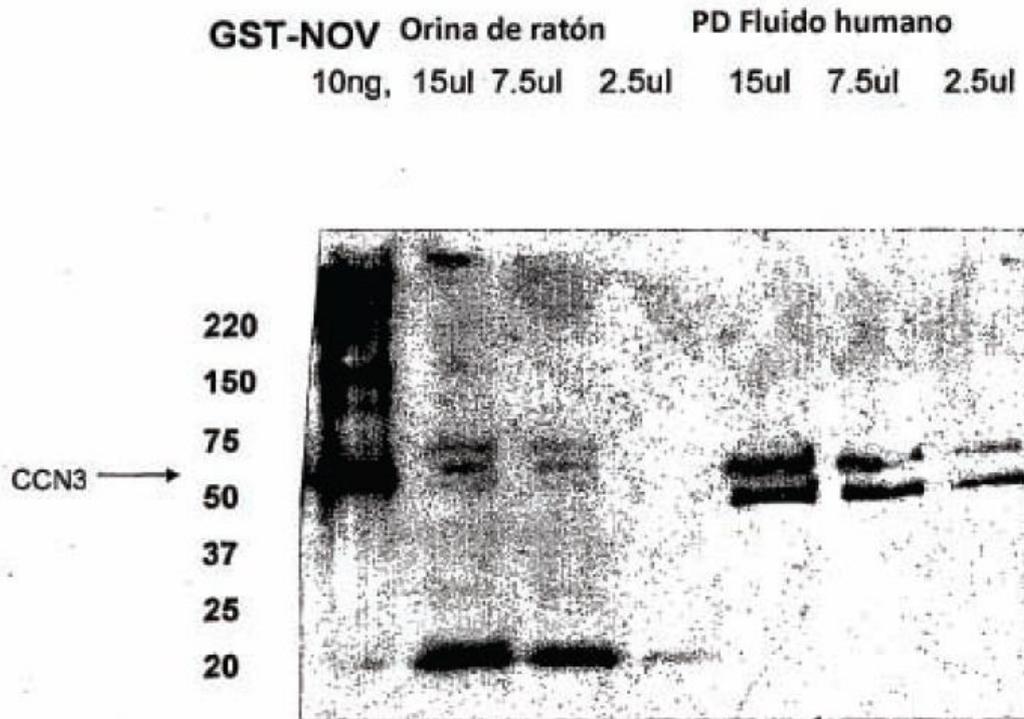


FIG. 4

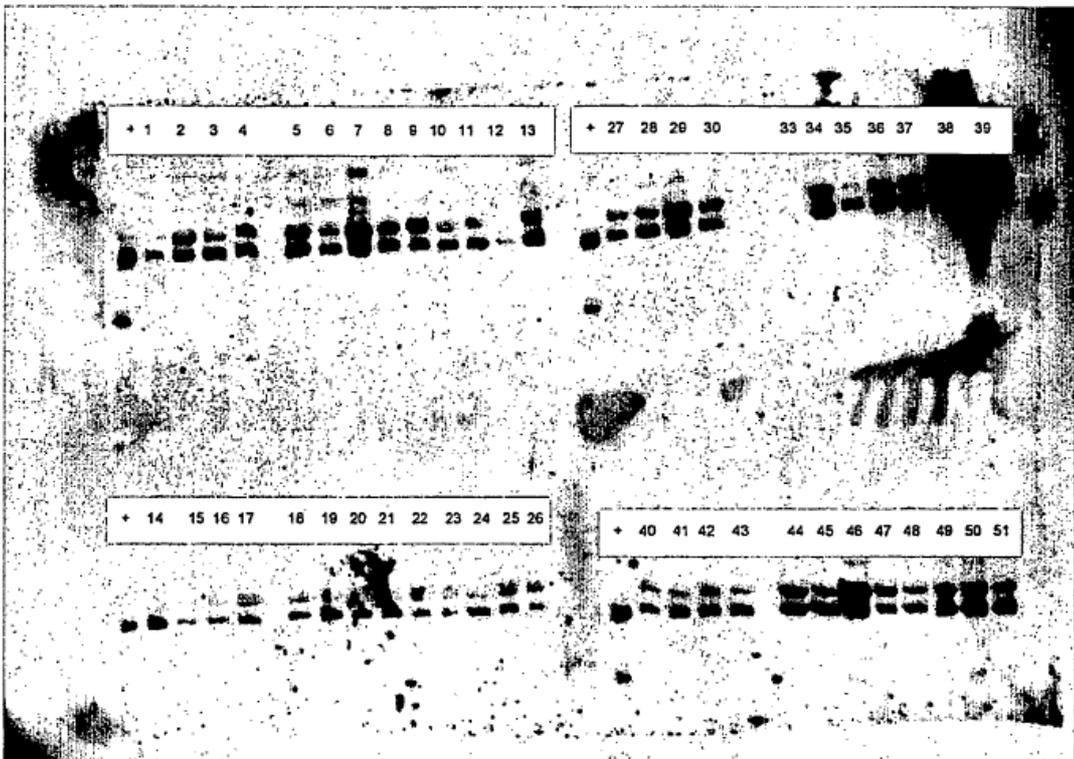


FIG. 5

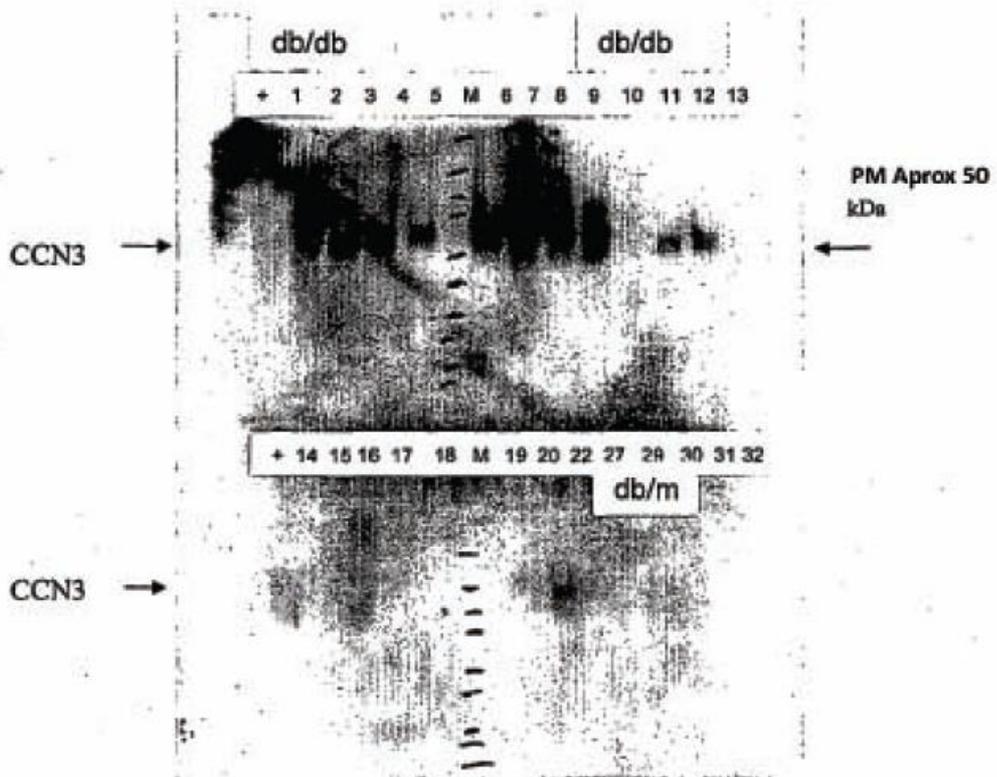
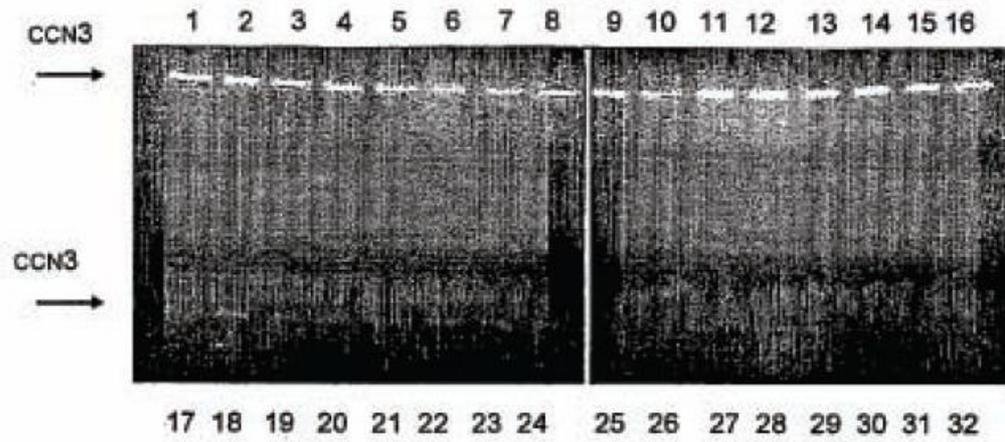
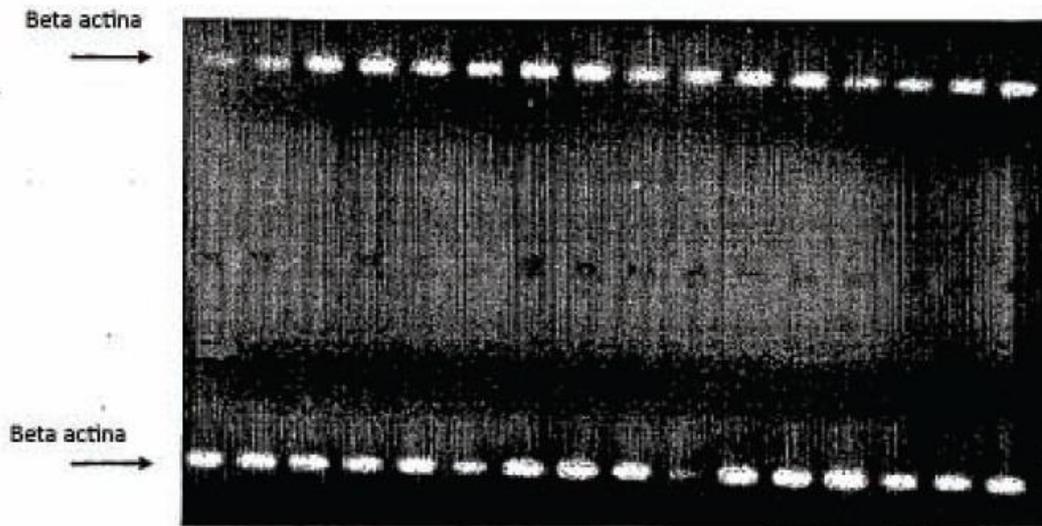


FIG. 6
db/db: Riñón diabético



db/m: riñón no diabético

db/db: riñón diabético



db/m: Riñón no diabético

FIG. 7

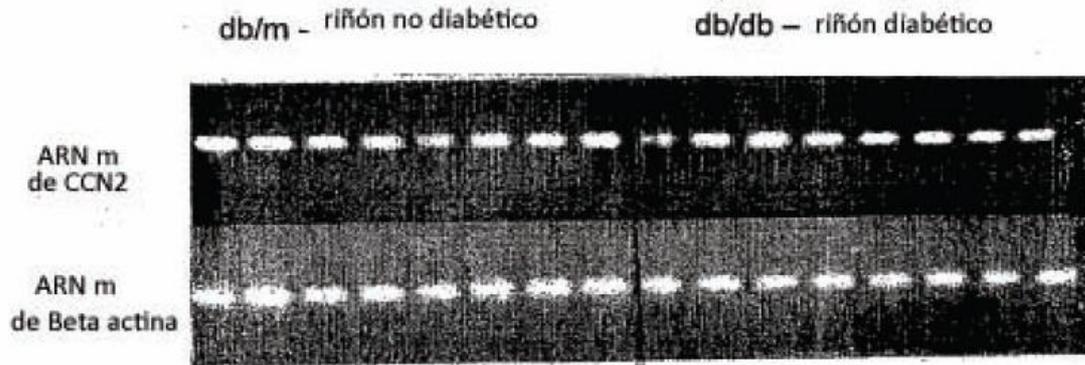


FIG. 8

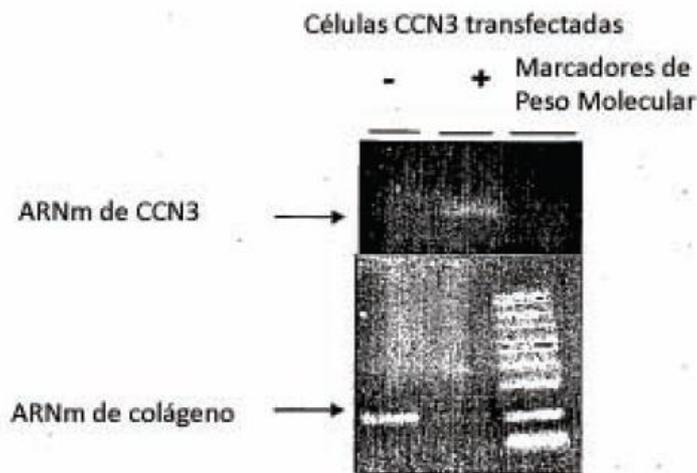


FIG. 9

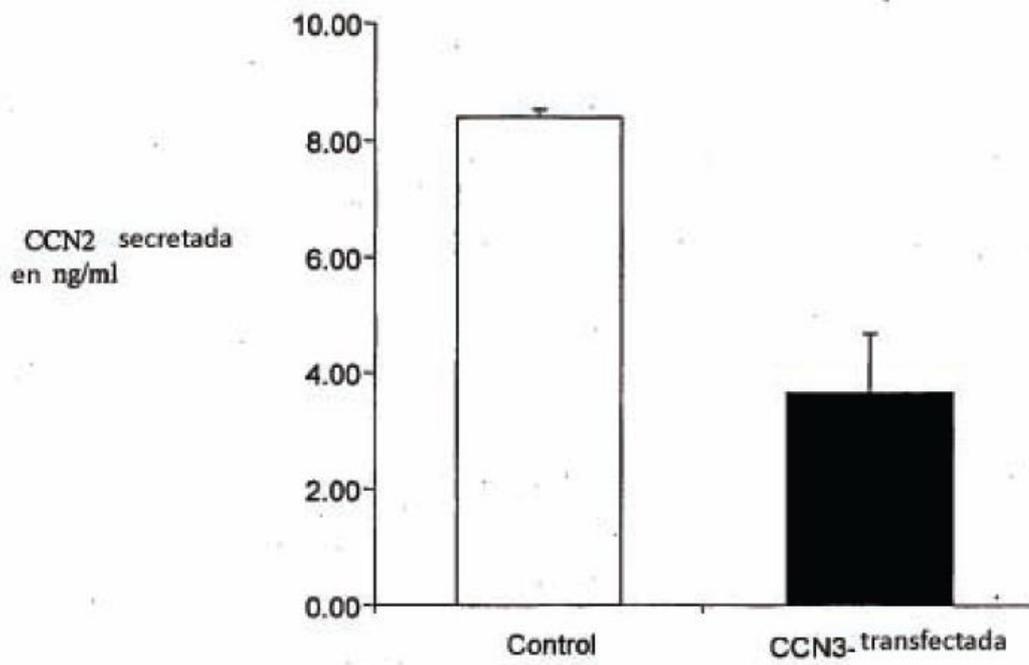


FIG. 10

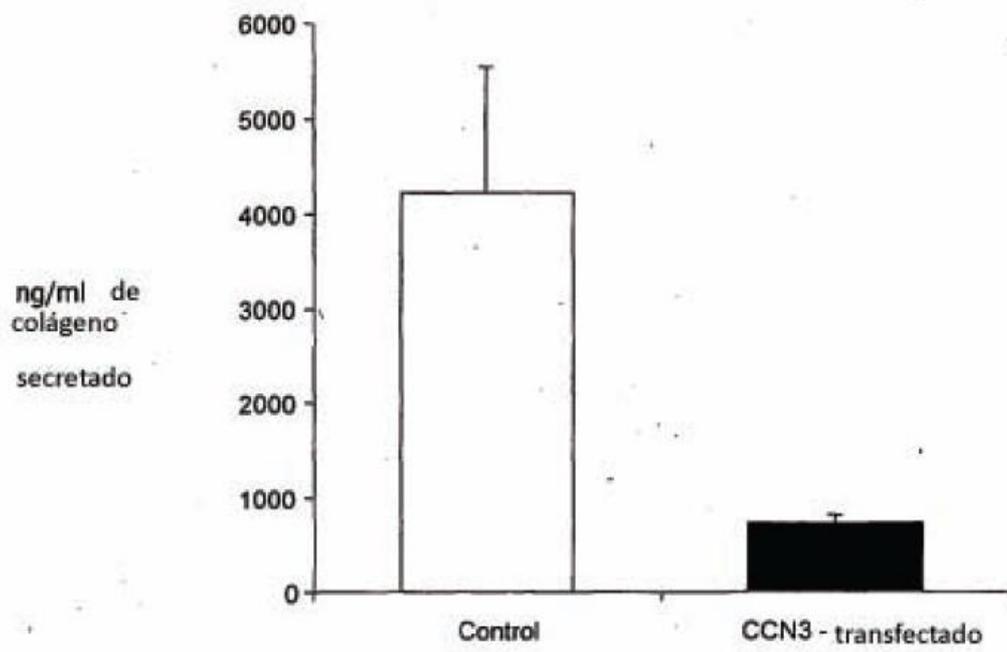


FIG. 11

