

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 039**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2001 E 01956188 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 1263464**

54 Título: **Uso de anticuerpos antagonistas anti-TGF- β para tratar o prevenir la pérdida de función renal**

30 Prioridad:

09.03.2000 US 188060 P

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

13.03.2013

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (50.0%)

One Kendall Square

Cambridge Massachusetts 02139-1562, US y

MCW RESEARCH FOUNDATION (50.0%)

72 Inventor/es:

LEDBETTER, STEVEN R. y

ROMAN, RICHARD J.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 398 039 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

Uso de anticuerpos antagonistas anti-TGF- β para tratar o prevenir la pérdida de función renal.

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece a los campos de la biología molecular y la (pato)biología renal. La presente invención se refiere a la preparación de composiciones farmacéuticas para uso en nuevos métodos para tratar o prevenir la pérdida de función renal por administración de una cantidad eficaz de un antagonista de TGF- β a un individuo, en donde dicho antagonista de TGF- β es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige contra una o más isoformas de TGF- β .

Antecedentes de la invención

10 En los animales vertebrados, el riñón actúa para reabsorber agua y para concentrar y eliminar metabolitos de desecho del sistema circulatorio, así como para regular el pH, el equilibrio de sales y el volumen de la sangre. La pérdida aguda o crónica de función renal, debida a una lesión, una enfermedad o algún trastorno intrínseco, pueda causar una diversidad de complicaciones sistémicas. La insuficiencia renal de fase terminal, tratable sólo mediante diálisis o un trasplante de órgano, puede conducir a la muerte.

15 El riñón se divide macroscópicamente en tres regiones principales, la corteza renal (exterior), la médula renal (interior) y la pelvis renal. Microscópicamente, el riñón está compuesto de millones de nefronas funcionales unitarias embebidas dentro de vastas redes de lechos capilares. Cada nefrona tiene su propio suministro de sangre. La nefrona estructural es un túbulo renal en forma de "U" que atraviesa la corteza y la médula del riñón. La nefrona está compuesta de la cápsula de Bowman, que abarca un haz glomerular de capilares, o glomérulo, y está situada en la
20 corteza renal. El túbulo contorneado proximal va de la cápsula de Bowman a la rama descendente, al asa de Henle y luego a la rama ascendente, todos los cuales están situados en la médula renal e íntimamente asociados con los vasa recta, la región de los capilares peritubulares que reside dentro de la médula renal. La rama ascendente conduce al túbulo contorneado distal, situado en la corteza, que desemboca en conductos colectores que terminan en la pelvis renal.

25 En la apropiada función del riñón están implicados tres procesos fisiológicos: filtración a presión, reabsorción selectiva y secreción tubular, todos los cuales sirven para conservar agua y librar al cuerpo de sales y productos nitrogenados de desecho antes de que alcancen niveles tóxicos.

30 La filtración a presión tiene lugar en la corteza, a través de las delgadas paredes de los capilares del glomérulo. La filtración a presión se refiere al proceso en donde moléculas grandes y elementos formados de la sangre quedan retenidos en el sistema circulatorio, mientras la presión sanguínea glomerular normal (típicamente de aproximadamente 60 mm Hg) fuerza al agua y a moléculas pequeñas (sales y diversos compuestos nutrientes y de desecho) al espacio capsular de Bowman, que es continuo con la luz del túbulo proximal.

35 La reabsorción selectiva tiene lugar en la médula renal, cuando diversos componentes (por ejemplo, agua, glucosa, sodio y cloruro) son activa y pasivamente reabsorbidos de la rama ascendente y descendente delgada del asa de Henle, y de la rama ascendente gruesa del asa de Henle, hasta los vasa recta. La reabsorción selectiva tiene parcialmente lugar como resultado de un complejo sistema a contracorriente en que están implicados capilares de vasa recta y túbulos renales de la médula, de modo que la reabsorción activa de iones de sodio causa una concomitante reabsorción pasiva de iones cloruro y agua, creándose un gradiente de osmolaridad.

40 La secreción tubular es un proceso por el que diversos componentes sanguíneos (por ejemplo, iones hidrógeno y amonio, creatina y diversos fármacos, tal como la penicilina) son activamente secretados desde el sistema circulatorio hasta los túbulos contorneados proximal y distal. A causa del transporte activo de iones hidrógeno, la secreción tubular también regula el pH de la sangre.

45 De este modo, la apropiada función renal produce un producto final de desecho que contiene sustancias retiradas del sistema circulatorio a causa de la filtración a presión a través del glomérulo, la secreción tubular en los túbulos contorneados proximal y distal de la corteza renal, y la reabsorción de (fundamentalmente) agua que tiene lugar en la rama descendente del asa de Henle y el conducto colector medular a causa del mecanismo de concentración de la médula renal.

50 A causa de la función vital que desempeña el riñón en cuanto a mantener una apropiada homeostasia de fluidos corporales, la pérdida de función renal representa un evento que pone en riesgo la vida. Típicamente, las agresiones al riñón inician una respuesta de reparación de heridas. Parte de este mecanismo protector implica reparación y remodelación tisulares. Sin embargo, si no se regula apropiadamente la reparación tisular, se produce fibrosis. Por lo tanto, muchas enfermedades y trastornos renales presentan una concomitante fibrosis del riñón.

La investigación actual relativa a la progresión y el tratamiento de enfermedades y trastornos del riñón se ha centrado en mecanismos para detener la fibrosis en la corteza renal. En seres humanos, el flujo sanguíneo renal es

el más elevado del organismo, con respecto al peso del órgano, y representa la cuarta parte del gasto cardiaco total. La mayor parte del flujo sanguíneo renal se dirige a la corteza para optimizar la filtración glomerular. A causa del papel que desempeña el glomérulo como sitio de filtración a presión, el conocimiento convencional ha impulsado a los investigadores a buscar y desarrollar agentes terapéuticos que detuvieran, o al menos lentificaran, la fibrosis del glomérulo. El TGF- β ha sido un objetivo en el tratamiento de la fibrosis glomerular, y se ha investigado a fondo el uso de antagonistas de TGF- β como posibles agentes terapéuticos para lentificar la progresión de la fibrosis cortical. Sin embargo, no se ha demostrado la asociación entre fibrosis cortical y disfunción renal.

El TGF- β es un miembro de una superfamilia de polipéptidos que controlan el desarrollo y la homeostasis tisular en organismos tan diversos como *Drosophila* y seres humanos (Grande, 1997). El TGF- β desempeña funciones biológicas ubicuas y diversas que van de la producción de energía en las mitocondrias a la regulación del tono vascular y a la diferenciación, proliferación y apoptosis celulares. No obstante, el TGF- β es mejor conocido como una citocina responsable de activar la producción de matriz extracelular, asociada con la reparación de heridas.

Una amplia investigación ha mostrado que el TGF- β desempeña un papel importante en cuanto a inducir una síntesis aumentada y un metabolismo disminuido de proteínas de la matriz extracelular (por ejemplo, fibronectina, colágenos y proteoglicanos) en los glomérulos, lo que conduce a enfermedades glomerulares tales como la esclerosis glomerular. En los glomérulos se encuentra un gran complejo latente de TGF- β , compuesto de péptidos asociados a la latencia (LAP; del inglés, *latency associated peptides*; que en realidad son dominios C-terminales del precursor de TGF- β), TGF- β y una proteína ligante de TGF- β latente (LTBP; del inglés, *latent TGF- β binding protein*) (Mackay et al., 1992).

Se han asociado unos niveles séricos elevados de TGF- β con la esclerosis y la fibrosis glomerulares (Bottinger y Kopp, 1998). Ruiz-Torres et al. (1998) han sugerido que el TGF- β actúa como un factor de crecimiento fibrogénico, que es, al menos parcialmente, responsable de la fibrosis intersticial de la corteza renal asociada con el envejecimiento, y que el tratamiento con captopril, un inhibidor de la enzima conversiva de angiotensina, puede lentificar la progresión de lesiones intersticiales corticales (véase también Wolf, 1998).

Border et al. (1990, 1992a, 1992b, 1994; véanse también Border y Ruoslahti, 1991; Ruoslahti et al., 1993; Ruoslahti y Border, 1993; y Ruoslahti et al., 1998) han comunicado que la glomerulonefritis, una inflamación del riñón caracterizada por la acumulación de matriz extracelular dentro de glomérulos dañados, está asociada con una producción y una actividad aumentadas de TGF- β 1 y que la administración de un antagonista de TGF- β 1 puede suprimir la producción aumentada de matriz extracelular en los glomérulos. Otros han comunicado que se pueden utilizar antagonistas de TGF- β para suprimir el depósito de matriz extracelular y la fibrosis provocados por TGF- β (Dasch et al., 1996; Ferguson et al., 1997; Gotwals et al., 1998; Logan y Baird, 1999; Ruoslahti et al., 1995, 1996, 1997, 1998; Segarini et al., 1997). En el Documento WO 91/19513 se describe el posible uso de antagonistas de TGF- β para el tratamiento de la hipotensión en la insuficiencia renal aguda.

Sin embargo, la fibrosis no es *per se* la causa última de la disfunción renal. En realidad, aunque se cree que el proceso fibrogénico es un factor en la obliteración de los túbulos renales, se desconoce la conexión exacta entre fibrosis renal y el decaimiento de la función renal (Eddy, 1996). De hecho, en el curso de la enfermedad renal progresiva se produce pronto un daño tubular renal. Los posibles agentes causativos de daño tubular incluyen obstrucción tubular, enzimas lisosómicas, metabolitos de oxígeno reactivo, proteínas del complemento, e isquemia (Eddy, 1994).

A pesar de los amplios esfuerzos de investigación anteriormente detallados, no existen un tratamiento y una profilaxis eficaces de la disfunción renal. Se han sugerido agentes anti-TGF- β como posibles agentes terapéuticos en el tratamiento de la fibrosis de la corteza renal, los cuales pueden exacerbar la pérdida de función renal por obliteración de capilares glomerulares. Sin embargo, no se ha comunicado hasta ahora que estos agentes ejerzan impacto alguno sobre la función renal. Además, no están claros los mecanismos exactos de la pérdida inicial y progresiva de la función renal. Por lo tanto, existe en la técnica la necesidad de conocer las causas últimas de la disfunción renal y descubrir y desarrollar eficaces agentes terapéuticos útiles para tratar y prevenir directamente la pérdida de función renal.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los antagonistas de TGF- β son útiles para tratar y prevenir la pérdida de función renal que se produce en el contexto de enfermedades renales agudas y crónicas. Aunque otros estudios han sugerido el uso de agentes anti-TGF- β para tratar una diversidad de trastornos fibroproliferativos (incluyendo los de la corteza renal), ninguno ha proporcionado demostración alguna de que la reducción de la fibrosis ejerciera *per se* impacto alguno sobre la enfermedad asociada. Se describe en la presente memoria la primera demostración de que el antagonismo de TGF- β lentifica eficazmente la progresión del daño renal, por ejemplo, al prevenir la pérdida de circulación vascular renal, reducir la lesión tubular de la médula renal y prevenir la hipertensión sistémica.

Este descubrimiento marca un significativo punto de partida del estado actual de la técnica en cuanto a la

investigación renal terapéutica, que se ha centrado en el tratamiento de la fibrosis cortical (secundaria y sintomática). La fibrosis cortical (por ejemplo, la esclerosis glomerular) ayuda a exacerbar la pérdida de función renal al obstruir físicamente la vasculatura y los túbulos de la corteza renal. Sin embargo, no existe evidencia alguna de que se pueda evitar la disfunción renal mediante un tratamiento para la fibrosis cortical.

5 Por contraste, la presente invención demuestra la importancia de una función medular apropiada y, específicamente, el papel de la lesión hipóxica de los túbulos medulares en el inicio y la progresión de enfermedades y trastornos del riñón. Este descubrimiento respalda la visión de que una circulación renal comprometida es fundamental para el inicio de trastornos renales agudos y crónicos. La salud renal es finalmente una función de la circulación renal y la integridad tubular. La fibrosis renal se ve como una consecuencia independiente (y quizá secundaria) de (y con los
10 subsiguientes efectos agravantes sobre) una función capilar y tubular reducida. Como resultado, los tratamientos eficaces para la enfermedad renal han de centrarse en mantener la integridad circulatoria y tubular del riñón.

Aunque el TGF- β es mejor conocido como una citocina responsable de activar la producción de matriz extracelular, asociada con la reparación de heridas, y aunque sigue siendo la primera citocina fibrogénica de estudio en cuanto a la fibrosis glomerular en particular, presenta funciones biológicas ubicuas y diversas. La presente invención enseña
15 que el TGF- β desempeña *per se* un significativo papel en la función renal, al margen de su papel en los estados fibroproliferativos corticales, y demuestra que los antagonistas de TGF- β actúan como agentes terapéuticos eficaces previniendo la pérdida de función renal al mantener una circulación adecuada, especialmente en la médula renal.

Por lo tanto, un objeto de la presente descripción es proporcionar un método para tratar una enfermedad o trastorno del riñón, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un antagonista de TGF- β a un
20 individuo aquejado de dicha enfermedad.

En un aspecto relacionado de la presente descripción, un objeto es proporcionar el uso de un antagonista de TGF- β para la preparación de una composición farmacéutica útil para tratar una enfermedad o trastorno del riñón como se describe en esta memoria.

Otro objeto de la descripción es que se utilice un antagonista de TGF- β para mantener la función renal o para
25 lentificar, detener, prevenir o invertir la pérdida de función renal, específicamente de la médula renal, y, más específicamente, preservar la integridad vascular y tubular de la médula renal. Los casos preferidos de la presente descripción incluyen la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un antagonista de TGF- β para mantener y regular unos niveles deseables para la presión sanguínea sistémica y el flujo sanguíneo medular, o para reducir o inhibir la proteinuria, la fibrosis medular, la isquemia medular, la hipertensión sistémica y/o la lesión tubular hipóxica y la necrosis de la médula en grados suficientes para mantener la función renal.
30

Los antagonistas de TGF- β de la presente descripción incluyen cualquier molécula que es capaz de disminuir la cantidad o actividad de TGF- β , sea dentro de una célula o sea dentro de un sistema fisiológico. Los antagonistas de TGF- β de la presente descripción también incluyen cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula capaz de disminuir la cantidad o actividad de TGF- β . Preferiblemente, los antagonistas de TGF- β incluyen:
35 anticuerpos dirigidos contra una o más isoformas de TGF- β ; receptores de TGF- β y fragmentos solubles de los mismos; anticuerpos dirigidos contra receptores de TGF- β ; péptido asociado a la latencia; TGF- β latente grande; proteoglicanos que inhiben TGF- β , tales como fetuina, decorina, biglicano, fibromodulina, lumicano y endogлина; somatostatina; manosa-6-fosfato; manosa-1-fosfato; prolactina; factor II de crecimiento de tipo insulina; IP-10; péptidos que contienen arg-gly-asp; extractos de plantas, hongos o bacterias; oligonucleótidos antisentido; proteínas implicadas en la señalización de TGF- β , incluyendo SMADs, MADs, Ski y Sno; y cualesquier mutantes, fragmentos o derivados de las moléculas anteriormente identificadas, que conserven la capacidad para inhibir la actividad de TGF- β . Más preferiblemente, el antagonista de TGF- β es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado que bloquea la unión de TGF- β con su receptor [o fragmentos del mismo tales como fragmentos F(ab)₂, fragmentos Fv, anticuerpos de cadena única y otras formas de "anticuerpos" que conservan la capacidad para unirse a TGF- β]. Muy
45 preferiblemente, el anticuerpo monoclonal es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal murino obtenido del hibridoma 1D11.16 (nº de acceso de la ATCC: HB 9849).

Basándose en la descripción contenida en esta memoria, la presente invención proporciona el uso de un antagonista de TGF- β para la preparación de una composición farmacéutica para reducir la hipertensión sistémica, mantener el flujo sanguíneo medular, reducir la pérdida de función medular renal o reducir la lesión tubular hipóxica en un individuo que padece, o es potencialmente susceptible de padecer, pérdida de función renal, en donde dicho antagonista de TGF- β es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige contra una o más isoformas de TGF- β .
50

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un antagonista de TGF- β para uso en la reducción de la hipertensión sistémica, mantenimiento del flujo sanguíneo medular, reducción de la pérdida de función medular renal o reducción de la lesión tubular hipóxica en un individuo que padece, o es potencialmente susceptible de padecer, pérdida de función renal, en donde dicho antagonista de TGF- β es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige contra una o más isoformas de TGF- β .
55

En un aspecto más, la presente invención proporciona el uso de un antagonista de TGF- β para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o lentificar la progresión del daño renal asociado con una enfermedad o trastorno del riñón seleccionada del grupo que consiste en nefropatía obstructiva, enfermedad renal poliquística, nefroesclerosis y nefrocalcinosis, en donde dicho antagonista de TGF- β es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige contra una o más isoformas de TGF- β .

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un antagonista de TGF- β para uso en el tratamiento o la lentificación de la progresión del daño renal asociado con una enfermedad o trastorno del riñón seleccionada del grupo que consiste en nefropatía obstructiva, enfermedad renal poliquística, nefroesclerosis y nefrocalcinosis, en donde dicho antagonista de TGF- β es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige contra una o más isoformas de TGF- β .

En las reivindicaciones adjuntas se exponen otros aspectos y realizaciones de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona micrografías histológicas ópticas comparativas de cortes de glomérulos (ilustraciones A y B) y de médula renal (ilustraciones C y D) teñidos con PAS, preparados a partir de ratas Dahl S no tratadas (ilustraciones A y C) y tratadas con anti-TGF- β (ilustraciones B y D), alimentadas con una dieta con alto contenido de sal.

La Figura 2 representa los efectos de intervención precoz de una terapia con Ab anti-TGF- β , sobre la excreción de proteína (a) y albúmina (b) en ratas Dahl S alimentadas con una dieta con alto contenido de sal (AS).

Descripción detallada de la invención

Se describe en esta memoria el primer informe que describe el uso eficaz de antagonistas de TGF- β para lentificar la progresión del daño renal que, de lo contrario, se produciría durante la enfermedad renal crónica. Como se demuestra en esta memoria, los antagonistas de TGF- β son útiles para prevenir y reducir la pérdida de circulación vascular renal, la lesión tubular de la médula renal y la hipertensión sistémica. Basándose en estudios previos sobre el desarrollo de glomeruloesclerosis en un modelo de animal hipertenso, una idea convencional en la técnica es que el daño cortical es la causa próxima de la pérdida de función renal. En esta memoria se presenta por vez primera el inesperado descubrimiento de que los índices de hipertrofia cortical y lesión glomerular entre un grupo de animales hipertensos tratado con un antagonista de TGF- β y un grupo testigo no tratado no son significativamente diferentes (a pesar de una significativa reducción de proteinuria mostrada por el grupo de ensayo). Sin embargo, los animales tratados con anti-TGF- β presentaban inesperadamente una presión arterial media significativamente menor, una fibrosis significativamente menor de los vasa recta, una lesión tubular medular significativamente menor, una necrosis tubular medular significativamente menor y un flujo sanguíneo medular significativamente mayor en comparación con los animales testigo.

Como se describió anteriormente, la función renal se lleva a cabo a través de los procesos de filtración a presión, reabsorción selectiva y secreción tubular, todos los cuales son muy dependientes de la integridad de cada nefrona en estrecha asociación con la vasculatura circundante. El sistema a contracorriente de la médula renal, que es responsable del proceso de reabsorción selectiva, tiene lugar en un ambiente medular localizado con poco oxígeno (hipóxico). Para una función renal apropiada es crítica una rigurosa correspondencia entre suministro y demanda de oxígeno mediante una precisa regulación del flujo sanguíneo medular y el sistema tubular (Brezis y Rosen, 1995). En seres humanos, la presión parcial medular de oxígeno varía de aproximadamente 10 a 20 mm Hg, mientras que la presión parcial cortical de O₂ es aproximadamente 50 mm Hg (Brezis et al., 1991, 1994a y 1994b). Sin embargo, la hipoxia medular plantea una amenaza constante para la integridad celular y hace a la médula muy sensible a una lesión, especialmente si está dañado el delicado equilibrio de oxígeno en la médula.

La lesión hipóxica medular se caracteriza típicamente por una isquemia medular y una necrosis tubular, especialmente en el asa ascendente gruesa de Henle, muy metabólicamente activa. Además, las condiciones anaeróbicas y la anoxia en la médula facilitan la fibrosis de los vasa recta. El presente descubrimiento resalta la importancia de una apropiada función medular y, específicamente, el papel que la lesión hipóxica medular desempeña en el inicio y la progresión de enfermedades y trastornos del riñón. Este descubrimiento respalda la visión de que una circulación renal comprometida y una lesión tubular son fundamentales para el inicio de trastornos renales agudos y crónicos.

La presente descripción se dirige a un método para tratar o lentificar la progresión del daño renal asociado con una enfermedad o trastorno del riñón, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un antagonista de TGF- β a un individuo que padece dicha enfermedad o trastorno. La presente descripción también se dirige al uso de un antagonista de TGF- β para la preparación de una composición farmacéutica útil para tratar o lentificar la progresión del daño renal asociado con una enfermedad o trastorno del riñón como se describe en esta memoria. En un caso, la enfermedad o el trastorno del riñón es crónico. En otro caso, la enfermedad o el trastorno del riñón son agudos.

- Las enfermedades o trastornos del riñón incluyen cualquier enfermedad o trastorno agudo o crónico que comprometa la circulación renal, cause lesión tubular o, en cualquier caso, cause una disminución de la función renal. Una gran variedad de enfermedades o trastornos pueden provocar patologías renales, incluyendo trastornos reumáticos/inmunológicos, trastornos genéticos/metabólicos, trastornos hematológicos/oncológicos, trastornos infecciosos, lesión por radiación, cirugía renal, litotricia, y trastornos provocados por fármacos o toxinas/nefrotóxicos. Dichas enfermedades o trastornos incluyen, pero no se limitan a, nefropatía diabética (tipo I y tipo II), nefropatía obstructiva, enfermedad renal hereditaria (por ejemplo, enfermedad renal poliquística, riñón de médula esponjosa y riñón en herradura), glomerulonefritis, nefrosclerosis, nefrocalcinosis, lupus sistémico, síndrome de Sjogren, hipertensión, nefropatía tubulointersticial, acidosis tubular renal, tuberculosis renal e infarto renal.
- Como se emplea en esta memoria, "tratamiento o lentificación de la progresión del daño renal" se refiere, en general, a cualquier proceso que actúa para lentificar, detener (incluyendo parar el comienzo inicial) o invertir la pérdida de función renal.
- Como se emplea en esta memoria, la pérdida de función renal (o del riñón) se refiere a cualquier alteración o disfunción fisiológica de la función renal normal de un animal. Para los fines de esta descripción, que incluye la invención, las meras anomalías estructurales (por ejemplo, la fibrosis) del riñón no son *per se* consideradas disfunciones renales ni una enfermedad o trastorno del riñón. La pérdida de función renal se refiere específicamente a la disminución de la filtración a presión, la reabsorción selectiva o la secreción tubular del riñón. La pérdida de función renal incluye, pero no se limita a, hipoperfusión medular; hipoxia medular; incluyendo lesión tubular hipóxica, necrosis tubular, formación de cilindros proteicos y obstrucción tubular, y otras manifestaciones que reducen el flujo tubular; así como manifestaciones que reducen el flujo sanguíneo medular, tales como isquemia y otra lesión de los vasa recta.
- Como se emplea en esta memoria, una "composición farmacéutica" se refiere a cualquier composición que contiene una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o más ingredientes activos (por ejemplo, un antagonista de TGF- β) en combinación con uno o más vehículos y/o aditivos farmacéuticos. La determinación de adecuados vehículos y/o aditivos farmacéuticos útiles para una composición farmacéutica, así como la forma, formulación y dosificación de dicha composición, está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.). Los vehículos y/o aditivos pueden incluir, pero no se limitan a, excipientes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes espesantes, lubricantes, vehículos acuosos, vehículos oleosos, agentes dispersivos, conservantes, y agentes para proporcionar isotonicidad, tamponamiento, solubilización, sedación y/o estabilización. La proporción de ingrediente(s) activo(s) en una composición farmacéutica de la presente descripción puede ser apropiadamente determinada por una persona experta en la técnica basándose en, por ejemplo, el individuo, la edad y el peso corporal del individuo, el estado clínico del individuo, el periodo de administración, la forma de dosificación, el método de administración y la combinación de componentes activos, entre otros factores. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente descripción es de poca toxicidad y puede ser usada de forma segura en vertebrados, más preferiblemente en mamíferos, y muy preferiblemente en seres humanos.
- Como se emplea en esta memoria, una "cantidad farmacéuticamente eficaz" es una cantidad eficaz para alcanzar el deseado resultado fisiológico en un sujeto. Específicamente, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un antagonista de TGF- β es una cantidad suficiente para disminuir la cantidad o actividad de TGF- β durante un periodo de tiempo suficiente para mejorar uno o más de los procesos patológicos asociados con la pérdida de función renal. La cantidad eficaz puede variar dependiendo del específico antagonista de TGF- β seleccionado, y también depende de una diversidad de factores y condiciones relacionados con el sujeto que se va a tratar y con la gravedad del trastorno (por ejemplo, la edad, el peso y la salud del paciente, así como las curvas de dosis-respuesta y los datos de toxicidad). La determinación de una cantidad farmacéuticamente eficaz para un agente dado está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.
- La "administración" a un individuo no se limita a un sistema de distribución particular y puede incluir, sin limitación, las administraciones parenteral (incluyendo las inyecciones subcutánea, intravenosa, intramedular, intraarticular, intramuscular e intraperitoneal), rectal, tópica, transdérmica y oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones o tabletas). La administración a un individuo puede tener lugar en una sola dosis o en administraciones repetidas, y en cualquiera de una diversidad de formas salinas fisiológicamente aceptables, y/o con un vehículo y/o aditivo farmacéutico aceptable como parte de una composición farmacéutica (previamente descrita). Una vez más, las formas salinas fisiológicamente aceptables y las técnicas estándares para formulaciones farmacéuticas son bien conocidas por las personas expertas en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.). La administración de un antagonista de TGF- β a un individuo puede ser también por medio de terapia génica, mediante la cual se administra una secuencia de ácido nucleico que codifica el antagonista al paciente *in vivo* o a células *in vitro* que son luego introducidas en el paciente, y se produce el antagonista por expresión del producto codificado por la secuencia de ácido nucleico. Los métodos de terapia génica para suministrar antagonistas de TGF- β son además bien conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica (véase, por ejemplo, Border, 1996).
- Como se emplea en esta memoria, "individuo" se refiere a cualquier vertebrado que padece, o es potencialmente

susceptible de padecer, pérdida de función renal, incluyendo cualquier enfermedad o trastorno del riñón como los definidos en esta memoria. Las ratas Dahl S, bien conocidas y utilizadas en la técnica para el estudio de la disfunción renal y la hipertensión sensible a la sal, se describen específicamente en esta memoria sólo como un modelo animal representativo y no se debería considerar que restringen el alcance de esta descripción, que incluye la invención. Estudios previos indican que las ratas Dahl S presentan muchos rasgos asociados con la hipertensión sensible a la sal en seres humanos. Las ratas Dahl S son sensibles a la sal, resistentes a la insulina e hiperlipidémicas y presentan una forma de hipertensión con bajos niveles de renina que es resistente a inhibidores de la enzima conversiva pero responde bien al tratamiento con diuréticos y agentes bloqueadores del canal de Ca^{++} . Las ratas Dahl S también desarrollan rápidamente una intensa proteinuria, glomerulosclerosis y enfermedad renal tubulointersticial durante el desarrollo de la hipertensión que progresa hasta la enfermedad renal de fase terminal. Las lesiones glomerulares que se desarrollan se parecen a las vistas en pacientes humanos con glomerulosclerosis provocada por hipertensión y por diabetes.

Como se emplea en esta memoria, "TGF- β " se refiere a todas las isoformas de TGF- β . Actualmente hay 5 isoformas conocidas de TGF- β (1-5), todas las cuales son homólogas (identidad de 60-80%) y todas las cuales forman homodímeros de aproximadamente 25 kDa y actúan sobre receptores celulares de TGF- β comunes (Tipos I, II y III). La biología genética y molecular del TGF- β es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Roberts, 1998; Wrana, 1998).

Como se emplea en esta memoria, un "antagonista de TGF- β " es cualquier molécula que es capaz de disminuir la cantidad o actividad de TGF- β , sea dentro de una célula o sea dentro de un sistema fisiológico. Preferiblemente, el antagonista de TGF- β actúa para disminuir la cantidad o actividad de un TGF- β 1, 2 ó 3 de mamífero. Por ejemplo, un antagonista de TGF- β puede ser una molécula que inhiba la expresión de TGF- β a nivel de transcripción, traducción, procesamiento o transporte; puede afectar a la estabilidad de TGF- β o a la conversión de la molécula precursora en la forma activa y madura; puede afectar a la capacidad de TGF- β para unirse a uno o más receptores celulares (por ejemplo, de Tipo I, II o III); o puede interferir en la señalización de TGF- β .

En la técnica se conoce bien diversos antagonistas de TGF- β y métodos para su producción, y muchos más están actualmente bajo desarrollo (véase, por ejemplo, Dennis y Demetriou, 1998). El específico antagonista de TGF- β empleado no es una característica limitante; cualquier antagonista eficaz de TGF- β como se define en esta memoria puede ser útil en los métodos y composiciones de esta descripción. Preferiblemente el antagonista de TGF- β es un antagonista de TGF- β 1, TGF- β 2 o TGF- β 3. Muy preferiblemente, el antagonista es un antagonista de TGF- β 1.

Los ejemplos de antagonistas de TGF- β incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra una o más isoformas de TGF- β (Dasch, et al., 1996; Thompson et al., 1997 y 2000); receptores de TGF- β o anticuerpos dirigidos contra receptores de TGF- β (Segarini et al., 1997; Lin et al., 1999a; Lin et al., 1999b; Lin et al., 2000; Iwata et al., 1992; Lin et al., 1993; Ruoslahti et al., 1995; y Gotwals et al., 1998); péptido asociado a la latencia (Levinson et al., 1991); TGF- β latente grande (Heldin et al., 1994); fetuína (Dennis y Demetriou, 1998); decorina y otros proteoglicanos tales como biglicano, fibromodulina, lumicano y endogлина (Ruoslahti y Yamaguchi., 1996; Ruoslahti et al., 1997; Ruoslahti et al., 1998; Ruoslahti et al., 1998; Border, 1998; Letarte et al., 1998; Letarte et al., 2000; Border y Ruoslahti, 1991; Ruoslahti y Yamaguchi, 1991; Ruoslahti et al., 1993; y Letarte et al., 1994); somatostatina (Culler y Kasprzyk, 1998); manosa-6-fosfato o manosa-1-fosfato (Ferguson, 1996); prolactina (Mcperson y Richards, 1997); factor II de crecimiento de tipo insulina (Jeffrey y Gosiewska, 1998); IP-10 (Luster y Leder, 1997); péptidos que contienen arg-gly-asp (Pfeffer, 1999; Ruoslahti y Border, 1993); extractos de plantas, hongos y bacterias (Aoki et al., 1993; Mayumi et al., 1996; y Matsunaga et al., 1997); oligonucleótidos antisentido (Chung, 1997; Fakhrai et al., 1998; Dzau, 1998; Dzau, 1999; y Schlingensiepen et al., 1994); proteínas implicadas en la señalización de TGF- β , incluyendo SMADs y MADs (Okazaki y Kitamura, 1998; Donahoe y Wang, 1997; Goldstein, 1997; Matsumoto e Irie, 1998; Ni et al., 1998; Wrana et al., 1998; Gimeno y Falb, 1998; Nakao et al., 1998; Verschueren et al., 1998; Miyazono y Kawabata, 1998; Whitman y Chen, 1998; Grinnell et al., 1999; Falb, 1998; Falb y Gimeno, 1998; y Gimeno y Falb, 1999), Ski y Sno (Vogel 1999; y Stroschein et al., 1999); y cualesquier mutantes, fragmentos o derivados de las moléculas anteriormente identificadas, que conserven la capacidad para inhibir la actividad de TGF- β .

En un caso preferido de esta descripción, por ejemplo, en una realización preferida, el antagonista de TGF- β es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado que bloquea la unión de TGF- β con su receptor, o es seleccionado de entre fragmentos del mismo tales como fragmentos F(ab)₂, fragmentos Fv, anticuerpos de cadena única y otras formas de "anticuerpos" que conservan la capacidad para unirse a TGF- β . En un caso, por ejemplo, en una realización, el antagonista de TGF- β es un anticuerpo humano producido mediante presentación en fago (Thompson et al., 2000). En un caso más preferido, por ejemplo, una realización más preferida, el anticuerpo monoclonal es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal murino obtenido del hibridoma 1D11.16 (nº de acceso de la ATCC: HB 9849; como describen Dasch et al., 1996, 1998a y 1998b).

Los mutantes, variantes, derivados y compuestos análogos del susodicho antagonista de TGF- β pueden también resultar útiles en los métodos de esta descripción. Como se emplean en esta memoria, "mutantes, variantes, derivados y compuestos análogos" se refieren a moléculas con una forma o estructura similar a la del compuesto parental y que conservan la capacidad para actuar como antagonistas de TGF- β . Por ejemplo, cualquiera de los

antagonistas de TGF- β descritos en esta memoria puede ser cristalizado, y se pueden diseñar racionalmente compuestos análogos útiles basándose en las coordenadas responsables de la forma de el(los) sitio(s) activo(s). Alternativamente, el técnico normalmente experto puede, sin una experimentación excesiva, modificar los grupos funcionales de un conocido antagonista y explorar dichas moléculas modificadas en cuanto a una actividad, semivida o biodisponibilidad aumentadas u otras características deseables. Cuando el antagonista de TGF- β es un polipéptido, se pueden producir fragmentos y modificaciones del polipéptido para aumentar la facilidad de suministro, la actividad, la semivida, etc. (por ejemplo, anticuerpos humanizados o fragmentos funcionales de anticuerpo, como se discutió anteriormente). Dado el nivel de experiencia en la técnica de producción de polipéptidos sintéticos y recombinantes, dichas modificaciones se pueden llevar a cabo sin una experimentación excesiva.

Habiéndose ahora descrito la presente invención con detalle, la misma será más claramente entendida por referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen con fines de ilustración.

EJEMPLO 1: Un modelo animal de rata Dahl S con una dieta con alto contenido de sal, tratado con un antagonista de TGF- β

Ciertos estudios indican que la producción renal de TGF- β puede ser estimulada mediante elevaciones en la ingestión dietética de sal (Ying y Sanders, 1998b; Yu et al., 1998; Tamaki et al., 1996). Para estudiar los efectos profilácticos de un antagonista de TGF- β sobre el desarrollo de hipertensión y disfunción renal, se alimentaron ratas Dahl S con una dieta con alto contenido de sal (NaCl al 8,0%) como un modelo animal para la hipertensión y la lesión renal. Como se discutió previamente, la rata Dahl sensible a la sal (Dahl S), que desarrolla hipertensión y lesiones renales cuando se estimula con una dieta con alto contenido de sal, es bien conocida y es utilizada en la técnica como un modelo para trastornos renales crónicos (véase, por ejemplo, Karlsen et al., 1997).

Se alimentaron machos de rata Dahl SS/Jr (obtenidos de una colonia mantenida en el Medical College of Wisconsin) con una dieta con bajo contenido de sal (NaCl al 0,1%) hasta las nueve semanas de edad para mantener una presión sanguínea normal y minimizar la lesión renal.

A las nueve semanas de edad, se cambió la dieta de los animales (~ 250 a 300 g) a un alto contenido de sal (NaCl al 8%) durante tres semanas (con agua proporcionada *ad libitum*). A las diez semanas de edad, los animales fueron divididos en tres grupos de tratamiento: los animales del grupo I recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) de anticuerpo 1D11.16 anti-TGF- β (Genzyme Corporation, Framingham, Massachusetts, EE.UU.), en una dosis de 5,0 mg/kg cada dos días durante dos semanas; los animales del grupo II recibieron una dosis de 0,5 mg/kg de anticuerpo 1D11 anti-TGF- β cada dos días durante dos semanas; y un grupo testigo de animales recibió una dosis de 5,0 mg/kg de un anticuerpo testigo cada dos días durante dos semanas. El anticuerpo testigo era un anticuerpo IgG1 monoclonal murino anti-verotoxina (mAb 13C4, Genzyme Corporation, Framingham, Massachusetts, EE.UU.). Para los fines del análisis estadístico, se reunieron los datos de los dos grupos de ensayo y se compararon con los del grupo testigo.

EJEMPLO 2: Efectos de un antagonista de TGF- β sobre la presión arterial media (MAP)

Para demostrar la eficacia de un antagonista de TGF- β en cuanto a mantener una apropiada presión sanguínea sistémica en un modelo animal con hipertensión inducida, se controló la presión arterial de las ratas Dahl S sometidas al régimen de tratamiento descrito en el Ejemplo 1.

Durante la semana dos de la dieta con alto contenido de sal, los animales objetivo fueron anestesiados con una inyección intramuscular (i.m.) de ketamina (40 mg/kg), xilazina (2,5 mg/kg) y acepromazina (0,6 mg/kg). Se insertó un catéter permanente en la arteria femoral para la medición continua de la presión arterial media (MAP; del inglés, mean arterial pressure). El catéter fue conducido subcutáneamente hasta la parte posterior del cuello, alimentado a través de un botón de malla de Dacron suturado debajo de la piel, conducido por medio de un muelle de acero inoxidable que estaba conectado a un pieza giratoria (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, Pennsylvania, EE.UU.), y montado encima de la jaula del animal para permitir el libre movimiento de los animales dentro de sus jaulas.

Los animales se recuperaron de la cirugía durante una semana. Durante la semana tres, se registraron diariamente (con una frecuencia de muestreo de 100 Hz) la MAP y la frecuencia cardíaca (HR; del inglés, heart rate) de los animales conscientes y activos, durante cuatro días consecutivos entre la 1:00 h y las 5:00 h de la tarde. Se promediaron la frecuencia cardíaca y las presiones arteriales sistólica, diastólica y media a lo largo de intervalos de 1 minuto. Se calcularon los valores diarios medios individuales. Se utilizaron los promedios diarios para calcular un valor medio global para cada animal durante el periodo de registro de 4 días.

Se calcularon los valores medios [\pm 1 error estándar de la media (SEM; del inglés, standard error of mean)]. Utilizando un análisis de varianza seguido de una prueba de rango múltiple de Duncan, se analizó la significación de las diferencias en los valores medios entre el grupo testigo y el tratado con anticuerpo anti-TGF- β . Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

La MAP del grupo testigo alcanzó un promedio de 190 ± 4 mm Hg ($n = 12$). No hubo diferencia significativa alguna

entre la MAP de los animales tratados con una dosis baja (0,5 mg/kg) de anticuerpo anti-TGF- β y la MAP de los animales tratados con una dosis alta (5,0 mg/kg). La MAP global alcanzó un promedio de 177 ± 3 mm Hg ($n = 17$) en el grupo de ensayo. La MAP de los animales de ensayo fue significativamente menor que la MAP de los animales testigo.

- 5 Estos resultados demuestran que el tratamiento con un antagonista de TGF- β reduce significativamente la hipertensión en un modelo de animal hipertenso.

EJEMPLO 3: Medición de la proteinuria y del aclaramiento plasmático y urinario de creatinina

10 Para demostrar los efectos de un tratamiento con anti-TGF- β sobre el aclaramiento urinario de proteína en un modelo animal sometido a agresión renal, se recogieron muestras de orina de la noche de ratas Dahl S sometidas al régimen de tratamiento descrito en el Ejemplo 1, al final de la semana tres de la dieta de 3 semanas con alto contenido de sal, y se examinaron las muestras en cuanto a proteinuria y aclaramiento urinario de creatinina.

Se calcularon los valores medios (± 1 SEM). Utilizando un análisis de varianza seguido de una prueba de rango múltiple de Duncan, se analizó la significación de las diferencias en los valores medios entre el grupo testigo y el tratado con anticuerpo anti-TGF- β . Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

- 15 La proteinuria de los animales testigo alcanzó un promedio de 226 ± 20 mg/día ($n = 12$). Sin embargo, la proteinuria de los animales tratados con anticuerpo anti-TGF- β alcanzó un promedio de 154 ± 16 mg/día ($n = 20$), significativamente menor que la del grupo testigo.

20 Por contraste, no se observó diferencia significativa alguna en la concentración plasmática de creatinina ni en el aclaramiento urinario de creatinina entre los grupos experimental y testigo. La concentración plasmática de creatinina alcanzó un promedio de $0,9 \pm 0,15$ mg/dl ($n = 11$) en el grupo testigo y alcanzó un promedio de $1,28 \pm 0,23$ ($n = 16$) en los animales tratados con anticuerpo anti-TGF- β . Ambos valores están elevados en comparación con los valores normales de $0,52 \pm 0,06$ mg/dl ($n = 16$) medidos en un grupo testigo de ratas Brown Norway resistentes a la sal, alimentadas durante tres semanas con una dieta con alto contenido de sal. El aclaramiento de creatinina alcanzó un promedio de $0,40 \pm 0,08$ ml/min/kg de peso ($n = 7$) en los animales testigo y de $0,35 \pm 0,07$ ml/min/kg de peso ($n = 8$) en los animales tratados con el anticuerpo anti-TGF- β .

Estos resultados demuestran la eficacia de un antagonista de TGF- β para reducir significativamente *in vivo* la excreción proteica urinaria asociada con un daño renal.

30 A pesar de la significativa reducción de la excreción urinaria de proteína, los índices de función glomerular (concentración plasmática de creatinina y aclaramiento de creatinina) no fueron significativamente diferentes entre el grupo testigo y el grupo tratado con el antagonista de TGF- β .

35 Estos resultados son muy inesperados a la vista de la evidencia científica actual que correlaciona expresión aumentada de TGF- β con matriz extracelular glomerular en ratas diabéticas (Sharma y Ziyadeh, 1994), ratas normotensas (Yamamoto et al., 1994), ratones transgénicos que sobreexpresan TGF- β (Kopp et al., 1991) y ratas Dahl S (Tamaki et al., 1996). La presente invención demuestra por vez primera que los antagonistas de TGF- β son útiles para mantener la función renal (medular), al margen de cualquier posible efecto terapéutico de los inhibidores de TGF- β sobre la glomeruloesclerosis (como se sugiere en la técnica).

EJEMPLO 4: Efectos de un antagonista de TGF- β sobre los flujos renales vascular y tubular

40 Para demostrar la eficacia de un antagonista de TGF- β en cuanto a mantener una apropiada función renal en un modelo de animal renalmente estresado, se controlaron el flujo sanguíneo renal (RBF; del inglés, renal blood flow), el flujo sanguíneo cortical (CBF; del inglés, cortical blood flow), el flujo sanguíneo medular (MBF; del inglés, medullary blood flow) y el caudal glomerular (GFR; del inglés, glomerular flow rate) en ratas Dahl S sometidas al régimen de tratamiento descrito en el Ejemplo 1.

45 Al final de la semana tres de la dieta de 3 semanas con alto contenido de sal, se anestesiaron los animales bajo estudio con una inyección i.m. de ketamina (30 mg/kg) y una inyección i.p. de ácido tiobarbitúrico (Inactin, 50 mg/kg). Se pusieron los individuos sobre una mesa calefactora termostáticamente controlada (para mantener la temperatura corporal a 37°C durante todo el procedimiento experimental) y recibieron una infusión intravenosa (i.v.) de una disolución de NaCl al 0,9% que contenía albúmina sérica bovina al 1%, con un caudal de 6 ml/h. Se incluyó [^3H]-inulina (74 kBq/ml) en la disolución de infusión para permitir la cuantificación del aclaramiento de inulina como una medida del GFR (además del aclaramiento de creatinina).

50 Después de una traqueotomía, se insertó una cánula en la vena yugular externa para las infusiones i.v. y en la arteria femoral para la medición de la presión arterial. Se puso una cánula en el uréter izquierdo para la recogida de orina. Se dispuso una sonda de flujo de 2 mm alrededor de la arteria renal izquierda para medir el RBF usando un caudalímetro electromagnético (Carolina Instruments, King, Carolina del Norte, EE.UU.). Después del procedimiento quirúrgico, los sujetos fueron estabilizados durante una hora antes del muestreo para flujo urinario y para

concentración plasmática de [³H]-inulina.

Después del periodo de equilibrio, se recogieron muestras de orina y plasma durante dos periodos de aclaramiento separados y consecutivos de 20 minutos, para medir el GFR y el RBF. También se registró la presión sanguínea.

5 Después del segundo periodo de aclaramiento, se midió el CBF de 5 sitios de la corteza renal usando una sonda externa (PF 316) y un caudalímetro por efecto Doppler con láser (Pf3, Perimed Corp., Estocolmo, Suecia). El MBF se midió usando una sonda de fibra óptica finamente implantada (del modo descrito por Mattson, 1993; y Kelly et al., 1999).

10 Se calcularon los valores medios (± 1 SEM). Utilizando un análisis de varianza seguido de una prueba de rango múltiple de Duncan, se analizó la significación de las diferencias en los valores medios entre el grupo testigo y el tratado con anticuerpo anti-TGF- β . Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

La MAP alcanzó un promedio de 160 ± 14 mm Hg en los animales testigo después de la anestesia. Sin embargo, la MAP era significativamente menor en los animales tratados con anticuerpo anti-TGF- β , alcanzando un promedio de 145 ± 12 mm Hg después de la anestesia.

15 El RBF alcanzó un promedio de $3,13 \pm 0,67$ ml/min/kg de peso ($n = 7$) en los animales testigo y $3,22 \pm 0,41$ ml/min/kg de peso ($n = 14$) en los animales tratados con anticuerpo anti-TGF- β . Los datos demuestran un aumento del 3% del flujo sanguíneo renal en los animales tratados con un antagonista de TGF- β con respecto al grupo testigo; la diferencia entre los promedios del grupo testigo y el grupo de ensayo no fue estadísticamente significativa.

20 Aunque la señal de CBF era un 22% mayor en los animales tratados que en el grupo testigo, la diferencia entre los animales tratados con anticuerpo anti-TGF- β ($1,85 \pm 0,23$ voltios, $n = 13$) y los animales testigo ($2,26 \pm 0,19$ voltios, $n = 10$) no fue estadísticamente significativa.

25 Más específicamente, el aclaramiento de inulina (como una medida separada de GFR además del aclaramiento de creatinina presentado en el Ejemplo 3), aunque un 17% mayor en el grupo de ensayo que en el grupo testigo, no fue estadísticamente significativo. El aclaramiento de inulina en los animales que recibieron el tratamiento con antagonista de TGF- β alcanzó un promedio de $0,47 \pm 0,03$ ml/min/kg de peso, y el aclaramiento de inulina en los animales testigo alcanzó un promedio de $0,52 \pm 0,10$ ml/min/kg de peso.

Sin embargo, por notable contraste, el MBF era significativamente mayor (154%) en los animales tratados con anticuerpo anti-TGF- β ($0,99 \pm 0,12$, $n = 13$) que en los animales testigo ($0,39 \pm 0,09$, $n = 10$).

30 Estos resultados demuestran por vez primera la eficacia de una terapia relativa a TGF- β en cuanto a mantener la función medular renal. Estos hallazgos sustentan además el presente descubrimiento de que un tratamiento terapéutico con un antagonista de TGF- β es útil para reducir la lesión tubular hipóxica, reduciendo así la proteinuria independientemente de cualquier efecto sobre la función o la estructura glomerulares, y sugieren además que la preservación del flujo sanguíneo medular contribuye al efecto antihipertensivo de la terapia relativa a TGF- β (demostrado en el Ejemplo 2).

EJEMPLO 5: Efectos de un antagonista de TGF- β sobre la estructura renal

35 Para examinar los efectos de un antagonista de TGF- β en cuanto a mantener la integridad estructural renal en un modelo de animal renalmente estresado, se llevaron a cabo análisis renales toscos e histológicos, así como ensayos moleculares, sobre los riñones de las ratas Dahl S sometidas al régimen de tratamiento descrito en el Ejemplo 1.

40 Al final del protocolo experimental de 12 semanas esbozado en el Ejemplo 1, se recogieron y pesaron los riñones objetivo. El riñón derecho de cada animal fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C para la medición de niveles de mRNA de colágeno de tipo III, fibronectina, TGF- β 1 y TGF- β 2. El riñón izquierdo fue fijado con disolución tamponada de formalina al 5%, embebido en parafina, cortado y teñido con PAS para análisis por microscopía óptica.

45 Se midieron los diámetros glomerulares y se evaluó el grado de expansión matricial y de lesión glomerular en un mínimo de 20 glomérulos/corte. Se calificó el grado de glomeruloesclerosis del modo previamente descrito por Raji et al. (1984). Se registró en una escala de 0-4 el porcentaje de área capilar glomerular llena de matriz. Una calificación de 0 indica que no hay daño; una calificación de 2 indica que el 50% del área capilar glomerular está obliterada, y una calificación de 4 indica el cierre completo (100%) de todos los capilares de un glomérulo dado.

También se examinaron cortes histológicos (cortes para microscopía óptica teñidos con PAS) en cuanto a la fibrosis de capilares de vasa recta y al grado de daño tubulointerstial.

50 Los pesos medios de los riñones eran casi idénticos en los animales testigo ($1,87 \pm 0,06$ g; $n = 12$) y los animales tratados con anticuerpo anti-TGF- β ($1,76 \pm 0,06$ g; $n = 20$), lo que indica que el grado de hipertrofia renal era similar en los dos grupos.

El efecto del bloqueo de la función de TGF- β sobre la morfología glomerular se ilustra mediante los representativos cortes renales teñidos con PAS, presentados en la Figura 1 (ilustraciones A y B). El examen histológico de riñones de grupos tratados y no tratados reveló que había una acusada expansión de matriz mesangial en casi todos los glomérulos. En la mayoría de los glomérulos más intensamente lesionados, un gran porcentaje (50-75%) de capilares glomerulares estaban llenos de material matricial con tinción positiva por PAS.

El tratamiento con anticuerpo anti-TGF- β no ejerció efecto alguno sobre el diámetro glomerular medio ($123,3 \pm 1,4 \mu\text{m}$) en comparación con el tratamiento testigo ($121,2 \pm 2,3 \mu\text{m}$). Además, el tratamiento con anticuerpo anti-TGF- β no ejerció efecto significativo alguno sobre el grado de lesión glomerular. La calificación de FGS alcanzó un promedio de $2,8 \pm 0,18$ (70% de daño; $n = 176$ glomérulos de 8 animales) en los animales tratados y de $2,5 \pm 0,11$ (63% de daño; $n = 140$ glomérulos de 7 animales) en los animales testigo.

Estos resultados impulsaron un examen del grado de lesión glomerular en un grupo testigo de ratas Dahl S normotensas alimentadas con una dieta con bajo contenido de sal (NaCl al 0,1%). No hubo diferencia significativa alguna en las calificaciones de FGS vistas en el grupo testigo, el grupo tratado y el grupo mantenido con una dieta con bajo contenido de sal (sin embargo, en el grupo con dieta con bajo contenido de sal, el diámetro glomerular y el peso renal medios eran menores y el grado de proteinuria estaba también notablemente reducido).

Estos hallazgos indican que las ratas Dahl S desarrollan espontáneamente enfermedad renal y que la hipertensión acelera la proteinuria y la hipertrofia renal pero no aumenta la gravedad de la lesión glomerular. Un examen histológico comparativo sugiere que en las ratas Dahl S pueden existir lesiones glomerulares antes de la estimulación con dieta salina y pone en tela de juicio la asociación entre lesión glomerular e hipertensión.

En marcado contraste con las anteriores observaciones sobre la lesión cortical, el examen histológico de la médula renal reveló una lesión y un daño reducidos en los animales tratados con el antagonista de TGF- β en comparación con los animales testigo. Las ilustraciones C y D de la Figura 1 son representativas de cortes histológicos de médula renal preparados a partir de animales no tratados y tratados con anti-TGF- β . Los cortes renales tomados de animales tratados con anti-TGF- β revelaron una afectación mínima a la médula, sin evidencia alguna de daño capilar ni necrosis tubular de las ramas ascendentes gruesas. Sin embargo, en los cortes renales tomados de animales testigo, haces de vasa recta estaban fibróticos y los capilares estaban completamente ocluidos. Además, los cortes renales de animales testigo revelaron que las ramas ascendentes gruesas que rodean los capilares estaban necróticas y las luces de los túbulos estaban llenas de cilindros proteicos.

Aunque el anticuerpo anti-TGF- β redujo eficazmente la excreción proteica urinaria en un 50% (Ejemplo 3 anterior), el examen histológico no pudo revelar ninguna mejora en el grado de lesión glomerular o de hipertrofia de los glomérulos o la corteza. Estos resultados demuestran los efectos protectores de la terapia con antagonista de TGF- β sobre el riñón, al prevenir la lesión hipóxica medular asociada con un flujo sanguíneo reducido a la médula renal.

EJEMPLO 6: Efectos de un antagonista de TGF- β sobre los niveles de expresión de mRNA

Para examinar los efectos de un antagonista de TGF- β sobre la expresión celular de proteínas esenciales en un modelo de animal renalmente estresado, se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA del colágeno de tipo III, la fibronectina, el TGF- β 1 y el TGF- β 2 en los riñones de las ratas Dahl S sometidas al régimen de tratamiento descrito en el Ejemplo 1, siguiendo protocolos del "ensayo de protección frente a ribonucleasas" (RPA; del inglés, *ribonuclease protection assay*) conocidos en la técnica.

Para generar sondas de RNA útiles para el RPA (es decir, ribosondas) para cada diana de ensayo (es decir, mRNAs de colágeno de tipo III, fibronectina, TGF- β 1 y TGF- β 2), se emplearon protocolos de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR; del inglés, *reverse transcription polymerase chain reaction*), bien conocidos en la técnica, para generar cDNAs (a partir del RNA celular total) usando cebadores oligonucleotídicos sintetizados, complementarios de cada una de las secuencias diana que se van a examinar (véanse Odermatt et al., 1985, para la secuencia de cDNA de fibronectina; Glumoff et al., 1994, para la secuencia de cDNA del dominio EDA de fibronectina y del colágeno de tipo III; Derynck et al., 1985, para la secuencia de cDNA de TGF- β 1; y Madisen et al., 1988, para la secuencia de cDNA de TGF- β 2).

El cDNA linearizado fue transcrito *in vitro* usando el kit de transcripción *in vitro* MAXIscript™ (Ambion, Inc., Austin, Texas, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se incluyeron polimerasa de T7 y ^{32}P -CTP ($1,11 \cdot 10^{14}$ Bq/milimol; Dupont-NEN, Boston, Massachusetts, EE.UU.) en la mezcla de reacción para generar la ribosonda marcada con ^{32}P . Se incubó la mezcla de reacción a 37 °C durante 60 minutos y luego se eliminó el molde de DNA por digestión con 0,5 U de DNasa exenta de RNasa. Las sondas de longitud completa fueron purificadas de la mezcla de reacción de transcripción, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%/TBE. Las bandas fueron identificadas por autorradiografía, y cada sonda de RNA (antisentido) fue escindida de la banda de gel y hecha difundir pasivamente en tampón para elución de sondas (kit MAXIscript™, Ambion, Inc., Austin, Texas, EE.UU.) a 37 °C durante la noche. La actividad de cada sonda fue cuantificada por recuento de centelleo.

Al final del protocolo experimental de 12 semanas esbozado en el Ejemplo 1, se recogieron y pesaron los riñones

objetivo. El riñón derecho de cada animal fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C para el ensayo de niveles de mRNA de colágeno de tipo III, fibronectina, TGF-β1 y TGF-β2.

5 Se obtuvo el RNA celular total de tejido renal completo usando el kit RNAqueous™ para purificación de RNA total (Ambion, Inc., Austin, Texas, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo el RPA usando el kit HybSpeed™ para RPA (Ambion, Inc., Austin, Texas, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se combinaron sondas de RNA antisentido radiomarcadas para fibronectina, colágeno de tipo III, TGF-β1 y TGF-β2 y se hibridaron con 10 µg de RNA celular total de diferentes muestras de riñón. También se incluyó una sonda de RNA 18S (Ambion, Inc., Austin, Texas, EE.UU.) en cada mezcla de hibridación para normalizar el RNA total en las muestras individuales. También se llevó a cabo un RPA sobre RNA de levadura como testigo negativo. Se llevó a cabo una digestión con mezcla de RNasa A/RNasa T1 para degradar los RNAs no hibridados. Los RNAs hibridados, protegidos de la digestión, fueron resueltos por electroforesis y fueron visualizados usando el analizador de autorradiografías ("phosphoimager") Fujifilm BAS-1500 (Fujifilm, Tokio, Japón). Las bandas del analizador que representaban mRNA de colágeno de tipo III, fibronectina, TGF-β1 y TGF-β2 fueron cuantificadas usando el software MacBAS, versión 2.4. Los datos obtenidos de cada muestra fueron normalizados.

15 Los niveles de expresión de mRNA de colágeno de tipo III y de fibronectina estaban notablemente reducidos en las ratas Dahl S tratadas con el anticuerpo anti-TGF-β (intensidades relativas de $38,5 \pm 7,5$ y $38,9 \pm 4,5$, respectivamente; $n = 13$) en comparación con los del grupo testigo (intensidades relativas de $100 \pm 7,5$ y $100 \pm 4,5$, respectivamente; $n = 5$).

20 Los niveles de expresión de mRNA de TGF-β1 y TGF-β2 también estaban notablemente reducidos en las ratas Dahl S tratadas con el anticuerpo anti-TGF-β (intensidades relativas de $0,08 \pm 0,01$ y $0,07 \pm 0,01$, respectivamente; $n = 13$) en comparación con los del grupo testigo (intensidades relativas de $0,26 \pm 0,04$ y $0,30 \pm 0,02$, respectivamente; $n = 5$). Estos resultados probablemente reflejan menos fibrosis renal y son consistentes con los perfiles de expresión de mRNA de colágeno de tipo III y de fibronectina.

EJEMPLO 7: Efectos de intervención precoz de una terapia con antagonista de TGF-β

25 Para demostrar la eficacia protectora de una terapia de intervención precoz con antagonista de TGF-β sobre el riñón, machos de rata Dahl S de 6 semanas de edad alimentados con una dieta con alto contenido de sal fueron sometidos a un régimen de tratamiento con Ab anti-TGF-β (0,5 mg/día), similar al descrito en el Ejemplo 1, durante tres semanas.

30 A las seis semanas de edad (a diferencia de como se describe en el Ejemplo 1, que fue a las nueve semanas), se cambió la dieta de las ratas Dahl S ($n = 22$, 175 a 200 g) a un alto contenido de sal (NaCl al 8%) durante tres semanas (con agua proporcionada *ad libitum*). El tratamiento de ensayo también comenzó a las seis semanas de edad (a diferencia de como se describe en el Ejemplo 1, que fue a las diez semanas). Los animales fueron aleatoriamente divididos en dos grupos experimentales: el grupo de tratamiento recibió inyecciones i.p. de Ab anti-TGF-β en una dosis de 0,50 mg/kg cada dos días durante tres semanas; el grupo testigo recibió inyecciones i.p. del mAb testigo (mAb 13C4, Genzyme Corporation, Framingham, Massachusetts, EE.UU.) cada dos días durante tres semanas.

EJEMPLO 7.1: Medición de proteinuria y microalbuminuria en intervención precoz

40 Para demostrar la eficacia de una terapia de intervención precoz con antagonista de TGF-β sobre el aclaramiento proteico urinario en un modelo animal sometido a agresión renal, se recogieron muestras de orina de ratas Dahl S sometidas al régimen de tratamiento descrito en el Ejemplo 7, los días 4, 11, 18 y 21 de la dieta con alto contenido de sal, y se analizaron las muestras en cuanto a proteinuria y aclaramiento urinario de albúmina. También se recogió una muestra de orina de la noche antes de que se cambiara la dieta de los animales a un alto contenido de sal, como un punto de datos de la línea basal.

45 Se determinó la proteinuria usando el método Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EE.UU.) con albúmina sérica bovina como patrón. Se determinó la concentración de albúmina en orina mediante el método Albumin Blue 580 (Molecular Probes, Eugene, Oregón, EE.UU.).

Se calcularon los valores medios (± 1 SEM). Utilizando un análisis de varianza seguido de una prueba de rango múltiple de Duncan, se analizó la significación de las diferencias en los valores medios entre el grupo testigo y el tratado con anticuerpo anti-TGF-β. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

50 Los resultados se presentan en la Figura 2.

55 La proteinuria estaba por debajo de 20 mg/día tanto en las ratas Dahl S tratadas con Ab anti-TGF-β como en las testigo, alimentadas con una dieta con bajo contenido de sal (0,1%). Durante las dos primeras semanas de la dieta con alto contenido de sal, la excreción de proteína aumentó gradualmente tanto en las ratas testigo como en las tratadas con Ab anti-TGF-β. El día 18 de la dieta con alto contenido de sal, se observó una intensa proteinuria en ambos grupos experimentales. Sin embargo, el grado de proteinuria tendía a ser menor en el grupo tratado con Ab

anti-TGF- β ($74,2 \pm 11,6$ mg/día; $n = 15$) que en el grupo testigo ($102,7 \pm 16,8$ mg/día; $n = 7$). Después de tres semanas con una dieta con alto contenido de sal, la intensidad de la proteinuria en las ratas Dahl S era significativa menor en los animales tratados con Ab anti-TGF- β (91 ± 20 mg/día) que en el grupo testigo (172 ± 20 mg/día) (Figura 2a).

- 5 El efecto del tratamiento con Ab anti-TGF- β sobre la excreción de albúmina en los animales de ensayo fue similar (Figura 2b). Tanto en los animales testigo como en los tratados con Ab anti-TGF- β , alimentados con una dieta con bajo contenido de sal (NaCl al 0,1%), la excreción de albúmina estuvo por debajo de 10 mg/día. Sin embargo, después de tres semanas con una dieta con alto contenido de sal, la excreción de albúmina era significativa menor en la orina de las ratas Dahl S tratadas con Ab anti-TGF- β ($44,8 \pm 8,4$ mg/día; $n = 15$) que en la orina de las ratas testigo ($84,6 \pm 21,4$ mg/día; $n = 7$).

Estos resultados demuestran la eficacia de una terapia de intervención precoz con antagonista de TGF- β para reducir significativamente *in vivo* la excreción urinaria de proteína y albúmina, asociada con un daño renal.

EJEMPLO 7.2: Efectos de intervención precoz de un antagonista de TGF- β sobre la estructura renal

- 15 Para examinar los efectos de intervención precoz de un antagonista de TGF- β en cuanto a mantener la integridad estructural renal en un modelo de animal renalmente estresado, se llevaron a cabo análisis renales toscos e histológicos, así como ensayos moleculares, sobre los riñones de las ratas Dahl S sometidas al régimen de tratamiento descrito en el Ejemplo 7, siguiendo los protocolos descritos en el Ejemplo 5.

- 20 El examen histológico de los riñones recogidos reveló que un gran porcentaje de los capilares glomerulares estaban llenos de material matricial, con material positivo para PAS en la mayoría de los glomérulos gravemente lesionados. Sin embargo, el tratamiento con Ab anti-TGF- β antes del inicio de la dieta con alto contenido de sal en las ratas Dahl S más jóvenes redujo el grado de lesión glomerular. La calificación de lesión por glomerulosclerosis focal alcanzó un promedio de $3,25 \pm 0,06$ ($n = 144$ glomérulos de 7 animales) en las ratas Dahl S tratadas con el Ab testigo. Por contraste, la lesión glomerular en los animales tratados con Ab anti-TGF- β fue significativamente menor ($2,73 \pm 0,04$; $n = 382$ glomérulos de 15 animales).

- 25 La terapia con Ab anti-TGF- β también redujo el grado de fibrosis de los capilares de vasa recta, la necrosis del asa ascendente gruesa de Henle y la formación de cilindros proteicos. En el grupo testigo, el $22,2 \pm 1,3\%$ ($n = 7$) del área de la médula externa estaba lleno de cilindros proteicos en comparación con el $5,57 \pm 0,32\%$ ($n = 15$) en los animales tratados con Ab anti-TGF- β , lo que representa una disminución de cuatro veces en el grado de formación de cilindros proteicos.

- 30 La práctica de la presente invención puede implicar técnicas bien conocidas en el campo de la biología molecular. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, técnicas descritas en las publicaciones siguientes:

F. M. Ausubel et al., redactores, Short Protocols in Molecular Biology (4^a ed., 1999), John Wiley & Sons, New York (ISBN 0-471-32938-X).

- 35 R. W. Old y S. B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3^a ed., 1985), Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology, V. 2: 409 páginas (ISBN 0-632-01318-4).

J. Sambrook et al., redactores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^a ed., 1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, volúmenes 1-3 (ISBN 0-87969-309-6).

E. L. Winnacker, From Genes to Clones: Introduction to Gene Technology (1987), VCH Publishers, New York (traducido por Horst Ibelgaufts), 634 páginas (ISBN 0-89573-614-4).

40 Referencias

Ando et al., 1998, Miner. Electrolyte and Metab. 24 (2-3): 149-153.

Aoki et al., 1993, Documento EU 813875.

Basile y Hammerman, 1998, Miner. Electrolyte and Metab. 24 (2-3): 144-148.

Border et al., 1990, Nature 346: 371-374.

- 45 Border y Ruoslahti, 1991, Documento WO 91/04748.

Border et al., 1992a, Nature 360: 361-364.

Border et al., 1992b, J. Clin. Invest. 90: 1-7.

Border y Noble, 1994, NEJM. 331 (19): 1286-1292.

- Border, 1996, Documento WO 96/25178.
- Border y Noble, 1998, Hypertension 3: 181-188.
- Border, 1998, patente de EE.UU. nº 5.824.655.
- Bottinger et al., 1997, Kidney Intern'l. 51: 1255-1360.
- 5 Bottinger y Kopp, 1998, Miner. Electrolyte and Metab. 24 (2-3): 154-160.
- Brezis y Rosen, 1995, New Engl. J. Med. 332 (10): 647-655.
- Brezis et al., 1991, J. Clin. Invest. 88: 390-395.
- Brezis et al., 1994a, Am. J. Physiol. 267: F1059-F1062.
- Brezis et al., 1994b, Am. J. Physiol. 267: F1063-F1068.
- 10 Chung, 1997, patente de EE.UU. nº 5.683.988.
- Culler y Kasprzyk, 1998, Documento WO 98/08529.
- Dasch et al., 1996, patente de EE.UU. nº 5.571.714.
- Dasch et al., 1998a, patente de EE.UU. nº 5.772.998.
- Dasch et al., 1998b, patente de EE.UU. nº 5.783.185.
- 15 Dennis y Demetriou, 1998, patente de EE.UU. nº 5.821.227.
- Derynck et al., 1985, Nature 316 (6030): 701-705.
- Donahoe y Wang, 1997, Documento WO 97/31020.
- Douthwaite et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10: 2109-2119.
- Dzau, 1998, patente de EE.UU. nº 5.821.234.
- 20 Dzau, 1999, patente de EE.UU. nº 5.869.462.
- Eddy, 1996, J. Am. Soc. Nephrol. 7: 2495-2508.
- Eddy, 1994, J. Am. Soc. Nephrol. 5: 1273-1287.
- English et al., 1987, Transplantation 44: 135-141.
- Fakhrai et al., 1998, patente de EE.UU. nº 5.772.995.
- 25 Falb, 1998, patente de EE.UU. nº 5.834.248.
- Falb y Gimeno, 1998, patente de EE.UU. nº 5.807.708.
- Gimeno y Falb, 1999, patente de EE.UU. nº 5.948.639.
- Ferguson, 1996, patente de EE.UU. nº 5.520.926.
- Ferguson et al., 1997, patente de EE.UU. nº 5.662.904.
- 30 Gimeno y Falb, 1998, Documento WO 98/45467.
- Glumoff et al., 1994, Biochim. Biophys. Acta. 1219 (3): 613-622.
- Goldstein, 1997, Documento WO 97/38729.
- Gotwals et al., 1998, Documento WO 98/48024.
- Grande, 1997, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 214 (1): 27-40.
- 35 Grinnell et al., 1999, Documento WO 99/50296.
- Heldin et al., 1994, Documento WO 94/09812.

- Hocevar y Howe, 1998, Miner. Electrolyte and Metab. 24 (2-3): 131-135.
- Isaka et al., 1993, J. Clin. Invest. 92: 2597-2601.
- Iwata et al., 1992, Documento WO 92/00330.
- Jeffrey y Gosiewska, 1998, Documento WO 98/17304.
- 5 Johnson et al., 1997, Kidney Intern'l. 52: 1169-1179.
- Johnson et al., 1999, Hypertension 34: 151-159.
- Karlsen et al., 1997, Hypertension 30: 975-983.
- Kelly et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10: 1264-1273, 1999.
- Ketteler et al., 1994, Curr. Opin. Nephrol. and Hypertension 3: 446-452.
- 10 Kopp et al., 1991, Lab. Invest. 74: 991-1003.
- Kuihara et al., 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 159: 1435-1440.
- Letarte et al., 1994, Documento WO 94/10187.
- Letarte et al., 1998, patente de EE.UU. nº 5.830.847.
- Letarte et al., 2000, patente de EE.UU. nº 6.015.693.
- 15 Levinson et al., 1991, Documento WO 91/08291.
- Li et al., 1999, Hypertension 33: 271-275.
- Lin et al., 1993, Documento WO 93/09228.
- Lin et al., 1999a, patente de EE.UU. nº 6.001.969.
- Lin et al., 1999b, patente de EE.UU. nº 6.008.011.
- 20 Lin et al., 2000, patente de EE.UU. nº 6.010.872.
- Logan y Baird, 1999, patente de EE.UU. nº 5.958.411.
- Luster y Leder, 1997, Documento WO 97/00691.
- Madisen et al., 1988, DNA 7 (1): 1-8.
- Mackay et al., 1992, J. Biol. Chem. 267: 11.449-11.454.
- 25 Matsumoto e Irie, 1998, Documento WO 98/03663.
- Matsunaga et al., 1997, patente de EE.UU. nº 5.693.610.
- Mattson, 1993, Am. J. Physiol. 264: H190-H195.
- Mayumi et al., 1996, patente japonesa JP 8119984.
- Mcperson y Richards, 1997, Documento WO 97/40848.
- 30 Miyazono y Kawabata, 1998, Documento WO 98/56913.
- Mozes et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10: 271-280.
- Nabel et al., 1993, PNAS USA 90: 10.759-10.763.
- Nakao et al., 1998, Documento WO 98/53068.
- Ni et al., 1998, Documento WO 98/07735.
- 35 Odermatt et al., 1985, PNAS USA 82: 6571-6575.
- Ohno et al., 1995, J. Clin. Invest. 95: 1363-1369.

- Okazaki y Kitamura, 1998, patente europea EP 874046.
- Parrella et al., 1998, *Miner. Electrolyte and Metab.* 24 (2-3): 136-143.
- Pfeffer, 1999, patente de EE.UU. nº 5.958.411.
- Raij et al., 1984, *Kidney Int.* 26: 137-143.
- 5 Roberts, 1998, *Miner. Electrolyte and Metab.* 24 (2-3): 111-119.
- Ruiz-Torres, 1998, *J. Am. Soc. Nephrol.* 9 (5): 782-791.
- Ruoslahti y Yamaguchi., 1991, Documento WO 91/10727.
- Ruoslahti et al., 1993, Documento WO 93/09800.
- Ruoslahti y Border, 1993, Documento WO 93/10808.
- 10 Ruoslahti et al., 1995, Documento WO 95/10610.
- Ruoslahti y Yamaguchi., 1996, patente de EE.UU. nº 5.583.103.
- Ruoslahti et al., 1997, patente de EE.UU. nº 5.654.270.
- Ruoslahti et al., 1998, patente de EE.UU. nº 5.705.609.
- Ruoslahti et al., 1998, patente de EE.UU. nº 5.726.149.
- 15 Segarini et al., 1997, patente de EE.UU. nº 5.693.607.
- Sharma y Ziyadeh, 1994, *Am. J. Physiol.* 267: F1094-F1101.
- St. Lezin et al., 1994, *Hypertension* 23: 786-790.
- Sarzani et al., 1989, *J. Clin. Invest.* 83: 1404-1408.
- Schlingensiepen et al., 1994, Documento WO 94/25588.
- 20 Sterzel et al., 1988, *Kidney Internl.* 33: 1119-1129.
- Stroschein et al., 1999, *Science* 286: 771-774.
- Tamaki et al., 1996, *J. Am. Soc. Nephrol.* 7: 2578-2589.
- Thompson et al., 1997, Documento WO 97/13844.
- Thompson et al., 2000, Documento WO 00/66631.
- 25 Verschueren et al., 1998, Documento WO 98/55512.
- Vodovotz et al., 1996, *J. Experimental Med.* 183: 2337-2342.
- Vogel, 1999, *Science* 286: 665.
- Whitman y Chen, 1998, Documento WO 98/53830.
- Wolf, 1998, *Miner. Electrolyte and Metab.* 24 (2-3): 174-180.
- 30 Wrana, 1998, *Miner. Electrolyte and Metab.* 24 (2-3): 120-130.
- Wrana et al., 1998, Documento WO 98/07849.
- Yamamoto et al., 1994, *Kidney Intern'l.* 45: 916-927.
- Ying y Sanders, 1998a, *Am. J. Physiol.* 274: F635-F641.
- Ying y Sanders, 1998b, *Am. J. Physiol.* 275: F18-F24.
- 35 Yu et al., 1998, *Hypertension* 98: 2621-2628.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un antagonista de TGF- β para la preparación de una composición farmacéutica para reducir la hipertensión sistémica, mantener el flujo sanguíneo medular, reducir la pérdida de función medular renal o reducir la lesión tubular hipóxica en un individuo que padece, o es potencialmente susceptible de padecer, pérdida de función renal, en donde dicho antagonista de TGF- β es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige contra una o más isoformas de TGF- β .
2. El uso de la Reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica es para reducir la pérdida de función medular renal en un individuo que padece, o es potencialmente susceptible de padecer, pérdida de función renal.
- 10 3. El uso de la Reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica es para reducir la lesión tubular hipóxica en un individuo que padece, o es potencialmente susceptible de padecer, pérdida de función renal.
4. El uso de la Reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica es para reducir la hipertensión sistémica en un individuo que padece, o es potencialmente susceptible de padecer, pérdida de función renal.
- 15 5. El uso de la Reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica es para mantener el flujo sanguíneo medular en un individuo que padece, o es potencialmente susceptible de padecer, pérdida de función renal.
6. El uso de la Reivindicación 1, en donde dicho individuo padece hipertensión.
7. Uso de un antagonista de TGF- β para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o lentificar la progresión del daño renal asociado con una enfermedad o trastorno del riñón seleccionada del grupo que consiste en nefropatía obstructiva, enfermedad renal poliquística, nefroesclerosis y nefrocalcinosis, en donde dicho antagonista de TGF- β es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige contra una o más isoformas de TGF- β .
- 20 8. El uso de cualquiera de las Reivindicaciones 1-7, en donde dicho antagonista de TGF- β es un anticuerpo monoclonal que se dirige contra una o más isoformas de TGF- β .
9. El uso de la Reivindicación 8, en donde dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado.
- 25 10. El uso de cualquiera de las Reivindicaciones 1-7, en donde dicho antagonista de TGF- β es un fragmento de anticuerpo que se dirige contra una o más isoformas de TGF- β .
11. El uso de la Reivindicación 10, en donde dicho fragmento de anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste en un fragmento F(ab)₂, un fragmento Fv y un anticuerpo de cadena única.
- 30 12. El uso de cualquiera de las Reivindicaciones 1-7, en donde dicho antagonista de TGF- β es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 1D11.16, según está depositado con la ATCC bajo el número de acceso HB9849.
13. Un antagonista de TGF- β para uso en la reducción de la hipertensión sistémica, el mantenimiento del flujo sanguíneo medular, la reducción de la pérdida de función medular renal o la reducción de la lesión tubular hipóxica en un individuo que padece, o es potencialmente susceptible de padecer, pérdida de función renal, en donde dicho antagonista de TGF- β es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige contra una o más isoformas de TGF- β .
- 35 14. Un antagonista de TGF- β para uso en el tratamiento o la lentificación de la progresión del daño renal asociado con una enfermedad o trastorno del riñón seleccionada del grupo que consiste en nefropatía obstructiva, enfermedad renal poliquística, nefroesclerosis y nefrocalcinosis, en donde dicho antagonista de TGF- β es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige contra una o más isoformas de TGF- β .
- 40 15. El antagonista de TGF- β de la Reivindicación 13 ó 14, en donde dicho antagonista de TGF- β es un anticuerpo monoclonal que se dirige contra una o más isoformas de TGF- β .
16. El antagonista de TGF- β de la Reivindicación 15, en donde dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado.
- 45 17. El antagonista de TGF- β de la Reivindicación 13 ó 14, en donde dicho antagonista de TGF- β es un fragmento de anticuerpo que se dirige contra una o más isoformas de TGF- β .
18. El antagonista de TGF- β de la Reivindicación 17, en donde dicho fragmento de anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste en un fragmento F(ab)₂, un fragmento Fv y un anticuerpo de cadena única.

19. El antagonista de TGF- β de la Reivindicación 13 ó 14, en donde dicho antagonista de TGF- β es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 1D11.16, según está depositado con la ATCC bajo el número de acceso HB9849.

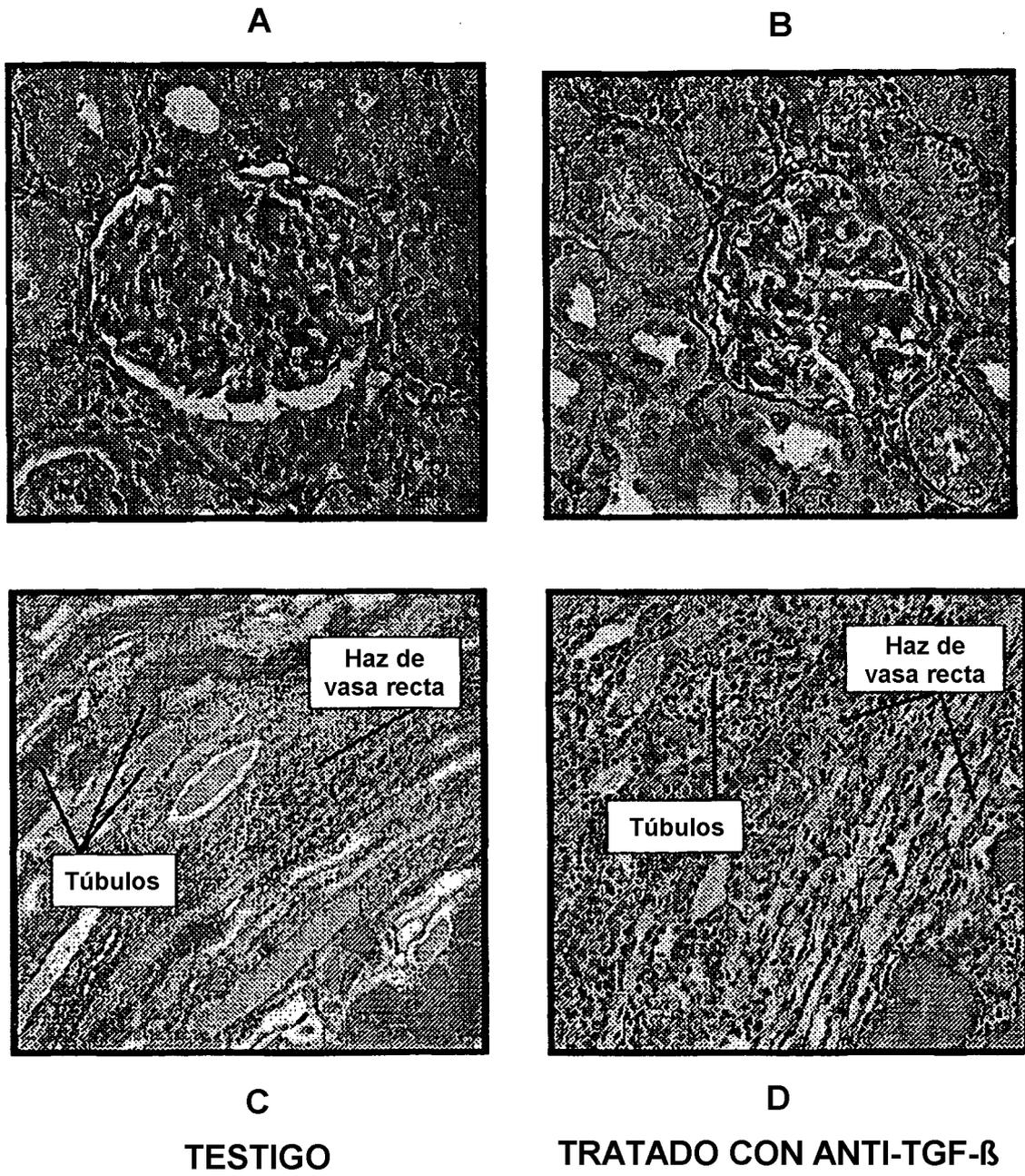


FIGURA 1

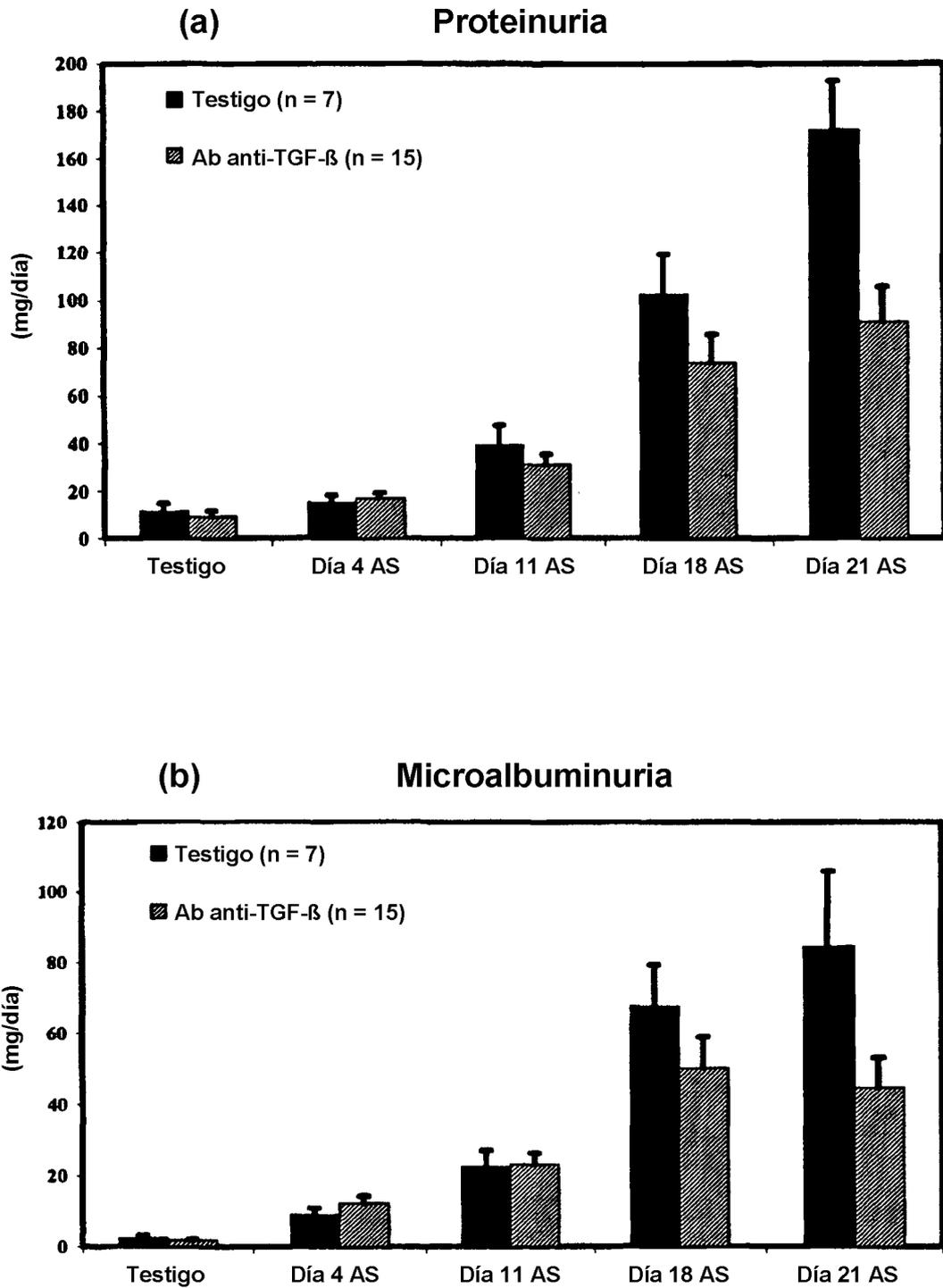


FIGURA 2